

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

Maria da Conceição Correia Silva

**O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) modula a via do
óxido nítrico para exercer efeito tocolítico em rata**

**João Pessoa-PB
2015**

Maria da Conceição Correia Silva

O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) modula a via do óxido nítrico para exercer efeito tocolítico em rata

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

Coorientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

**João Pessoa-PB
2015**

S586o Silva, Maria da Conceição Correia.
O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham.
(Verbenaceae) modula a via do óxido nítrico para exercer
efeito tocolítico em rata / Maria da Conceição Correia Silva.-
João Pessoa, 2015.
132f. : il.
Orientadoras: Fabiana de Andrade Cavalcante, Bagnólia
Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Lippia microphylla* Cham. 3. Óleo
essencial. 4. Útero de rata. 5. Sintase do óxido nítrico.
6. Canais de K⁺.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

Maria da Conceição Correia Silva

O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) modula a via do óxido nítrico para exercer efeito tocolítico em rata

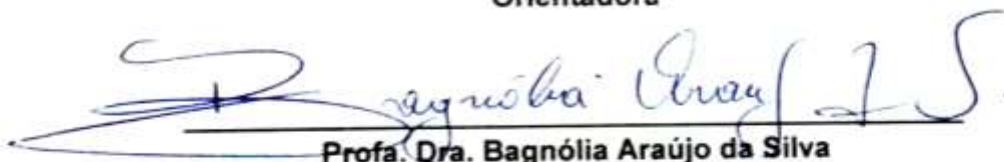
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de Concentração: **Farmacologia**.

Aprovada em 31/03/2015

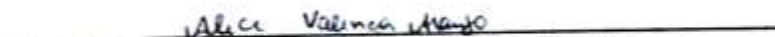
Banca Examinadora



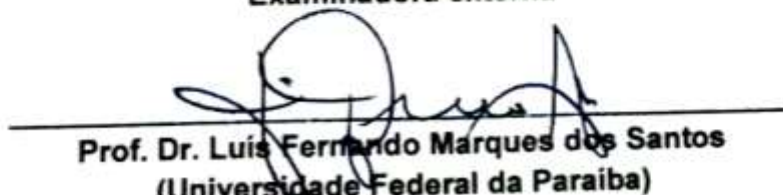
Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientadora



Profa. Dra. Alice Valença Araújo
(Universidade Federal de Pernambuco)
Examinadora externa



Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno



Dedicatórias

Em especial aos meus pais, João Ferreira da Silva e Maria das Mercês Correia da Silva, por terem me dado o essencial: a vida e a educação dentro dos princípios éticos e morais. A vocês todo o meu reconhecimento e a minha gratidão pela paciência, pelo amor, pelos grandes ensinamentos e por quererem sempre o melhor pra mim. Sem vocês não seria possível.

Aos meus irmãos, D'jalma Correia Silva, Diógenes Correia Silva e Daniel Correia Silva, pelo incentivo, pela torcida, pelo reconhecimento e por acreditarem que era possível.

Aos meus sobrinhos, Danyelle de Farias Silva, Karla Emanuely de Queiroz Silva e Diogo Aparício de Farias Silva, por todos os momentos de alegria e brincadeiras.

Ao meu avô, José Severino de Farias (*in memoriam*), obrigada por possibilitar que eu recomeçasse.



Agradecimientos

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós"
(Antoine de Saint-Exupéry).

Por isso agradeço:

A Deus, pelo dom da vida, por sempre guiar e iluminar minhas escolhas, por colocar pessoas em meu caminho que ajudam em meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, minha orientadora e professora, por toda dedicação, confiança, disponibilidade em ajudar e orientar. Um exemplo de profissional a ser seguido e que sempre será lembrada ao longo da minha vida. Obrigada por me orientar sempre direcionando para o caminho do bem e do crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, minha coorientadora e professora, por todos os ensinamentos científicos e não científicos durante o mestrado e a graduação. Também é um exemplo de profissional a ser seguido e lembrado, que nos encoraja a seguir em frente, a perder o medo pelo desconhecido e a lutar por aquilo que sonhamos sempre dentro dos princípios éticos, uma educadora que faz nossos olhos brilhar a cada dia com a Farmacologia/Farmacodinâmica.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares pela gentileza em ceder o óleo essencial, objeto de estudo deste trabalho.

Aos professores doutores Alice Valença Araújo e Luís Fernando Marques dos Santos por aceitarem participar da banca examinadora de defesa de mestrado, bem como Robson Cavalcante Veras e Tatjana Keesen de Souza Lima como membros suplentes. Agradeço por suas contribuições e pela participação nesta importante etapa em minha formação.

A todos os professores do Curso de Graduação em Farmácia e do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), em especial aqueles que estão sempre instigando a curiosidade dos discentes e por serem exemplos de bons profissionais: Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Arnaldo Medeiros, Bagnólia Araújo, Demétrius Araújo, Eduardo Oliveira, Elizete Ventura, Fabiana Cavalcante, Fábio Santos, Francisca Inês, João Vianney, Leônia Batista, Luís Fernando Marques, Patrícia Simões, Robson Veras, Rossana Souto, Tatjana Keesen e Zélia Braz.

Ao coordenador do PPgPNSB, Prof. Dr. Josean Fechine Tavares e ao vice-coordenador, Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, pela competência com que coordenam esse programa.

À Caroline Mangueira e Dayana Rosa do Amarante, secretárias do PPgPNSB, pela paciência, disponibilidade, dedicação e eficiência com que conduzem seus trabalhos.

Aos colegas e amigos da equipe da Profa. Fabiana Cavalcante: Filipe Rodolfo de Oliveira, Giulyane Targino, Indyra Alencar, Joedna Cavalcante e Sarah Rebeca Ferreira por toda ajuda, amizade e companheirismo.

A toda equipe dos "relaxados" que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do PPgPNSB: Aline de Freitas, Ana Carolina Correia, Ana Caroline de Lima, Bárbara Cavalcanti, Cibério Macêdo, Fernando Queiroga, Fabio Monteiro, Gislaine Alves, Giuliana Amanda de Oliveira, Hannah Olga Rodovalho, Iara Leão Luna, Italo Rossi Roseno, José Lucas Galvão, José Rabêlo, Juliana Carreiro, Kimã Barbosa, Layanne Cabral, Luiz Henrique Vasconcelos, Maria Alice Bezerra, Millena Medeiros, Polyana Cristina Barros, Paula Benvindo, Rafael Travassos, Renata Sampaio e Tamyris Ferreira por toda ajuda, amizade, convivência, apoio científico e de bancada.

À Ana Carolina Correia, Cibério Macêdo, Fabio Monteiro, Gislaine Alves e Rafael Travassos, pelos primeiros ensinamentos durante a Iniciação Científica.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e torceram por esta conquista, em especial, Adriana Silva, Alda Lúcia, Alexandra Leite, Ana Carolina Correia, Ana Maria Lopes, Antônio Justino, Cristiane Lourenço, Daniel Cristino, Eduardo Cavalcante, Emmanuel Farias, Fabiana Carla, Fabrícia Lucimery, Felipe Queiroz, Filipe Rodolfo, Francisco Casimiro Júnior, Georgiana Lopes, Gicélia Sobral, Giulyane Targino, Graças Farias, Iara Leão, Inalva Silva, Indyra Alencar, Iran Moises, João Paulo Messias, Josildo Oliveira, Landoaldo Farias, Layanne Cabral, Lúcia Lúcia, Liliane Queirós, Luana Lúcia de Souza, Luiz Henrique César, Luzineide Queiroz, Luzinete Queiroz, Maria da Conceição Queiroz, Nathália Bélem, Renato Almeida, Rosildo Diniz, Sarah Rebeca, Silene Meira e Vicente Carlos.

A minha turma de mestrado aos colegas de outras turmas do mestrado e do doutorado do PPgPNSB, em especial, Adriano Alves, Ayala Nara, Cris Husein, Daniele Figueiredo, Igor Sales, Joedna Cavalcante, Márcio Cahino, Renan Braga, Raphaela Nascimento, Sallett Rocha e Yuri Mangueira.

Aos colegas e amigos que fazem parte da “Turma Feliz, Farmácia 2013.1”. Em especial, Felipe Nóbrega, Genivaldo dos Reis Neto, Herta Ellen Moreira, Jéssica Hanne Araújo, Joedna Cavalcante, Juliana Monteiro, Lídia Lúcia Bezerra, Liliane de Queirós, Luana Santos, Rodrigo Lacerda, Renata Figueiredo, Thaylan Martins e Werkuilândia Matias.

À comissão organizadora e aos participantes do I Curso de Verão de Farmacologia do PPgPNSB por proporcionar momentos de aprendizado e de alegrias.

Aos funcionários do PPgPNSB, Adriano Cordeiro, Dona Avani, Dona Luzinete, José Crispim, Luís Silva, Matheus Monteiro e Mônica Rodrigues da Silva, por toda dedicação e pelos trabalhos prestados ao laboratório e ao programa.

Aos meus primos, Joelcio Farias e Joselma Queiroz, e suas famílias por terem me acolhido no período da graduação e à Paula Benvindo por ter me acolhido em sua residência entre o período de transição graduação-mestrado.

A toda minha família, em especial aos meus pais, irmãos, cunhadas, sobrinhos e ao meu tio, José Gonçalves Correia, pela força, carinho e confiança depositados em mim.

Ao professor e Conselheiro Federal de Farmácia, Samuel Meira, pelo apoio financeiro concedido para participação em eventos científicos.

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

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

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

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável por minha formação profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada,

Maria da Conceição Correia Silva

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes".

(Martin Luther King)



Resumo

RESUMO

Lippia microphylla Cham. (Verbenaceae), conhecida como “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” e “alecrim-pimenta”, é usada popularmente como antisséptico ou para tratar distúrbios respiratórios. Das folhas dessa espécie foi extraído o óleo essencial (LM-OE) que, de acordo com Silva (2013), apresentou efeito tocolítico em útero isolado de rata, indicando uma provável inibição indireta do influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata. As contrações isométricas foram monitoradas para determinar e comparar a eficácia e a potência relativas ($n = 5$). Tendo em vista que os Ca_V podem ser modulados negativamente pela via do óxido nítrico (NO), decidiu-se avaliar a participação dessa via em útero de rata pré-contráido com ocitocina. Para tanto, utilizou-se L-NAME, um inibidor não seletivo de sintase do NO (NOS). Os resultados evidenciaram que a potência tocolítica do LM-OE ($\text{CE}_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) foi reduzida em aproximadamente 9,5 vezes, na presença de L-NAME ($\text{CE}_{50} = 25,6 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$), sendo essa redução revertida na presença de L-arginina ($\text{CE}_{50} = 6,2 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$), substrato para a NOS, e na presença simultânea de L-arginina e de L-NAME ($\text{CE}_{50} = 7,2 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$), confirmando o envolvimento da via do NO na ação tocolítica do LM-OE. Semelhantemente, a potência relaxante do LM-OE foi reduzida em aproximadamente 3,7 vezes na presença de ODQ ($\text{CE}_{50} = 10,1 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$), inibidor de ciclase de guanilil solúvel (sGC), e 3,3 vezes na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS ($\text{CE}_{50} = 8,9 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$), inibidor de proteína cinase G (PKG). Sendo assim, o LM-OE modula positivamente a via do NO/sGC/PKG para promover seu efeito tocolítico em rata. Uma vez que essa via pode ativar canais de K^+ , questionou-se se esses canais estariam participando do efeito tocolítico do LM-OE. Para confirmar essa hipótese, foram realizados experimentos na presença de CsCl, bloqueador não seletivo de canais de K^+ , e observou-se que a curva concentração-resposta do LM-OE ($\text{CE}_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita com redução da potência relaxante ($\text{CE}_{50} = 11,7 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$) em aproximadamente 4,3 vezes, confirmando a participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do óleo essencial. Para verificar quais seriam esses subtipos de canais utilizou-se bloqueadores seletivos. A curva controle concentração-resposta também foi desviada para a direita e a potência tocolítica reduzida na presença de tetraetilamônio ($\text{CE}_{50} = 10,5 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$), de apamina ($\text{CE}_{50} = 10,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$), de 4-aminopiridina ($\text{CE}_{50} = 12,4 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$) e de glibenclamida ($\text{CE}_{50} = 9,7 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$), bloqueadores de canais de potássio: ativados por cálcio de grande (BK_{Ca}) e de pequena condutância (SK_{Ca}), dependentes de voltagem (K_V) e sensíveis ao trifosfato de adenosina (K_{ATP}), respectivamente. Ademais, o LM-OE teve sua potência tocolítica reduzida quando esses quatro bloqueadores foram pré-incubados simultaneamente ($\text{CE}_{50} = 16,6 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$), não sendo observado efeito sinérgico. Assim, o mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata envolve a modulação positiva da via NO/sGC/PKG/canais de K^+ , sugerindo o bloqueio do influxo de cálcio via Ca_V e, conseqüentemente, o relaxamento do músculo liso uterino.

Palavras-chave: Produtos naturais. *Lippia microphylla* Cham. Óleo essencial. Útero de rata. Sintase do óxido nítrico. Canais de K^+ .



Abstract

ABSTRACT

Lippia microphylla Cham. (Verbenaceae), known as “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” and “alecrim-pimenta”, is popularly used as antiseptic or to treat respiratory disorders. From its leaves, the essential oil (LM-OE) was extracted, that, according to Silva (2013), presented tocolytic effect on rat, with a probably indirect inhibition of Ca^{2+} influx through voltage-gated calcium channels (Ca_V). Thus, the aim of this work was to characterize the tocolytic action mechanism of LM-OE on rat. Isometric contractions were recorded to determine and compare the relative efficacy and potency ($n = 5$). Considering that the NO pathway can negatively modulate the Ca_V , we decided to evaluate this participation on rat uterus pre-contracted by oxytocin. For that, it was employed L-NAME, a non-selective inhibitor of NO synthase (NOS). The results show that the tocolytic potency of LM-OE ($\text{EC}_{50} = 2.7 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$) was approximately 9.5-fold attenuated in the presence of L-NAME ($\text{EC}_{50} = 25.6 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$). Furthermore, this reduction was reversed in the presence of the L-arginine ($\text{EC}_{50} = 6.2 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$), a NOS substrate, and simultaneous presence of the L-arginine and L-NAME ($\text{EC}_{50} = 7.2 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$), confirming the participation of NO pathway in the tocolytic action of LM-OE. Similarly, the relaxant potency of LM-OE was approximately 3.7-fold reduced in the presence of ODQ ($\text{EC}_{50} = 10.1 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$), a soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor, and 3.3-fold in the presence of Rp-8-Br-PET-cGMPS ($\text{EC}_{50} = 8.9 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$), a protein kinase G (PKG) inhibitor. Thus, LM-OE positively modulates the NO/sGC/PKG pathway to promote its tocolytic effect on rat. Given that this pathway can activate the K^+ channels, it was questioned if these channels would be involved on tocolytic effect of LM-OE. To confirm this hypothesis, experiments were made in the presence of CsCl, a non-selective K^+ channels blocker, and it was observed that the concentration-response curve of LM-OE ($\text{EC}_{50} = 2.7 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$) was rightward shifted with an approximately 4.3-fold reduction on its relaxant potency, confirming the participation of K^+ channels on tocolytic effect of essential oil. In order to verify the subtypes involved, it was employed selective blockers of K^+ channels. Control concentration-response curve was also shifted to the right and the tocolytic potency of LM-OE was attenuated in the presence of tetraethylammonium ($\text{EC}_{50} = 10.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$), apamin ($\text{EC}_{50} = 10.0 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$), 4-aminopyridine ($\text{EC}_{50} = 12.4 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$) and glibenclamide ($\text{EC}_{50} = 9.7 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$), the large (BK_{Ca}) and small conductance (SK_{Ca}) calcium-activated, voltage-gated (K_V) and adenosine triphosphate-sensitive (K_{ATP}) potassium channels blockers, respectively. Moreover, LM-OE had its tocolytic potency reduced in the same intensity when these four blockers were simultaneously incubated ($\text{EC}_{50} = 16.6 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$), not observing synergistic effect. Therefore, the tocolytic action mechanism of LM-OE on rat involves the positive modulation of the NO/sGC/PKG/ K^+ channels pathway, suggesting the blockade of calcium influx through Ca_V , leading to the relaxation of uterine smooth muscle.

Keywords: Natural products. *Lippia microphylla* Cham. Essential oil. Rat uterus. Nitric oxide synthase. K^+ channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Lippia microphylla</i> Cham. (Verbenaceae).....	32
Figura 2 – Anatomia do útero de rata	35
Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	38
Figura 4 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$	40
Figura 5 – Modelo estrutural das subunidades α e β dos canais de potássio ativados pelo cálcio de alta condutância	43
Figura 6 – Modelo estrutural de uma subunidade dos canais de potássio ativados pelo cálcio de baixa condutância.....	43
Figura 7 – Modelo estrutural de uma subunidade dos canais de potássio dependentes de voltagem	44
Figura 8 – Modelo estrutural das subunidades $K_{ir}6$ e SUR dos canais de potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina	44
Figura 9 – Estrutura funcional das sintases do óxido nítrico	46
Figura 10 – Estrutura funcional da ciclase de guanilil solúvel.....	47
Figura 11 – Estrutura funcional da proteína cinase G do tipo I.....	48
Figura 12 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG	50
Figura 13 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de L-NAME em rata	64
Figura 14 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A), na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B), de 10^{-3} M de L-arginina (C) e na presença simultânea (D) de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina em rata	67
Figura 15 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de ODQ em rata	71
Figura 16 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em rata	74

Figura 17 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5×10^{-3} M de CsCl em rata.....	78
Figura 18 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-3} M de TEA ⁺ em rata	81
Figura 19 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-7} M de apamina em rata.....	83
Figura 20 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 3×10^{-3} M de 4-AP em rata.....	85
Figura 21 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-5} M de glibenclamida em rata.....	87
Figura 22 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A), na presença (B) de 5×10^{-3} M de CsCl e na presença simultânea (C) de bloqueadores seletivos de canais de K ⁺ em rata	90
Figura 23 – Proposta de mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham. em rata.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (☆) de 10^{-4} M de L-NAME em rata	65
Gráfico 2 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●), na presença de 10^{-4} M de L-NAME (☆), de 10^{-3} M de L-arginina (▷) e na presença simultânea (■) de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina em rata.....	69
Gráfico 3 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (□) de 10^{-6} M de ODQ em rata	72
Gráfico 4 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (◁) de 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em rata	75
Gráfico 5 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-5} M de CsCl em rata	79
Gráfico 6 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença de (◇) 10^{-3} M de TEA ⁺ em rata	82
Gráfico 7 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (▽) de 10^{-7} M de apamina em rata	84
Gráfico 8 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (△) de 3×10^{-3} M de 4-AP em rata	86
Gráfico 9 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (□) de 10^{-5} M de glibenclamida em rata	88
Gráfico 10 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●), na presença (○) de 5×10^{-3} M de CsCl e na presença simultânea (◆) de bloqueadores seletivos de canais de K ⁺ em rata....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de E_{max} , de CE_{50} e de R^2 do LM-OE na ausência e na presença de um substrato de NOS e de inibidores da via NO/sGC/PKG em útero isolado de rata	76
Tabela 2 – Valores de E_{max} , de CE_{50} e de R^2 do LM-OE na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K^+ em útero isolado de rata	92

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
4Ca²⁺-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
BH₄	tetra-hidrobiopterina
BK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de alta condutância
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 cério
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
FAD	dinucleotídio de adenina e flavina
FMN	mononucleotídio de flavina
FP	receptor da prostaglandina F _{2α}

G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou G ₁₃
G_{q/11}	proteína G _q ou G ₁₁
G_s	proteína G _s
G_{αq/11}	subunidade α da proteína G _{q/11}
G_{αs}	subunidade α da proteína G _s
GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
Heme Fe³⁺	grupo prostético heme férrico
Heme Fe²⁺	grupo prostético heme ferroso
IK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de condutância intermediária
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
LM-OE	óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham.
L-NAME	cloridrato de N _ω -nitro-L-arginina metil éster
M₃	receptor muscarínico da ACh do subtipo 3
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da MLC
MLCP	fosfatase da MLC
MYPT1	subunidade catalítica da MLCP
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NCX	trocador sódio/cálcio

NO	óxido nítrico
NOS	sintase do NO
OCI	ocitocina
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
OT	receptor da ocitocina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLCβ_1	fosfolipase C do tipo beta 1
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
R²	coeficiente de correlação não linear
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RhoA	pequena proteína G da família Rho
ROK	proteína cinase da RhoA
Rp-8-Br-PET-cGMPS	Rp-8-bromo- β -fenil-1,N ² -etenoguanosina-3', 5', monofosforotioato cíclico
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
SK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de baixa condutância
TEA⁺	íon tetraetilamônio

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	24
2 Fundamentação teórica	27
2.1 Produtos naturais e fitoterapia no Brasil	28
2.2 Família Verbenaceae	30
2.3 Gênero <i>Lippia</i> e espécie <i>Lippia microphylla</i> Cham.	31
2.4 Óleos essenciais	32
2.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso	34
3 Objetivos	51
3.1 Geral	52
3.2 Específicos	52
4 Material e métodos	53
4.1 Material	54
4.1.1 Material botânico	54
4.1.2 Produto-teste	54
4.1.3 Animais	54
4.1.4 Drogas e reagentes	55
4.1.5 Solução nutritiva	55
4.1.6 Aparelhos	56
4.2 Métodos	56
4.2.1 Preparo da solução-estoque do LM-OE	56
4.2.2 Caracterização do mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata	57
4.2.2.1 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do LM-OE em rata	57
4.2.2.1.1 Avaliação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME	57
4.2.2.1.2 Confirmação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência, na presença de L-arginina e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina	58
4.2.2.1.3 Avaliação da participação da sGC no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de ODQ	58

4.2.2.1.4 Avaliação da participação da PKG no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	59
4.2.2.2 Avaliação do envolvimento de canais iônicos no efeito tocolítico do LM-OE	59
4.2.2.2.1 Avaliação da participação dos canais de K ⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl	59
4.2.2.2.2 Avaliação da participação de subtipos de canais de K ⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA ⁺ , de apamina, de 4-AP ou de glibenclamida ...	60
4.2.2.2.3 Avaliação da participação de subtipos de canais de K ⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de bloqueadores seletivos	61
4.3 Análise estatística	61
5 Resultados	62
5.1 Caracterização do mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata	63
5.1.1 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do LM-OE em rata	63
5.1.1.1 Avaliação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME	63
5.1.1.2 Confirmação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência, na presença de L-arginina e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina	66
5.1.1.3 Avaliação da participação da sGC no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de ODQ	70
5.1.1.4 Avaliação da participação da PKG no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	73
5.1.2 Avaliação do envolvimento de canais iônicos no efeito tocolítico do LM-OE	77

5.1.2.1 Avaliação da participação dos canais de K ⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl	77
5.1.2.2 Avaliação da participação de subtipos de canais de K ⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA ⁺ , de apamina, de 4-AP ou de glibenclamida ...	80
5.1.2.3 Avaliação da participação de subtipos de canais de K ⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de bloqueadores seletivos.....	89
6 Discussão.....	93
7 Conclusões.....	103
Referências	105
Anexos	128
Anexo 1	129
Anexo 2	130
Anexo 3	131
Anexo 4	132



1 Introdução

Os produtos naturais são reconhecidamente uma das fontes mais ricas da atual diversidade química, além de formarem a base dos sistemas do uso popular em diversas partes do mundo ao longo de milhares de anos. A esses, se atribui a descoberta de novas entidades químicas, tornando-os produtos de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos. Estima-se que cerca de 60% das 1073 dessas novas entidades aprovadas entre 1981-2010 sejam oriundas de produtos naturais, derivadas ou análogas sintéticas desses (CRAGG; NEWMAN, 2013; OGBOURNE; PARSONS, 2014).

A disponibilidade em abundância de fontes naturais oferece grandes possibilidades de se descobrir substâncias de interesse terapêutico. De acordo com a literatura, mais de 100 produtos naturais ou derivados deles estão em fase de desenvolvimento clínico, destacando-se aqueles para o tratamento do câncer e de doenças infecciosas e cardiovasculares, além daqueles aprovados para utilização clínica entre 2008 e 2013, representando um total de 25 fármacos (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

Apesar de quase metade de todos os medicamentos lançados no mercado entre 1981-2006 serem produtos naturais ou derivados desses, a maioria das indústrias farmacêuticas tem redirecionado seus recursos para o desenvolvimento de ensaios de alto rendimento e para a criação de bibliotecas químicas devido à complexidade em descobrir, isolar e desenvolver medicamentos a partir de produtos naturais. Todavia, esse não pode ser apontado como o único fator para a redução da aprovação de novas entidades químicas, também pode-se citar as fusões e aquisições entre as indústrias farmacêuticas, o que aumenta os custos no desenvolvimento de medicamentos, a redução na investigação de doenças infecciosas, o avanço na área da genômica e dos produtos biológicos, entre outros (MARIENHAGEN; BOTT, 2013; OGBOURNE; PARSONS, 2014).

Dentre os vários produtos naturais vegetais, destacam-se os óleos essenciais que são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, sanitária, alimentícia e agrônômica devido as suas propriedades naturais, como por exemplo, bactericida, fungicida, organoléptica e inseticida (BAKKALI et al., 2008). Devido à grande diversidade química dos seus componentes, outras importantes funções biológicas e/ou fisiológicas são atribuídas a esses produtos, incluindo ações antinociceptiva, antioxidante, antimicrobiana e espasmolítica (LANG; BUCHBAUER, 2012), podendo ser encontrados em espécies das famílias Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae,

Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae, entre outras (PASCUAL et al., 2001; TRIPATHI et al., 2009).

Algumas espécies da família Verbenaceae têm seu potencial econômico amplamente explorado, tanto para ornamentação (LORENZI; SOUZA 2001) como para uso terapêutico, nesse caso devido à presença de óleos essenciais (SANTOS et al., 2009). Entre os gêneros dessa família, merece destaque o de *Lippia*, que é popularmente utilizado para o tratamento de doenças dos sistemas respiratório e gastrointestinal (MORTON, 1981). Além disso, espécies desse gênero, como *Lippia alba* é indicada como ansiolítico, sedativo leve, antidiarréico e antiespasmódico (BRASIL, 2011) e *Lippia microphylla* que é utilizada como antisséptico ou para o tratamento de doenças respiratórias (PASCUAL et al., 2001; AGRA et al., 2008).

Nesse sentido, o interesse em investigar a atividade espasmolítica de espécies que apresentam os óleos essenciais como constituintes químicos reside no fato de que esses produtos podem exercer diferentes ações em processos fisiopatológicos distintos, tais como: asma, hipertensão, disfunção erétil, diarreias, espasmos renais, intestinais e uterinos e abortos. O processo de contração de vários músculos lisos, a exemplo do útero, é complexo e depende do aumento na concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), sendo assim, o músculo liso uterino se apresenta como um importante modelo experimental para a investigação dos mecanismos de ação de diversas substâncias com potenciais atividades relaxantes (WEBB, 2003; HUBINONT; DEBIEVE, 2011).

Em estudos anteriores, Silva (2013) evidenciou que o óleo essencial obtido das folhas de *L. microphylla* Cham. (LM-OE) exerce efeito tocolítico em rata e, que esse efeito parece ser devido à inibição indireta do influxo de cálcio. Como os mecanismos de contração e de relaxamento do músculo liso envolvem mobilizações de íons Ca^{2+} , sendo sua concentração modulada pela maioria dos fármacos em nosso organismo, decidiu-se caracterizar o mecanismo de ação tocolítica desse óleo essencial em rata, utilizando para tanto técnicas e ferramentas farmacológicas em nível funcional.



2 Fundamentação teórica

2.1 Produtos naturais e fitoterapia no Brasil

Os produtos naturais são considerados uma fonte rica em substâncias ativas que são utilizadas pela população mundial para promover a saúde e/ou prevenir doenças (ZHANG; SUN; WANG, 2013). Esses produtos são caracterizados pela presença de metabólitos primários e secundários, sendo que os primeiros estão diretamente envolvidos 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).

De acordo com a Convenção da Diversidade Biológica, o Brasil detém o maior número de espécies endêmicas do planeta e representa de 15 a 20% da biodiversidade mundial (BARREIRO; BOLZANI, 2009), sendo essa biodiversidade distribuída em distintos biomas como a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal, a Caatinga e o Manguezal, onde medram cerca de 60 mil espécies vegetais. Tal magnitude e complexidade de espécies têm uma enorme importância científica, social, econômica, cultural e ambiental para a população, bem como para os pesquisadores brasileiros (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Os produtos naturais como as plantas e as toxinas de animais e de microrganismos permitiram o avanço no desenvolvimento da biologia celular e molecular e da eletrofisiologia, permitindo a identificação, o isolamento e a clonagem de enzimas, de receptores e de canais iônicos, o que direcionou a indústria farmacêutica na busca por estratégias que levassem ao aumento da especificidade, da seletividade e da eficácia de fármacos sobre tais alvos farmacológicos no combate a diversas doenças (CALIXTO, 2003).

O uso das plantas medicinais e o conhecimento etnofarmacológico dos recursos naturais por várias culturas há milhares de anos, desempenham um papel essencial na descoberta de novos agentes terapêuticos (SILVA et al., 2012). Nessa perspectiva, a Organização Mundial de Saúde estimou que entre 75-80% da população mundial faz uso desse recurso para cuidados primários à saúde e que apesar do desenvolvimento da química sintética, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos são provenientes, direta ou indiretamente de plantas (ALVES; ROSA, 2005; FOWLER, 2006).

Além disso, o interesse pela fitoterapia vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas entre os usuários, pesquisadores e serviços de saúde (ROSA;

CÂMARA; BÉRIA, 2011), sendo reconhecida pelo Sistema Único de Saúde como um recurso terapêutico integrativo e complementar à saúde. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos contempla diretrizes, ações e responsabilidades dos governos federal, estadual e municipal que visam à garantia ao acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e de fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13 de maio de 2014, ficam definidas duas categorias de fitoterápicos: medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, sendo o primeiro aquele obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia são baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Já o produto tradicional fitoterápico, também pode ser obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, entretanto, 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 monitorização (BRASIL, 2014).

Sendo 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 oftálmica. Além disso, é importante salientar que os produtos que contêm em sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais, e associações dessas com extratos vegetais ou de outras fontes não são considerados medicamento ou produto tradicional fitoterápico. Esta resolução possui como objetivo estabelecer os requisitos mínimos para o registro de medicamentos e de produtos tradicionais fitoterápicos e revoga as RDCs nº 14 de 31 de março de 2010 e nº 10 de 9 de março de 2010, a Resolução nº 90 de 16 de março de 2004 e a Instrução Normativa nº 5 de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2014).

Em nosso país, a comercialização de medicamentos fitoterápicos se baseia nas classes terapêuticas dos psicoléticos (sedativos, ansiolíticos e antidepressivos), antivaricosos, anti-hemorroidários, auxiliares digestivos e hepáticos, antiespasmódicos, tônicos, laxantes, descongestionantes, antigripais e para auxiliar na circulação cerebral (VALEZE; BRENZAN, 2011). Entre os medicamentos fitoterápicos mais comercializados estão o Tebonin® e o Tanakan® (*Gingko biloba*), utilizados para tratar distúrbios vestibulares e cerebrais, o Laitan® (*Piper*

methysticum), um ansiolítico (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002) e o Acheflan[®] (*Cordia verbenacea* DC.), um anti-inflamatório de uso tópico totalmente desenvolvido no Brasil (QUEIROZ; FARO; MELO, 2009). Dois outros medicamentos fitoterápicos desenvolvidos no Brasil são o Giamebil[®] (*Mentha crispera*), um antiparasitário, e o Kronei[®] (*Schinus terebinthifolius*) usado para tratar vaginite (ALVES, 2013).

Diante dos exemplos citados, é importante ressaltar a biodiversidade brasileira como fonte de pesquisa e de desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos, bem como o estudo de diversas espécies da família Verbenaceae, reconhecida por sua importância química, econômica e farmacológica (PASCUAL et al., 2001).

2.2 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae destaca-se entre a grande diversidade das plantas medicinais, reunindo aproximadamente 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), sendo constituída por subarbustos e ervas que se desenvolvem por períodos anuais a perenes (SALIMENA, 2000). As espécies dessa família medram em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, da África e da Índia, sendo os centros de maior diversidade as regiões subtropicais da América do Sul (SANDERS, 2001). No Brasil ocorrem aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

Os maiores gêneros da família Verbenaceae são *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (JUDD et al., 2002), sendo suas espécies amplamente exploradas para ornamentação (LORENZI; SOUZA 2001), bem como para o uso terapêutico, nesse último caso devido à presença de óleos essenciais (SANTOS et al., 2009). Várias atividades farmacológicas já foram descritas para espécies dessa família, entre elas: repelente de mosquito do gênero *Aedes* para a espécie *Lantana camara* L. (DUA et al., 2003); antinociceptiva e hipnótica para a espécie *Premna tomentosa* L. (DEVI et al., 2003); leishmanicida para formas promastigotas de várias espécies de *Leishmania* para a espécie *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl. (MOREIRA et al., 2007) e relaxante em corpos cavernosos de coelhos para a espécie *Clerodendron capitatum* (Willd) (ABDELWAHAB et al., 2012) e jejuno de rato para a espécie *Lippia integrifolia* (Gris.) Hieronymus (GORZALCZANY et al., 2008).

2.3 Gênero *Lippia* e espécie *Lippia microphylla* Cham.

Entre os diversos gêneros pertencentes à família Verbenaceae encontra-se o gênero *Lippia*, considerado o segundo maior da família. Esse gênero é constituído por cerca de 200 espécies de ervas, de subarbustos e de árvores de pequeno porte. Espécies desse gênero podem ser encontradas em países das Américas Central e do Sul, principalmente Brasil, Argentina e Paraguai, além de territórios da África tropical (PASCUAL et al., 2001; CAMPOS et al., 2010). O Brasil detém cerca de 70-75% das espécies conhecidas desse gênero, estando a maioria delas concentrada na Cordilheira do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e de Goiás, região caracterizada pela ocorrência de pedras, ideal para o crescimento das espécies desse gênero (VICCINI et al., 2005).

Muitas espécies de *Lippia* são utilizadas popularmente como remédios para o tratamento de doenças dos sistemas respiratório e gastrointestinal (MORTON, 1981) como, por exemplo, *L. alba*, que é usada como antiespasmódica (MING, 1992). Além disso, algumas atividades farmacológicas são descritas para espécies desse gênero, entre elas, antimalárica para *L. chevalieri* (GASQUET et al., 1993); antiviral (ABAD et al., 1995) e citostática para *L. alba* (LÓPEZ et al., 1979; SLOWING BARILLAS, 1992; KLUEGER et al., 1997) e espasmolítica em traqueia de ratos para a espécie *L. sidoides* Cham. (TEÓFILO, 2012) e aorta de rato e útero de rata para a espécie *L. thymoides* Mart. & Schauer (SILVA, 2012).

Uma das espécies pertencentes ao gênero *Lippia* é a *Lippia microphylla* Cham. (Figura 1), que é encontrada apenas na Guiana e no Brasil (LEMOS et al., 1992), sendo popularmente conhecida como “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” e “alecrim-pimenta”. Essa espécie é utilizada pela população na forma de macerado em álcool como um antisséptico ou decocto para tratar doenças respiratórias como resfriado, gripe, bronquite, tosse e asma (AGRA et al., 2008).

Botanicamente, caracteriza-se por ser um arbusto muito ramificado e quebradiço, que mede de 2-3 m de altura. Apresenta folhas de cheiro forte e sabor picante, além de flores pequenas e esbranquiçadas (MATOS, 2000; 2002; LORENZI; MATOS, 2002). Essa espécie também pode ser encontrada com os nomes científicos de *L. microphylla* Cham. & Schlecht, *L. microphylla* Mart. e *Lantana microphylla* Mart. (PASCUAL et al., 2001).

Figura 1 – *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).



Fonte: Foto cedida pelo Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, 2007.

Entre as atividades farmacológicas citadas para *L. microphylla* encontram-se antimicrobiana (LEMOS et al., 1992) e antioxidante (DAVID et al., 2007) para o extrato metanólico de suas partes aéreas e do caule; protetora da mucosa gástrica, relaxante em íleo (JACINTO et al., 2011), aorta e traqueia de rato (ANTUNES et al., 2012) e útero de rata (BORZANI et al., 2010) para o extrato etanólico de suas partes aéreas; antitumoral *in vitro* e *in vivo* (XAVIER, 2011) e espasmolítica em artérias mesentérica e aorta de rato (ARAÚJO, 2011), traqueia (OLIVEIRA et al., 2012) e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) e útero de rata (SILVA, 2013) para o óleo essencial de suas folhas.

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos que contêm metabólitos secundários de plantas aromáticas, caracterizados por serem complexos, naturais, voláteis, lípidos, raramente coloridos e de forte aroma, geralmente agradável. Esses podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta como broto, flor, folha, caule, ramo, semente, fruto, raiz e casca, sendo armazenados em células secretoras, canais ou células da epiderme (BAKKALI et al., 2008).

Quanto à sua origem, podem ser sintetizados a partir do ácido mevalônico por duas rotas biossintéticas distintas: a série terpênica e, menos frequentemente, a dos fenilpropanoides (SAAD et al., 2009). Em sua constituição são encontrados, principalmente, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, ésteres, hidrocarbonetos e outras substâncias com baixo peso molecular (CRAVEIRO; DE QUEIROZ, 1993; TRIPATHI et al., 2009), sendo que os monoterpenos e sesquiterpenos, constituintes majoritários, caracterizam-se por serem formados por duas e por três unidades isoprênicas (5 carbonos), respectivamente. Os óleos essenciais podem atuar como elementos de defesa para as plantas por repelir ou exercer efeitos tóxicos para insetos, além disso, podem atrair agentes polinizadores (CHÁVEZ, 1991).

É importante ressaltar que a constituição desses produtos voláteis pode variar quanti e qualitativamente dependendo da composição química do solo (SANTOS et al., 2012), da fase de crescimento e de maturação da planta (TAVARES et al., 2005), da sazonalidade da coleta (CERQUEIRA et al., 2009), da temperatura do ar de secagem do material vegetal (RADÜNZ et al., 2002), entre outras variáveis.

A literatura relata a existência de cerca de 350 mil espécies de plantas, das quais, aproximadamente 17.500 são aromáticas (TISSERAND; YOUNG, 2014) e 3000 óleos essenciais, sendo que 300 desses são importantes comercialmente para os produtos farmacêuticos e para a indústria de cosméticos e de perfumes (BAKKALI et al., 2008).

No Brasil, esses produtos vêm sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas com resultados promissores, a exemplo do Acheflan[®] (*Cordia verbenacea* DC.), produto a base de óleo essencial que contém α -humuleno e é indicado para o tratamento de tendinite crônica e de dores miofaciais (HENRIQUE; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009).

Entre as atividades espasmolíticas descritas para alguns óleos essenciais pode-se citar a de: *Zingiber roseum* e *Satureja obovata* em duodeno de rato (CRUZ et al., 1990; PRAKASH et al., 2006), *Ocimum gratissimum* e espécies do gênero *Pelargoniums* (Geraniaceae) em íleo de cobaia (LIS-BALCHIN; HART; ROTH, 1997; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004; MADEIRA et al., 2005), *Pterodon polygalaeflorus* em traqueia de rato (EVANGELISTA et al., 2007), *Casimiroa pringlei* em útero de rata (PONCE-MONTER et al., 2008), *Xylopija langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. em vários modelos de músculo liso (CORREIA, 2013), *Xylopija frutescens* Aubl.

em íleo de cobaia (CORREIA, 2013; SOUZA, 2014) e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries em útero de rata (CORREIA, 2013; FERREIRA, 2014).

Em relação ao objeto de estudo, o óleo essencial das folhas de *L. microphylla*, as atividades farmacológicas relatadas, além das já citadas anteriormente, são: antifúngica contra *Rhizoctonia solani* (SCHURT et al., 2012) e bactericida contra *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (RODRIGUES et al., 2011). Também é importante salientar que esse óleo essencial até a concentração de 250 µg/mL não apresentou toxicidade frente a eritrócitos de camundongos Swiss, nem efeito genotóxico em animais saudáveis, no entanto apresentou moderada toxicidade em animais transplantados com células da linhagem sarcoma 180 nas doses de 50 e 100 mg/kg (XAVIER, 2011).

Uma revisão realizada por Pascual et al. (2001), aponta que os principais componentes do óleo essencial de *Lippia microphylla* são os monoterpenos 1,8-cineol, α -terpineol, terpinen-4-ol, metiltimol, sabineno, γ -terpineno e timol e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno. A alíquota do óleo essencial em estudo nesse trabalho apresenta uma variedade de componentes, sendo os majoritários o timol e o carvacrol, com abundância de aproximadamente 46 e 32%, respectivamente (ANEXO 1 e 2).

Esses dois constituintes são monoterpenos fenólicos e isômeros de posição e apresentam atividades farmacológicas tais como anti-inflamatória (RIELLA et al., 2012; LIMA et al., 2013), antinociceptiva (MELO et al., 2012) e vasorrelaxante em aorta de rato (PEIXOTO-NEVES et al., 2010) para o carvacrol; antimicrobiana (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001), espasmolítica em íleo e traqueia de rato, aumento do transporte mucociliar em camundongo (BEGROW et al., 2010) e vasorrelaxante em artérias aorta e mesentérica de rato (PEIXOTO-NEVES et al., 2010; ARAÚJO, 2011) para o timol e espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) e útero de rata (SILVA, 2013) para ambos os compostos.

2.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

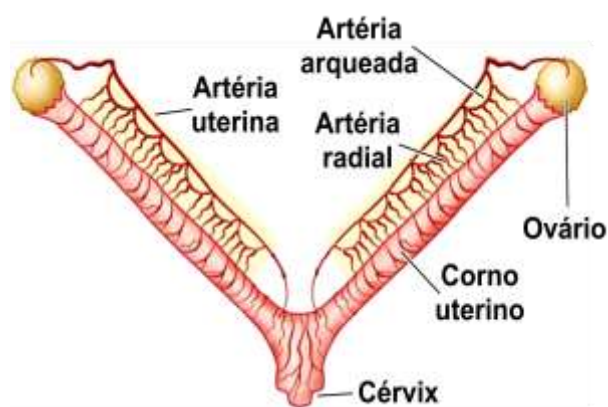
Sabendo-se da importância dos produtos naturais como fonte de substâncias potencialmente terapêuticas e da descoberta de novas substâncias com ação espasmolítica, que são aquelas que reduzem o tônus dos músculos lisos, além de inibir a sua contração ou induzir o seu relaxamento, esse tipo de músculo torna-se

um importante modelo farmacológico para testar tais substâncias. O músculo liso é o principal controlador da maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo, como vasos sanguíneos, estômago, bexiga, vias aéreas, intestinos e útero. A regulação/desregulação da contração desse músculo desempenha um papel essencial em muitos processos fisiopatológicos como hipertensão, asma, distúrbios gastrintestinais e cólicas uterinas, sendo o íon Ca^{2+} mediador de grande parte desses processos e das ações dos fármacos no organismo humano (WEBB, 2003; KIM et al., 2008).

O útero humano é formado por três camadas distintas: uma externa (perimétrio), uma intermediária (miométrio) e uma interna (endométrio). O perimétrio é responsável pelo revestimento epitelial do órgão, enquanto o miométrio é a camada mais espessa e consiste em fibras musculares lisas entrelaçadas e envoltas em tecido conjuntivo organizado em camadas indefinidas. Essa organização permite que as contrações ocorram em qualquer direção. Já o endométrio é formado pelo estroma endometrial caracterizado por revestimento epitelial e por tecido conjuntivo (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990; GRUBER; O'BRIEN, 2011).

Com relação ao útero de rata (Figura 2), é denominado útero duplo, consistindo em dois tubos ligados a dois canais cervicais distintos e a vagina (MARTINS et al., 2011).

Figura 2 – Anatomia do útero de rata.



Fonte: Adaptado de OSOL; MANDALA, 2009.

Sua estrutura é formada por uma camada interna, o endométrio, e uma externa, o miométrio, que é constituído por duas camadas de músculo liso distintas, uma longitudinal exterior e uma circular interna com origem, estrutura, função e

padrões de contração diferentes. Além disso, nos roedores observa-se um tecido conjuntivo chamado de mesométrio (sombreado de amarelo), onde se ramificam as artérias arqueadas, radiais e uterinas (VEALE; OLIVER; HAVLIK, 2000; OSOL; MANDALA, 2009; AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Qualquer anormalidade no processo contrátil do músculo liso uterino pode desencadear algumas desordens como aborto, parto prematuro, hemorragia pós-parto e cólica uterina (WRAY et al., 2001; SHMYGOL; WRAY, 2004). A contratilidade do miométrio é um processo complexo, que se baseia no funcionamento dos miócitos e envolve a presença de receptores hormonais e canais iônicos como, por exemplo, os canais de Ca^{2+} , sendo assim o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ torna-se essencial para a contração uterina (HUBINONT; DEBIEVE, 2011).

Como os mecanismos de contração e de relaxamento muscular envolvem mobilizações de íons Ca^{2+} e este íon medeia grande parte das ações de substâncias no nosso organismo, o modelo do músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas para investigar mecanismos de ação de substâncias que envolvem a sinalização intracelular do cálcio (KARAKI et al., 1997; WEBB, 2003).

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro onipresente que exerce papel essencial no controle de inúmeras funções celulares como proliferação, transcrição gênica, apoptose e contração muscular (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; VACA, 2010). Dessa maneira, a homeostase do Ca^{2+} deve ser altamente controlada pelas células e, para isso, é necessário um número de bombas, de trocadores e de canais que mantêm a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em escala nanomolar (KREBS; MICHALAK, 2007).

No músculo liso, há duas fontes de Ca^{2+} : uma extracelular, que permite o influxo desse íon através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) presentes na membrana plasmática de células excitáveis; e outra intracelular, representada pelos estoques internos, principalmente pelo retículo sarcoplasmático (RS), sendo que em útero, caracterizado por ser um músculo liso de componente fásico, a contração é dependente, principalmente, do cálcio extracelular (MA; PAN, 2003; WRAY, 2007; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011). A liberação de Ca^{2+} do RS ocorre em decorrência da ação do 1,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol (IP_3) sobre os seus receptores IP_3R e pela ativação dos receptores de rianodina (RyR) pelo próprio Ca^{2+} liberado através dos IP_3R , num processo denominado liberação de

Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR) (MACLENNAN, 2000; TAYLOR; LAUDE, 2002; WRAY; SHMYGOL, 2007).

O mecanismo de contração do músculo liso é, majoritariamente, resultado de uma elevação na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que pode ser de origem externa, quando ocorre uma mudança no potencial de membrana e/ou indiretamente através da interação entre agonistas e seus respectivos receptores, com consequente abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L ($\text{Ca}_V\text{-L}$) (CASTEELS; SUZUKI, 1980; NEILD; KOTTECHA, 1987; NELSON; STANDEN; WORLEY, 1988). Em útero, a elevação do cálcio se dá, principalmente por: 1) influxo de cálcio através dos Ca_V ; 2) ligação de agonistas como acetilcolina (ACh) e trifosfato de adenosina (ATP) aos canais operados por receptor e 3) ligação de agonistas como ocitocina aos respectivos receptores aumentando a liberação de cálcio dos estoques intracelulares (LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014).

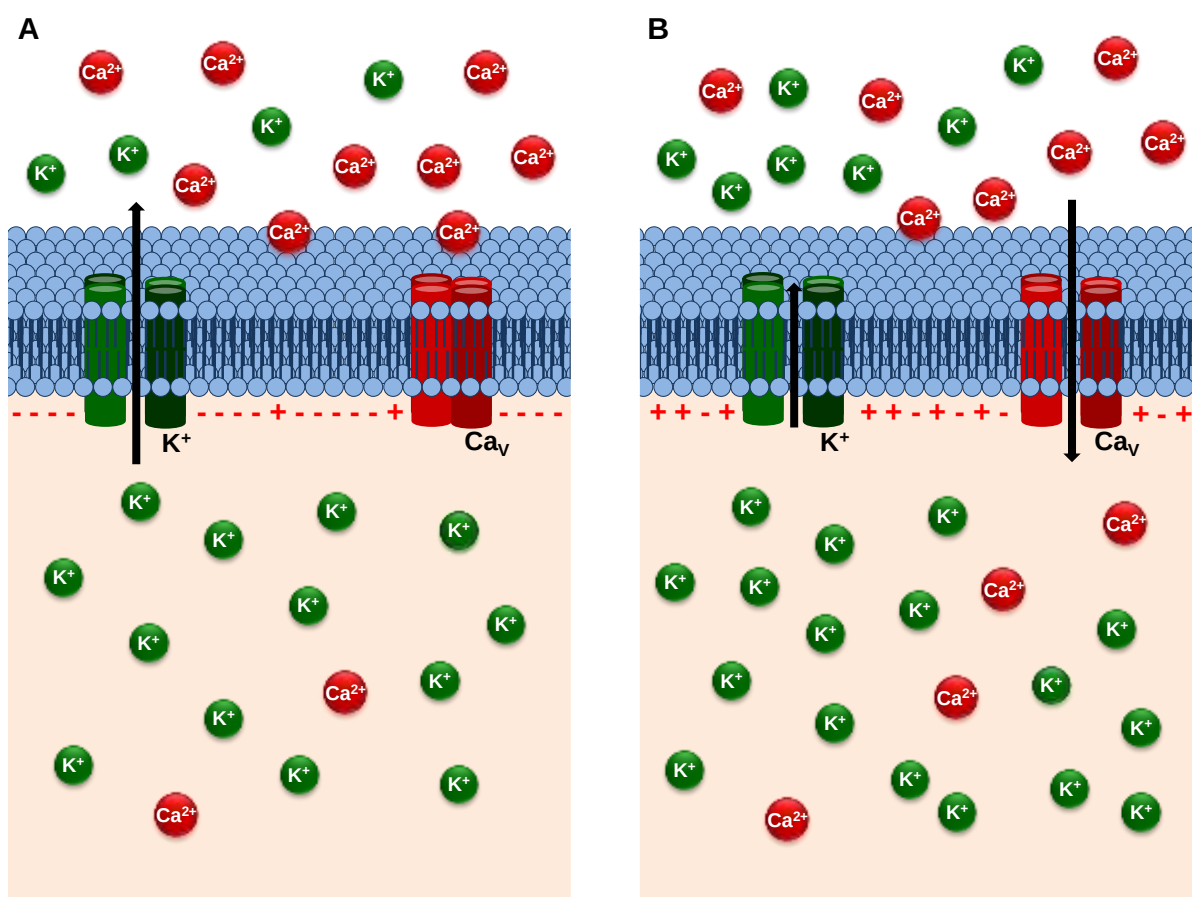
Esse aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$, além de promover a contração, também está envolvido na proliferação celular do músculo liso (HILL-EUBANKS et al., 2011). A regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, em nível funcional, para dar início a uma resposta contrátil é dependente de estímulos que desencadeiam dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana (V_m) e o acoplamento farmacomecânico, que ocorre com a ligação de um agonista ao seu receptor, promovendo uma contração maior que àquela observada com o acoplamento eletromecânico (REMBOLD, 1992; 1996).

A despolarização da membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[\text{K}^+]_e$) ou indiretamente pela ação de agonistas caracterizam o acoplamento eletromecânico (Figura 3), promovendo uma resposta contrátil devido à abertura de Ca_V e, consequentemente, o influxo de Ca^{2+} (REMBOLD, 1996).

A atual nomenclatura dos Ca_V foi proposta por Ertel et al. (2000) e aprovada pela subcomissão da Comissão da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica em Nomenclatura de Receptor e Classificação de Drogas (NC-IUPHAR) (CATTERALL et al., 2005). Esses canais são distribuídos em três famílias e classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas: 1) Ca_V1 ou $\text{Ca}_V\text{-L}$ ($\text{Ca}_V1.1$, $\text{Ca}_V1.2$, $\text{Ca}_V1.3$ e $\text{Ca}_V1.4$) – sensíveis à di-hidropiridinas, ativados por alta voltagem e são os principais canais envolvidos no acoplamento excitação-contração; 2) Ca_V2 ou $\text{Ca}_V\text{-P/Q}$ ($\text{Ca}_V2.1$); $\text{Ca}_V\text{-N}$ ($\text{Ca}_V2.2$);

Ca_V-R (Ca_V2.3) – insensíveis à di-hidropiridinas, sensíveis à alta voltagem e à toxinas de aranha e de caramujo marinho (ω -agatoxina, ω -conotoxina e SNX482), são expressos principalmente em neurônios; 3) Ca_V3 ou Ca_V-T (Ca_V3.1, Ca_V3.2 e Ca_V3.3) – insensíveis à di-hidropiridinas e às toxinas de aranha e de caramujo marinho, ativados por baixa voltagem, são transitórios e expressos em vários tipos celulares, onde estão envolvidos na formação do potencial de ação com padrões repetitivos (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; CATTERALL, 2011; ALEXANDER et al., 2013).

Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K⁺.



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 Ca²⁺, com consequente contração do músculo liso.

Fonte: Silva, 2015.

Em músculo liso, o Ca_v1 é o principal, e muitas vezes o único, tipo de canal de Ca^{2+} expresso (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005), sendo alvo de bloqueadores usados na terapêutica como o nifedipino e o verapamil (WATERMAN, 2000). Em útero humano também é relatado a presença de $\text{Ca}_v\text{-T}$, no entanto, esses canais são ausentes em útero de rata (WRAY et al., 2003).

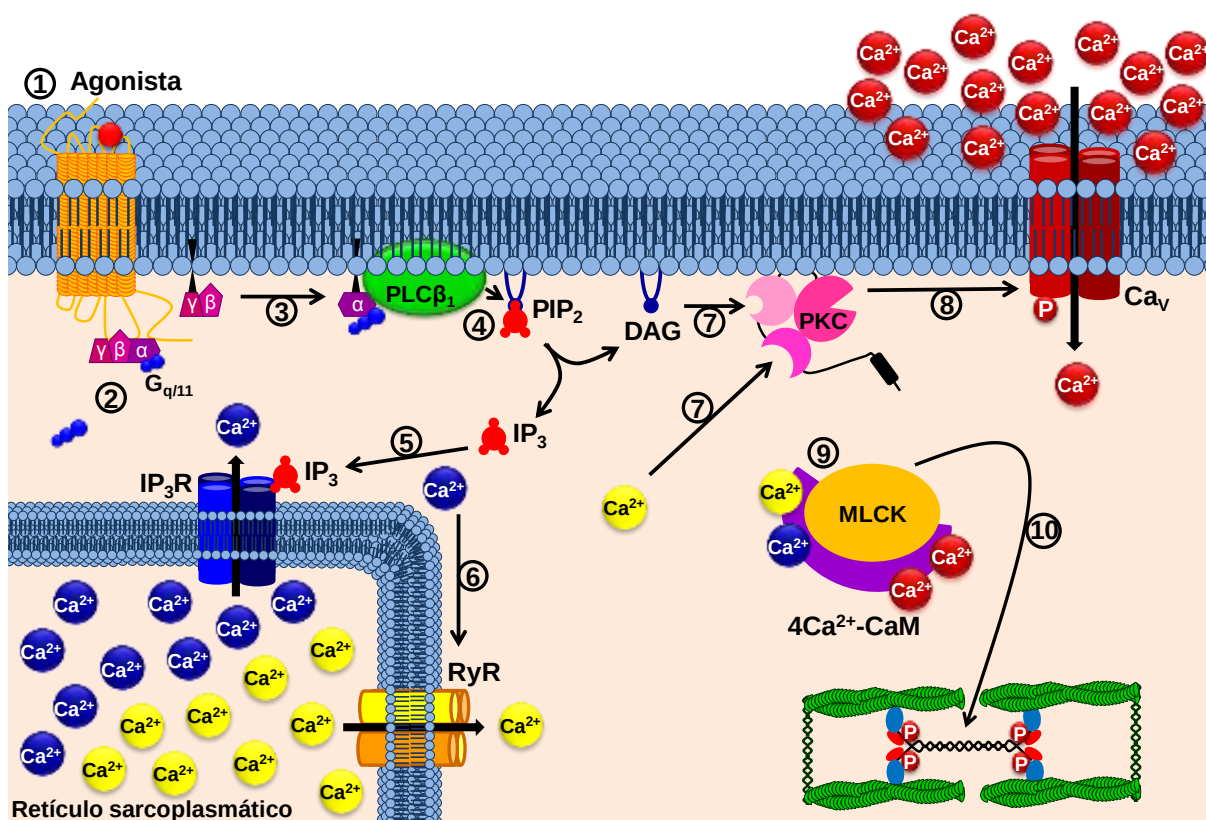
Outra forma pela qual o músculo liso pode contrair é através do acoplamento farmacomecânico (Figura 4). Esse mecanismo ocorre quando agonistas como ACh (ou análogos, como o carbacol), prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ e ocitocina se ligam aos seus receptores, M_3 , FP e OT, respectivamente, acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através das proteínas G_q ou G_{11} , cuja subunidade α ativa a fosfolipase C β_1 ($\text{PLC}\beta_1$) e, conseqüentemente, promovem a hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) formando IP_3 e diacilglicerol (DAG) (SANBORN; WANG; DODGE, 1998; BERRIDGE, 2008). O IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do RS através dos IP_3R , o Ca^{2+} liberado, por sua vez, ativa os RyR aumentando ainda mais a liberação de Ca^{2+} dessa organela para o citosol e, conseqüentemente, a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (DELLIS et al., 2006; McHALE et al., 2006; WRAY; SHMYGOL, 2007).

A liberação de Ca^{2+} do RS induz o deslocamento da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde é ativada pelo DAG, e uma vez ativa, fosforila proteínas-alvo específicas, como os Ca_v ativando-os e promovendo o influxo de Ca^{2+} (SANBORN; WANG; DODGE, 1998; BERRIDGE, 2012). O Ca^{2+} , quando em concentrações elevadas no meio citoplasmático, liga-se a calmodulina (CaM) na proporção 4:1, formando o complexo $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), responsável por fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) permitindo o mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e de miosina favorecendo o deslizamento entre esses filamentos, com o conseqüente desenvolvimento da contração muscular (SOMLYO; SOMLYO, 1994; 2003; WRAY et al., 2003).

Além disso, tem sido relatada uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso denominada via de sensibilização ao Ca^{2+} . Essa via envolve a modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) pela proteína G monomérica RhoA e a sua cinase associada (ROK), uma proteína serina/treonina cinase (KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998; WRAY et al., 2003). Agonistas contráteis como endotelina-1, carbacol e ocitocina aumentam a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ via GPCRs

(principalmente aqueles receptores acoplados as proteínas $G_{12/13}$ ou $G_{q/11}$) levam à ativação direta ou indireta do fator de troca de nucleotídeos de guanina da RhoA (RhoGEF), que, por sua vez, ativa a RhoA, (SOMLYO; SOMLYO, 2003; WRAY et al., 2003). A RhoA-GTP ativa a ROK, e esta fosforila a MLCP, tornando-a inativa, o que intensifica a ativação da MLC induzida pela MLCK e, dessa forma, a contração do músculo liso (KIMURA et al., 1996; WRAY et al., 2003).

Figura 4 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α , tornando-se ativas; 3) A subunidade $G_{q/11}$ -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.

Fonte: Silva, 2015.

O relaxamento do músculo liso é facilitado pela diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ (SOMLYO; SOMLYO, 1994; SANBORN; WANG; DODGE, 1998;) através do mecanismo eletromecânico, caracterizado pela repolarização ou pela hiperpolarização da membrana, ou ainda, pelo mecanismo farmacomecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O acoplamento eletromecânico de relaxamento é caracterizado pela abertura de canais de K^+ , que desempenham um papel-chave na regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular, sendo que a contração no músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K^+ , gerando uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição de sua condutância, que gera uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Os canais de K^+ conduzem íons K^+ através da membrana plasmática a favor do seu gradiente eletroquímico (MACKINNON, 2003), mantendo o potencial de membrana das células no estado de repouso próximo ao potencial de equilíbrio do K^+ (cerca de -90 mV) (VOGALIS, 2000). 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).

Diversos 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), os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e os canais de K^+ retificadores de entrada (K_{ir}) (THORNELOE; NELSON, 2005). Em miométrio, é relatada a presença desses subtipos de canais de K^+ (WANG et al., 1998; SMITH et al., 2007), sendo os BK_{Ca} os majoritários e responsáveis por repolarizar a membrana durante os potenciais de ação e manter a quiescência uterina (LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014).

A atual nomenclatura dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) os classificam em três famílias com base em suas condutância, cinética e farmacologia: 1) BK_{Ca} ($K_{Ca1.1}$, $K_{Ca4.1}$, $K_{Ca4.2}$ e $K_{Ca5.1}$) – bloqueados por caribdotoxina, por iberitotoxina e por baixas concentrações de TEA^+ , ativados tanto por voltagem como por Ca^{2+} , exceto os $K_{Ca4.1}$ e 4.2 que são ativados por Na^+ e Cl^- intracelular e o $K_{Ca5.1}$ que é sensível ao pH. Os $K_{Ca1.1}$ são expressos no cérebro, na cóclea e nos músculos

esquelético e liso; 2) SK_{Ca} (K_{Ca}2.1, K_{Ca}2.2 e K_{Ca}2.3) – bloqueados por apamina, são encontrados no cérebro, no coração e alguns tipos de músculo liso e 3) canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de condutância intermediária (IK_{Ca}) (K_{Ca}3.1) – bloqueados por clotrimazol e por caribdotoxina, estão presentes na placenta, na próstata, nos linfócitos, no pâncreas e no endotélio vascular. Essas duas últimas famílias são insensíveis à voltagem e ativadas por baixa [Ca²⁺]_c (< 1,0 μM) (SCHREIBER et al., 1998; SAH; FABER, 2002; YUAN et al., 2003; WEI et al., 2005; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; ALEXANDER et al., 2013).

Estruturalmente, os BK_{Ca} são octâmeros formados por quatro subunidades α e quatro β (Figura 5), sendo que a α consiste em 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10), além de ser responsável por formar o poro do canal, que encontra-se entre os domínios S5-6. Os domínios S0-S6 são transmembranares e constituem o núcleo da subunidade α com uma cauda NH₂ terminal, enquanto os domínios S7-S10 estão localizados no citoplasma e formam a cauda COOH terminal da proteína. A subunidade β é formada por dois domínios transmembranares, sendo responsável por aumentar a sensibilidade do canal ao cálcio e a voltagem, através da interação com o domínio S0 e a cauda NH₂ terminal da subunidade α (PAULSON; NEWMAN, 1987; BOYLE et al., 1992; LEDOUX et al., 2006).

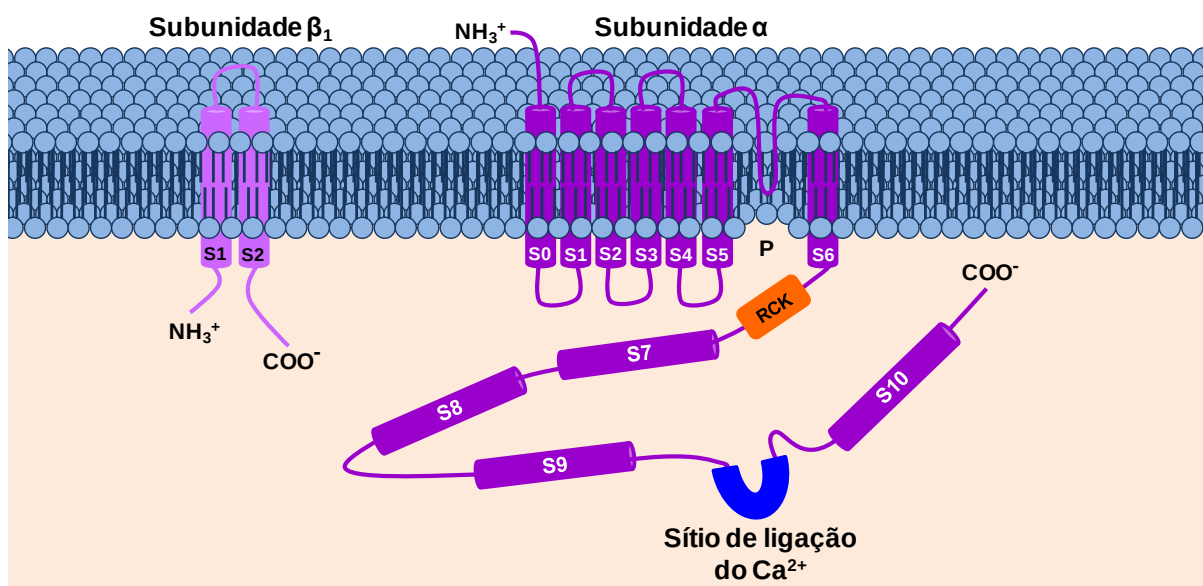
Os SK_{Ca} são formados por quatro subunidades proteicas, cada uma constituída por seis domínios transmembranares (S1-S6), domínios terminais NH₂ e COOH intracelulares e a região do poro localizada entre os domínios S5 e S6 (Figura 6). Esses canais estão constitutivamente associados à calmodulina através do grupo COOH terminal, o que lhes confere uma alta sensibilidade ao aumento submicromolar do cálcio intracelular (SCHUMACHER et al., 2001; LEDOUX et al., 2006).

Os K_V, assim como os SK_{Ca}, também são constituídos por quatro subunidades proteicas, cada uma delas com seis domínios hidrofóbicos (S1-S6) inseridos na membrana (Figura 7). O domínio S4 é um importante componente do sensor de voltagem dos K_V por conter os aminoácidos lisina ou arginina que são carregados positivamente em pH neutro, enquanto os domínios S5-6 são responsáveis por formar o poro (JAN; JAN, 1992; PARK et al., 2008).

Os K_{ATP} têm como característica funcional a formação de um complexo, de pelo menos duas proteínas, entre o receptor de sulfonilureias (SUR) e a subunidade formadora do poro que pertence à família dos K_{ir} (Figura 8). O poro do canal é

formado por um tetrâmero de subunidades $K_{ir}6.1$ e 6.2 , essenciais para a formação do K_{ATP} , associado a quatro proteínas SUR, que conferem sensibilidade às sulfonilureias e aos ativadores desse canal, como o diazóxido e o ATP em baixas concentrações (STANDEN, 1997; BURKE; MUTHARASAN; ARDEHALI, 2008).

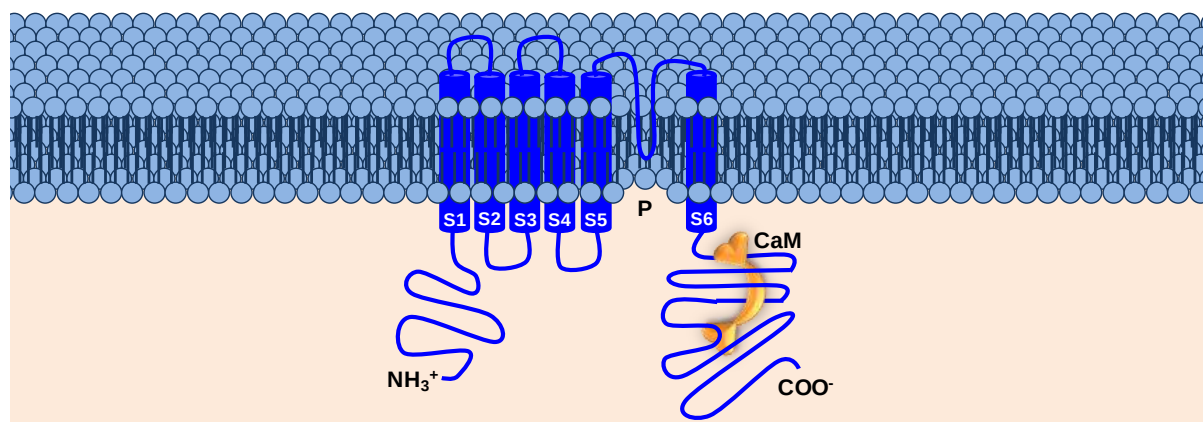
Figura 5 – Modelo estrutural das subunidades α e β dos canais de potássio ativados pelo cálcio de alta condutância.



P = poro; RCK = domínio regulador da condutância ao potássio; NH_3^+ = cauda N-terminal; COO^- = cauda C-terminal; S0-S10 = domínios (Redesenhada de LEDOUX et al., 2006).

Fonte: Silva, 2015.

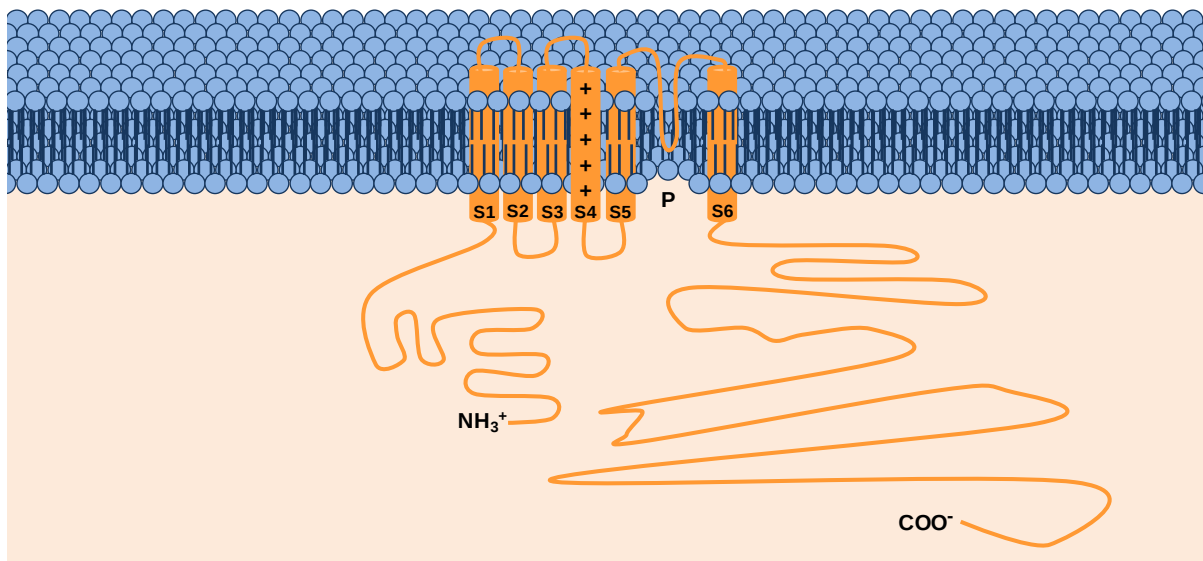
Figura 6 – Modelo estrutural de uma subunidade dos canais de potássio ativados pelo cálcio de baixa condutância.



P = poro; CaM = calmodulina; NH_3^+ = cauda N-terminal; COO^- = cauda C-terminal; S0-S6 = domínios (Redesenhada de LEDOUX et al., 2006).

Fonte: Silva, 2015.

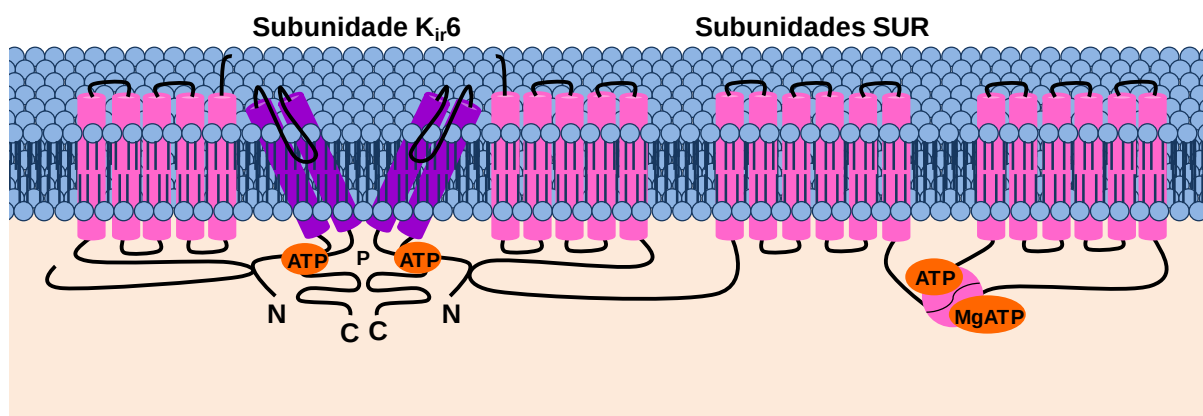
Figura 7 – Modelo estrutural de uma subunidade dos canais de potássio dependentes de voltagem.



P = poro; NH_3^+ = cauda N-terminal; COO^- = cauda C-terminal; S0-S6 = domínios (Redesenhada de PARK et al., 2008).

Fonte: Silva, 2015.

Figura 8 – Modelo estrutural das subunidades $\text{K}_{\text{ir}}6$ e SUR dos canais de potássio sensíveis ao trifostato de adenosina.



P = poro; N = cauda N-terminal; C = cauda C-terminal; ATP = trifostato de adenosina (Redesenhada de BURKE; MUTHARASAN; ARDEHALI, 2008).

Fonte: Silva, 2015.

Nesse contexto, substâncias ativadoras de canais de K^+ como, por exemplo, cromacalina, levocromacalina e nicorandil promovem hiperpolarização da membrana das células musculares lisas e, conseqüentemente, aumentam o efluxo de K^+ (GURNEY, 1994). Dessa forma, a hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} através

dos Ca_v , diminuindo, a $[Ca^{2+}]_c$ e a fosforilação da cadeia leve da miosina e, como consequência, ocorre o relaxamento do músculo liso (REMBOLD, 1996).

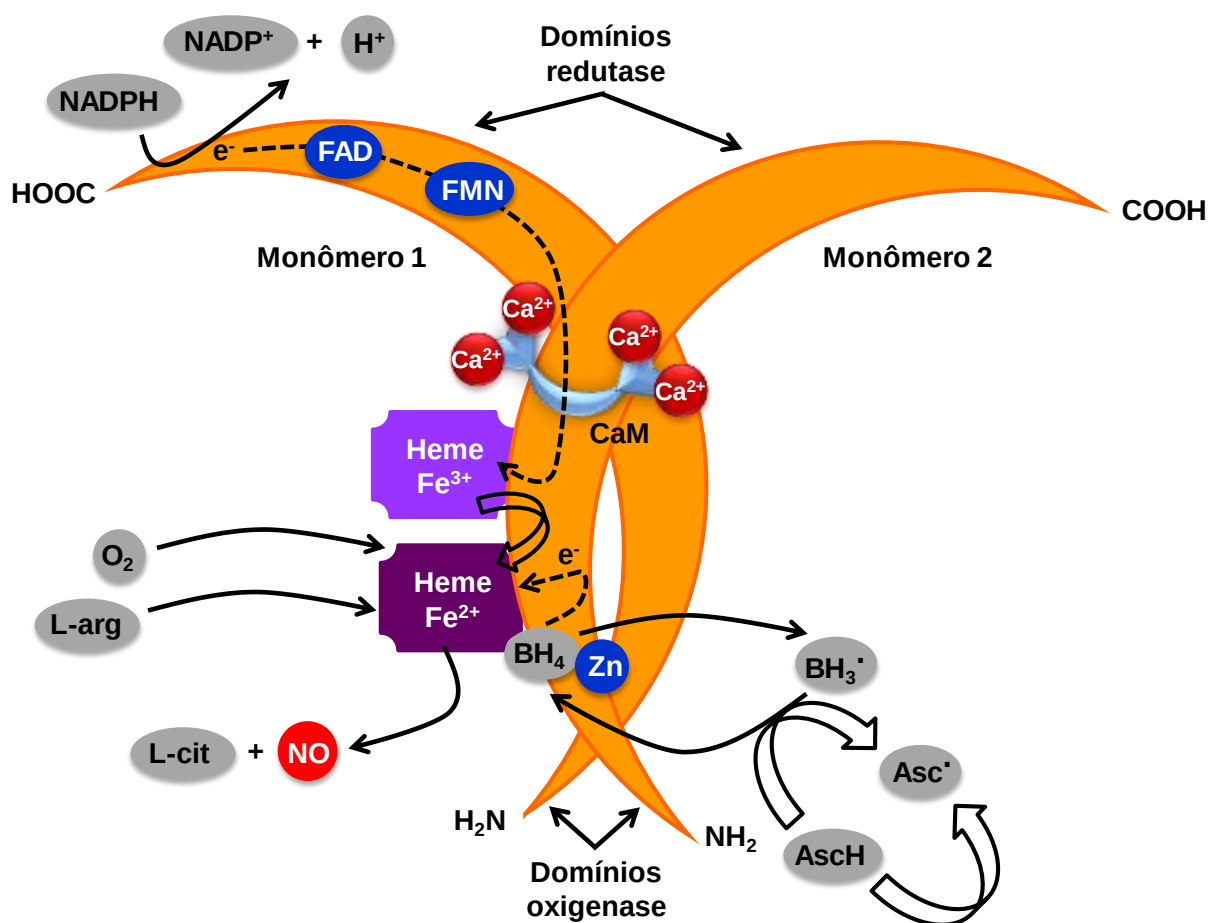
O acoplamento farmacomecânico de relaxamento do músculo liso pode ocorrer via receptores acoplados à proteína G_s , cuja subunidade α ativa a ciclase de adenilil (AC) que converte o ATP em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Outra via que leva ao relaxamento caracterizado por esse acoplamento é a geração de óxido nítrico (NO), um fator relaxante derivado do endotélio/epitélio, pelos nervos nitrérgicos e pelas células endoteliais, estimulando a ciclase de guanilil solúvel (sGC) que induz a formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (ARNOLD et al., 1977; REMBOLD, 1996; WRAY et al., 2003). O aumento nos níveis citosólicos desses nucleotídeos cíclicos em músculo liso é considerado um dos principais mecanismos que medeiam seu relaxamento em condições fisiológicas (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

A formação de NO se dá a partir da ativação das enzimas sintases do óxido nítrico (NOS). As NOS são divididas em três isoformas, sendo que duas delas, a NOS neuronal (nNOS ou NOS I) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS III), são consideradas constitutivas, dependentes do aumento da $[Ca^{2+}]_c$ para ligação da CaM as enzimas e produzem baixas quantidades de NO, e a terceira isoforma é caracterizada por ser induzível (iNOS ou NOS II), independente de Ca^{2+} , a CaM se liga a enzima mesmo na ausência desse íon, ativada por citocinas e por fatores microbianos e produz grandes quantidades de NO (AL-HIJJI; LARSSON; BATRA, 2001; WEINBERG et al., 2009).

Estruturalmente semelhantes, as NOS são homodímeros formados por dois monômeros, que na presença do grupo heme formam um dímero funcional (Figura 9). A presença desse composto e a dimerização das NOS são condições essenciais para que ocorra transferência de elétrons do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) para o dinucleotídeo de adenina e flavina (FAD) e o mononucleotídeo de flavina (FMN) nos domínios redutase de um monômero para o grupo prostético heme férrico (heme Fe^{3+}) do monômero oposto. O heme Fe^{3+} , ao receber o elétron, é reduzido a heme ferroso (heme Fe^{2+}), que pode receber outro elétron da tetra-hidrobiopterina (BH_4) gerando o radical tri-hidrobiopterina, esse radical é reciclado pelas enzimas NOS ou pelo agente redutor ácido ascórbico. Em quantidades suficientes de L-arginina e do cofator BH_4 , as NOS acoplam ao seu grupo heme e reduzem o oxigênio para converter L-arginina em L-citrulina e NO nos

domínios oxigenase. Essa reação ocorre em duas etapas: primeiro a L-arginina é hidroxilada e, em seguida, é oxidada. Todas as NOS têm um sítio de ligação na interface do dímero para o íon zinco, cuja importância é facilitar a ligação da L-arginina e da BH_4 (IGNARRO, 1990; FUKUTO; CHAUDHURI, 1995; FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Figura 9 – Estrutura funcional das sintases do óxido nítrico.

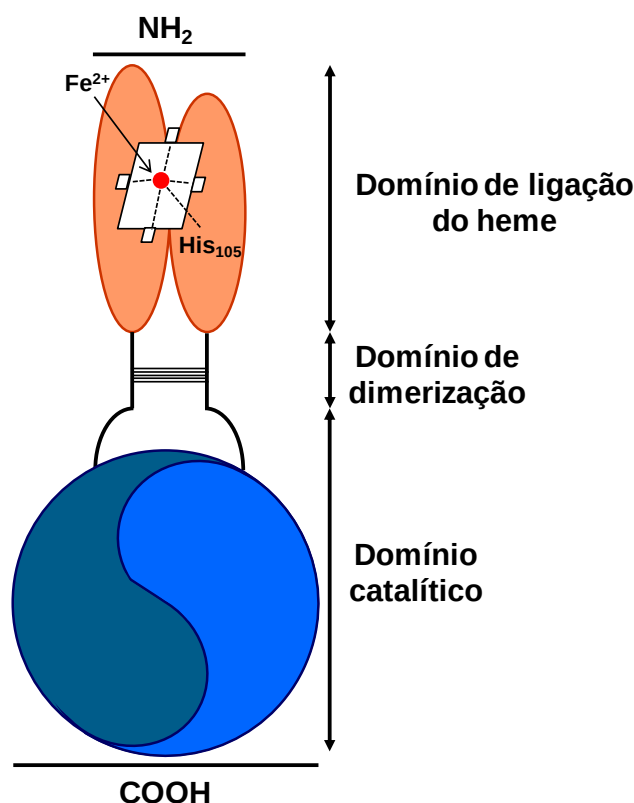


NH_2 = domínio N-terminal; COOH = domínio C-terminal; NO = óxido nítrico; L-arg = L-arginina; L-cit = L-citrulina; e^- = elétron; CaM = calmodulina; NADPH = fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida; NADP^+ = NADPH oxidado; H^+ = próton; FAD = dinucleotídeo de adenina e flavina; FMN = mononucleotídeo de flavina; BH_4 = (6R-)5,6,7,8-tetra-hidro-L-biopterina; $\text{BH}_3^\bullet$ = radical tri-hidrobiopterina; AsCH = ácido ascórbico; $\text{Asc}^\bullet$ = radical ascorbato; heme Fe^{3+} = heme férrico; heme Fe^{2+} = heme ferroso; Zn = zinco. Para facilitar o entendimento, demonstrou-se o funcionamento da enzima apenas com o fluxo de elétrons do domínio redutase de um monômero para o domínio oxigenase do outro monômero (Redesenhada de FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Fonte: Silva, 2015.

Uma vez formado NO, esse se difunde pelo citosol e ativa a sGC por ligação direta a sexta posição do grupo heme, um grupo prostético constituído por um anel de cinco membros, com quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na forma reduzida ou oxidada. Essa ligação quebra a ligação entre a histidina e o ferro, dessa maneira, o NO liga-se ao ferro e forma o complexo hemenitrosil ferroso (IGNARRO, 1990; STONE; MARLETTA, 1994; LUCAS et al., 2000). Estruturalmente, a enzima sGC (Figura 10) é caracterizada por ser um heterodímero composto pelas subunidades α e β que se dividem em três domínios: de ligação ao heme, de dimerização e catalítico (KOESLING; BÖHME; SCHULTZ, 1991; SCHULZ; YUEN; GARBERS, 1991; HOBBS, 1997), onde estão localizados os domínios regulatório N-terminal e catalítico C-terminal (HARTENECK et al., 1990; BUECHLER; NAKANE; MURAD, 1991).

Figura 10 – Estrutura funcional da ciclase de guanilil solúvel.



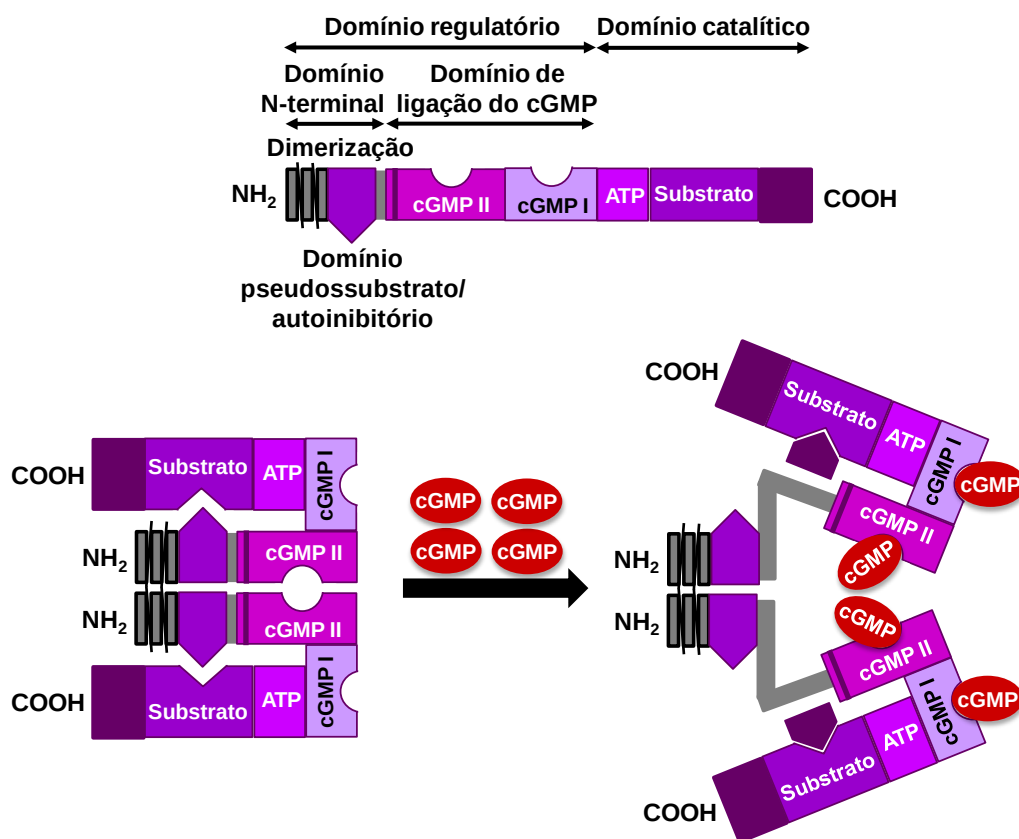
NH₂ = domínio N-terminal; COOH = domínio C-terminal; Fe²⁺ = ferro; His₁₀₅ = histidina 105 (Redesenhada de LUCAS et al., 2000).

Fonte: Silva, 2015.

A ativação da sGC culmina em aumento de sua atividade catalítica e, consequentemente, na formação do nucleotídeo cíclico cGMP a partir do substrato GTP (REMBOLD, 1996; WRAY et al., 2003). No músculo liso, o cGMP ativa a proteína cinase dependente de cGMP (PKG) que também pode ser ativada por cAMP em altas concentrações citoplasmáticas, um nucleotídeo cíclico que, em baixas concentrações, é responsável por ativar a proteína cinase dependente de cAMP (PKA). A própria ativação da PKG pelo cGMP aumenta gradualmente a afinidade do cAMP por essa proteína (SANBORN; WANG; DODGE, 1998; WRAY et al., 2003).

A PKG (também conhecida por cGK) é um homodímero dividido em dois tipos, PKG I e II, sendo a primeira citosólica e a segunda uma proteína de membrana. A PKG I (Figura 11) ainda é dividida nos subtipos I α e I β , que diferem entre si pela afinidade de ligação ao cGMP (LUCAS et al., 2000; HOFMANN et al., 2009).

Figura 11 – Estrutura funcional da proteína cinase G do tipo I.



NH₂ = domínio N-terminal; COOH = domínio C-terminal; ATP = trifosfato de adenosina; cGMP I = domínio de ligação de alta afinidade do monofosfato cíclico de guanósina; cGMP II = domínio de ligação de baixa afinidade do monofosfato cíclico de guanósina (Redesenhada de HOFMANN et al., 2009).

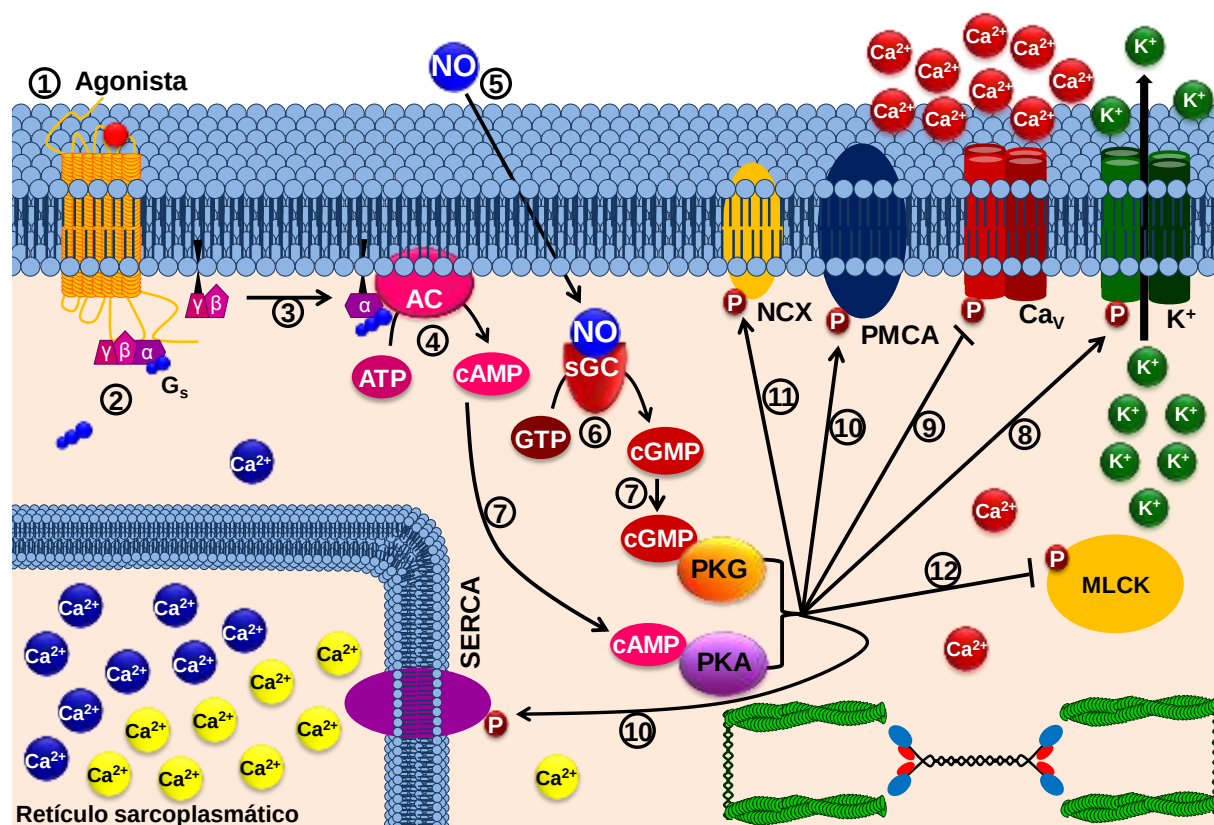
Esses subtipos, estruturalmente, possuem dois domínios funcionais comuns: o regulatório e o catalítico, sendo o regulatório composto pelo domínio N-terminal e pelo domínio de ligação ao cGMP. A ligação do cGMP em ambos os sítios de ligação no domínio regulatório induz uma alteração conformacional, expondo o centro catalítico pelo domínio pseudossustrato/autoinibitório do N-terminal e permitindo a fosforilação de substratos proteicos. No domínio catalítico existe um sítio de ligação para o ATP que favorece a catálise e a transferência de um dos seus grupos fosfato para resíduos de serina/treonina dos alvos a serem fosforilados (HOFMANN et al., 2009).

Dessa maneira, a PKA e a PKG fosforilam vários substratos, levando a: 1) ativação de canais de K^+ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, inibem os Ca_v ; 2) inibição direta dos Ca_v , diminuindo o influxo de Ca^{2+} e, consequentemente, a $[Ca^{2+}]_c$ (REMBOLD, 1996; MAKHLOUF; MURTHY, 1997; WRAY et al., 2003); 3) um aumento na cinética da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, e dessa forma, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; 4) diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) (BLAUSTEIN, 1989); 5) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $4Ca^{2+}$ -CaM, impedindo a fosforilação da MLC e, consequentemente, o processo contrátil (REMBOLD, 1992) (Figura 12); 6) inativação dos IP_3R que reduz a liberação do Ca^{2+} pelo RS (WOODRUM; BROPHY, 2001); 7) inativação da RhoA por fosforilação do resíduo Ser^{188} , deslocando-a para o citosol; 8) ativação da MLCP por fosforilação no resíduo de Ser^{695} da subunidade MYPT1 o que impede a fosforilação no resíduo de Thr^{696} pela ROK; 9) ativação da MLCP por fosforilação do telokin (ativador endógeno da MLCP), sendo esse um mecanismo independente de RhoA (MURTHY, 2006; AGUILLAR; MITCHELL, 2010).

Diante do exposto, a relevância deste estudo reside na utilização da musculatura lisa uterina como modelo animal para investigar funcionalmente o mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham., uma vez que apresentou atividade tocolítica por inibição indireta do influxo de Ca^{2+} via Ca_v (SILVA, 2013). Sabendo-se que esses canais são inibidos indiretamente a partir do aumento da concentração intracelular de NO que, consequentemente, aumenta a atividade da sCG e da PKG, bem como pode ativar diretamente ou indiretamente canais de K^+ (REMBOLD, 1996; MAKHLOUF; MURTHY, 1997; WRAY et al., 2003;

LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014), decidiu-se investigar a participação dessa via de transdução na ação tocolítica do óleo essencial.

Figura 12 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG.



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, consequentemente, 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.

Fonte: Silva, 2015.



3 Objetivos

3.1 Geral

- Investigar o mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial obtido das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (LM-OE) em rata.

3.2 Específicos

- Caracterizar o mecanismo de ação tocolítica do LM-OE avaliando, em nível funcional, a participação da(os):
 1. Sintase do óxido nítrico;
 2. Ciclase de guanilil solúvel;
 3. Proteína cinase G;
 4. Subtipos de canais de potássio.



4 Material e métodos

4.1 Material

4.1.1 Material botânico

A espécie *Lippia microphylla* Cham. foi coletada, em junho de 2010, no município de Serra Branca, estado da Paraíba, sendo o material botânico identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de Botânica 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). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB sob código de identificação AGRA 6118.

4.1.2 Produto-teste

O óleo essencial obtido das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (LM-OE) foi caracterizado pelos Profs. Drs. José Guilherme Soares Maia e Eloisa Helena de Aguiar Andrade da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará (Anexos 1 e 2) e gentilmente cedido pela equipe do Prof. Dr. Josean Fachine Tavares do setor de Fitoquímica do PPgPNSB/CCS/UFPB.

4.1.3 Animais

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens, pesando entre 150-250 g, eram 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 com 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 eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais submetidos e aprovados pela

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Certidão N° 1005/13) da UFPB (Anexos 3 e 4).

4.1.4 Drogas e reagentes

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

A ocitocina foi obtida da Eurofarma (Brasil), era diluída em água destilada para obtenção da solução-estoque (1 UI/mL) e armazenada a 4-8 °C em refrigerador.

O óleo de castor (Cremophor EL[®]), o cloreto de cério (CsCl), a glibencalmida, o íon tetraetilamônio (TEA^+), a apamina, a 4-aminopiridina (4-AP), o cloridrato de L-arginina, o dietilestilbestrol, a 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-ona (ODQ), o Rp-8-bromo- β -fenil-1,N²-etenoguanosina-3',5', monofosforotioato cíclico (Rp-8-Br-PET-cGMPS) e o cloridrato de N_ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Estas substâncias, menos o Cremophor[®], eram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C e quando necessário, eram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto a glibenclamida, a ODQ e o dietilestilbestrol, que eram dissolvidos em álcool etílico absoluto.

O ácido clorídrico P.A. (HCl) foi obtido da Química Moderna (Brasil), o hidróxido de sódio (NaOH) e o álcool etílico absoluto foram obtidos da Fmaia (Brasil). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.5 Solução nutritiva

O pH da solução nutritiva, cuja composição está descrita abaixo, era ajustado para 7,4 com HCl ou NaOH 1 N.

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).

4.1.6 Aparelhos

As contrações isométricas eram registradas, com o útero suspenso em cubas de banho para órgãos isolados de 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 2.4.1, para aquisição dos dados, e ANCAD para análise. O sistema continha 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 eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 versão 4.3 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

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

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da solução-estoque do LM-OE

O LM-OE era 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 caracterizam-se pela presença de compostos voláteis (BAKKALI et al., 2008). A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v), nessa concentração, o Cremophor[®] é desprovido de efeito relaxante ou contrátil significativo em útero de rata, de acordo com experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (dados não mostrados).

No momento da realização dos experimentos, essa solução era diluída em água destilada de acordo com a exigência do protocolo. As concentrações do LM-OE eram utilizadas em múltiplos de 3.

4.2.2 Caracterização do mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata

4.2.2.1 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do LM-OE em rata

4.2.2.1.1 Avaliação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

As ratas eram tratadas, 24 horas antes dos experimentos, com dietilestilbestrol (1 mg/kg) por via subcutânea para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por guilhotina. A cavidade abdominal era aberta, o útero era retirado e colocado em um Becker contendo solução nutritiva de Locke Ringer sob gaseificação com carbogênio (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997; MEDEIROS, 2006).

Em papel absorvente embebido em solução fisiológica, o útero era dissecado para retirada de todo o tecido conjuntivo e adiposo adjacentes. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados, contendo solução nutritiva, aquecidas a 32 °C e gaseificadas com carbogênio. Estes tecidos eram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 40 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação e durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Após o período de estabilização, era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e, sobre o componenteônico dessa contração, era adicionado o veículo (Cremophor® e água destilada, controle negativo) ou o LM-OE de forma cumulativa (curva-controle). Em outro experimento, era adicionado à cuba 10^{-4} M de L-NAME (MUNGLUE et al., 2012), inibidor não seletivo de sintase do óxido nítrico (NOS), após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componenteônico dessa contração era adicionado o LM-OE de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo veículo ou pelo LM-OE era expresso como a porcentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. A potência e a eficácia relaxantes do LM-OE foram avaliadas comparando-se os valores da concentração do óleo que promovia 50% do seu efeito máximo (CE_{50}) e do efeito máximo (E_{max}) na ausência e na presença do inibidor.

4.2.2.1.2 Confirmação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência, na presença de L-arginina e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina

O útero era preparado conforme o descrito no item 4.2.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componenteônico dessa contração era adicionado o LM-OE de forma cumulativa (curva-controle). Em preparação diferente, era adicionado simultaneamente à cuba 10^{-4} M de L-NAME, inibidor não seletivo de NOS, e 10^{-3} M de L-arginina, (substrato para a NOS) (Adaptado de BULBUL et al., 2007), para avaliar a reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME e confirmar a participação da NOS no efeito tocolítico do LM-OE. Também era realizado experimentos na presença apenas de 10^{-3} M de L-arginina. Após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componenteônico dessa contração era adicionado o LM-OE de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do LM-OE eram avaliadas como descrito no item anterior.

4.2.2.1.3 Avaliação da participação da sGC no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de ODQ

O útero era preparado conforme o descrito no item 4.2.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componenteônico dessa

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

A eficácia e a potência relativas do LM-OE eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.2.1.4 Avaliação da participação da PKG no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

O útero era preparado conforme o descrito anteriormente. Após o período de estabilização, era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o LM-OE de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG, era pré-incubado por 30 minutos (PARRA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000), após esse tempo era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico o LM-OE era adicionado de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do LM-OE eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.2.2 Avaliação do envolvimento de canais iônicos no efeito tocolítico do LM-OE

4.2.2.2.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

O órgão era preparado conforme o descrito anteriormente. Após o período de estabilização, era induzida uma contração isométrica por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos,

uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o LM-OE era adicionado de maneira cumulativa (curva-controle). Em outro experimento, 5×10^{-3} M de CsCl, bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , era adicionado a cuba e, após 20 minutos, (LATORRE et al., 1989) era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico o LM-OE era adicionado de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do LM-OE eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.2.2.2 Avaliação da participação de subtipos de canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA^+ , de apamina, de 4-AP ou de glibenclamida

O útero era preparado conforme o descrito no item 4.2.2.1.1. Após o período de estabilização era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o LM-OE era adicionado de forma cumulativa (curva-controle). Em preparações diferentes, era pré-incubado, por 20 minutos, 10^{-3} M de TEA^+ que, nessa concentração, é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (AARONSON et al., 2006) 10^{-7} M de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (TSAI et al., 1998; AYAR et al., 2001), 3×10^{-3} M de 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_v (Adaptado de AARONSON et al., 2006) ou 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos K_{ATP} (PIPER et al., 1990; HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), após esse tempo uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o LM-OE era adicionado de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do LM-OE eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.2.2.3 Avaliação da participação de subtipos de canais de K⁺ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de bloqueadores seletivos

O útero era preparado conforme o descrito no item 4.2.2.1.1. Após o período de estabilização era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, era induzida uma contração por 10⁻² UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o LM-OE de forma cumulativa (curva-controle). Em preparação diferente, para verificar se haveria somação de efeito na ativação dos canais de K⁺ era pré-incubado simultaneamente 10⁻⁵ M de glibenclamida, 10⁻⁷ M de apamina, 10⁻³ M de TEA⁺ e 3 x 10⁻³ M de 4-AP, bloqueadores seletivos dos K_{ATP}, dos SK_{Ca}, dos BK_{Ca} e dos K_V, respectivamente (PIPER et al., 1990; HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997; TSAI et al., 1998; AYAR et al., 2001; AARONSON et al., 2006) e, após 20 minutos, uma contração era induzida por 10⁻² UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico o LM-OE era adicionado de forma cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do LM-OE eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.3 Análise estatística

Todos 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.

Os valores de CE₅₀ (NEUBIG et al., 2003) e do coeficiente de correlação linear (R²) foram calculados por regressão não linear. Os valores de E_{max} foram utilizados como parâmetro de eficácia.

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).



5 Resultados

5.1 Carcterização do mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata

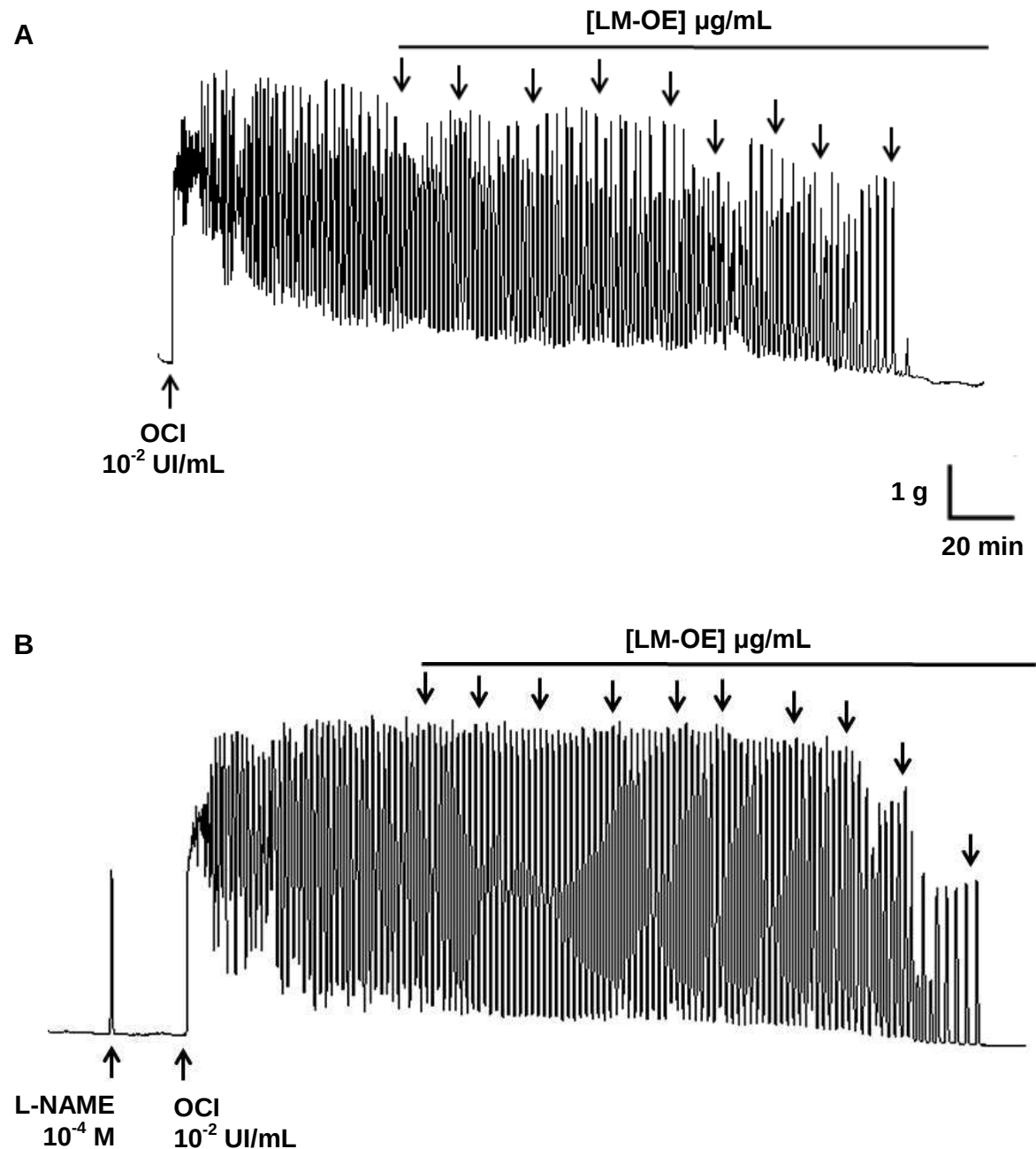
5.1.1 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do LM-OE em rata

5.1.1.1 Avaliação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

A curva-controle de relaxamento do LM-OE ($0,003-81 \mu\text{g/mL}$) ($\text{CE}_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,92 \pm 0,03$) foi desviada para a direita na presença de 10^{-4} M de L-NAME ($\text{CE}_{50} = 25,6 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,93 \pm 0,01$), inibidor não seletivo de NOS (Figura 13 e Gráfico 1, $n = 5$).

Comparando-se as curvas concentrações-resposta, observou-se que a potência relaxante do LM-OE foi reduzida em aproximadamente 9,5 vezes na presença de L-NAME e que o E_{max} de 100% foi atingido na concentração de 27 e de 81 $\mu\text{g/mL}$, na ausência e na presença do inibidor, respectivamente (Tabela 1).

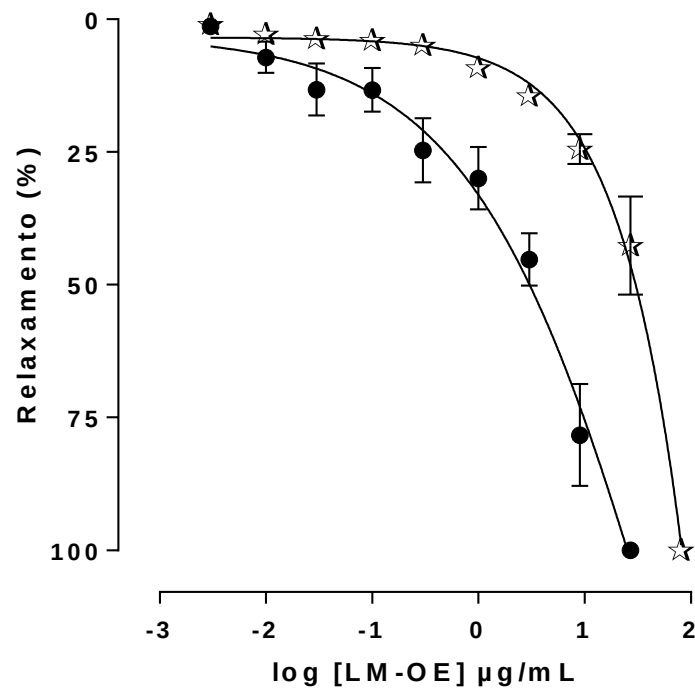
Figura 13 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de L-NAME em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

Gráfico 1 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (☆) de 10^{-4} M de L-NAME em rata.



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

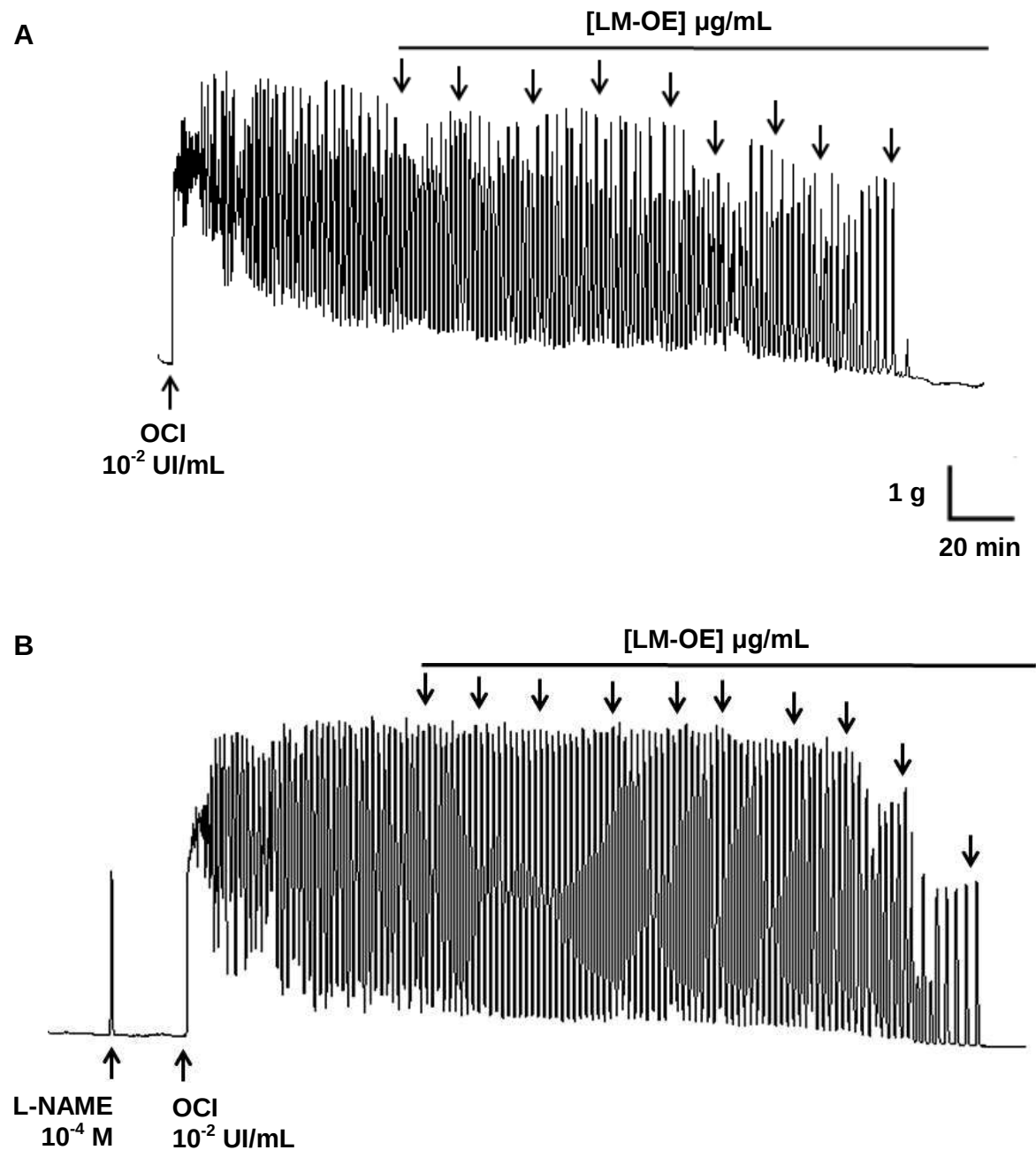
Fonte: Silva, 2015.

5.1.1.2 Confirmação da participação da NOS na resposta tocolítica do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência, na presença de L-arginina e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina

As curvas concentrações-resposta de relaxamento do LM-OE foram sobrepostas à curva-controle ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) quando na presença de 10^{-3} M de L-arginina, substrato para a NOS, ($CE_{50} = 6,2 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,92 \pm 0,01$) e na presença simultânea de 10^{-4} M de L-NAME, inibidor não seletivo de NOS, e de 10^{-3} M de L-arginina ($CE_{50} = 7,2 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,95 \pm 0,02$), atingindo o E_{max} de 100% na concentração de 27 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14 e Gráfico 2, $n = 5$).

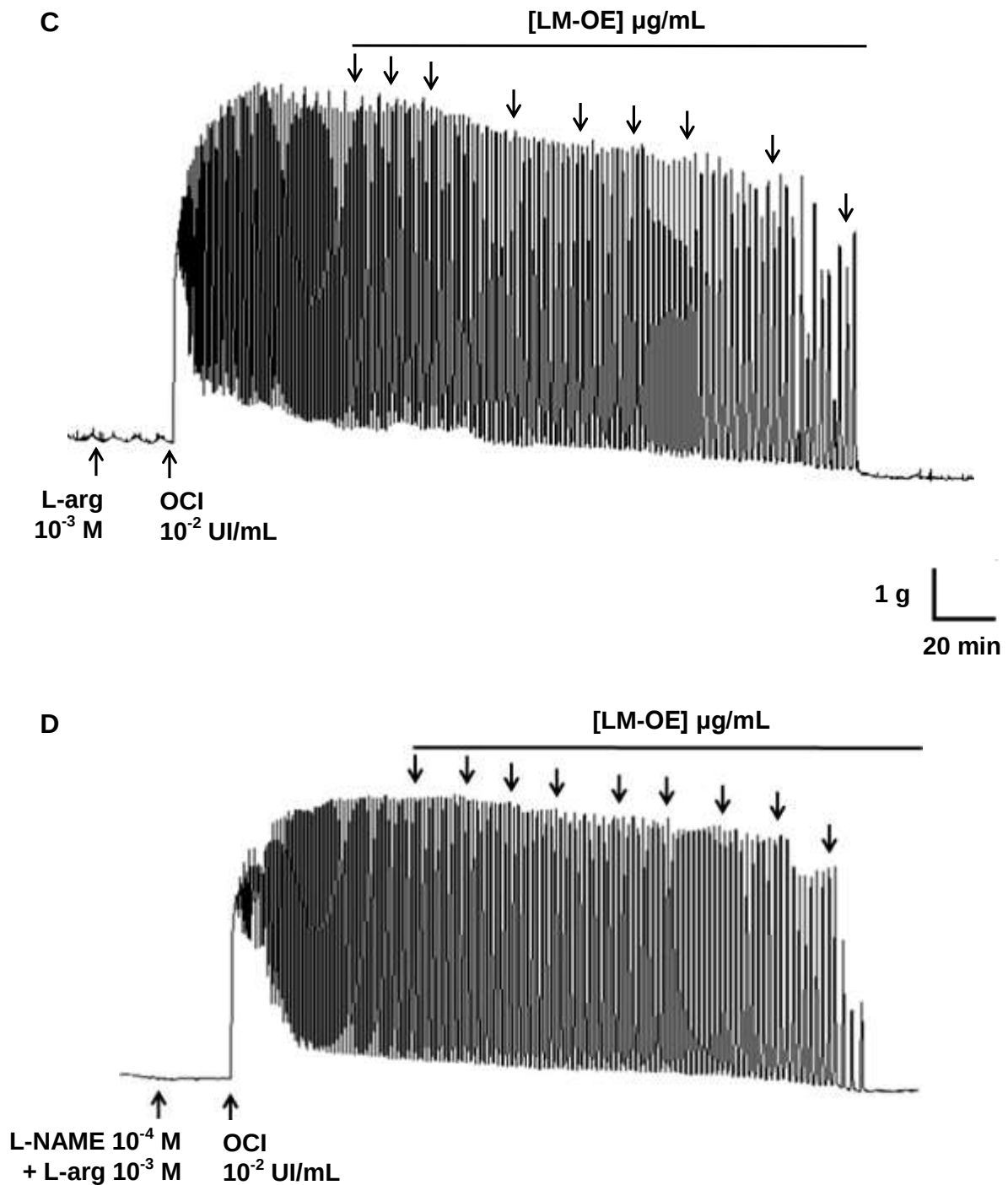
Ao comparar-se as curvas concentrações-resposta, observou-se que o efeito inibitório do L-NAME sobre a potência relaxante do LM-OE foi revertido na presença da L-arginina (Tabela 1).

Figura 14 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A), na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B), de 10^{-3} M de L-arginina (C) e na presença simultânea (D) de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina em rata.



(Continua)

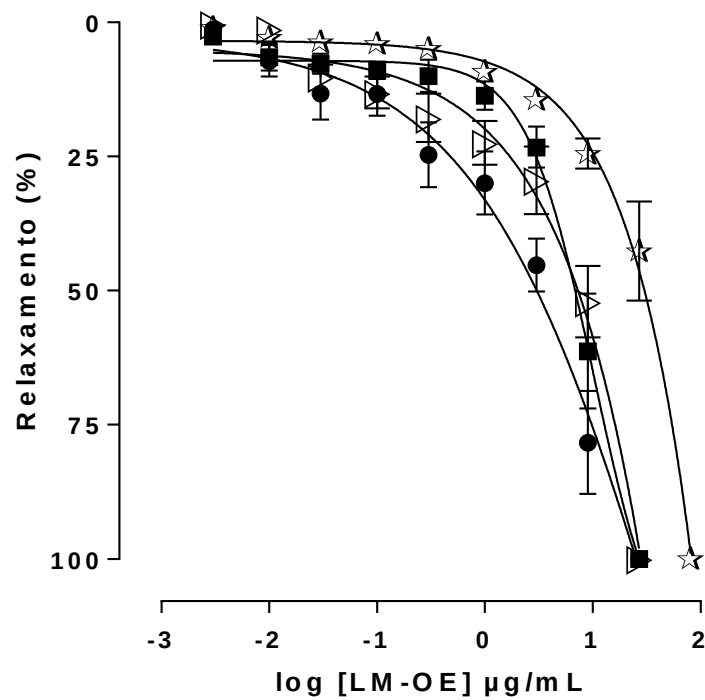
(Continuação)



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**A**, **C** e **D**) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (**B**), OCI = ocitocina; L-arg = L-arginina.

Fonte: Silva, 2015.

Gráfico 2 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●), na presença de 10^{-4} M de L-NAME (☆), de 10^{-3} M de L-arginina (▷) e na presença simultânea (■) de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina em rata.



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

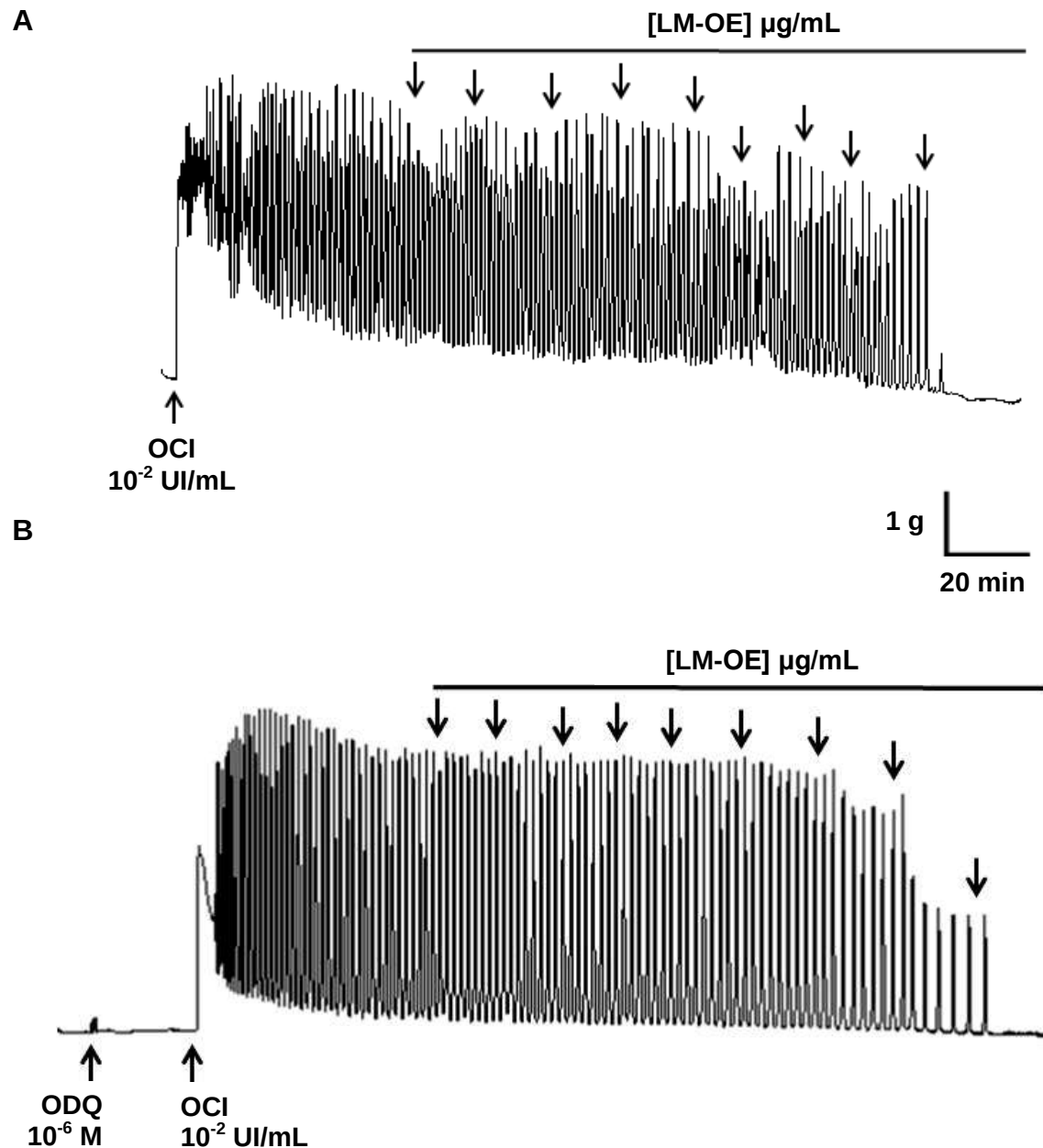
Fonte: Silva, 2015.

5.1.1.3 Avaliação da participação da sGC no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de ODQ

A curva concentração-resposta de relaxamento do LM-OE (0,003-27 µg/mL) foi deslocada para direita na presença de 10^{-6} M de ODQ, inibidor de sGC, atingindo 100% de $E_{\max}$ na concentração de 27 µg/mL (Figura 15 e Gráfico 3, $n = 5$).

Ao comparar-se a potência relaxante do LM-OE na ausência ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,6$ µg/mL) e na presença ($CE_{50} = 10,1 \pm 0,9$ µg/mL e $R^2 = 0,97 \pm 0,02$) de ODQ, observou-se que essa potência foi reduzida em, aproximadamente, 3,7 vezes na presença do inibidor (Tabela 1).

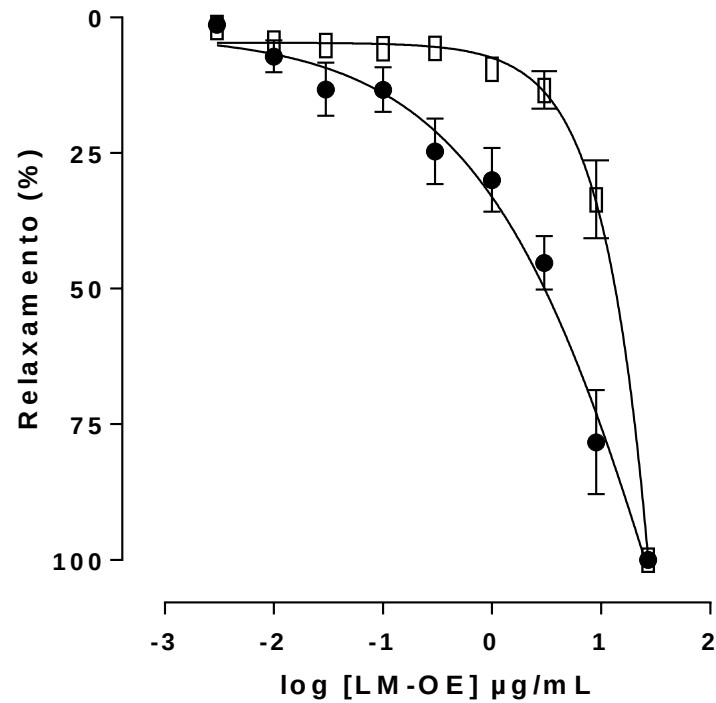
Figura 15 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de ODQ em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 µg/mL (A e B), OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

Gráfico 3 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (□) de 10^{-6} M de ODQ em rata.



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

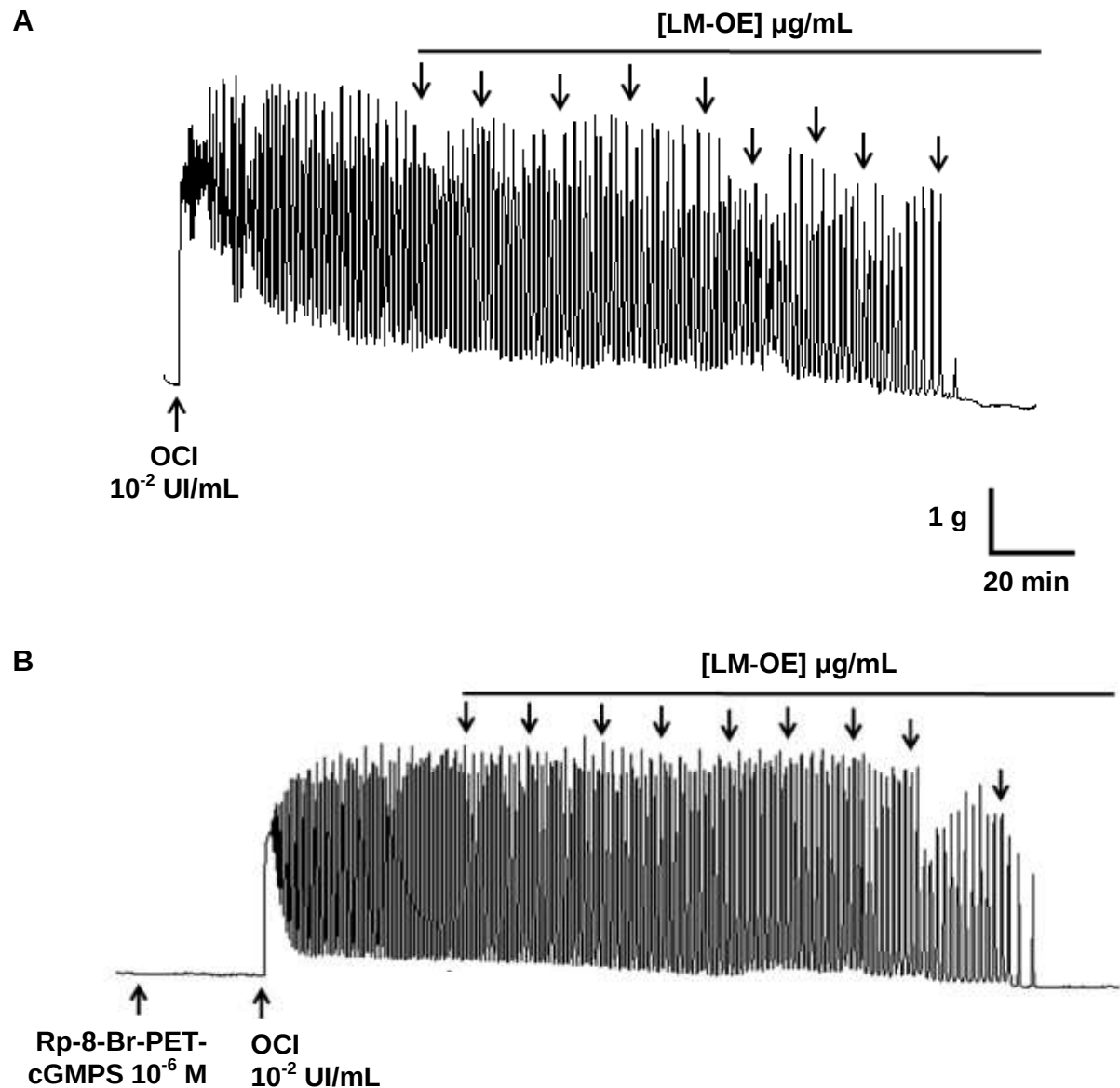
Fonte: Silva, 2015.

5.1.1.4 Avaliação da participação da PKG no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

Quando utilizou-se 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, inibidor de PKG, observou-se que a curva de relaxamento induzida pelo LM-OE (0,003-27 $\mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita, quando comparada a curva-controle, atingindo o E_{max} ($99,2 \pm 0,8\%$) na concentração de 27 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16 e Gráfico 4, $n = 5$).

A potência relaxante do LM-OE ($CE_{50} = 8,9 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,94 \pm 0,02$), na presença do inibidor foi reduzida, em aproximadamente 3,3 vezes quando comparada a potência produzida pelo óleo essencial na ausência de Rp-8-Br-PET-cGMPS ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 1).

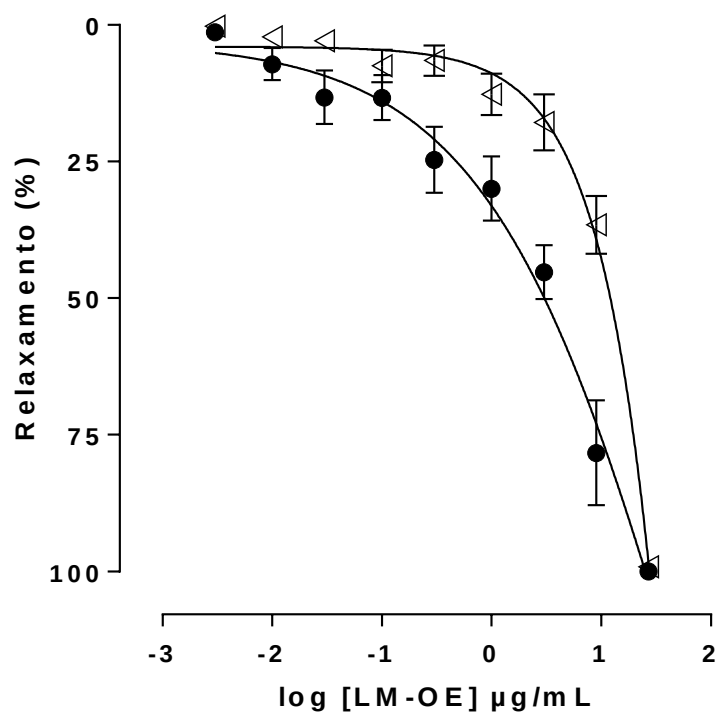
Figura 16 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A e B) OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

Gráfico 4 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (◁) de 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPs em rata.



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

Fonte: Silva, 2015.

Tabela 1 – Valores de $E_{\max}$, de CE_{50} e de R^2 do LM-OE na ausência e na presença de um substrato de NOS e de inibidores da via NO/sGC/PKG em útero isolado de rata.

Inibidores	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
Ausência	100	$2,7 \pm 0,6$	$0,92 \pm 0,03$
L-NAME	100	$25,6 \pm 3,9^{****}$	$0,93 \pm 0,01$
L-arginina	100	$6,2 \pm 1,7^{####}$	$0,92 \pm 0,01$
L-NAME + L-arginina	100	$7,2 \pm 1,4^{###}$	$0,95 \pm 0,02$
ODQ	100	$10,1 \pm 0,9^{***}$	$0,97 \pm 0,02$
Rp-8-Br-PET-cGMPS	$99,2 \pm 0,8$	$8,9 \pm 0,9^{***}$	$0,94 \pm 0,02$

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni; $***p < 0,001$ (ausência vs. ODQ e Rp-8-Br-PET-cGMPS); $****p < 0,0001$ (ausência vs. L-NAME); $###p < 0,001$ (L-NAME vs. L-NAME + L-arginina) e $####p < 0,0001$ (L-NAME vs. L-arginina), $n = 5$.

Fonte: Silva, 2015.

5.1.2 Avaliação do envolvimento de canais iônicos no efeito tocolítico do LM-OE

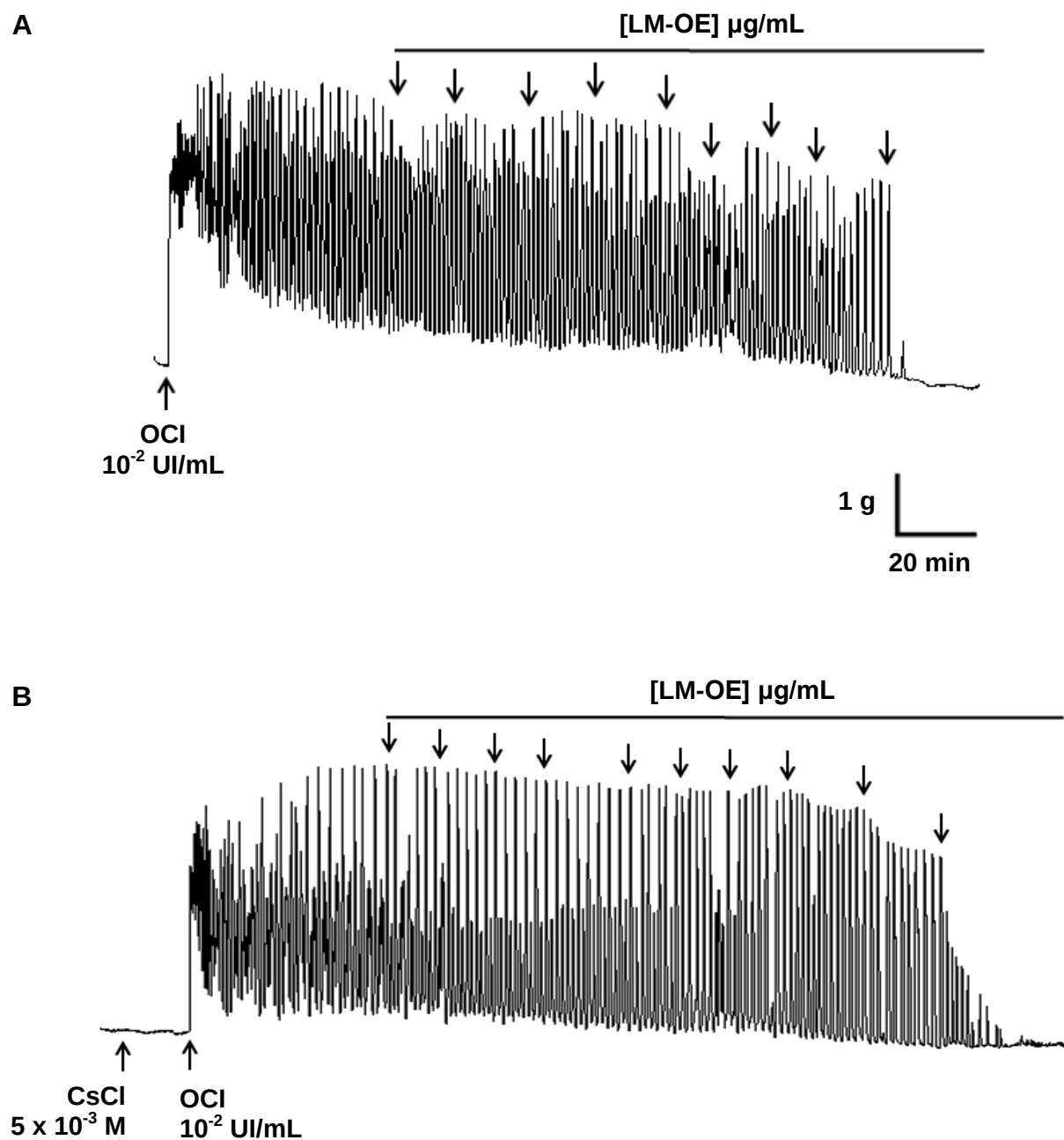
5.1.2.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

A curva concentração-resposta ao LM-OE (0,003-81 $\mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita na presença de 5×10^{-3} M de CsCl ($CE_{50} = 11,7 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,96 \pm 0,01$), bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (Figura 17 e Gráfico 5, $n = 5$).

Analisando os valores de CE_{50} , observou-se que a potência relaxante do óleo essencial na presença do bloqueador foi reduzida em aproximadamente 4,3 vezes quando comparada a curva concentração-resposta na ausência de CsCl ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 2).

Comparando-se os valores de E_{max} do LM-OE, observou-se que o relaxamento máximo (100%) foi alcançado nas concentrações de 27 $\mu\text{g/mL}$ na ausência e de 81 $\mu\text{g/mL}$ na presença de CsCl, respectivamente.

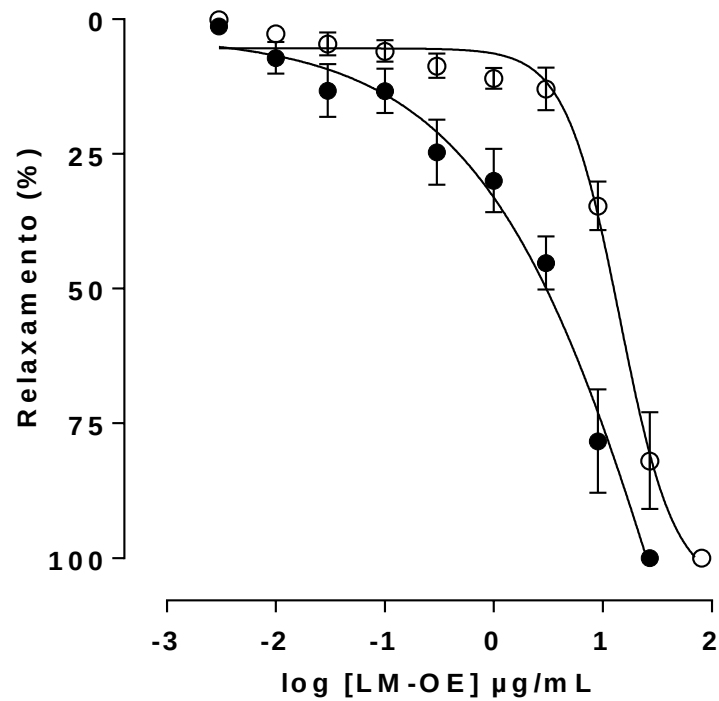
Figura 17 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5×10^{-3} M de CsCl em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

Gráfico 5 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (○) de 5×10^{-3} M de CsCl em rata.



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

Fonte: Silva, 2015.

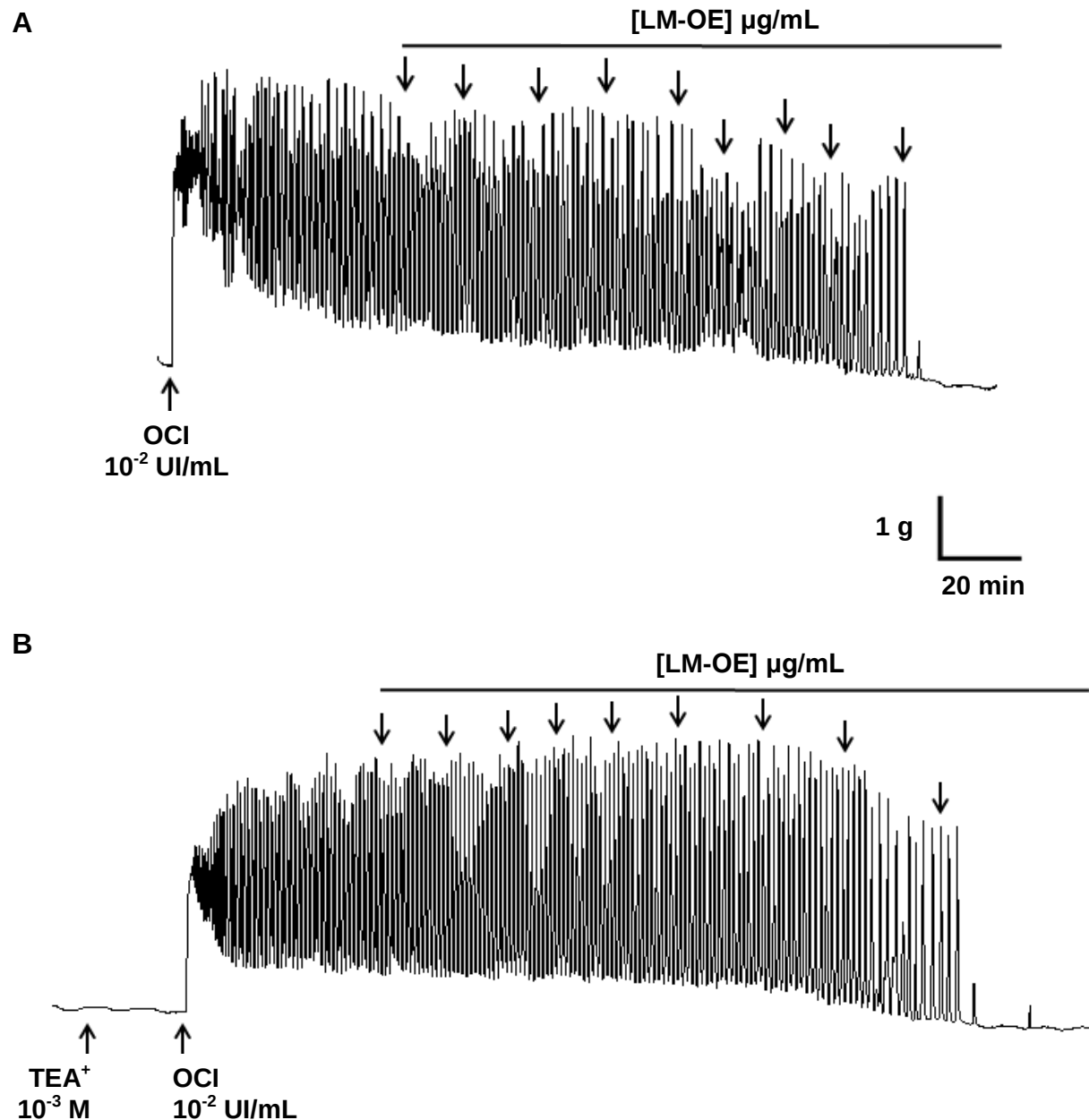
5.1.2.2 Avaliação da participação de subtipos de canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA^+ , de apamina, de 4-AP ou de glibenclamida

As curvas concentrações-resposta do LM-OE (0,003-81 $\mu\text{g/mL}$) em útero de rata foram deslocadas para a direita de maneira significativa, em relação à curva-controle, na presença de 10^{-3} M de TEA^+ que, nessa concentração, é bloqueador dos BK_{Ca} (Figura 18 e Gráfico 6, $n = 5$), de 10^{-7} M de apamina, bloqueador dos SK_{Ca} (Figura 19 e Gráfico 7, $n = 5$), de 3×10^{-3} M de 4-AP, bloqueador dos K_V (Figura 20 e Gráfico 8, $n = 5$) ou de 10^{-5} M de glibenclamida, bloqueador dos K_{ATP} (Figura 21 e Gráfico 9, $n = 5$),

Ao comparar-se os valores de CE_{50} , observou-se a redução da potência relaxante do LM-OE na presença de TEA^+ ($CE_{50} = 10,5 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,94 \pm 0,02$); de apamina ($CE_{50} = 10,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,96 \pm 0,01$); de 4-AP ($CE_{50} = 12,4 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,96 \pm 0,01$) ou de glibenclamida ($CE_{50} = 9,7 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,95 \pm 0,01$) em aproximadamente 3,9; 3,7; 4,6 e 3,6 vezes, respectivamente, quando comparada a potência relaxante do óleo essencial na ausência desses bloqueadores ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 2).

Os valores de E_{max} foram atingidos nas concentrações de 27 $\mu\text{g/mL}$ ($E_{max} = 100\%$) tanto na ausência como na presença dos bloqueadores dos BK_{Ca} , dos SK_{Ca} e dos K_{ATP} , no entanto, na presença do bloqueador dos K_V o E_{max} só foi alcançado na concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$.

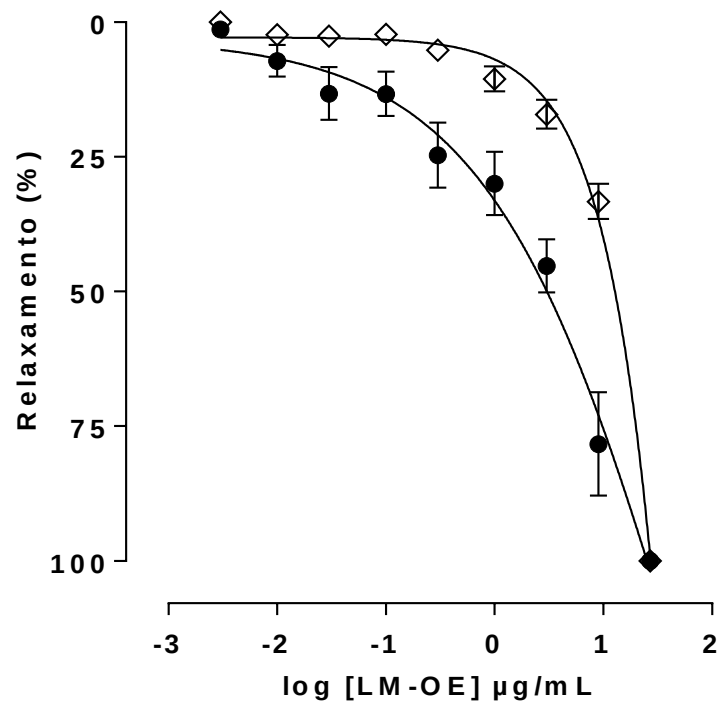
Figura 18 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-3} M de TEA⁺ em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A e B), OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

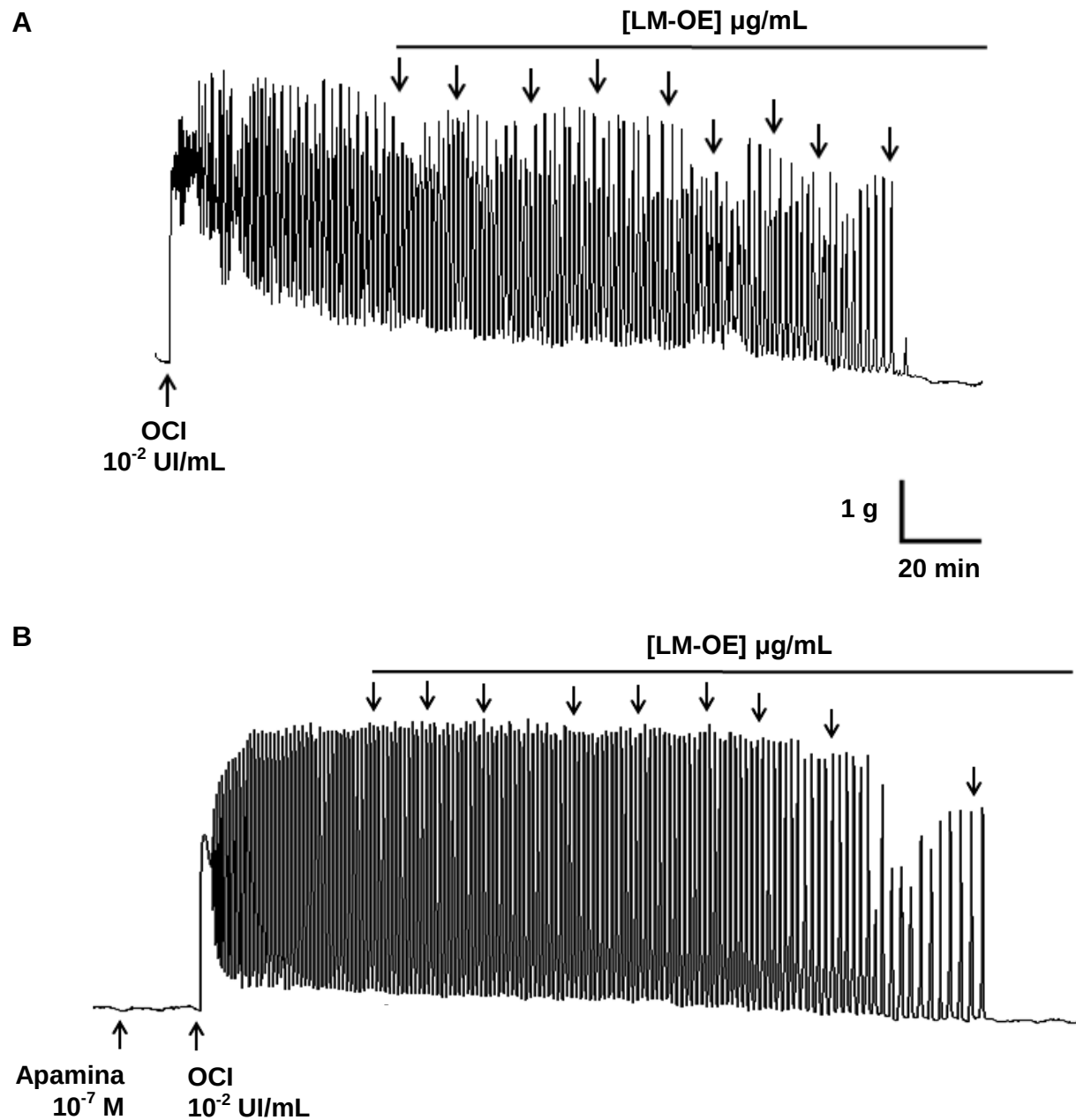
Gráfico 6 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (◇) de 10^{-3} M de TEA⁺ em rata.



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

Fonte: Silva, 2015.

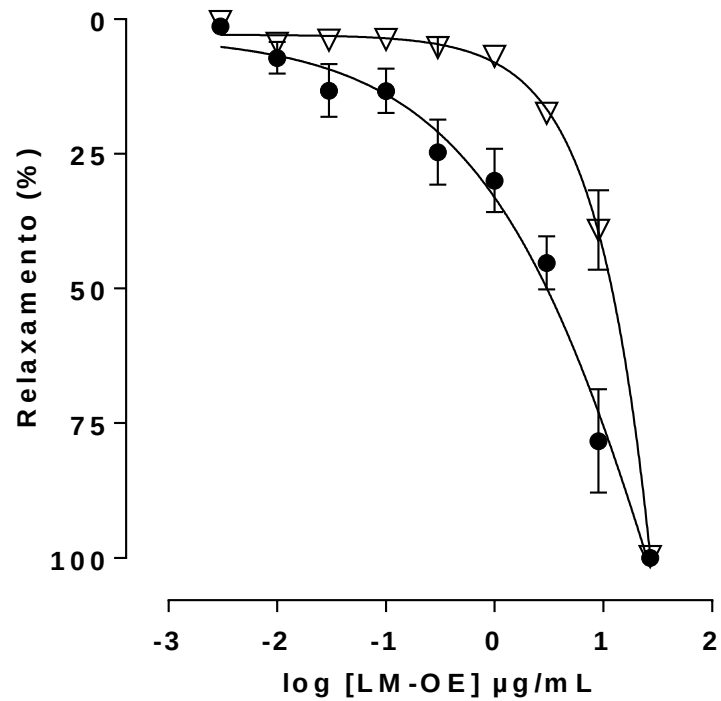
Figura 19 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 10^{-7} M de apamina em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**A** e **B**), OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

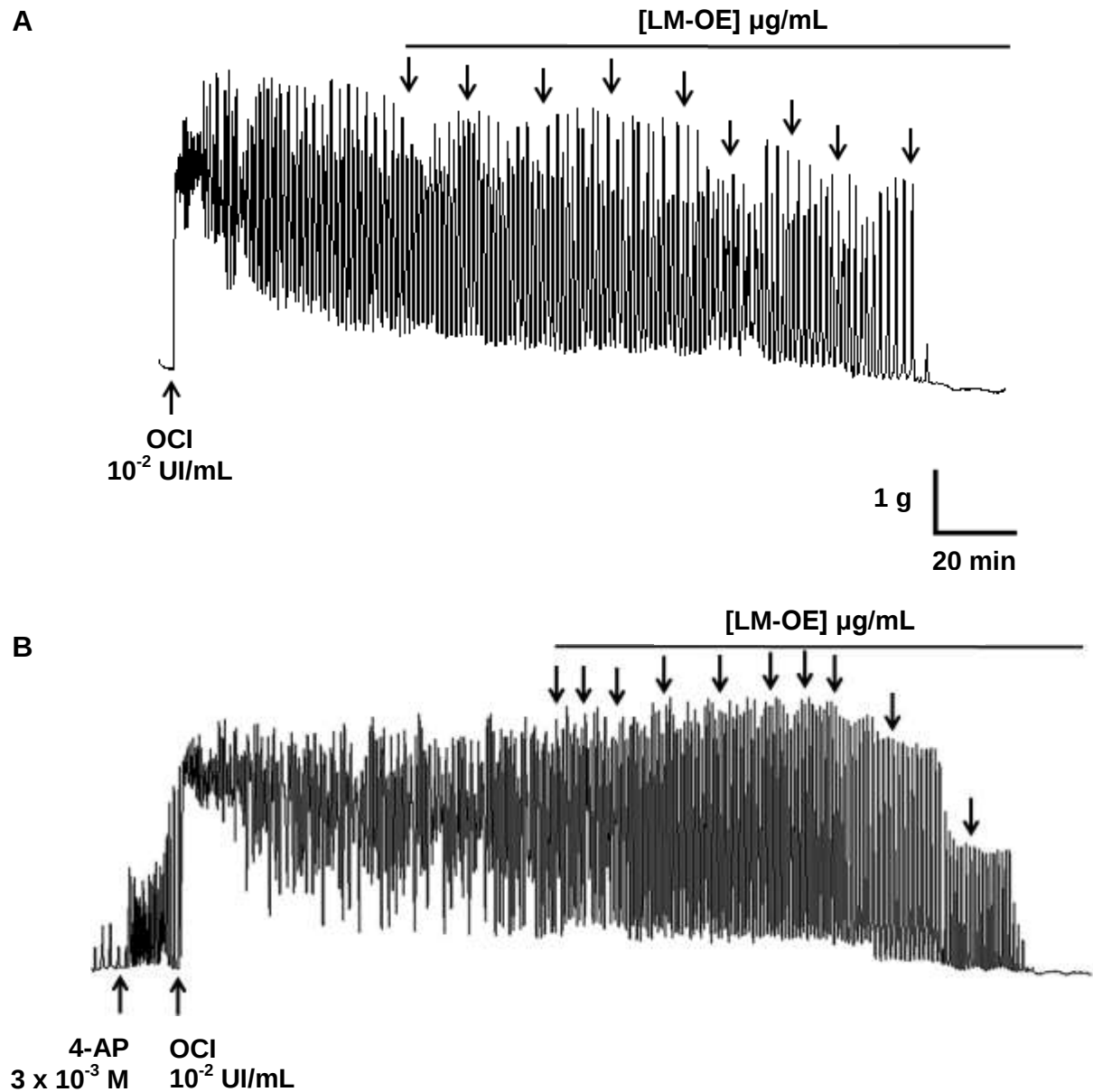
Gráfico 7 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (▽) de 10^{-7} M de apamina em rata.



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

Fonte: Silva, 2015.

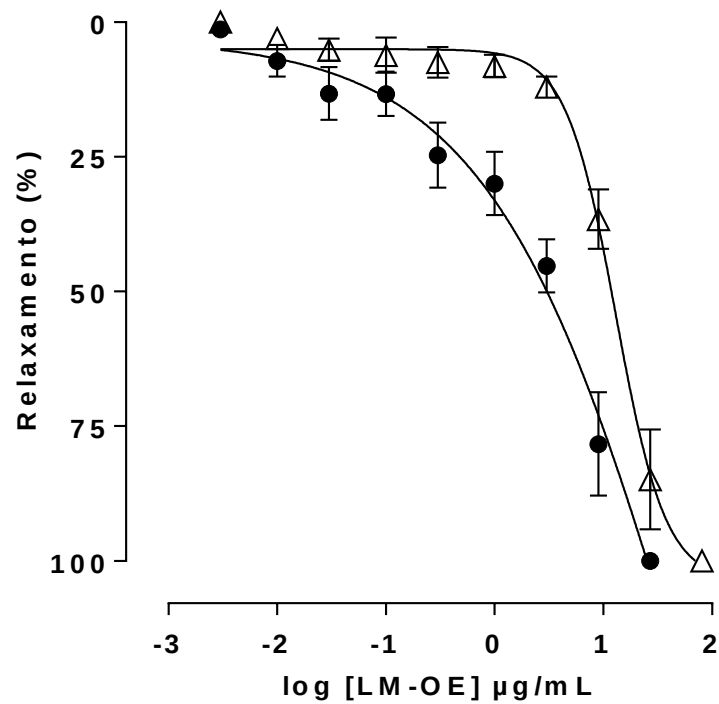
Figura 20 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 3×10^{-3} M de 4-AP em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Silva, 2015.

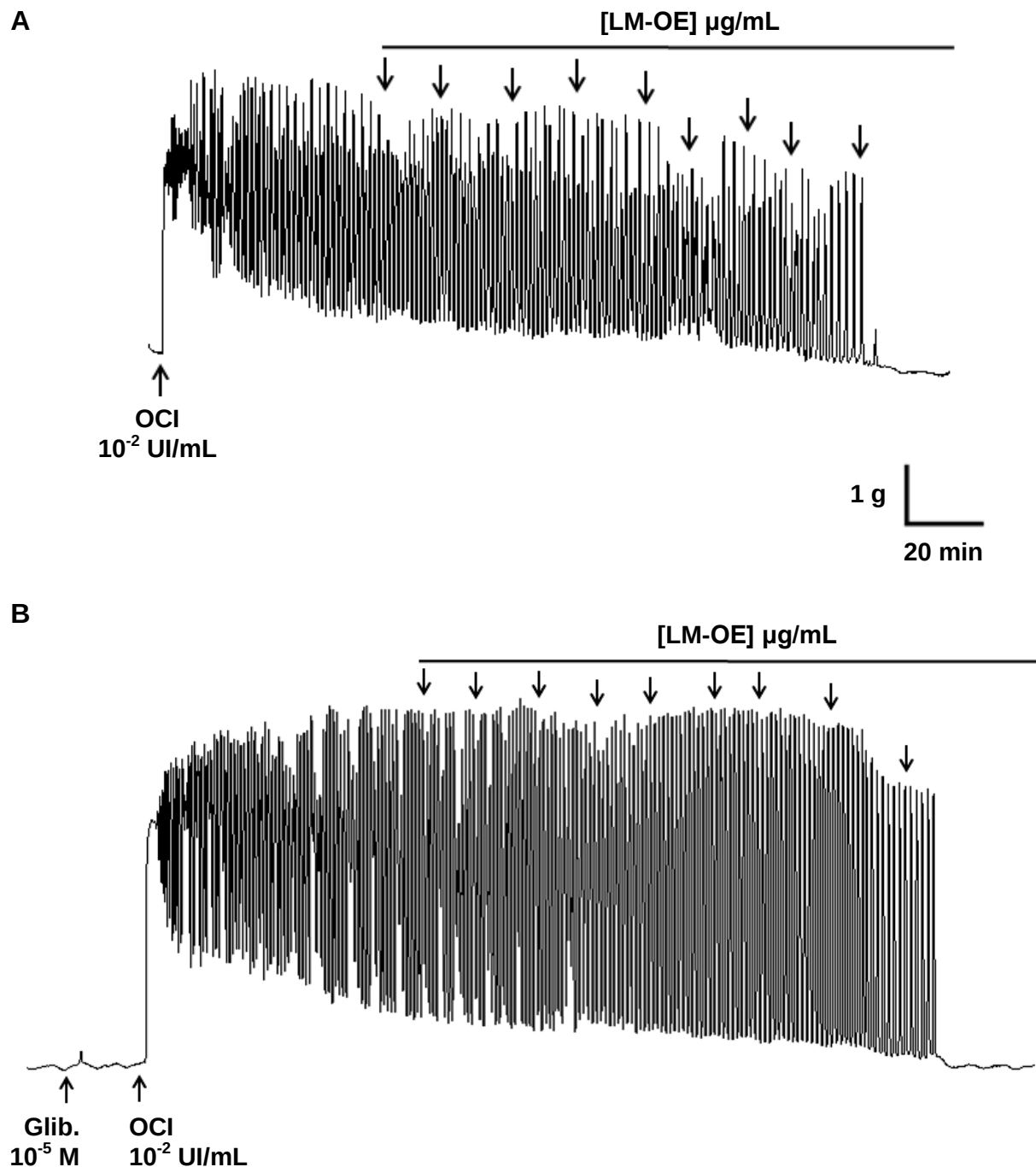
Gráfico 8 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença ($\triangle$) de 3×10^{-3} M de 4-AP em rata.



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

Fonte: Silva, 2015.

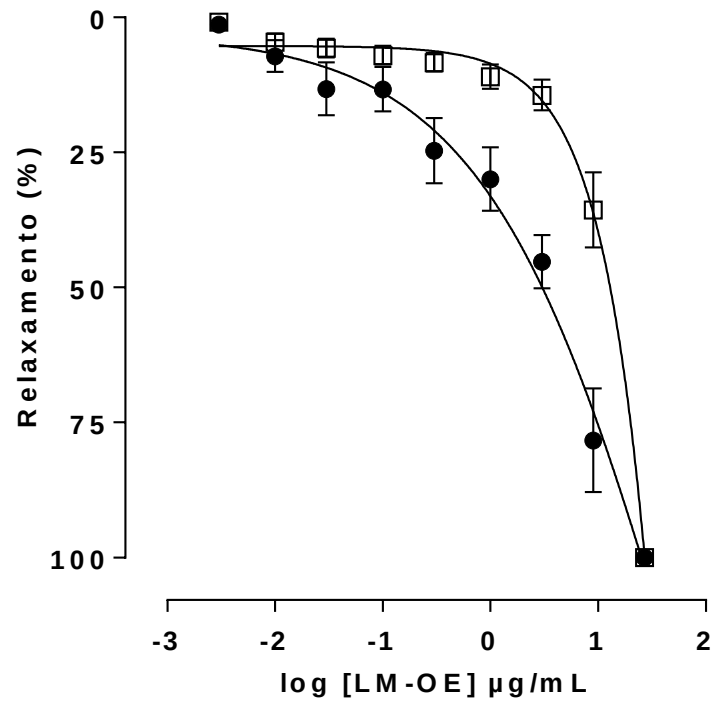
Figura 21 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-5} M de glibenclamida em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A e B), OCI = ocitocina; Glib. = glibenclamida.

Fonte: Silva, 2015.

Gráfico 9 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●) e na presença (□) de 10^{-5} M de glibenclamida em rata.



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

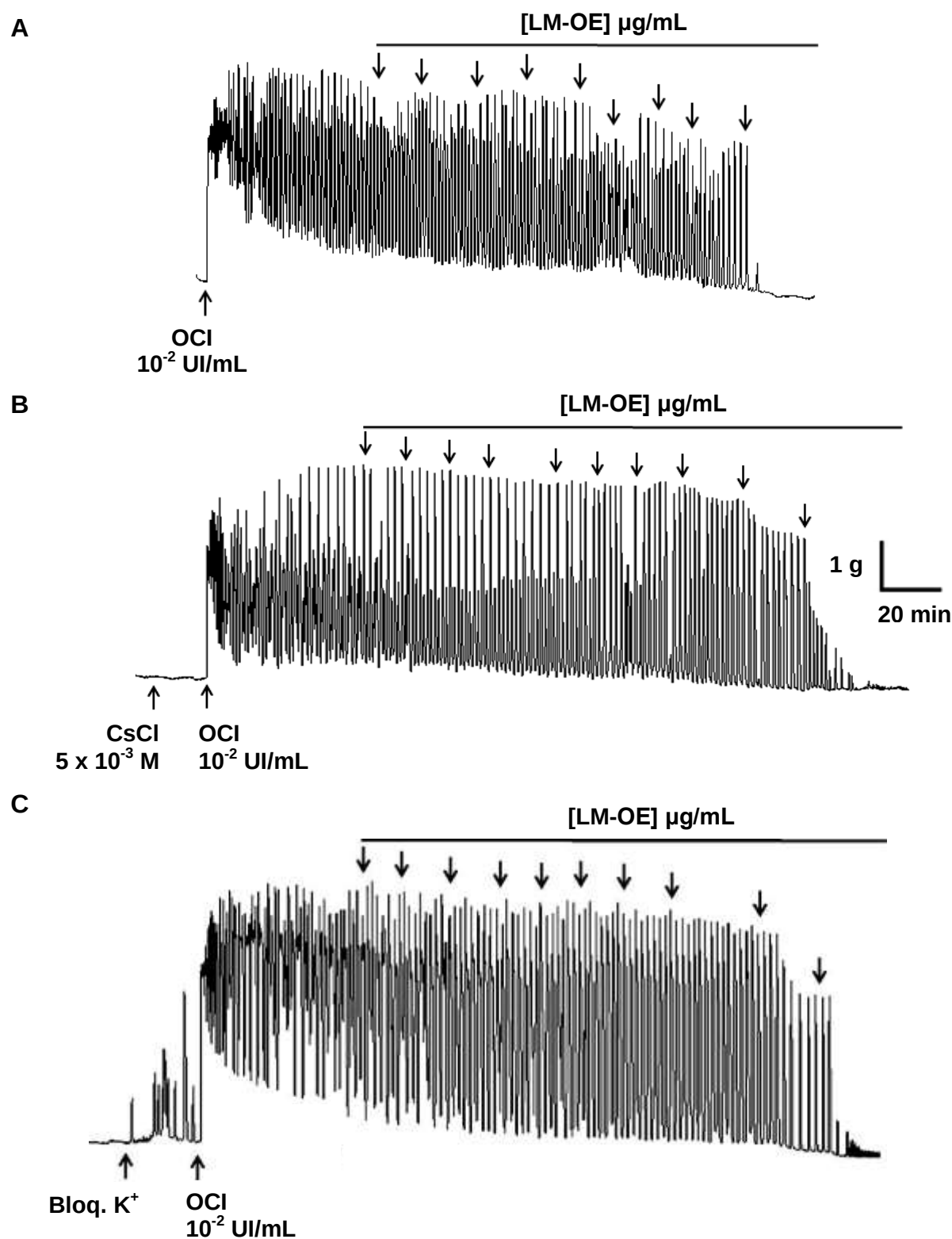
Fonte: Silva, 2015.

5.1.2.3 Avaliação da participação de subtipos de canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de bloqueadores seletivos

Na presença simultânea de 10^{-5} M de glibenclamida, de 10^{-3} M de TEA⁺, de 10^{-7} M de apamina e de 3×10^{-3} M de 4-AP, bloqueadores dos K_{ATP} , dos BK_{Ca} , dos SK_{Ca} e dos K_V , respectivamente, o LM-OE (0,003-81 µg/mL) relaxou o útero de rata desviando a curva concentração-resposta para a direita, em comparação com a curva-controle, de maneira significativa e atingindo 100% de E_{max} na concentração de 81 µg/mL (Figura 22 e Gráfico 10, n = 5).

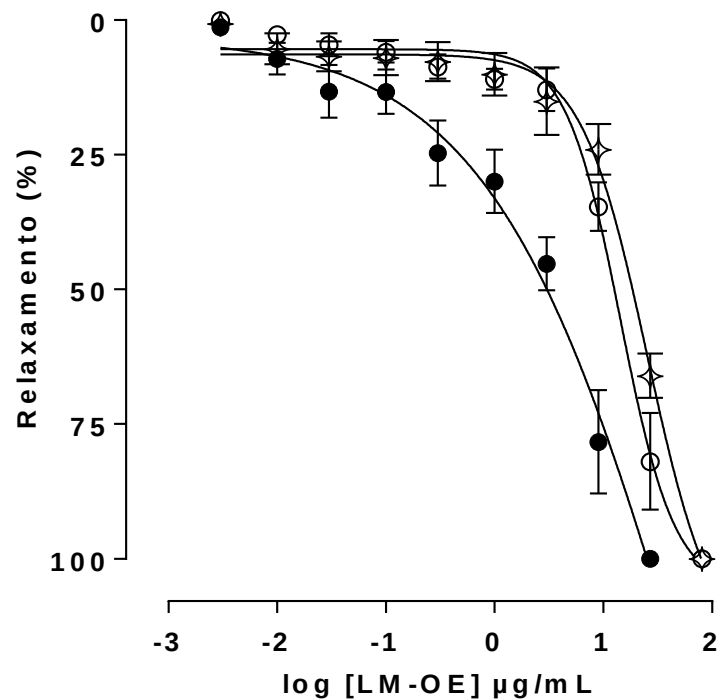
A potência relaxante do LM-OE na presença simultânea dos bloqueadores de canais de K^+ ($CE_{50} = 16,6 \pm 2,6$ µg/mL e $R^2 = 0,94 \pm 0,03$) foi reduzida em aproximadamente 6,1 vezes quando comparada a potência do óleo na ausência dos bloqueadores ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,8$ µg/mL), no entanto, não diferiu da potência relaxante do LM-OE na presença de CsCl ($CE_{50} = 11,7 \pm 1,5$ µg/mL) (Tabela 2).

Figura 22 – Registros representativos do efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A), na presença (B) de 5×10^{-3} M de CsCl e na presença simultânea (C) de bloqueadores de canais de K^+ em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (B e C), OCI = ocitocina; Bloq. K^+ = glibenclamida + TEA $^+$ + apamina + 4-AP.

Gráfico 10 – Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (●), na presença (○) de 5×10^{-3} M de CsCl e na presença simultânea (◈) de bloqueadores de canais de K^+ em rata.



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

Fonte: Silva, 2015.

Tabela 2 – Valores de $E_{\max}$, de CE_{50} e de R^2 do LM-OE na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K^+ em útero isolado de rata.

Bloqueadores	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
Ausência	100	$2,7 \pm 0,6$	$0,92 \pm 0,03$
CsCl	100	$11,7 \pm 1,5^*$	$0,96 \pm 0,01$
TEA ⁺	100	$10,5 \pm 0,3^{***}$	$0,94 \pm 0,02$
Apamina	100	$10,0 \pm 1,0^{**}$	$0,96 \pm 0,01$
4-AP	100	$12,4 \pm 2,0^{****}$	$0,96 \pm 0,01$
Glibenclamida	100	$9,7 \pm 0,9^{**}$	$0,95 \pm 0,01$
Bloqueadores seletivos de canais de K^+	100	$16,6 \pm 2,6^{***}$	$0,94 \pm 0,03$

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni; $*p < 0,05$ (ausência vs. CsCl); $**p < 0,01$ (ausência vs. apamina e glibenclamida); $***p < 0,001$ (ausência vs. TEA⁺ e bloqueadores seletivos de canais de K^+) e $****p < 0,0001$ (ausência vs. 4-AP), $n = 5$.

Fonte: Silva, 2015.



6 Discussão

Nesse trabalho, investigou-se o mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (LM-OE) em útero isolado de rata, e demonstrou-se que sua ação modula positivamente a via do óxido nítrico (NO/sGC/PKG), bem como os canais de K^+ (K_{ATP} , BK_{Ca} , SK_{Ca} e K_v), o que, consequentemente, leva ao relaxamento do músculo liso uterino.

Entre as camadas do útero, o miométrio, uma camada muscular espessa, possui importantes funções em processos fisiológicos como transporte do espermatozoide e implantação do embrião, bem como em manifestações de distúrbios, a exemplo da dismenorrea, da endometriose e da interrupção da gravidez por aborto espontâneo (AGUILLAR; MITCHELL, 2010). A cólica uterina acomete a grande maioria das mulheres em alguma etapa da sua vida, tornando 10% dessas pacientes incapazes de realizar atividades habituais diárias (PASSOS et al., 2008). A dor geralmente é mais intensa no início do ciclo menstrual e, em mais de 50% dos casos, é acompanhada por outros sintomas como náuseas, vômitos, palidez, cefaleia, diarreia, vertigem e desmaio (FONSECA et al., 2000).

A busca constante por substâncias ou produtos biologicamente ativos que possam vir a ser usados para combater tais distúrbios estimula o crescente interesse na composição química de óleos essenciais, assim como dos seus efeitos sobre a musculatura lisa (SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003; MAGALHÃES et al., 2004; ASEKUN; GRIERSON; AFOLAYAN, 2007; SILVA et al., 2010).

Os constituintes majoritários dos óleos essenciais, assim como de outras misturas complexas, a exemplo dos extratos podem exercer os mesmos efeitos da mistura como um todo, no entanto, é mais interessante estudar o complexo, uma vez que o conceito de sinergismo parece ser mais significativo nesse tipo de droga (BAKKALI et al., 2008). Recentemente, demonstramos que o LM-OE apresentou efeito tocolítico equipotente em útero de rata pré-contráído com KCl ($CE_{50} = 5,0 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) ou com ocitocina ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), no entanto, frente às contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644, um ativador de Ca_v1 , sua eficácia foi praticamente abolida, indicando um bloqueio indireto dos Ca_v . Também foi demonstrado que seus constituintes isolados (carvacrol, timol e a mistura timol-carvacrol) apresentaram atividade tocolítica em rata, todavia com baixa eficácia, o que reforça a possibilidade da atividade tocolítica do LM-OE ser devido ao complexo de substâncias como um todo (SILVA, 2013).

Os constituintes majoritários dos óleos essenciais, em sua maioria, são mono, di e sesquiterpenos (BAKKALI et al., 2008). A literatura relata que monoterpenos presentes no LM-OE (Anexos 1 e 2) apresentaram atividade relaxante como, por exemplo, timol em aorta (PEIXOTO-NEVES et al., 2010), mesentérica (ARAÚJO, 2011) e traqueia de rato (TEÓFILO, 2012) e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013); carvacrol em aorta de rato (PEIXOTO-NEVES et al., 2010) e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013); 4-terpineol em aorta de rato (JOCA, 2012), *p*-cimeno em traqueia de rato (TEÓFILO, 2012) e γ -terpineno em jejuno de coelho (ASTUDILLO et al., 2004), bem como do sesquiterpeno β -cariofileno em aorta (FARIAS, 2006) e traqueia de rato (TEÓFILO, 2012).

Com base nessas premissas e na evidência de que o LM-OE relaxou, de maneira dependente de concentração, o útero de rata pré-contráído com ocitocina por um mecanismo que, provavelmente, bloqueia indiretamente o influxo de Ca^{2+} pelos Ca_v1 (SILVA, 2013), decidiu-se dar continuidade ao estudo na tentativa de caracterizar a participação de outras vias de transdução no efeito tocolítico do LM-OE.

Sabendo-se que os Ca_v1 são inibidos por fosforilação na subunidade α_1 pela PKG e que essa, por sua vez, é ativada pelo aumento de cGMP proveniente da estimulação da sGC pelo NO, um radical livre e gás solúvel, formado a partir da atividade catalítica da enzima NOS sobre o substrato L-arginina na presença do cosubstrato oxigênio molecular e de cofatores como NADPH, FAD, FMN, zinco, BH_4 e do complexo Ca^{2+} -CaM (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988; FUKUTO; CHAUDHURI, 1995; REMBOLD, 1996; CHAUD et al., 1997; WRAY et al., 2003; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012), decidiu-se avaliar o efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na presença de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; KIRKEBOEN; STRAND; 1999), para verificar se esse efeito seria dependente da via do NO.

As funções fisiológicas do NO estão relacionadas com lesões celulares, transdução de sinal e regulação da resistência vascular, assim como da atividade do miométrio, sendo considerado um relaxante endógeno que contribui para a quiescência uterina durante a gravidez, enquanto que para realização do parto, esse mediador tem sua produção modulada negativamente (AL-HIJJI; LARSSON; BATRA, 2001; KHORRAM; HAN, 2009).

A literatura relata a existência de três isoformas distintas de NOS e todas são encontradas em útero de rata, sendo que a eNOS não sofre alteração de expressão em animais não grávidos e grávidos, a nNOS é expressa apenas em animais não grávidos e a iNOS tem sua expressão aumentada durante a gravidez (DONG; GANGULA; YALLAMPALLI, 1996). Também é relatado que em ratas não grávidas o NO é produzido pelas fibras nervosas via nNOS (CHAUD et al., 1997). Em útero humano, a isoforma predominante no endométrio é a eNOS, que tem sua expressão variada durante o ciclo menstrual (HAN; MAGEE; KHORRAM, 2005).

Neste estudo, verificou-se que a curva concentração-resposta de relaxamento do LM-OE na presença do L-NAME, um inibidor de NOS, foi desviada para a direita, com redução da potência em aproximadamente 9,5 vezes quando comparada a curva na ausência desse inibidor (Gráfico 1 e Tabela 1). Este resultado sugere que o LM-OE estaria modulando positivamente a via do NO para relaxar o útero isolado de rata.

Em contrapartida, no estudo realizado por Ferreira (2014) foi demonstrado a não participação da via do NO no efeito relaxante do óleo essencial de *Rollinia leptopetala* em útero isolado de rata.

As isoformas de NOS têm como substrato o aminoácido L-arginina. Essas enzimas promovem uma reação catalítica de oxidação da L-arginina formando NO e L-citrulina. O L-NAME é considerado um falso substrato das NOS, dessa forma não sofre catálise e atua por um mecanismo de competição pelo sítio de ligação da L-arginina (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Yallampalli et al. (1994) relataram a reversão do efeito relaxante de L-arginina sobre as contrações espontâneas em útero de rata grávida pela adição do inibidor competitivo L-NAME, assim como Bulbul et al. (2007) observaram que L-NNA, um inibidor de NOS, e L-arginina adicionados simultaneamente diminuíram a resposta contrátil em ratas ovariectomizadas e estrogeinizadas.

Para verificar a reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME e confirmar a participação da NOS no efeito tocolítico do LM-OE, realizou-se experimentos na presença simultânea de L-NAME e de L-arginina (Adaptado de BULBUL et al., 2007). Se realmente o LM-OE estivesse ativando a NOS para promover o relaxamento do útero de rata, a L-arginina deveria reverter o efeito inibitório do L-NAME e, desta forma, o relaxamento na presença simultânea de L-NAME e de L-arginina deveria ser similar ao efeito do óleo sozinho sobre a contração induzida

por ocitocina. Uma vez que, os resultados obtidos demonstraram que a L-arginina reverteu o efeito inibidor do L-NAME, bem como a curva de relaxamento do LM-OE na presença apenas da L-arginina foi sobreposta a curva-controle, confirma-se que o mecanismo de ação tocolítica do LM-OE envolve a ativação da NOS, entretanto, como o efeito tocolítico do óleo essencial não foi completamente abolido na presença do L-NAME, sugere-se que o LM-OE pode estar agindo em outro(a) sítio/via para promover relaxamento em útero isolado de rata (Gráfico 2 e Tabela 1).

O NO formado induz o relaxamento por ativação da sGC, e essa catalisa a formação de cGMP a partir de GTP (ARNOLD et al., 1977; IGNARRO, 1990; LOHSE et al., 1998), ou por ativação direta de canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014). A sGC é expressa no citosol e medeia funções como inibição da agregação plaquetária, transdução de sinais em neurônios, imunomodulação e relaxamento do músculo liso (COLLIER; VALLANCE, 1989).

Uma vez que sugere-se a ativação de NOS pelo LM-OE com consequente formação de NO, e como a formação dessa molécula culmina com a ativação da sGC, nos questionamos se o óleo essencial estaria ativando essa enzima para promover seu efeito tocolítico em rata. Para confirmar ou descartar essa hipótese investigou-se o efeito relaxante do LM-OE na presença de ODQ, um inibidor de sGC (GARTHWAITE et al., 1995). Foi observado que a potência relaxante do LM-OE foi reduzida em aproximadamente 3,7 vezes (Gráfico 3 e Tabela 1) sugerindo o envolvimento da sGC/cGMP no efeito tocolítico do óleo essencial.

O aumento na concentração de cGMP, por sua vez, ativa a PKG que fosforila, ativando ou inibindo, alvos distintos para promover o relaxamento do músculo liso (MURAD, 1994). Entre esses alvos pode-se citar: canais de K^+ , Ca_v , (REMBOLD, 1996; MAKHLOUF; MURTHY, 1997; WRAY et al., 2003), SERCA, PMCA, trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1989), IP_3R (WOODRUM; BROPHY, 2001), MLCK (REMBOLD, 1992) e MLCP (AGUILLAR; MITCHELL, 2010).

A PKG, uma proteína serina/treonina cinase, é considerada o principal mediador intracelular para ações do cGMP e medeia a tradução do estímulo extracelular em função biológica. São conhecidas duas formas dessa proteína, a PKG I e a PKG II, sendo a primeira amplamente distribuída em tecidos de mamíferos, a exemplo do cerebelo, de plaquetas e do músculo liso. A PKG I divide-se em duas isoformas a $I\alpha$, encontrada no sistema vascular, rins,

suprarrenais, glândulas e útero, e a $I\beta$, localizada, principalmente em útero humano. Já a PKG II é encontrada no cérebro, no intestino, nos pulmões, nos rins e nos ossos (TAMURA et al., 1996; LUCAS et al., 2000).

Diante dos resultados e com a premissa de que o LM-OE estaria ativando a via NO/sGC que, conseqüentemente, ativa a PKG, foram realizados experimentos para verificar a participação dessa proteína no efeito tocolítico do LM-OE. Para tanto, utilizou-se o Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG (BUTT et al., 1995). Os resultados demonstraram que a potência relaxante do óleo essencial (Gráfico 4 e Tabela 1) foi atenuada em aproximadamente 3,3 vezes na presença desse inibidor. Dessa maneira, pode-se inferir, em nível funcional, a participação da PKG no mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata.

Entre os alvos da PKG, estão os Ca_v , que são inibidos, e os canais de K^+ , a exemplo dos BK_{Ca} que são ativados e permitem a hiperpolarização da membrana plasmática e conseqüente o bloqueio indireto dos Ca_v , favorecendo o relaxamento do músculo liso. A literatura também relata que o NO pode ativar diretamente os canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; REMBOLD, 1996; MAKHLOUF; MURTHY, 1997; WRAY et al., 2003; LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014).

Diversos estudos evidenciam a importância no aumento da atividade de canais de K^+ distintos para promover o relaxamento do músculo liso, tanto em nível funcional como eletrofisiológico, entre eles podemos citar: K_v em íleo (LIMA, 2004; CAVALCANTE, 2008; CORREIA, 2013; VASCONCELOS, 2013) e traqueia de cobaia (MARTINS et al., 2013), aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007; MONTEIRO, 2013; MACÊDO et al., 2014) e útero de rata (FERREIRA, 2014); BK_{Ca} em íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993; SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; 2008; LIMA, 2008; CORREIA, 2013; MONTEIRO, 2013), miométrio humano (ANWER et al., 1993; MEERA et al., 1995), traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993), de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994; RIBEIRO, 2007; MARTINS et al., 2013) e de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004) e útero de rata (LIMA, 2008, TRAVASSOS et al. 2009); SK_{Ca} em aorta de rato (SILVA et al., 1994; MONTEIRO, 2013; MACÊDO et al., 2014), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996), traqueia (MARTINS et al., 2013; MACÊDO et al., 2015) e íleo de cobaia

(CAVALCANTE, 2008; MACÊDO, 2008; MONTEIRO, 2013); K_{ATP} em íleo (SUN; BENISHIN, 1994; CAVALCANTE, 2008; MACÊDO, 2008; VASCONCELOS, 2013), uretra (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999) e traqueia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995; MARTINS et al., 2013), traqueia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000), íleo (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996) e aorta de rato (MONTEIRO, 2013; MACÊDO et al., 2014).

Fundamentando-se no fato de que o LM-OE bloqueou indiretamente o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 (SILVA, 2013) e em evidências farmacológicas de que esse óleo essencial estaria modulando positivamente a via NO/sGC/PKG, decidiu-se investigar a participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE, uma vez que, essa modulação pode culminar com a ativação dos canais de K^+ , e esses, consequentemente, inibem indiretamente os Ca_v .

Para confirmar ou descartar essa hipótese, avaliou-se o efeito do óleo essencial sobre as contrações induzidas por ocitocina na presença de CsCl, um bloqueador não seletivo de canais de K^+ (LATORRE et al., 1989). Observou-se que a curva-controle de relaxamento do LM-EO na presença do CsCl foi desviada para direita com redução da potência relaxante em aproximadamente 4,3 vezes (Gráfico 5 e Tabela 2). Esse resultado indica a participação desses canais no mecanismo de ação tocolítica do LM-OE.

Os subtipos de canais de K^+ mais abundantes e mais estudados em músculo liso uterino são os BK_{Ca} , os SK_{Ca} , os K_v e os K_{ATP} , sendo que o efluxo desses íons em células miométriais resulta em repolarização de membrana e é considerado a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Uma vez que, foi confirmado o envolvimento de canais de K^+ no efeito tocolítico do LM-OE, tornou-se necessário elucidar quais subtipos desses canais seriam os responsáveis por esse efeito. Para tanto, utilizou-se bloqueadores seletivos de canais de K^+ .

Os BK_{Ca} são os subtipos de canais de K^+ mais estudados no músculo liso uterino por serem majoritários e exercerem uma significativa corrente de repolarização nesse músculo (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Sua ativação induz um mecanismo de retroalimentação negativa causando hiperpolarização e redução da duração do potencial de ação no músculo liso, o que

diminui a entrada de Ca^{2+} através dos Ca_V e impede a contração (PONTE et al., 2012).

Os SK_{Ca} , também presentes em útero, desencadeiam uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a geração do potencial de ação, e assim o relaxamento do músculo liso (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Esses canais atenuam a ativação dos Ca_V1 e deprimem as contrações fásicas em útero de camundongo (BROWN et al., 2007), bem como estão envolvidos no relaxamento induzido por NO em útero não grávido e grávido de humanos (MODZELEWSKA et al., 2003; MODZELEWSKA; KLESZCZEWSKI; KOSTRZEWSKA, 2003).

Os K_V também são amplamente expressos em músculo liso uterino, sendo responsáveis pela repolarização e, dessa forma, por manter o potencial de repouso da membrana, ou seja, o tônus basal do útero (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Entre os subtipos de canais de K^+ presentes em útero também pode-se citar os K_{ATP} , cuja característica primária é a sua inibição por altas concentrações intracelulares de ATP, por sulfonilureias como a glibenclamida e a tobutamida e por baixas concentrações extracelulares de Ba^{2+} (NOMA, 1983; STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). A literatura relata que a isoforma majoritária desse canal em miométrio é a $\text{K}_{\text{ir}}6.1/\text{SUR2B}$ (CHIEN et al., 1999; CURLEY et al., 2002).

Os resultados evidenciaram o deslocamento da curva concentração-resposta de relaxamento do LM-OE (Gráficos 6-9 e Tabela 2) para a direita e a redução da potência relaxante em aproximadamente 3,9; 3,7; 4,6 e 3,6 vezes para $\text{TEA}^+ 10^{-3} \text{ M}$ (bloqueador dos BK_{Ca}), apamina (bloqueador dos SK_{Ca}), 4-AP (bloqueador dos K_V) e glibenclamida (bloqueador dos K_{ATP}), respectivamente (PIPER et al., 1990; HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997; TSAI et al., 1998; AYAR et al., 2001; AARONSON et al., 2006). Com isso confirma-se, em nível funcional, a participação dos subtipos de canais de K^+ , BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V e K_{ATP} , no mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em rata. Observou-se ainda, que não havia diferença entre as potências relaxantes do óleo essencial na presença dos bloqueadores quando comparadas entre si, indicando que não haveria prevalência de ação de determinado subtipo de canal.

No entanto, nos questionamos se haveria um efeito sinérgico do LM-OE sobre os subtipos distintos de canais de K^+ . Para responder esse questionamento incubou-se, simultaneamente, os bloqueadores seletivos dos quatro subtipos desses

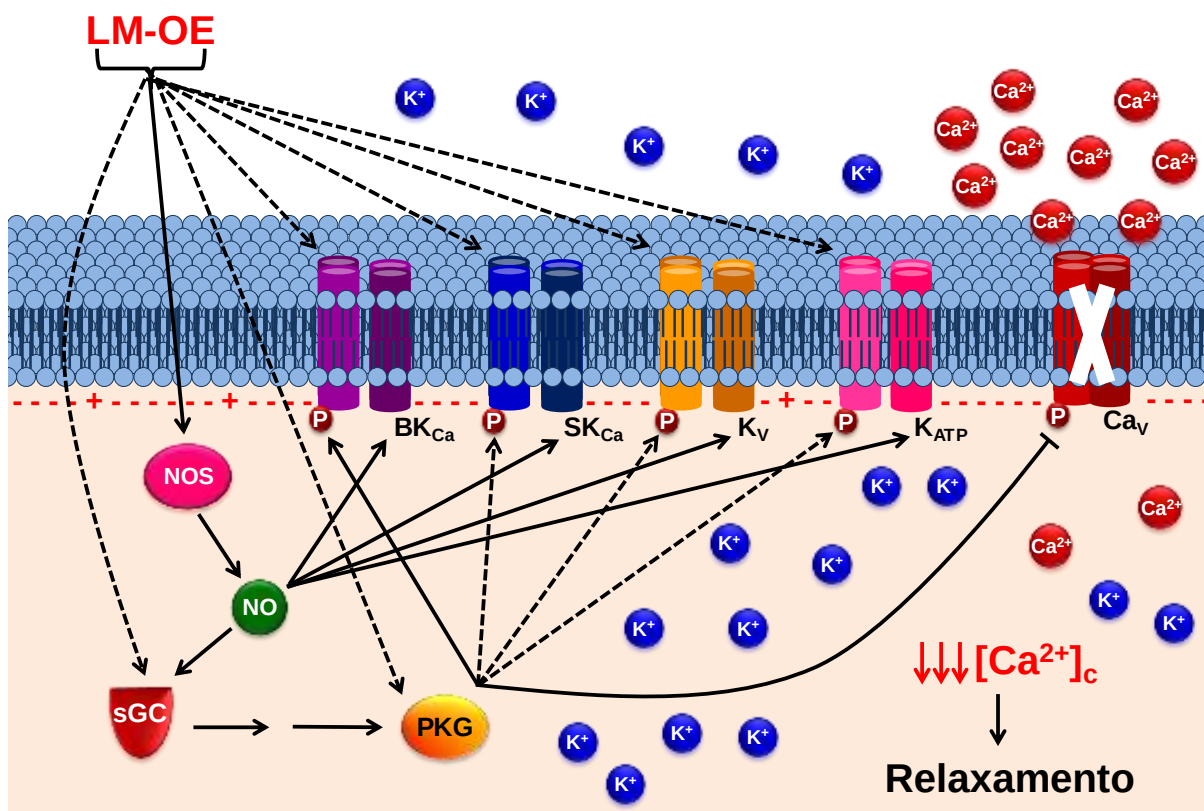
canais. Observou-se a redução da potência relaxante do LM-OE na presença simultânea desses bloqueadores, todavia não foi observado nenhum efeito sinérgico. Além disso, ao comparar-se essa curva concentração-resposta a curva de relaxamento do LM-OE na presença de CsCl foi observado uma sobreposição da potência relaxante (Gráfico 10 e Tabela 2). Dessa forma, pode-se sugerir que todos os subtipos de canais de K^+ investigados estão participando do efeito tocolítico do LM-OE e que suas ativações podem ser via NO/sGC/PKG.

Em estudo realizado por Oliveira (2013) foi evidenciado que o efeito espasmolítico do LM-OE independe da ativação dos canais de K^+ em íleo isolado de cobaia, sendo o mecanismo caracterizado por inibir os Ca_v e reduzir a $[Ca^{2+}]_c$. No entanto, Martins et al. (2013) observaram a participação de quatro subtipos de canais de potássio no efeito relaxante do diterpeno traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia e Travassos et al. (2009) demonstraram a participação dos BK_{Ca} e dos SK_{Ca} no efeito tocolítico do diterpeno labdano-302 em útero isolado de rata.

Diante do exposto, pode-se inferir que o LM-OE está modulando positivamente a via NO/sGC/PKG, que por sua vez, ativa os canais de K^+ , mais especificamente os BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_v e K_{ATP} (Tabela 2), e inibe indiretamente os Ca_v (SILVA, 2013). Uma vez que a literatura relata que o NO ativa diretamente os canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014), sugere-se que o LM-OE pode estar ativando direta ou indiretamente os canais de K^+ , o que desencadearia uma repolarização/hiperpolarização de membrana, consequentemente, redução do influxo de Ca^{2+} via Ca_v , reduzindo a $[Ca^{2+}]_c$ e, por fim, produziria o relaxamento do útero isolado de rata (Figura 23).

É notável a importância de estudos envolvendo o músculo liso uterino na tentativa de descoberta de novas drogas/fármacos que possam vir a ser utilizadas terapeuticamente no combate ao trabalho de parto prematuro e/ou cólicas menstruais ou como ferramentas farmacológicas para um melhor entendimento do mecanismo excitação/contração do útero. Diante disso, este trabalho torna-se relevante ao caracterizar, em parte, o mecanismo de ação tocolítica do LM-OE, mostrando que os óleos essenciais são compostos de interesse no tocante a modulação da contratilidade uterina.

Figura 23 – Proposta de mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. em rata.



O LM-OE modula positivamente a via $NO/sGC/PKG$, assim como os subtipos de canais de K^+ (BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V e K_{ATP}) diretamente e/ou via NO e PKG , promovendo o efluxo de K^+ com consequente repolarização/hiperpolarização da membrana e bloqueio indireto dos Ca_V , que também são inibidos pela PKG . Esses eventos intracelulares culminam com a diminuição da concentração citosólica de cálcio, promovendo o relaxamento do músculo liso uterino.

Fonte: Silva, 2015.



7 Conclusões

Na investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (LM-OE) (Verbenaceae) em rata, pode-se concluir que há ativação da(os):

- Sintase do óxido nítrico;
- Ciclase de guanilil solúvel;
- Proteína cinase G, que inibe os Ca_v ;
- BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_v e K_{ATP} , diretamente e/ou via NO e PKG, levando a uma repolarização/hiperpolarização de membrana que, indiretamente, reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$ e, conseqüentemente, relaxa o músculo liso uterino.



Referências

- AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca^{2+} -activated, K^{+} channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 815-824, 2006.
- ABAD, M. J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings**, v. 17 (Supl. A), p. 108, 1995.
- ABDELWAHAB, S. I.; MOHAMED, A. H.; MOHAMED, O. Y.; OALL, M.; TAHA, M. M. E.; MOHAN, S.; NOORDIN, M. I.; MUSTAFA, M. R.; ALKHARFY, K. M. Erectogenic effects of *Clerodendron capitatum*: involvement of phosphodiesterase type-5 inhibition. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, 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.; BENSON, H. E.; FACCENDA, E.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; CATTERALL, W. A.; SPEDDING, M.; PETERS, J. A.; HARMAR, A. J.; CGTP COLLABORATORS. The concise guide to pharmacology 2013/14: Ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, p. 1607-1651, 2013.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels (GRAC), 5nd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 (Supl. 1), p. S1-S324, 2011.
- AL-HIJJI, J.; LARSSON, I.; BATRA, S. Effect of ovarian steroids on nitric oxide synthase in the rat uterus, cervix and vagina. **Life Sciences**, v. 69, p. 1133-1142, 2001.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 5, 2005.
- ANTUNES, R. O. G.; SILVA, A. P. S.; SILVA, A. C. S.; OLIVEIRA, P. R.; TAVARES, J. F.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A.; SILVA, J. L. V. Relaxant effects of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) on isolated rat aorta and trachea. **Pharmacology**, v. 2 p. 82-86, 2012.

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.

ARAÚJO, I. G. A. **Efeitos hipotensor e vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu constituinte principal timol: envolvimento do bloqueio de canais para cálcio.** 2011. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis. **Food Chemistry**, v. 101, p. 995-998, 2007.

ASTUDILLO, A.; HONG, E.; BYE, R.; NAVARRETE, A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 102-106, 2004.

AYAR, A.; KUTLU, S.; YILMAZ, B.; KELESTIMUR, H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, p. 199-207, 2001.

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.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEGROW, F.; ENGELBERTZ, J.; FEISTEL, B.; LEHNFELD, R.; BAUER, K.; VERSPOHL, E. J. Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. **Planta Medica**, v. 76, n. 4, p. 311-318, 2010.

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

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

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, v. 395, p. 645-648, 1998.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 289-330, 1989.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BORZANI, A. C.; SANTOS, A. A.; TAVARES, J. F.; ABOULAFIA, J.; SILVA, J. L. V. Investigação da atividade tocolítica de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) em útero de rata. In: VIII Encontro de Iniciação Científica – Formação Científica como Fator de Inovação e Mobilidade Social, 2010, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Ciências Biológicas, 2010, p. 54.

BOYLE, J. P.; TOMASIC, M.; KOTLIKOFF, M. I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **Journal of Physiology**, v. 447, p. 329-350; 1992.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**, Brasília, DF, p. 126, 2011.

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.

BROWN, A.; CORNWELL, T.; KORNIYENKO, I.; SOLODUSHKO, V.; BOND, C. T.; ADELMAN, J. P.; TAYLOR, M. S. Myometrial expression of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels depresses phasic uterine contraction. **The American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 292, p. C832-C840, 2007.

BUECHLER, W. A.; NAKANE, M.; MURAD F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 174, n. 1, p. 351-7, 1991.

BULBUL, A.; YAGCI, A.; ALTUNBAS, K.; SEVIMLI, A.; CELIK, H. A.; KARADENIZ, A.; AKDAG, E. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1156-1168, 2007.

BURKE, M. A.; MUTHARASAN, R. K.; ARDEHALI, H. The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the K_{ATP} channel. **Circulation Research**, v. 102, n. 2, p. 164-176, 2008.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 1612-1661, 2014.

BUTT, E.; PÖHLER, D.; GENIESER, H-G.; HUGGINS, J. P.; BUCHER, B. Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 3110-3116, 1995.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPOS, J. M. S.; SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; PINHEIRO, L. C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L. F. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 291, n. 1-2, p. 133-140, 2010.

CASTEELS, R.; SUZUKI, H. The effect of histamine on the smooth muscle cells of the ear of the rabbit. *Pfluegers Arch.* **European Journal of Physiology**, v. 387, p. 17-25, 1980.

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

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

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CHAUD, M. A.; FRANCHI, A. M.; BERON DE ASTRADA, M.; GIMENO, M. F. Role of nitric oxide on oxytocin. evoked contractions and prostaglandin synthesis in isolated pregnant rat uterus. **Prostaglandins, Leukotenes and Essential Fatly Acids**, v. 57, n. 3, p. 323-329, 1997.

CHAUD, M.; FRANCHI, A. M.; RETTORI, V.; MCCANN, S. M.; GIMENO, M. F. Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin F₂ a in the estrogenized rat uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11049-11054, 1997.

CHÁVEZ, J. P. **Terpenóides de *Ocotea corymbosa* [Meissn] Mez.** 1991. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHIEN, E. K.; ZHANG, Y.; FURUTA, H.; HARA, M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea binding regulatory subunit 2. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 180, p. 1121-1126, 1999.

COLLIER, J.; VALLANCE, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 11, p. 427-31, 1989.

CORREIA, A. C. C. **Estudo comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl.** 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CRUZ, T. CABO, M. M.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Composition and pharmaceutical activity of the essential oil of *Satureja obovata* L. Spasmolytic activity. **Journal Fitoterapia**, v. 61, n. 3, p. 247-251, 1990.

CURLEY, M.; CAIRNS, M. T.; FRIEL, A. M.; McMEEL, O. M.; MORRISON, J. J.; SMITH, T. J. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, p. 941-5, 2002.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

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.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca²⁺ entry through plasma membrane IP₃ receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.

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

DEVI, K. P.; SREEPRIYA, M.; DEVAKI, T.; BALAKRISHNA, K. Antinociceptive and hypnotic effects of *Premna tomentosa* L. (Verbenaceae) in experimental animals. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 261-264, 2003.

DONG, Y. L.; GANGULA, P. R. R.; YALLAMPALLI, C. Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p. 249-254, 1996.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; SINGH, R.; SHARMA, V. P.; SUBBARAO, S. K. Isolation of repellent ingredients from *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers and their repellency against Aedes mosquitoes. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 509-511, 2003.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, p. 533-535, 2000.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

FARIAS, M. S. Q. **Efeitos do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* Muell. Arg. e do β -cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta de rato.** 2006. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

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.** 2014. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R.; DIEGOLI, M. S.; ARIE, W. M. Y. Dismenorréia. In: HALBE, H. W., **Tratado de Ginecologia**. São Paulo: Roca, p. 748-54, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FOWLER, M. W. Review plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1797-1804, 2006.

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 165-194, 1995.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMÓN-DAVID, P.; KEITA, A.; GUINDO, M.; KOITA, N.; DIALLO, D.; DOUMBO, O. Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, 'Malarial-5'. **Fitoterapia**, v. 64, p. 423-426, 1993.

GORZALCZANY, S.; SÜLSEN, V.; REDKO, F.; VESCINA, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Choleric and antispasmodic effects of Lippia integrifolia aqueous extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 16-20, 2008.

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

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

HAN, G.; MAGEE, T.; KHORRAM, O. Regulation of nitric oxide synthase isoforms by estrogen in the human endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 84, Supl 2, p. 12220-1227, 2005.

HARTENECK, C.; KOESLING, D.; SÖLING, A.; SCHULTZ, G.; BÖHME, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Letters**, v. 272, n. 1-2, p. 221-223, 1990.

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.

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.

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 27, p. 1-21, 2011.

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.

HOBBS, A. J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 12, p. 484-91, 1997.

HOFMANN, F.; BERNHARD, D.; LUKOWSKI, R.; WEINMEISTER, P. cGMP regulated protein kinases (cGK). In: **cGMP: generators, effectors and therapeutic implications**. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, p. 1-583, 2009.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689-1633, 1998.

HUBINONT, C.; DEBIEVE, F. Prevention of Preterm Labour: 2011 Update on Tocolysis. **Journal of Pregnancy**, 2011.

HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a relaxant of the isolated rat uterus: comparison with its mechanism of action in vivo. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 829-833, 1997.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide – A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 477-483, 1990.

JACINTO, K. R.; SILVA, I. A.; CARVALHO, V. S.; CAVALCANTI, V. B.; TAVARES, J. F.; NOUAILHETAS, V. L. A.; BERALDO J.; SILVA, J. L. V. Etnofarmacologia de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae): Potencial propriedade gastrointestinal em ratos. In: XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos, 2011, Fortaleza. **Resumos...** Ceará: Conselho Federal de Farmácia, 2011, p. 175.

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

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

JOCA, R. P. M. M. **Ação vasorelaxante do terpinen-4-ol em aorta torácica de ratos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematic: a phylogenetic approach**. Sunderland, UK: Sinauer Associates, p. 419, 2002.

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.

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

KHORRAM, O.; HAN, G. The influence of progesterone on endometrial nitric oxide synthase expression. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5, p. 2157-2162, 2009.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 2165-2180, 2008.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 248-254, 1996.

KIRKEBOEN, K. A.; STRAND, O. A. The role of nitric oxide in sepsis – an overview. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 43, p. 275-288, 1999.

KLUEGER, P. A.; DAROS, M. R.; SILVA, R. M.; FARIAS, M. R.; DE LIMA T. C. M. Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* Will. N.E. Br. (Verbenaceae). In: INTERNATIONAL JOINT SYMPOSIUM: Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas. 1997. **Abstracts...** Poster Session, 2: B23, 1997.

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

KOESLING, D.; BÖHME, E.; SCHULTZ, G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal transducing enzymes. **FASEB Journal: official publication of the Federation of the American Societies of Experimental Biology**, v. 5, n. 13, p. 2785-2791, 1991.

KREBS, J.; MICHALAK, M. **Calcium: A Matter of Life or Death**. Oxford, UK: Elsevier, p. 167, 2007.

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

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 13-39, 2012.

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

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-79, 2006.

LEMOES, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; BARBOSA, R. C. S. B.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992.

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

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

LIMA, M. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; KANETO, C. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112-117, 2013.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; ROTH, G. The spasmolytic activity of the essential oils of scented *Pelargonium* (Geraniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 8, p. 583-584, 1997.

LOHSE, M. J.; FORSTERMANN, U.; SCHMITT, H. H. W. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p. 111-112, 1998.

LÓPEZ, A. A. M.; ROJAS, H. N. M.; JIMÉNEZ, M. C. A. Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 31, p. 105-111, 1979.

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.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 512, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 1030-1056, 2001.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375-413, 2000.

MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.

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

MACÊDO, C. L.; VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; MARTINS, I. R. R.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V. O.; SILVA, B. A. Mechanisms underlying the relaxant effect of galetin 3,6-dimethyl ether, from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, on guinea-pig trachea. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 69c, p. 434-442, 2015.

MACÊDO, C. L.; VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; MARTINS, I. R. R.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V. O.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Mechanisms underlying vasorelaxation induced in rat aorta by galetin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. **Molecules**, v. 19, p. 19678-19695, 2014.

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

MACLENNAN, D. H. Ca²⁺ signalling and muscle disease. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5291-5297, 2000.

MADEIRA, S. V. F.; RABELO, M.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, P. M. G.; MEIRELES, A. V. P.; MONTENEGRO, C.; LIMA, R. F.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomedicine**, v. 12, p. 506-509, 2005.

MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Spasmolytic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 539-546, 2004.

MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. **Cellular Signalling**, v. 9, n. 3, p. 269-276, 1997.

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, I. R. R.; SANTOS, R. F.; CORREIA, A. C. C.; OLIVEIRA, G. A.; MACÊDO, C. L.; MONTEIRO, F. S.; SANTOS, P. F.; CAVALCANTE, F. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Relaxant effect of Ent-7 α -hydroxytrachyloban 18-oic acid, a trachylobane diterpene from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul., on tracheal smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 49, p. 15-25, 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.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: Imprensa Universitária/Universidade Federal do Ceará, p. 267, 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária/Universidade Federal do Ceará, p. 344, 2000.

McHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 1, p. 23-28, 2006.

MEDEIROS, M. A. A. **Mecanismo de ação tocolítica de pipartina, alcalamida isolada de *Piper tuberculatum* Jacq., envolve bloqueio de cálcio**. 2006. Dissertação (mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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.

MELO, F. H. C.; RIOS, E. R.; ROCHA, N. F.; CITÓ, M. D. O. C.; FERNANDES, M. L.; DE SOUSA, D. P.; DE VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, F. C. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1722-1729, 2012.

MING, L. C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.)N.E.Br. – Verbenaceae**. 1992. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MODZELEWSKA, B.; KOSTRZEWSKA, A.; SIPOWICZ, M.; KLESZCZEWSKI, T.; BATRA, S. Apamin inhibits NO-induced relaxation of the spontaneous contractile activity of the myometrium from non-pregnant women. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 8-15, 2003.

MODZELEWSKA, B.; KLESZCZEWSKI, T.; KOSTRZEWSKA, A. The effect of a selective inhibition of potassium channels on the relaxation induced by nitric oxide in the human pregnant myometrium. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 8, n. 1, p. 69-75, 2003.

MONCADA, S. R.; PALMER, M. G.; HIGGS, E. A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTEIRO, F. S. **Ação relaxante da fração de alcaloides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric. envolve modulação positiva da via do óxido nítrico e dos canais de K^+ em íleo de cobaia e aorta de rato**. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBÊLO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2007.

MORTON, J. F. **Atlas of medicinal plants of middle America: Bahamas to Yucatan**. Springfield: Charles C Thomas Pub Ltd, v. 1 p. 745-750, 1981.

MUNGLUE, P.; EUMKEP, G.; WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S. The effects of watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts and L-citrulline on rat uterine contractility. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 4, p. 437-448, 2012.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cGMP signal transduction system. **Advances in Pharmacology**, v. 26, p. 19-33, 1994.

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.

NEILD, T. O.; KOTECHEA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, and potassium. **Circulation Research**, v. 60, n. 5, p. 791-795, 1987.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, p. 3382-3385, 1988.

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.

NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, n. 5930, p. 147-148, 1983.

OGBOURNE, A. S. M.; PARSONS, P. G. The value of nature's natural product library for the discovery of New Chemical Entities: The discovery of ingenol mebutate. **Fitoterapia**, v. 98, p. 36-44, 2014.

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, XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia, 2004, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: p. 268-269, 2004.

OLIVEIRA, G. A. **A ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia.** 2013. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A.; SOUZA, I. L. L.; MARTINS, I. R. R.; CARREIRO, J. N.; CORREIA, A. C. C.; Pereira, J. C.; FERREIRA, T. F.; SILVA, M. C. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Essential oil of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) shows spasmolytic effect on guinea-pig trachea and ileum. In: 44th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012, Foz do Iguaçu. **Anais...** Paraná: 2012.

OSOL, G.; MANDALA, M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Physiology**, v. 24, p. 58-71, 2009.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.

PARK, K-S.; YANG, J-W.; SEIKEL, E.; TRIMMER, J. S. Potassium channel phosphorylation in excitable cells: providing dynamic functional variability to a diverse family of ion channels. **Physiology**, v. 23, p. 49-57, 2008.

PARRA, J.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanism of mifepristone-induced spasmolytic effect on isolated rat uterus. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2563-2569, 2000.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PASSOS, R. B. F.; ARAUJO, D. V.; RIBEIRO, C. P.; MARINHO, T.; FERNANDES, C. E. Prevalência de dismenorréia primária e seu impacto sobre a produtividade em mulheres brasileiras – Estudo DISAB. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, n. 8, p. 250-3, 2008.

PAULSON, O. B.; NEWMAN, E. A. Does the release of potassium from astrocyte end feet regulate cerebral blood flow? **Science**, v. 237, n. 4817, p. 896-898, 1987.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D. M.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 341-350, 2010.

PIPER, I.; MINSHALL, E.; DOWNING, S. J.; HOLLINGSWORTH, M.; SADRAEI, H. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 901-907, 1990.

PONCE-MONTER, H.; CAMPOS, M. G.; PÉREZ, S.; PÉREZ, C.; ZAVALA, M.; MACÍAS, A.; OROPEZA, M.; CÁRDENAS, N. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. **Fitoterapia**, v. 79, p. 446-450, 2008.

PONTE, C. G.; MCMANUS, O. B.; SCHMALHOFER, W. A.; SHEN, D. M.; DAI, G.; STEVENSON, A.; SUR, S.; SHAH, T.; KISS, L.; SHU, M.; DOHERTY, J. B.; NARGUND, R.; KACZOROWSKI, G. J.; SUAREZ-KURTZ, G.; GARCIA, M. L. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle reaxation. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 567-577, 2012.

PRAKASH, O.; KASANA, V. K.; PANT, A. K.; ZAFAR, A.; HORE, S. K.; MATHELA, C. S. Phytochemical composition of essential oil from seeds of *Zingiber roseum* Rosc. and its antispasmodic activity in rat duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 344-347, 2006.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 342-356, 2009.

QUEIROZ, E. F.; FARO, R. R. A.; MELO, C. A. A biodiversidade brasileira como fonte de novas drogas: passado, presente e futuro. **Revista de Fitoterapia**, v. 9, Supl. S1, p. 31-35, 2009.

RADÜNZ, L. L. Efeitos da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 27, n. 3, p. 09-13, 2002.

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

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

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by 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 (lábdano-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.

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 *Xylopiia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 197-203, 2007.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 2, p. 141-144, 2011.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. **Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 29-59, 2009.

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia**, v. 74, p. 445-452, 2003.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345-353, 2002.

SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae)**. 2000. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, v. 5, p. 303-358, 2001.

SANTOS, J. S.; MELO, J. I. M.; ABREU, M. C.; SALES, M. F. Verbenaceae sensu stricto na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SANTOS, R. F.; ISOBE, M. T. C.; LALLA, J. G.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 224-234, 2012.

SCHREIBER, M.; WEI, A.; YUAN, A.; GAUT, J.; SAITO, M.; SALKOFF, L. Slo3, a novel pH-sensitive K^+ channel from mammalian spermatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 3509-3516, 1998.

SCHULZ, S.; YUEN, O. S.; GARBERS, D. L. The expanding family of guanylyl cyclases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 116-20, 1991.

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

SCHUMACHER, M. A.; RIVARD, A. F.; BACHINGER, H. P.; ADELMAN, J. P. Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^+ channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin. **Nature**, v. 410, p. 1120-1124, 2001.

SCHURT, D. A.; TRASSATO, L. B.; SOUZA, G. R.; SILVA, W. L. M. Uso de óleo essencial de *Lippia microphylla* na inibição do crescimento in vitro de *Rhizoctonia solani*. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2012, Manaus. **Anais... Amazonas: Tropical Plant Patology**, 2012, p. 511.

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, 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, C. J.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; PINHEIRO, A. L.; DIAS, I.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2010.

SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A. T.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Role of Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -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, F. S. **Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae)**. 2012. Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

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

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SLOWING BARILLAS, K. V. **Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala**. 1992. (Memoria Doctoral) – Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

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. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOUZA, I. L. L. **A ação espasmolítica do óleo essencial de *Xylopia frutescens* Aubl. envolve a redução dos níveis citosólicos de cálcio em íleo de cobaia**. 2014. Dissertação (mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica e Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

STANDEN N. B. Properties of cloned K_{ATP} channels mimic those of β -cells. **Journal of Physiology**, v. 498, p. 1, 1997.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M.; DAVIES, N. W.; BRAYDEN, J. E.; HUANG, Y.; NELSON, M. T. Hiperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 245, p. 177-180, 1989.

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. **Biochemistry**, v. 33, n. 18, p. 5636-5640, 1994.

SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K^+ channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

TAMURA, N.; ITOH, H.; OGAWA, Y.; NAKAGAWA, O.; HARADA, M.; CHUN, T. H.; SUGA, S.; YOSHIMASA, T.; NAKAO, K. cDNA cloning and gene expression of human type Ia cGMP-dependent protein kinase. **Hypertension**, v. 27, p. 552-557, 1996.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TAYLOR, C. W.; LAUDE, A. J. IP_3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca^{2+} . **Cell Calcium**, v. 32, p. 321-334, 2002.

TEÓFILO, T. M. N. G. **Efeito antiespasmódico do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, sobre o músculo liso traqueal de ratos**. 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K^+ channels underlying levcromakalim-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.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential oil safety: A Guide for Health Care Professionals**. Churchill Livingstone Elsevier, 780 p., 2014.

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: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009. Ribeirão Preto, **Anais...** São Paulo: 2009.

TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P. R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 1, n. 5, p. 52-63, 2009.

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

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.

VACA, L. SOCIC: the store-operated calcium influx complex. **Cell Calcium**, v. 47, n. 3, p. 199-209, 2010.

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.

VASCONCELOS, L. H. C. **A ação relaxante do flavonoide 3,6-dimetil éter galetina, isolado de *Piptadenia stipulaceae* (Benth.) Ducke, envolve modulação positiva de canais de potássio e redução dos níveis citosólicos de cálcio em íleo de cobaia.** 2013. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, p. 171-178, 2005.

VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207-219, 2000.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca²⁺-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.

WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, 2000.

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

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 463-472, 2005.

WEINBERG, J. B.; CHEN, Y.; JIANG, N.; BEASLEY, B. E.; SALERNO, J. C.; GHOSH, D. K. Inhibition of nitric oxide synthase by cobalamins and cobinamides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1626-1632, 2009.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, p. 135-143, 2001.

WRAY, S. Insights into the uterus. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 4, p. 621-631, 2007.

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.; SHMYGOL, 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.

XAVIER, A. L. **Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

YALLAMPALLI, C.; IZUMI, H.; BYAM-SMITH, M.; GARFIELD, R. E. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 170, n. 1, 1994.

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.

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

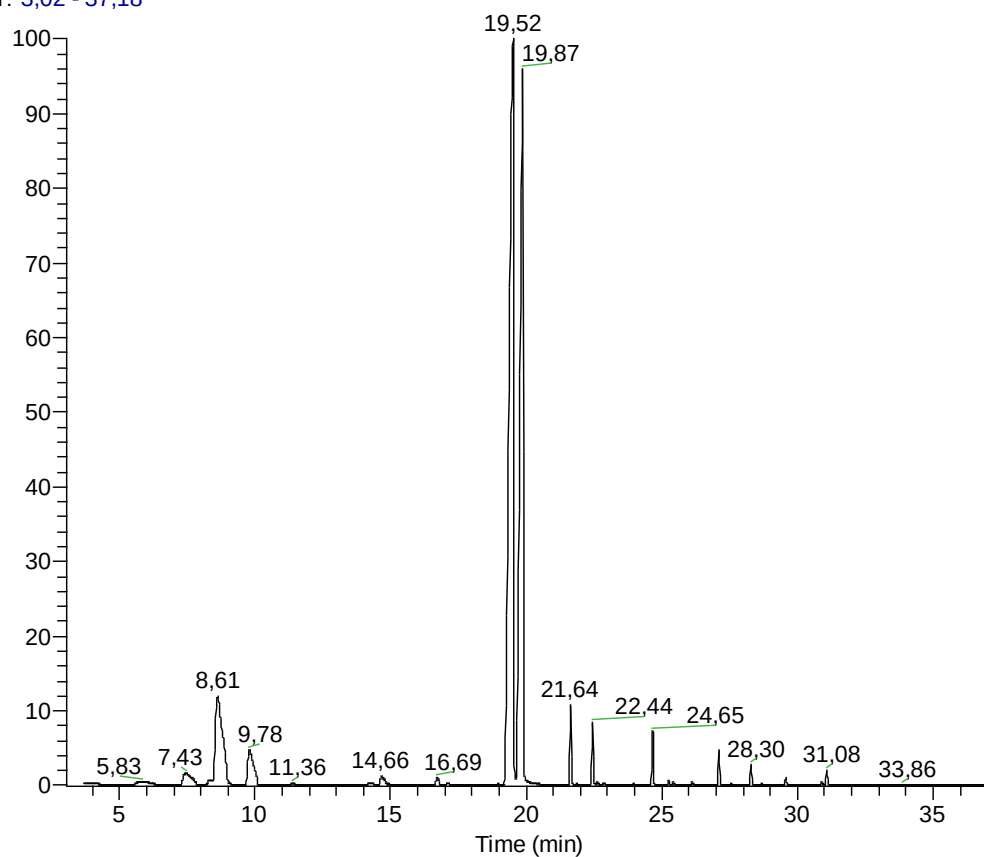
ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 570-577, 2013.



Anexos

Anexo 1 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).

RT: 3,02 - 37,18



NL:
1,58E9
TIC F: MS
LIPPIAMIC
ROPHYLLAF
OLHA

MAIA, J. G. S; ANDRADE, E. H. A.

Anexo 2 – Tabela dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).

IR	Constituintes	(%)
929	α -pineno	0,51
988	mirreno	1,40
1014	α -terpineno	0,20
1023	<i>p</i> -cimeno	9,00
1055	γ -terpineno	2,92
1088	<i>p</i> -cimeneno	0,10
1097	hidrato de trans-sabineno	0,10
1128	aloocimeno	0,10
1133	<i>cis</i> - <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,10
1170	umbelona	0,12
1179	4-terpineol	0,57
1182	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,10
1186	α -terpineol	0,10
1227	metiltimol	0,28
1236	metilcarvacrol	0,20
1293	timol	46,52
1301	carvacrol	31,74
1343	acetato de carvacrol	1,61
1362	acetato de timol	1,32
1415	β -cariofileno	1,15
1430	<i>trans</i> - α -bergamoteno	0,11
1451	α -humuleno	0,06
1476	hidroxianisol butilado	0,68
1505	β -bisaboleno	0,42
1537	espatulenol	0,16
1576	óxido de cariofileno	0,42
	Total	99,99

IR = índice de retenção

MAIA, J. G. S; ANDRADE, E. H. A.

Anexo 3 – Certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 28 de maio de 2013.

CEUA Nº 1005/13

Ilmo(a). **Bagnólia Araújo da Silva**

Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a) : **Maria da Conceição Correia Silva, (Outros (Justificar))**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de Lippia microphylla Cham. (Verbenaceae) e de seus constituintes majoritários, timol e carvacrol.**

Com previsão de empregar **80 Ratas WISTAR;**

- ANIMAIS

PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **01/06/2013 a 30/08/2013**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Anexo 4 – Errata da certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO - ERRATA



João Pessoa, 19 de fevereiro de 2015

CEUA Nº 1005/13

Ilmo(a). **Profa Dra Fabiana de Andrade Cavalcante**
Departamento Fisiologia e Patologia - CCS - UFPB

Orientando(a): **Maria da Conceição Correia Silva, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/2013** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de Lippia microphylla Cham. (Verbenaceae) em rata..**

Com previsão de empregar **80 Ratas WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/06/2013 a 28/02/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB