

Universidade Federal de São João del-Rei
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais

Estudo do efeito do extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea* na contração do ducto deferente de camundongo.

Bruna Cristina Franco

São João del-Rei

2024

Bruna Cristina Franco

Estudo do efeito do extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea* na contração do ducto deferente de camundongo.

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal de São João del Rei
Orientadora: Profa . Dra . Priscila Totarelli Monteforte

São João del-Rei

2023

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos, que são a luz da minha vida.

AGRADECIMENTO

Gratidão realmente é a palavra que define essa etapa que estou finalizando. Ao longo da minha vida, sempre tive a sorte de ser rodeada de pessoas maravilhosas, as quais sempre cuidaram de mim e ajudaram a me tornar quem sou. E hoje, mais de nunca, eu só tenho que agradecer por cada etapa, por cada ensinamento, por cada risada. Agradeço também os momentos de apreensão e sufoco, pois foram a partir deles, que me tornei mais forte.

Início agradecendo a Deus, pelo Dom da vida. Obrigada por guiar meus caminhos e por seu meu sustento e proteção. Agradeço também, minha amada Senhora das Graças, quem cuidou de mim e me amparou em todos os momentos.

Aos meus filhos, os amores da minha vida, minha gratidão, carinho e amor incondicional. Vocês são a razão de todo meu esforço e coragem. Vocês dois foram sempre tão generosos e compreenderam que, mesmo a mamãe não estando por perto fisicamente, o pensamento e o amor estavam, estão e sempre estarão, junto de vocês.

Agradeço também ao Bruno, pela sua paciência, pelo carinho, por me ouvir, por me apoiar em tudo. Em seguida, agradeço à minha mãe pelo amor incondicional, por sempre me dar suporte e me amparar em cada etapa, sendo minha conselheira, meu porto seguro e muitas vezes, minha aula IC. E ao meu irmão, que sempre acreditou em mim, até mesmo quando eu não acreditava que seria possível. Eu amo todos vocês demais.

Não posso me esquecer dos meus sogros e cunhadas, que me incentivaram e apoiaram demais, principalmente cuidando dos meninos enquanto estudava e fazia os experimentos. E aos meus avós, pelo carinho e amor. E à Angélica e Arthur que abriram a porta da sua casa e me acolheram durante tanto tempo.

É um agradecimento especial à minha querida orientadora, a Prof^ª. Dr^ª. Priscila Totareli Monteforte, que é um exemplo de profissional e ser humano. Já são muitos anos convivendo e aprendendo com ela. Desde 2014, quando a Priscila veio para a UFSJ, tenho a oportunidade de ser sua orientanda, da iniciação ao mestrado. A Priscila é um ser humano maravilhoso e uma professora sensacional, sempre com uma palavra amiga e muito conhecimento, se tornou mais que uma professora para mim, ela é realmente uma mãe-científica.

Agradeço aos meus queridos professores, da graduação em Ciências Biológicas e principalmente, os professores do PPGCM, que auxiliaram na minha formação e me guiaram para tornar-me a cientista que sou; e ao meu co-orientador Renê Couto pela colaboração, parceria e conhecimentos. Gratidão também pelos meus colegas de mestrado, que viveram essa jornada junto de mim, em cada matéria e em cada experimento. Agradeço à Victória Alvarenga, que

sempre estive disposta a me ajudar durante o mestrado. À todos os meus amigos e familiares. E a todos do LAPER que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização dos experimentos e me deram força nessa jornada.

Essa vitória só tem sentido porque foi construída com o auxílio de todos vocês. Muito obrigada!!

Resumo

A ejaculação precoce (EP) é uma disfunção sexual que acomete uma grande parcela da população masculina no mundo todo e os tratamentos disponíveis causam diversos efeitos adversos. As plantas medicinais têm sido utilizadas por exercerem um papel importante na saúde humana e o *Celtis iguanaea* (CI) apresenta efeito gastroprotetor e anti-inflamatório, porém ainda não foi demonstrado seu efeito no ducto deferente (DD). O objetivo deste trabalho foi verificar se esta espécie relaxa o DD, além de tentar elucidar o seu mecanismo de ação. O efeito de doses crescentes de CI, na presença e na ausência, de nifedipina, foi testado, sob a contração do DD de camundongos, estimulada por cloreto de potássio (KCl) ou adrenalina. Os experimentos foram realizados em um sistema de banho de órgãos, onde a contração foi registrada pelo hardware PowerLab e analisada pelo software LabChart. As respostas foram medidas considerando as amplitudes de contração de cada componente. O efeito de CI foi analisado pelo IC₅₀ (logaritmo negativo da concentração da droga que produz 50% do efeito inibitório máximo). *Celtis iguanaea*, apresentou efeito inibitório tanto no componente fásico como no tônico da contração induzida por KCl e adrenalina, sendo o componente tônico estatisticamente mais sensível à ação de CI. O efeito de CI, nos componentes fásico e tônico, na presença de nifedipina, um bloqueador clássico dos canais de cálcio, foi potencializado, quando a contração foi induzida pelo KCl. Já na contração induzida pela adrenalina, o efeito inibitório, nos componentes fásico e tônico, na presença da nifedipina, foi mantido. Esses resultados indicam que CI é capaz de inibir algum mecanismo envolvido na sinalização da contração do DD. Esses achados demonstram o efeito de *Celtis iguanaea* e contribuem para elucidação do seu mecanismo de ação e sua possível utilização no tratamento da ejaculação precoce.

Palavras-chave: Fitoterápicos; *Celtis iguanaea*; Ejaculação precoce; Ducto deferente; Contração muscular; Nifedipina.

Abstract

Premature ejaculation (PE) is a sexual dysfunction that affects a large proportion of the male population worldwide and the available treatments cause various side effects. Medicinal plants have been used because they play an important role in human health and *Celtis iguanaea* (CI) has a gastroprotective and anti-inflammatory effect, but its effect on the vas deferens (DD) has not yet been demonstrated. The aim of this study was to see if this species relaxes the DD, as well as trying to elucidate its mechanism of action. The effect of increasing doses of IC, in the presence and absence of nifedipine, was tested on the contraction of the DD of mice, stimulated by potassium chloride (KCl) or adrenaline. The experiments were carried out in an organ bath system, where the contraction was recorded using PowerLab hardware and analyzed using LabChart software. The responses were measured considering the contraction amplitudes of each component. The IC effect was analyzed by the IC₅₀ (negative logarithm of the drug concentration that produces 50% of the maximum inhibitory effect). *Celtis iguanaea* showed an inhibitory effect on both the phasic and tonic components of the contraction induced by KCl and adrenaline, with the tonic component being statistically more sensitive to the action of IC. The effect of IC on the phasic and tonic components in the presence of nifedipine, a classic calcium channel blocker, was potentiated when the contraction was induced by KCl. In adrenaline-induced contraction, the inhibitory effect on the phasic and tonic components in the presence of nifedipine was maintained. These results indicate that CI is capable of inhibiting some mechanism involved in DD contraction signaling. These findings demonstrate the effect of *Celtis iguanaea* and contribute to elucidating its mechanism of action and its possible use in the treatment of premature ejaculation.

Keywords: Herbal medicines; *Celtis iguanaea*; Premature ejaculation; Vas deferens; Muscle contraction; Nifedipine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécime de *Celtis iguanaea*. Fonte: Google Imagens - disponível em: <https://3-Celtis-iguanae-Gardener-Plach.jpg> (800×535) (unicentro.br).

Figura 2: Sinalização envolvida na contração do músculo liso (retirado de Webb, 2003): Diacilglicerol (DG), IP3 (inositol 1,4,5-trisfosfato); Ca²⁺ (íons cálcio), PKC (Proteína quinase C); MLC (cinase da cadeia leve da miosina), ATP (adenosina trifosfato), RhoGEF (fator de troca de nucleotídeos de guanina específicos de Rho), RhoA-GTP (), RhoA-GDP().

Figura 3: Sinalização envolvida no relaxamento do músculo liso (retirado de Webb, 2003): MLC (cinase da cadeia leve da miosina), Ca²⁺ (íons cálcio), Ca,Mg-ATPases (bombas de cálcio e magnésio ATPases), trocadores de Na⁺/Ca²⁺.

Figura 4: Desenho esquemático do registro típico da contração do ducto deferente (RABELO, 2021).

Figura 5: Representação gráfica do protocolo experimental para o estudo do efeito do extrato de *Celtis iguanaea* sobre a contração do ducto deferente induzida por KCl (80mM), adrenalina (2 x 10⁻⁵M), na presença ou na ausência de nifedipina (10⁻⁵M).

Figura 6: Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA para o extrato foliar em acetato de etilo de *Celtis iguanaea*. A fase móvel foi composta por uma mistura de água ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). O volume de injeção foi de 50 µL. A separação cromatográfica foi realizada num modo de gradiente exploratório (ou seja, de 0,01 min a 95 min com um aumento da taxa linear de 5% a cada 5 min do solvente B, de 5% até 100% na mistura) com um caudal de 1,0 mL/min numa coluna RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm, 110Å). O cromatograma 2D foi extraído a 270 nm e o 3D de 200 - 800 nm.

Figura 7: Perfil espectral dos fitoquímicos contidos no extrato de acetato de etilo das folhas de *Celtis iguanaea*. Dados obtidos com um detetor PDA (200 - 800 nm). Rt, tempo de retenção.

Figura 8: Efeito inibitório de concentrações crescentes de extrato de *C. iguanaea*, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes utilizadas foram 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,25

mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1 e -0,60. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). $p < 0,0001$ (****).

Figura 9: Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10^{-5} M). Utilizamos as seguintes concentrações crescentes de *Celtis iguanaea* / 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,25 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1 e -0,60. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*) $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). $p < 0,0001$ (****).

Figura 10: Efeito inibitório de *Celtis iguanaea* sob os componentes fásico e tônico da contração, induzida por KCl, na presença e ausência de nifedipina: A. Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,255 mg/ml de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). B: Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,255 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). Inibições estatisticamente significativas na comparação entre fásico/fásico e tônico/tônico. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*) $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). $p < 0,0001$ (****).

Figura 11: Efeito inibitório de concentrações crescentes de extrato de *C. iguanaea*, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por adrenalina. As concentrações crescentes utilizadas foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -3; -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1; -0,60 e 0. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 8 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*) $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). $p < 0,0001$ (****).

Figura 12 - Efeito inibitório de concentrações crescentes (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) de nifedipina, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração, induzida por adrenalina (10^{-5}). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*) $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). $p < 0,0001$ (****).

Figura 13: Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por adrenalina (10^{-5} M) na presença da nifedipina (10^{-7} M). As concentrações crescentes foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -3; -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1; -0,60 e 0. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Figura 14: Efeito inibitório do EAcCI sob os componentes fásico e tônico da contração, induzida por adrenalina, na presença e ausência de nifedipina (10^{-7} M). A: Componente fásico da contração induzida por adrenalina, na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). B: Componente tônico da contração induzida por adrenalina, na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-7} M) (cinza). Inibições estatisticamente significativas na comparação entre fásico/fásico e tônico/tônico (Teste t Student não pareado), $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Figura 15: Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por adrenalina (10^{-5} M) na presença da nifedipina (10^{-5} M). As concentrações crescentes foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -3; -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1; -0,60 e 0. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Figura 16: Efeito inibitório de EAcCI sob os componentes fásico e tônico da contração, induzida por adrenalina, na presença e ausência de nifedipina (10^{-5} M). A: Componente fásico da contração induzida por adrenalina, na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). B: Componente tônico da contração induzida por adrenalina (80mM), na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de

nifedipina (10^{-5} M) (cinza). Inibições estatisticamente significativas na comparação entre fásico/fásico e tônico/tônico Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*) $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). $p < 0,0001$ (****).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos grupos de acordo com o protocolo experimental

Tabela 2: Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM).

Tabela 3: Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM).

Tabela 4A: Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-5} M) sob o componente fásico da contração induzida por KCl (80 mM).

Tabela 4B: Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-5} M) sob o componente tônico da contração induzida por KCl (80 mM).

Tabela 5: Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* sob o componente fásico e tônico na contração induzida por Adrenalina (10^{-5} M).

Tabela 6: Valores da média de pIC_{50} da nifedipina sob o componente fásico e tônico na contração induzida por adrenalina (10^{-5} M) no ducto defere

Tabela 7: Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10^{-7} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por adrenalina.

Tabela 8A: Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-7} M) sob o componente fásico na contração induzida por adrenalina (10^{-5} M).

Tabela 8B: Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-7} M) sobre o componente tônico na contração induzida por adrenalina (10^{-5} M).

Tabela 9: Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por adrenalina.

Tabela 10A: Valores da média de IC₅₀ de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10⁻⁵M) sobre o componente fásico contração induzida por adrenalina (10⁻⁵M).

Tabela 10B: Valores da média de IC₅₀ de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10⁻⁵M) sobre o componente tônico contração induzida por adrenalina (10⁻⁵M).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo dos resultados obtidos na comparação da IC_{50} entre os diferentes protocolos e os diferentes componentes da contração no ducto deferente.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Plantas medicinais.....	1
1.2. <i>Celtis iguanaea</i>	2
1.3. Ducto deferente.....	5
1.4. Contração muscular.....	6
1.4.1. Ativadores da contração muscular.....	8
1.4.2. Inibidores da contração muscular.....	9
1.4.3. Contração do ducto deferente.....	10
1.5. Disfunção sexual – Ejaculação precoce.....	11
2. Objetivos.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Metodologia.....	14
3.1. Substâncias utilizadas.....	14
3.2. Obtenção e caracterização do extrato acetato de etila da <i>C. iguanaea</i>	14
3.2.1. Material Botânico.....	14
3.2.2. Obtenção do Extrato Acetato de Etila.....	14
3.2.3. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA.....	15
3.3. Animais.....	15
3.4. Isolamento do ducto deferente.....	16
3.5. Montagem da preparação biológica e aparelhagem.....	16
3.6. Protocolo experimental.....	16
3.6.1. Estudo do efeito do extrato acetato de etila de <i>Celtis iguanaea</i> (EAcEG).....	16
3.6.2. Estudo da participação dos canais de cálcio voltagem dependente.....	17
3.6.3. Resumo dos grupos experimentais.....	18
3.6.4. Parâmetros farmacológicos.....	19
3.6.5. Análise estatística.....	19
4. Resultados.....	20
4.1. Perfil fitoquímico cromatográfico.....	20
4.2. Efeito inibitório de <i>Celtis iguanaea</i> na contração induzida por KCl.....	21
4.2.1. Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl.....	22
4.2.2. Comparação do efeito inibitório de <i>Celtis iguanaea</i> , na presença e na ausência da nifedipina, sob cada componente da contração induzida por KCl.....	23

4.3. Efeito inibitório de <i>C. iguanaea</i> na contração induzida por Adrenalina.....	25
4.3.1. Efeito da nifedipina na contração induzida por adrenalina.....	26
4.3.2. Efeito de <i>Celtis iguanaea</i> , na presença de nifedipina (10^{-7} M) sobre a contração induzida por adrenalina.....	27
4.3.3. Comparação do efeito inibitório de <i>Celtis iguanaea</i> , na presença e na ausência da nifedipina (10^{-7} M), sob o componente fásico e tônico da contração induzida por adrenalina.....	28
4.3.4. Efeito de <i>Celtis iguanaea</i> , na presença de nifedipina (10^{-5} M) sobre a contração induzida por adrenalina.....	30
4.3.5. Comparação do efeito inibitório de <i>Celtis iguanaea</i> , na presença e na ausência da nifedipina (10^{-5} M), sob o componente fásico e tônico da contração induzida por adrenalina.....	31
5. Discussão.....	35
5.1. Avaliação da caracterização do extrato acetato de etila de <i>Celtis iguanaea</i>	35
5.1.1. Perfil fitoquímico cromatográfico.....	35
5.2. O efeito de <i>Celtis iguanaea</i> na contração induzida por KCl.....	36
5.2.1. Efeitos de <i>Celtis iguanaea</i> na presença da nifedipina, na contração induzida por KCl.....	37
5.3. O efeito de <i>Celtis iguanaea</i> na contração induzida por adrenalina.....	39
5.3.1. Efeitos de <i>Celtis iguanaea</i> na presença da nifedipina, na contração induzida por adrenalina.....	40
6. Conclusão.....	43
7. Referências bibliográficas.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais.

Ao longo do tempo, o ser humano foi capaz de reconhecer e utilizar diversas plantas para fins curativos. Mesmo com o grande desenvolvimento de medicamentos alopáticos, na segunda metade do século XX, muitas pessoas ainda não têm acesso a estes medicamentos. Com isso, parte dessa população é levada a utilizar plantas medicinais, uma vez que, são de fácil obtenção e há uma grande tradição em seu uso, sendo possível o consumo por diferentes maneiras como chás, extratos e óleos essenciais (VEIGA Jr *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) juntamente com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), no ano de 1978, promoveram a Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde, onde propuseram ações urgentes, por parte dos governantes, profissionais da saúde, bem como da comunidade mundial, afim de proteger e promover a saúde de todos os povos do mundo e foram formuladas políticas e regulamentações que propunham a utilização de medicamentos de uso tradicional e de eficácia comprovada, além da integração dos detentores de conhecimentos tradicionais às atividades primárias em saúde (BRASIL, 2016).

No Brasil, o governo federal, através do Ministério da Saúde, lançou em 2006, por meio da portaria GM/MS nº971, as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que visam oferecer serviços e produtos de homeopatia, plantas medicinais, fitoterapia e medicina tradicional chinesa/acupuntura entre outras práticas como opções terapêuticas (BRASIL, 2006a, 2018; MATTOS *et al.*, 2018). No mesmo ano, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF), por meio do decreto 5.813 que integra políticas públicas de saúde, desenvolvimento econômico e social, além do meio ambiente, visando a promoção da qualidade de vida da população brasileira, geração de emprego e renda, utilização sustentável da biodiversidade, entre outros (BRASIL, 2006b; BRASIL, 2016).

Já em dezembro de 2008, por meio da Portaria Interministerial nº 2960, a PNPMF, propôs, entre outras ações, a inserção de plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), de forma segura, eficaz e de qualidade, de acordo com o PNPIC (BRASIL, 2006b; BRASIL, 2016).

De acordo com a cartilha elaborada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2022), as plantas medicinais são aquelas capazes de curar ou aliviar enfermidades e têm tradi-

ção de uso pela população ou comunidade. E o termo fitoterápico é empregado para medicamentos feitos com plantas medicinais, e sendo assim, são comercializados ou distribuídos em formas farmacêuticas, tais como, comprimidos, xaropes ou pomadas, as quais são compostas pela planta ou seus derivados e compõem a formulação farmacêutica, com diferentes funções, como por exemplo, melhorar a aparência ou o sabor do medicamento (ANVISA, 2022).

O Brasil é o país com maior biodiversidade animal e vegetal, com ênfase para as plantas superiores, que apresentam cerca de 24% de toda a biodiversidade mundial. As plantas são substratos para a fabricação de cosméticos e fitoterápicos. Além disso, o Brasil possui, fora o acervo genético, uma grandiosa diversidade cultural e étnica, que culminou com conhecimentos e tecnologias tradicionais, transmitidas ao longo das gerações acerca do manejo e uso das plantas medicinais (BRASIL, 2016).

No entanto, apesar do país possuir essa grande biodiversidade da flora, apenas uma pequena parcela desses vegetais estão catalogados e foram estudados a fim de elucidar seus compostos bioativos e avaliar suas propriedades medicinais (GERRA *et al.*, 2001; BRASIL, 2016).

1.2. *Celtis iguanaea*.

A espécie *Celtis iguanaea* é conhecida popularmente como esporão de galo, taleira, entre outros nomes, e pertence à família *Cannabaceae*. É uma planta caracterizada como arbusto ou pequena árvore, com ramos compridos e muito flexíveis na forma de zigue-zague, e possui ampla distribuição geográfica ocorrendo desde os Estados Unidos até a América do Sul (LORENZI & SOUZA, 1999). Há diversos relatos populares que indicam o uso sob a forma de chá ou abafado de suas folhas para o tratamento de várias queixas tais como, dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má-digestão e como diurético (PEREIRA *et al.*, 2008). A partir desta etnofarmacologia, alguns trabalhos foram realizados e demonstraram os seguintes efeitos de *C. iguanaea*: efeito gastroprotetor, atividade anti-inflamatória, diminuição nos níveis de colesterol e baixa toxicidade (COSTA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2014a; MARTINS *et al.*, 2014b; GONÇALVES *et al.*, 2015; SILVA & FROEDER, 2016; ZANCHET *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2022).



Figura 1: Espécime de *Celtis iguanaea*. Fonte: Google Imagens - disponível em: <https://3-Celtis-iguanae-Gardener-Plach.jpg> (800×535) (unicentro.br).

Martins e colaboradores (2014a) comprovaram a eficácia do extrato hexânico de *Celtis iguanaea* na prevenção de úlceras é baseada em seu efeito antiulcerogênico e antissecretor. O bloqueio do betanecol e histamina pelo extrato sugeriu um mecanismo anticolinérgico e anti-histaminérgico ou uma interrupção de eventos intracelulares que estão ligados à secreção ácida (MARTINS et al, 2014a). E o mesmo grupo demonstrou em outro trabalho a atividade gastroprotetora de extrato hexânico *Celtis iguanaea* em diferentes modelos de úlcera gástrica e determinou que o mecanismo de efeito gastroprotetor de *Celtis iguanaea* está relacionado com a participação do muco, bem como o envolvimento de α_2 -receptores adrenérgicos, óxido nítrico e prostaglandinas (MARTINS et al., 2014b). Outro trabalho que também analisou o potencial efeito gastroprotetor de *Celtis iguanaea* foi o trabalho de Costa e colaboradores (2008), que investigou o efeito do extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* em camundongos e identificaram que este extrato possui princípios ativos gastroprotetores além de reduzir a motilidade intestinal, o que pode justificar o uso popular da planta no tratamento de distúrbios gástricos (COSTA et al., 2013).

Além destes efeitos, outro estudo atestou que o extrato hidroalcoólico de *C. iguanaea* promoveu reduções significativas nos níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), IL-1-6 (interleucinas 1 e 6) e TNF α (fator de necrose tumoral alfa) em ratos, além disso demonstrou que efeitos antioxidantes foram observados no plasma e

apresentou efeitos hipoglicêmicos associados a diminuição da atividade da sacarose, maltase e aumento nos níveis de glicogênio muscular. Com relação a diminuição dos níveis de colesterol, o artigo demonstrou que quando comparados com o grupo controle, o extrato hidroalcoólico de *C. iguanaea* se mostrou eficaz na proteção contra aterosclerose. O artigo demonstrou também que o extrato de *C. iguanaea* foi capaz de aumentar os níveis de glicogênio no músculo sóleo sem alterar o glicogênio hepático, o que provavelmente causou a redução da glicemia. Realizaram também, uma avaliação histológica que mostrou redução da gordura hepática em todos os grupos tratados com o extrato, o que pode estar relacionado à diminuição da atividade hepática do HMG-CoA com redução da síntese de colesterol. (ZANCHET *et al.*, 2018).

Já o trabalho de MORAES *et al.*, (2022) demonstrou as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das folhas de *Celtis iguanaea* (CEE) e de suas frações ativas. O tratamento com o extrato bruto, diminuiu o número de contorções, o que indica uma possível atividade antinociceptiva, no animal de forma dose-dependente, além disso, frações ativas (hexano, diclorometano, acetato de etila e aquoso) apresentaram atividade antinociceptiva envolvendo o sistema vaniloide e o efeito anti-inflamatório ocorreu devido a redução da citocina TNF- α . Além disso, o extrato etanólico bruto, o diclorometano e o acetato de etila (EAF) foram capazes de reduzir o edema, a migração de leucócitos e a atividade da mieloperoxidase. Os níveis de TNF- α no exsudato pleural também foram reduzidos pelo CEE e EAF, sendo assim o trabalho sugere que *Celtis iguanaea* pode ser uma grande promessa para o tratamento de condições dolorosas e doenças inflamatórias, apoiando seu uso popular na medicina popular brasileira.

Somado a esses trabalhos, os extratos aquosos (GONÇALVES *et al.*, 2015) e hidroalcoólico (70% v/v) (SILVA & FROEDER, 2016) das folhas desta espécie foram estudados quanto a sua toxicidade aguda e subaguda, e ambos demonstraram baixa toxicidade (GONÇALVES *et al.*, 2015; SILVA & FROEDER, 2016)

Em relação a musculatura lisa, até onde foi possível pesquisar, há somente um trabalho com uma espécie do gênero *Celtis*. Este, demonstrou que o extrato metanólico de *Celtis durandii* inibiu a contração da aorta induzida tanto por cloreto de potássio (KCl) quanto por noradrenalina. Neste trabalho, os autores também demonstraram que este efeito é dependente da sinalização das prostaglandinas (DIMO *et al.* 2005). Já em relação ao efeito de *C. iguanaea* sobre o ducto deferente, que também é formado de musculatura lisa, não foi possível encontrar nenhum trabalho descrevendo algum tipo de efeito. Uma vez que, a espécie em estudo apresenta poucos trabalhos na literatura científica, torna-se de extrema importância novos estudos

1.3. Ducto deferente.

O ducto deferente é um órgão que pertence ao sistema reprodutor masculino. É um tubo longo e fino, que se dispõe em par, ascende ao longo da margem posterior do epidídimo através do funículo espermático e, entra na cavidade pélvica. É formado por três camadas, uma mucosa interna com epitélio de revestimento apoiado sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo, uma camada muscular (com fibras longitudinais e circulares) e uma camada externa serosa, formada por tecido conjuntivo frouxo e células adiposas (KIERSZENBAUM, 2012; TORTORA, 2016).

Ele é dividido anatomicamente em duas porções, proximal e distal. A região proximal é mais próxima do epidídimo, sendo denominada também de porção epididimal, já a região distal encontra-se localizada mais próxima da próstata, denominada de porção prostática. Existem diferenças anatômicas e funcionais entre as porções. Em relação as diferenças anatômicas, a porção epididimal, em comparação com a prostática, é considerada mais estreita, uma vez que, possui uma camada de tecido muscular relativamente delgada. Já em relação as diferenças funcionais, há trabalhos que demonstram que alguns tipos de receptores são expressos somente na porção prostática e outros que são encontrados na porção epididimal (HAMILTON & COOPER, 1978; HEDLUND et al., 1985). De acordo com Koslov e Andersson (2013), as diferentes regiões do ducto deferente respondem diferentemente à estimulação nervosa e aos agonistas exógenos, sendo os segmentos da extremidade prostática mais responsivos ao ATP e os segmentos da porção epididimal são mais responsivos a noradrenalina, uma vez que, a densidade dos nervos adrenérgicos e do conteúdo de catecolaminas é maior na parte prostática do que na parte epididimal (KOSLOV & ANDERSSON, 2013).

O ducto deferente conduz os espermatozoides a partir do epidídimo, que é o local onde os espermatozoides são armazenados após serem produzidos nos testículos, até o ducto epididimário, que termina na uretra prostática, onde seu conteúdo é esvaziado, mas também contribui para a secreção de fluido para o transporte de espermatozoides e possivelmente para a reabsorção de restos de espermatozoides do lúmen do ducto (KOSLOV & ANDERSSON, 2013). A condução dos espermatozoides se dá por meio de movimentos contráteis, denominado peristaltismo, que é realizado pelas células musculares lisas que compõe o ducto deferente (WESTFALL et al., 1978).

1.4. Contração muscular

O tecido muscular liso é encontrado em uma grande variedade de sistemas, como vascular, respiratório e reprodutor e são responsáveis pelas contrações dos diferentes órgãos que compõe estes sistemas (KUO & EHRLICH, 2015).

O processo de contração-relaxamento muscular depende da alteração da concentração intracelular de cálcio. Os processos que envolvem a homeostase do cálcio são mantidos pelo funcionamento de canais, transportadores e bombas localizadas na membrana plasmática, e nas membranas de organelas intracelulares e pela ligação do cálcio às proteínas celulares (CARA-FOLI et al., 2001; BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; DONG et al., 2006; SILVERTHORN, 2017).

Os canais cálcio dependentes de voltagem são proteínas de sinalização transmembrana. E são ativados durante potenciais de ação em muitos tipos de células excitáveis e conduzem cálcio para dentro das células para iniciar inúmeros processos fisiológicos, incluindo contração, neurotransmissão, secreção e transcrição gênica (CATTERALL *et al.*, 2020).

Existem diferentes famílias de Ca^{2+} voltagens dependentes em mamíferos, e eles desempenham papéis relevantes na transdução da sinalização celular como os canais do tipo L, T, R, P e N (CATERRAL, 2011). Além disso, essas famílias podem se subdividir em subfamílias, como ocorre com os canais voltagem dependentes do tipo L, que apresentam 3 subfamílias: Ca_v1 , Ca_v2 e Ca_v3 . A subfamília Ca_v1 participa dos processos de contração, secreção, regulação da expressão gênica e transmissão sináptica em sinapses em células sensoriais especializadas. A subfamília Ca_v2 é responsável pelo acoplamento excitação-contração em músculo cardíaco e liso, regulação da atividade enzimática, regulação da transcrição início da transmissão sináptica em sinapses rápidas. Enquanto a subfamília Ca_v3 é importante para disparos repetitivos de potenciais de ação em células como miócitos cardíacos e neurônios talâmicos (ERTEL et al., 2000; CATTERALL *et al.*, 2005; DONATO, 2008; CATTERALL, 2011).

Outra família de canais de cálcio são os canais de cálcio do tipo T (transitórios/ativados por baixa voltagem), que desempenham e também subdividido em subfamílias $Ca_v3.1$ e $Ca_v3.2$ que atuarão como marcapasso e em disparos repetitivos (CATTERALL, 2011; FRITAR & JABR, 2014). Os canais do tipo T têm um papel na proliferação das células da próstata e na contração do músculo liso da próstata e do trato genital, influenciando assim a fisiologia normal desses órgãos (FRITAR & JABR, 2014).

A célula possui uma pequena concentração de Ca^{2+} no citoplasma, já no meio extracelular e nos estoques intracelulares, principalmente no retículo sarcoplasmático, há uma alta concentração. Quando a célula é estimulada, ocorre o aumento no nível intracelular de cálcio, sendo este aumento responsável pela contração. Esse aumento nos níveis de cálcio ocorre pelo influxo do mesmo através da membrana plasmática e também pela liberação no citoplasma dos estoques

presentes no retículo sarcoplasmático e em outras organelas como, mitocôndria e núcleo (CARAFOLI et al., 2001; BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; DONG et al., 2006; KUO & EHRLICH, 2015; SILVERTHORN, 2017).

Com o aumento no nível do Ca^{2+} , citoplasmático, ocorre a ligação destes íons à calmodulina, formando um complexo Ca^{2+} -calmodulina, que ativa a enzima conhecida como, cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que excita as cadeias proteicas leves da miosina (MLCP). A fosforilação da miosina aumenta a atividade da miosina-ATPase, que realiza aumento da tensão muscular, juntamente com a ligação à actina e os ciclos de ligação cruzada, levando a contração da fibra muscular (Webb, 2003; GUYTON, 2011; KUO & EHRLICH, 2015; SILVERTHORN, 2017). O resumo do processo de contração do músculo liso é representado na figura 2.

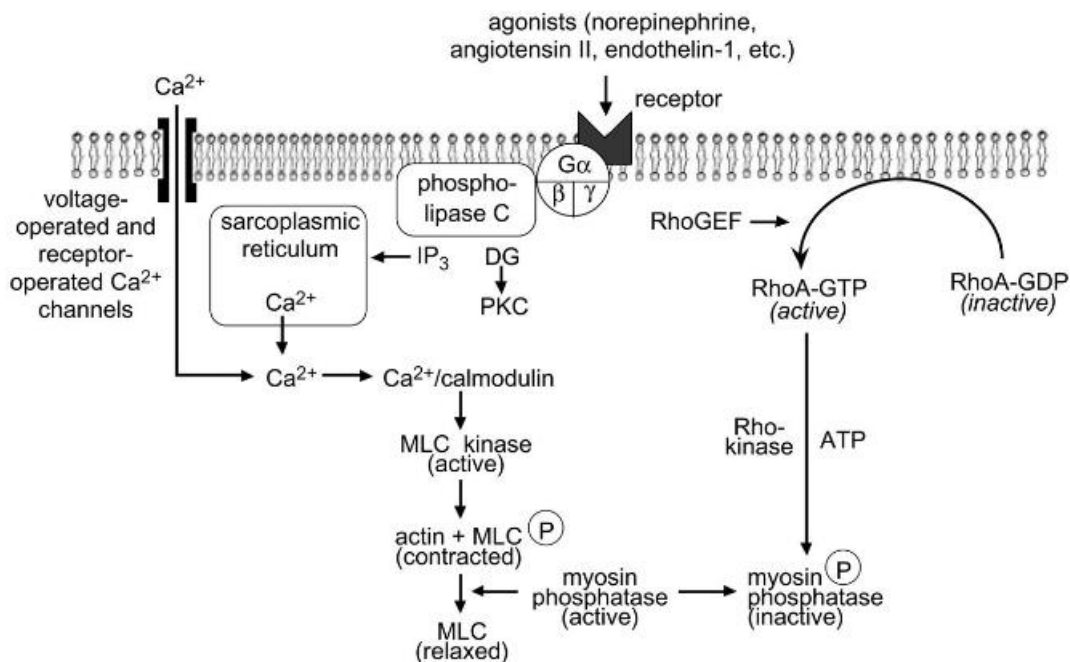


Figura 2: Sinalização envolvida na contração do músculo liso (retirado de Webb, 2003): Diacilglicerol (DG), IP₃ (inositol 1,4,5-trisfosfato); Ca^{2+} (íons cálcio), PKC (Proteína quinase C); MLC (cinase da cadeia leve da miosina), ATP (adenosina trifosfato).

A redução na concentração do cálcio intracelular é responsável pelo término da contração. Os níveis de Ca^{2+} são reduzidos com o bombeamento do mesmo para o interior do retículo sarcoplasmático, com auxílio da Ca^{2+} -ATPase. Além do transporte do Ca^{2+} para o meio extracelular por meio de trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da Ca^{2+} -ATPase. Por conseguinte, o complexo Ca^{2+} -calmodulina é desfeito, levando a inativação também da MLCK e consequentemente, a MLCP desfosforila a miosina, o que gera redução na concentração do cálcio intracelular e uma diminuição na atividade da miosina-ATPase ocasionando o relaxamento muscular (KUO &

EHRlich, 2015; SILVERTHORN, 2017). O resumo do processo de relaxamento do músculo liso é representado na figura 3.

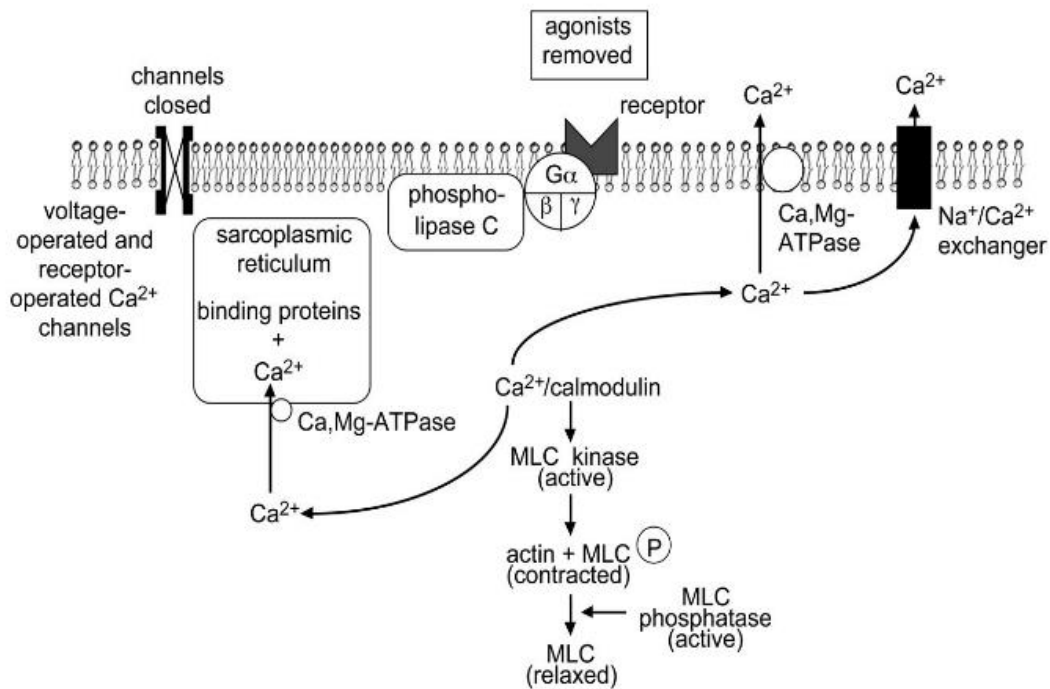


Figura 3: Sinalização envolvida no relaxamento do músculo liso (retirado de Webb, 2003): MLC (cinase da cadeia leve da miosina), Ca^{2+} (íons cálcio), Ca,Mg-ATPases (bombas de cálcio e magnésio ATPases), trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

1.4.1. Ativadores da contração muscular

A contração do músculo liso pode ser desencadeada por alterações no potencial de membrana (sinal elétrico), conhecido como acoplamento eletromecânico, ou por sinal químico, o chamado acoplamento farmacodinâmico. No processo de contração os íons cálcio (Ca^{2+}) são extremamente importantes, independentemente dos estímulos contráteis (SILVERTHORN, 2017).

A contração da despolarização da membrana induzida por KCl leva ao influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_V) do tipo L da membrana plasmática. Esse influxo aumenta a concentração de Ca^{2+} no citoplasma e estimula a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. A liberação de Ca^{2+} das reservas ocorre através de um processo chamado liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR), no qual os íons Ca^{2+} se ligam aos receptores de rianodina. Este processo faz com que as ondas de Ca^{2+} se propaguem e as células musculares lisas se contraíam. (PEREZ & SANDERSON, 2005; DONG et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2013).

Outra forma de induzir a contração muscular é a partir da estimulação dos receptores acoplados à proteína G. Estes receptores podem ser ativados por diferentes substâncias como a adrenalina. A adrenalina estimula os receptores $\alpha 1$ adrenérgicos que são acoplados à proteína G. A ativação deste receptor induz a estimulação da fosfolipase C (PLC) e forma dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O DAG ativa as isoformas da PKC, que inibem os canais de potássio e levam a despolarização da membrana e uma consequente ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e também aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . O IP3 se liga ao seu receptor localizado no retículo endoplasmático estimula a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma. A adrenalina estimula indiretamente o influxo de Ca^{2+} pelos canais da membrana plasmática e quando a adrenalina está ligada ao receptor da proteína G é capaz de ativar também a RhoA, que ativa a ROCK aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} levando a contração (BERRIDGE; BOOTMAN; RODE-RICK, 2003; BILLINGTON & PENN, 2003; DONG et al., 2006; WANG *et al.*, 2009; SILVERTHORN, 2017).

1.4.2. Inibidores da contração muscular

Existem diversos fármacos capazes de inibir a contração do músculo liso, como, as dihidropiridinas, representadas pela alodipina e nifedipina que induzem bloqueio dos canais de cálcio do tipo L voltagem-dependente, como os canais da sua subfamília, que causam inibição do influxo do cálcio e diminuição dos níveis de cálcio intracelular e consequentemente diminuição e/ou inibição da contração do músculo liso (CATTERAL, 2005; CATTERAL *et al*, 2020)

As fenilalquilaminas, como Verapamil e o Diltiazem, que atuam nos canais voltagem dependentes do tipo L, são bloqueadores de poros intracelulares, que entram no poro pelo lado citoplasmático do canal a fim de bloqueá-lo (CATTERAL, 2005).

Existe também um outro grupo de canais voltagem dependentes que são relevantes no processo de contração muscular, eles são denominados de canais de cálcio do tipo T. A kurtoxina, o níquel e o mibefradil são inibidores destes canais, levando assim ao relaxamento muscular (CHUANG et al., 1998; OYNIHAN; SMITH; MORRISON, 2008; SILVA & CABRAL, 2008; IUPHAR/BPS GUIDE TO PHARMACOLOGY, 2021).

1.4.3. Contração do ducto deferente

Como dito anteriormente, o ducto deferente é responsável por transportar os espermatozoides e este transporte ocorre por meio da contração do ducto deferente. Este é um órgão

formado por musculatura lisa e sua contração é dependente do aumento intracelular de cálcio, como descrito no item 1.4. A contração é caracterizada por uma resposta contrátil bifásica clássica, constituída por uma contração inicial, transitória e rápida, conhecida como componente “fásico”, que apresenta em um registro de força, um pico rápido, seguida de uma contração secundária lenta e sustentada, denominada componente “tônico”, que é representada, em um registro de força, por uma linha contínua horizontal, conforme esquematizado na Figura 4 (BRUSCHINI; SCHMIDT; TANAGHO, 1977; KIERSZENBAUM, 2008; LIPSKAIA et al., 2012; WALLACE et al., 2015).

De acordo com Langton e Huddart (1988), que realizaram experimentos com ducto deferente de ratos Wistar, o componente fásico e tônico da contração induzida por KCl é dependente de íons cálcio provenientes do meio extracelular. Este influxo de cálcio pelos canais de cálcio que são rapidamente inativados (canal voltagem dependente do tipo T) é responsável pelo componente fásico, enquanto a entrada de cálcio pelos canais de cálcio que são inativados lentamente é responsável pelo componente tônico (canal voltagem dependente do tipo L) (LANGTON; HUDDART, 1987, 1988). E no trabalho de Garcia-Pascual e colaboradores (1991), os autores demonstraram que está sinalização também é responsável pela contração da uretra de cordeiro, ou seja, o componente fásico depende da ativação de canais de Ca^{2+} de inativação rápida (tipo T), enquanto o componente tônico depende da ativação de canais de Ca^{2+} de inativação lenta (tipo L) (GARCIA-PASCUAL *et al*, 1991).

Em relação à contração induzida por adrenalina, foi demonstrado por HUANG *et al.* (2001), que a contração do ducto deferente é caracterizada por uma resposta bifásica, sendo que a contração fásica foi considerada rápida inicial seguida por uma contração tônica mantida ao longo do período de exposição (HUANG et al., 2001; OHMURA et al., 1992). No entanto, Boselli e colaboradores (1997), apontam que a resposta do ducto deferente de rato à noradrenalina ($3 \times 10^{-6}M$) é caracterizada por três componentes, sendo um componente fásico inicial, seguido por um componente tônico que tende de se estabilizar após 4-5 minutos, podendo durar mais de 15 minutos, e sobreposto a este componente, o que os autores nomearam de picos intermitentes de contração como esquematizado na Figura 3 (BOSELLI; BIANCHI; GRANA, 1997).

De acordo com Amobi e Smith (1999) as partes epididimal e prostática do ducto deferente de rato utilizam cálcio de diferentes fontes durante a estimulação com noradrenalina (NA). A parte epididimal utiliza predominantemente o cálcio mobilizado do meio extracelular, e o retículo sarcoplasmático (RS) serve principalmente para tamponar a entrada de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem L. Em contraste, a contração da parte prostática

induzida por NA depende tanto do cálcio extra como intracelular, com o RS servindo principalmente como fonte de cálcio. (AMOBÍ & SMITH, 1999).

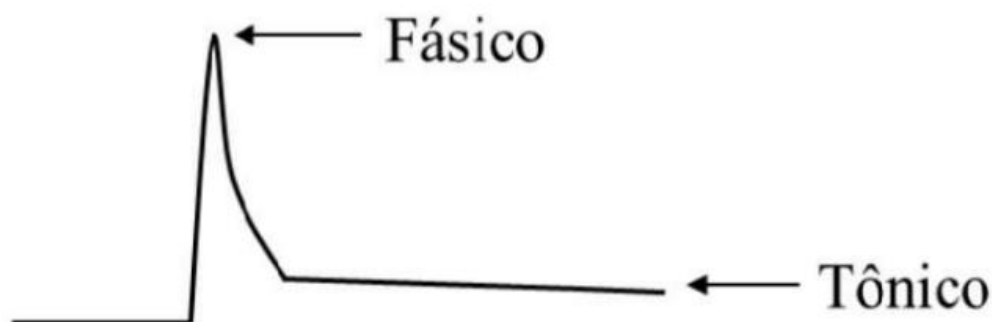


Figura 4: Desenho esquemático do registro típico da contração do ducto deferente (RABELO, 2021).

1.5. Disfunção sexual – Ejaculação precoce.

A ejaculação consiste em duas fases consecutivas distintas: a fase de emissão, na qual os espermatozoides armazenados no epidídimo caudal e as secreções das gônadas acessórias são direcionados para a uretra pela contração do músculo liso do epidídimo caudal, do ducto deferente, das vesículas seminais e da próstata. E a fase de expulsão, na qual o sêmen depositado na uretra prostática é ejetado pela uretra devido às contrações rítmicas do músculo estriado do assoalho pélvico (GIULIANO, 2011; KIGUTI & PUPO, 2012). Alterações nestes processos podem levar a ejaculação precoce (EP).

A EP é uma das disfunções sexuais masculinas mais comuns, com uma estimativa de 20% a 30% dos homens de qualquer idade, sendo acometido, em algum momento de suas vidas (BRASIL, 2018). A ejaculação precoce, conforme definido pelo Comitê de Definição de Ejaculação Precoce da Sociedade Internacional de Medicina Sexual, é caracterizada pela ejaculação que sempre ou quase sempre ocorre aproximadamente 1 minuto antes ou após a penetração vaginal. A EP possui consequências pessoais negativas como angústia, aborrecimento, frustração e/ou evitação da intimidade sexual (KIGUTI & PUPO, 2012). O controle da função ejaculatória masculina fisiológica é um processo que envolve estimulação de neurônios simpáticos, liberação de resistência para o fechamento do ducto ejaculatório e contração coordenada das vesículas seminais e do músculo liso do ducto deferente. O funcionamento correto destas estruturas e a integridade tecidual desses órgãos, é necessário para que os espermatozoides sejam transportados com êxito até a uretra prostática (BIROWO et al., 2009; GIULIANO, 2011).

A farmacoterapia da EP inclui o uso de antidepressivos (paroxetina e fluoxetina), anestésicos (tramadol) e inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (sildenafil e tadalafil). (YI *et al.*, 2019; Waldinger, 2018; LI *et al.*, 2020). No entanto, a falta de estudos sobre a relevância da EP, somado ao fato de os fármacos utilizados apresentarem efeitos adversos significativos dificultam o tratamento (GUR & SIKKA, 2015). Os países asiáticos, e em particular a Coréia, utilizam da fitoterapia há milhares de anos e acreditam que alguns fitoterápicos tenham efeitos positivos na função sexual dos homens (KIM *et al.*, 2011; SHIN *et al.*, 2015). Sendo assim, é importante que novos estudos sobre os possíveis fitoterápicos ou fármacos derivados de plantas medicinais, no tratamento da EP, sejam realizados, visando sustentabilidade científica, além de menores efeitos adversos para os pacientes e, melhores preços para a população (Luiz, 1997, apud Mattos *et al.*, 2018; Del-Vechio-Vieira *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2022).

Como dito anteriormente, ao longo da fase de emissão, as contrações coordenadas do músculo liso do ducto deferente impulsionam os espermatozoides do epidídimo em direção à uretra, assim, conhecer substâncias que inibem a contração é de extrema importância para se evitar a EP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar o efeito do extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea* na contração do ducto deferente de camundongo.

2.2. Objetivos específicos

Obter e caracterizar fitoquimicamente o extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea*,

Testar se o extrato de *Celtis iguanaea* é capaz de inibir a contratilidade do ducto deferente;

Verificar se na presença de nifedipina, há alteração do efeito de *Celtis iguanaea*;

3. METODOLOGIA

3.1. Substâncias utilizadas

Cloreto de potássio (KCl, peso molecular (PM): 74,55 g/mol, Synth). Nifedipina (Nif, N7634, PM: 346,34 g/mol, Sigma-Aldrich Co. LLC) foi doada gentilmente pelo Prof. Dr. Gustavo José da Silva Pereira, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Adrenalina (E4375, PM: 333,29, Sigma-Aldrich Co. LLC, que foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Andréa de Castro Perez, professora da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea* (150 mg/ml), fornecida pelo coorientador do trabalho, Prof. Dr. Renê Oliveira do Couto. O extrato de *Celtis iguanaea* é a substância alvo do estudo. O KCl e a adrenalina foram utilizados para estimular a contração do ducto deferente. A Nifedipina foi utilizada como controle positivo do bloqueio dos canais de cálcio. Com exceção do extrato de *Celtis iguanaea* e da nifedipina, que foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido), as demais substâncias foram diluídas em água destilada.

3.2. Obtenção e caracterização do extrato acetato de etila da *C. iguanaea*

3.2.1. Material Botânico

Amostras de folhas de *Celtis iguanaea* foram coletadas do 3º e 4º nós de indivíduos na região de cerrado modificado na cidade de Hidrolândia (GO), Brasil (786 m de altitude, 16° 53'59,4" Sul, 49° 13' 29,4" Oeste). O material botânico coletado foi identificado pelo Prof. Dr. José Realino de Paula - Faculdade de Farmácia – UFG. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o nº40110.

3.2.2. Obtenção do Extrato Acetato de Etila:

As folhas de *C. iguanaea* foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar 40°C durante 72 h e, posteriormente, pulverizadas em moinho de facas tipo Willey, obtendo-se a droga vegetal das folhas de esporão-de-galo (DVEG), com granulometria adequada para preparação do extrato. A DVEG tem sido armazenado em embalagem a vácuo em câmara fria (4° C), protegida da luz e umidade.

O extrato acetato de etila (EAcEG) foi obtido por extração exaustiva da DVEG na proporção de 100 g de pó para 1 L de acetato de etila, em aparelho de Soxhlet, sob aquecimento (60°C) por 72 h. O extrato foi concentrado em rotaevaporador sob vácuo e em temperatura

inferior a 40°C. O teor de sólidos (resíduo seco) do EAcEG é 150 mg/mL, sendo este determinado por gravimetria em estufa microbiológica a 40°C. O EAcEG foi acondicionado em frasco âmbar e tem sido armazenado sob refrigeração (4° C) até o momento do uso.

3.2.3. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA

O EAcEG foi diluído em metanol a 25 mg/mL e filtrado através de membranas Millex® (Millipore, São Paulo, SP, Brasil) de 0,45 µm antes da análise. A análise por HPLC-PDA foi efectuada utilizando um sistema Prominence UFLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), equipado com uma bomba binária LC-20AD, um auto-amostrador SIL-20AHT e um detetor de matriz de fotodíodos SPD M20A. A aquisição e a análise de dados foram efectuadas utilizando um módulo controlador Shimadzu® (CBM-20A Prominence) acoplado a um computador com o software Shimadzu® LC Solution.

A fase móvel era composta por uma mistura de água ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). O volume de injeção foi de 50 µL. A separação cromatográfica foi efectuada num modo de gradiente exploratório (ou seja, de 0,01 min a 95 min com um aumento linear de 5% a cada 5 min do solvente B, de 5% a 100% na mistura) com um caudal de 1,0 mL/min numa coluna de fase inversa, Gemini® RP-C18 (250 mmx 4,6 mm, 5µm, 110Å), adquirida à Phenomenex® (Phenomenex Inc., Torrance, CA, EUA). Os espectros UV-Vis foram registados de 200 a 800 nm. As classes de fitoquímicos provavelmente contidas no EAcCI foram identificadas através da comparação dos seus espectros ultravioleta com dados da literatura. Foram considerados os picos com pureza superior a 95%.

3.3. Animais

Para a realização do presente trabalho, foram utilizados 28 camundongos machos, da linhagem Swiss, com 60 dias de vida, provenientes do Núcleo de criação de animais de laboratório da Universidade Federal de São João del-Rei (NUCAL/UFSJ).

O manejo dos animais durante todo o período experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos e de bem-estar recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial de Camundongos do DCNAT (Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del Rei, Campus Dom Bosco) em ambiente controlado (temperatura 21°C, 12 horas claro/12 horas de escuro e exaustão de ar) com acesso livre a água e ração comercial balanceada autoclavadas (Nuvilab®).

Após atingirem 60 dias de vida, os camundongos foram eutanasiados com isoflurano e em seguida foi realizado o isolamento do ducto deferente. Todos os procedimentos realizados com animais neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ – CEUA (Protocolo N° 4745120922).

3.4. Isolamento do ducto deferente

Após a eutanásia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para o isolamento dos ductos deferentes direito e esquerdo. O isolamento ocorreu na seguinte ordem: abertura da cavidade abdominal, localização dos testículos e exposição dos mesmos, localização dos ductos deferentes direito e esquerdo, exposição dos ductos deferentes e retirada integral dos mesmos. Depois de isolados os ductos deferentes foram imediatamente imersos em solução nutritiva (LNV) conforme descrito por PICARELLI et al. (1962), com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5,7; CaCl₂ 1,8; 16 NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 15 glicose 5,5 (pH 7,4 a 30°C). Posteriormente foi realizada a dissecação dos ductos deferentes, com o auxílio de um microscópio estéreo visando retirar o máximo possível de tecido adjacente. Os ductos deferentes foram lavados internamente com a mesma solução nutritiva.

3.5. Montagem da preparação biológica e aparelhagem

Para realizar o estudo da contração muscular, foi utilizado o sistema de banho de órgãos que consiste em cubas de vidro com parede dupla, sendo a parte interna da cuba o compartimento para fixação do ducto deferente, tendo capacidade para 10mL de solução nutritiva. Entre as duas paredes da cuba, circula a água que é aquecida a 30°C por um banho maria.

O ducto deferente teve suas extremidades amarradas com fio de algodão e montado na cuba fixando-se uma das extremidades (porção prostática) em uma haste de vidro de sustentação, sendo a outra extremidade (porção epididimária) ligada ao transdutor isométrico (ADInstruments, Sydney, Austrália). A aeração da solução nutritiva ocorreu pelo interior da haste de vidro, sendo que esta foi conectada a um compressor para aeração. As contrações foram registradas pelo hardware PowerLab e analisadas pelo software LabChart (ADInstruments, Sydney, Austrália).

3.6. Protocolo experimental

3.6.1. Estudo do efeito do extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea* (EAcEG).

Após a fixação do ducto deferente ao sistema de registro, o tecido permaneceu em repouso por 30 minutos, mergulhado em solução LNV, para a estabilização da preparação. Os estudos funcionais foram testados em órgãos expostos ou não à incubação do EAcEG. Para promover a contração, foi utilizado cloreto de potássio (KCl, agente despolarizante) ou adrenalina (agonista de receptores adrenérgicos). Findado o período de estabilização da preparação, foram realizadas curvas tempo-efeito com concentrações únicas de KCl (80mM) ou adrenalina (2×10^{-5} M), de acordo com o protocolo experimental. Após a adição da droga indutora da contração, foi cronometrado 5 minutos, tempo em que este composto foi deixado em contato com o órgão para indução e registro da contração. Após os cinco minutos, a solução nutritiva com o indutor da contração foi retirada da cuba por meio de lavagens sucessivas com a solução nutritiva. Posteriormente a este processo, o órgão foi deixado em repouso por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. No 27º minuto de repouso, entre a terceira e a quarta curva foi adicionado ao banho o EAcEG. Após 3 minutos (no 30º minuto) um novo estímulo contrátil foi aplicado. Este protocolo repetiu-se com doses crescentes do EAcEG, sendo elas 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,25 mg/ml durante as contrações induzidas por KCl. E as concentrações utilizadas durante a indução por adrenalina foram 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1,0 mg/ml até a obtenção da inibição máxima da contração. A contração que antecedeu a incubação do órgão com o extrato, foi considerada a curva controle para aquele órgão.

3.6.2. Estudo da participação dos canais de cálcio voltagem dependente

Com o objetivo de comparar o efeito da nifedipina (inibidora dos canais de cálcio voltagem dependente) com o efeito de *C. iguanaea* foram realizados experimentos com o mesmo protocolo de contração, descrito em 3.6.1. porém, na presença da nifedipina. Esta foi adicionada no 17º minuto de repouso. No órgão contralateral, foi adicionado somente a nifedipina. As curvas obtidas com *C. iguanaea* foram comparadas com as curvas obtidas com *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10^{-5} M). A Figura 5 representa esquematicamente o protocolo experimental descrito nos tópicos 3.6.1 e 3.6.2.

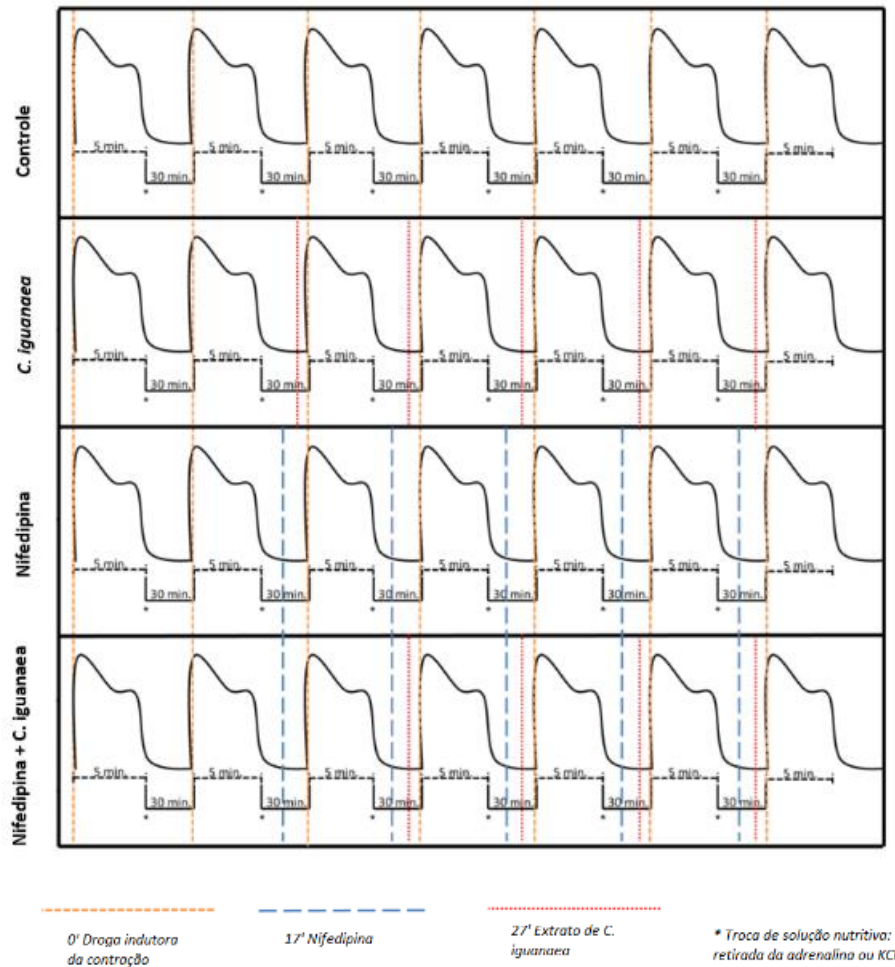


Figura 5: Representação gráfica do protocolo experimental para o estudo do efeito do extrato de *Celtis iguanaea* sobre a contração do ducto deferente induzida por KCl (80mM), adrenalina ($2 \times 10^{-5}M$), na presença ou na ausência de nifedipina ($10^{-5}M$).

3.6.3. Resumo dos grupos experimentais

Em nosso estudo utilizamos dois grupos experimentais, Grupo KCl e Grupo Adrenalina, sendo que cada grupo foi dividido em quatro subgrupos conforme podemos observar na tabela 1.

Tabela 1 – resumo dos grupos de acordo com o protocolo experimental

Grupo	KCl	Adrenalina
Subgrupo	KCl controle	Adrenalina controle
	KCl + <i>C. iguanaea</i>	Adrenalina + <i>C. iguanaea</i>
	KCl + Nifedipina	Adrenalina + Nifedipina
	KCl + Nifedipina + <i>C. iguanaea</i>	Adrenalina + Nifedipina + <i>C. iguanaea</i>

3.6.4. Parâmetros farmacológicos

As respostas contráteis foram medidas considerando as amplitudes de contração dos componentes fásico e tônico induzido por KCl ou adrenalina na presença e na ausência de *Celtis iguanaea* e/ou nifedipina. As medidas foram realizadas em gramas de tensão e em porcentagem em relação a um valor de referência, que foi considerado como 100% da amplitude de contração do componente correspondente (fásico ou tônico). O valor referência foi obtido a partir da análise da última curva (3ª curva) que antecedeu a incubação com *Celtis iguanaea* e/ou com nifedipina. A partir desses dados foram construídos gráficos com as curvas concentração-efeito inibitórias. O efeito das drogas estudadas foi analisado pelo parâmetro farmacológico IC₅₀ (logaritmo negativo da concentração molar da droga que produz 50% do efeito inibitório máximo). A Figura 5 representa os protocolos experimentais realizados.

3.6.5. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por teste *t* de Student pareado ou não pareado dependendo da análise, ou ANOVA one-way e pós teste de Dunnett para comparação entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Prism 8, versão 8.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil fitoquímico cromatográfico

Os perfis cromatográficos obtidos por HPLC-PDA para o EAcCI são apresentados na Figura 6. No total, foram identificados oitenta e um (81) picos de fitoquímicos. A maioria destes fitoquímicos (n = 56) foi caracterizada como derivados polares do ácido cinâmico ou do ácido benzoico (picos 1 a 19) ou flavonóides semi-polares (picos 20 a 56) com base nos seus espectros UV. Além disso, os compostos 57 a 81 correspondem ao perfil dos espectros UV das clorofilas.

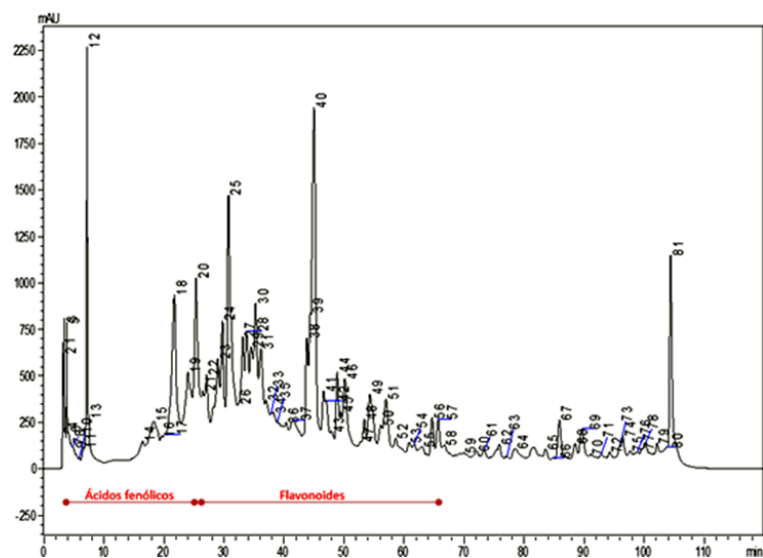


Figura 6: Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA para o extrato foliar em acetato de etilo de *Celtis iguanaea*. A fase móvel foi composta por uma mistura de água ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). O volume de injeção foi de 50 μ L. A separação cromatográfica foi realizada num modo de gradiente exploratório (ou seja, de 0,01 min a 95 min com um aumento da taxa linear de 5% a cada 5 min do solvente B, de 5% até 100% na mistura) com um caudal de 1,0 mL/min numa coluna RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, 110Å). O cromatograma 2D foi extraído a 270 nm e o 3D de 200 - 800 nm.

Os picos 2, 5, 10, 11, 12, 18, 20, 25, 31, 40, 42 e 56 podem indicar os compostos mais abundantes nas condições desta análise para o EAcCI, uma vez que obtiveram as maiores áreas no comprimento de onda extraído (270 nm). O perfil espectral destes fitoquímicos está representado na Figura 7.

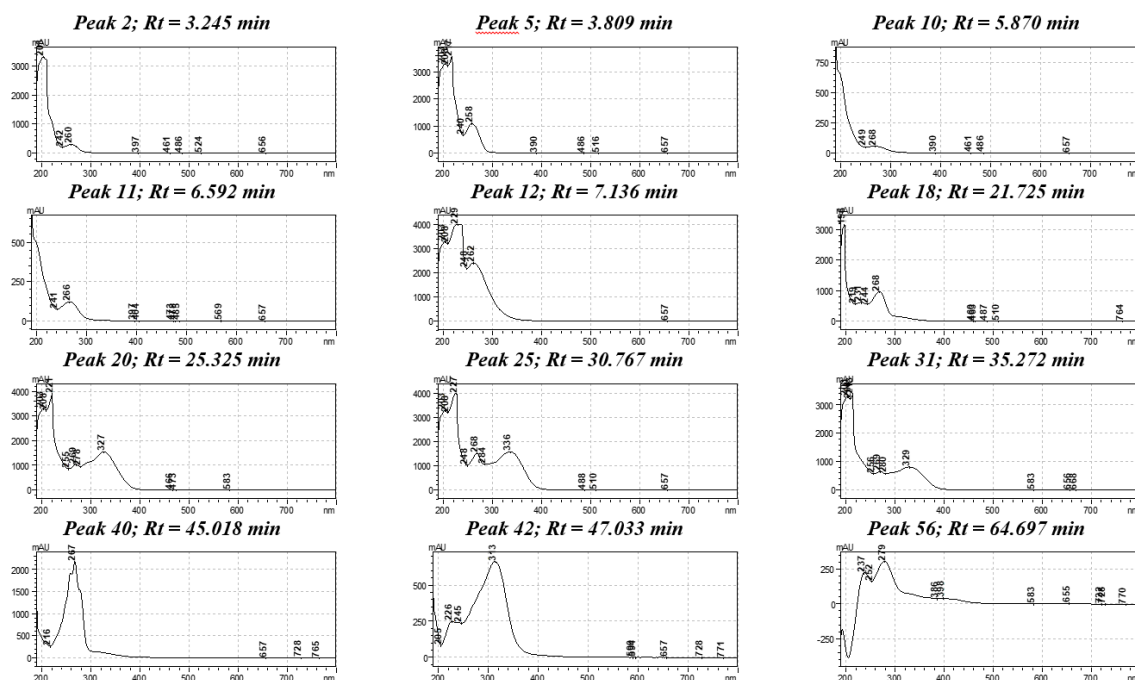


Figura 7: Perfil espectral dos fitoquímicos contidos no extrato de acetato de etilo das folhas de *Celtis iguanaea*. Dados obtidos com um detetor PDA (200 - 800 nm). Rt, tempo de retenção.

4.2. Efeito inibitório de *Celtis iguanaea* na contração induzida por KCl

A contração induzida por KCl no ducto deferente é composta por dois componentes: fásico e tônico. A Figura 8 mostra o efeito inibitório do extrato de *C. iguanaea*, sob ambos os componentes da contração. Sendo o componente tônico estatisticamente mais sensível quando utilizamos como comparação o parâmetro de IC₅₀. A Tabela 2 mostra o valor da média de pIC₅₀ de cada componente da contração.

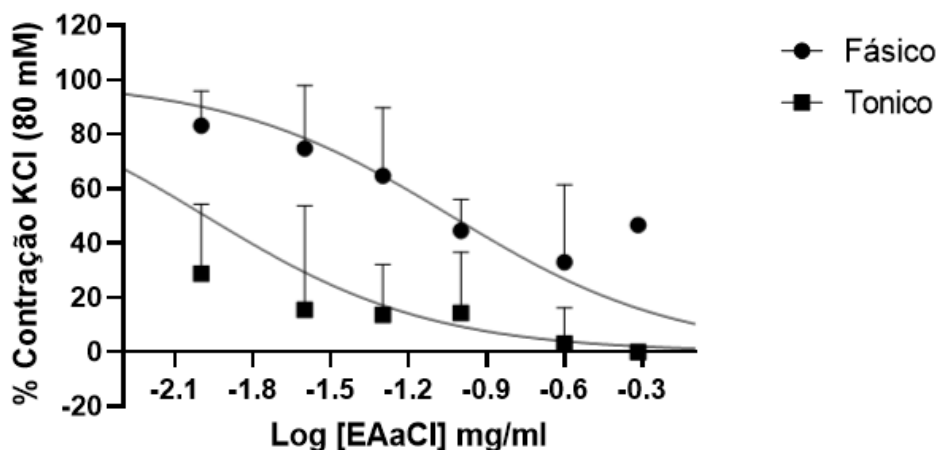


Figura 8: Efeito inibitório de concentrações crescentes de extrato de *C. iguanaea*, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes utilizadas foram 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,25

mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1 e -0,60. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 2 - Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM).

Componente	pIC_{50}
Fásico	-1,037
Tônico	-1,984*

* Componente tônico estatisticamente diferente do componente fásico, $p = 0,0006$.

4.2.1. Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl

Para tentar elucidar o mecanismo de ação de *Celtis iguanaea*, realizamos experimentos na presença de nifedipina ($10^{-5}M$), que é um inibidor clássico dos canais de cálcio voltagem dependente. Na figura 9 podemos observar que mesmo na presença de nifedipina, o extrato continuou inibindo a contração, tanto do componente fásico como do componente tônico. Os valores da Tabela 3, demonstram que o componente tônico é estatisticamente mais sensível que o componente fásico.

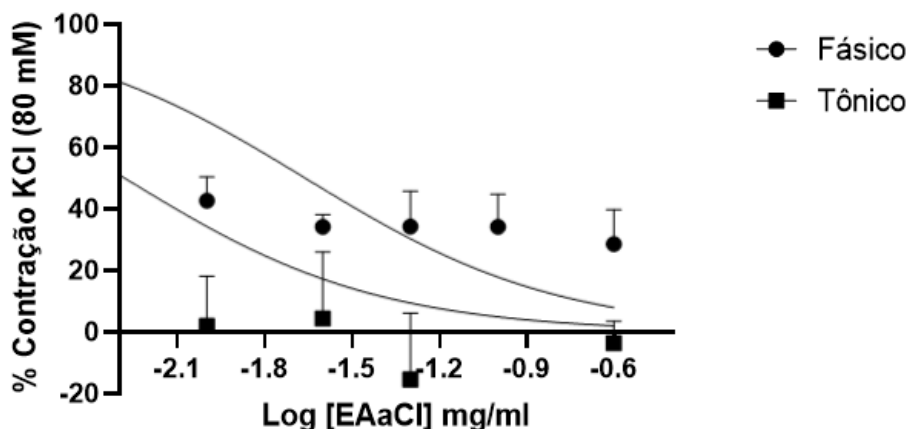


Figura 9: Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina ($10^{-5} M$). Utilizamos as seguintes concentrações crescentes de *Celtis iguanaea* / 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,25 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1 e -0,60. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 3 - Valores da média de pIC₅₀ do extrato de *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10⁻⁵ M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM).

Componente	pIC ₅₀
Fásico	-1,660
Tônico	-2,281*

* Componente tônico estatisticamente diferente do componente fásico, p <0,0001

4.2.2. Comparação do efeito inibitório de *Celtis iguanaea*, na presença e na ausência da nifedipina, sob cada componente da contração induzida por KCl.

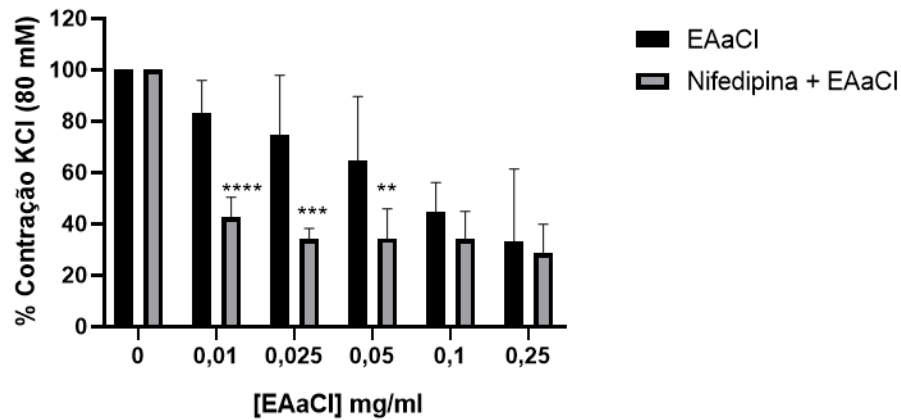
A partir dos dados obtidos nos itens 4.2. e 4.2.1. foram construídos os gráficos abaixo (Figura 10A e 10B).

A figura 10(A), mostra a comparação do efeito de EAcCl, na presença e na ausência de nifedipina, sob o componente fásico da contração. Na presença de nifedipina o efeito de *Celtis* foi potencializado somente nas menores concentrações utilizadas.

Já a figura 10(B), mostra o efeito sob o tônico de EAcCl na presença e na ausência de nifedipina. Podemos observar que na presença de nifedipina o efeito de EAcCl foi estatisticamente potencializado em algumas concentrações quando comparamos com seu efeito na ausência de nifedipina.

Além de compararmos o efeito de cada concentração do extrato sob o componente fásico e tônico, na presença ou ausência da nifedipina, também analisamos a IC₅₀. Observamos que na presença da nifedipina, a inibição tanto do componente fásico como do tônico, foi significativamente potencializada, quando comparada com o efeito de EAcCl na ausência da nifedipina (Tabela 4A e 4B, respectivamente).

A) Fásico



B) Tônico

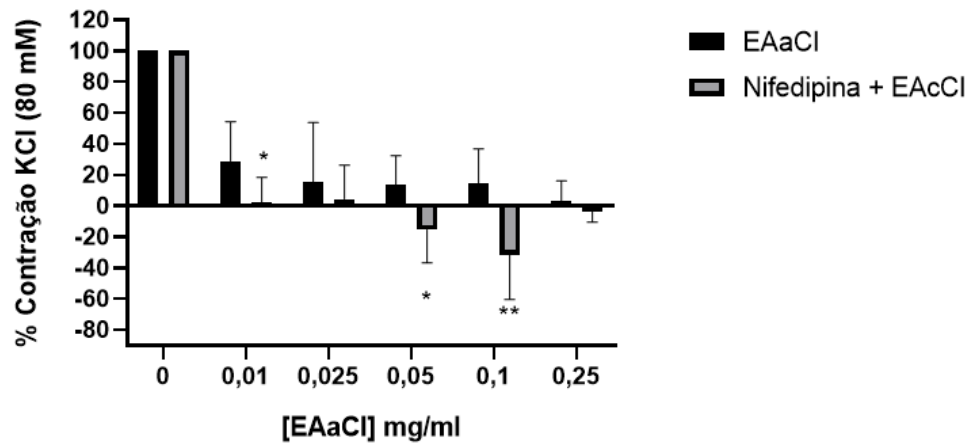


Figura 10: Efeito inibitório de *Celtis iguanaea* sob os componentes fásico e tônico da contração, induzida por KCl, na presença e ausência de nifedipina: A. Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,255 mg/ml de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). B: Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,255 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). Inibições estatisticamente significativas na comparação entre fásico/fásico e tônico/tônico. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 4A - Valores da média de IC₅₀ de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10⁻⁵M) sob o componente fásico da contração induzida por KCl (80 mM).

Fásico	pIC ₅₀
EAcCI	-1,048
Nifedipina + EAcCI	-1,660*

* Componente estatisticamente diferente, p = 0,0015

Tabela 4B - Valores da média de IC₅₀ de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10⁻⁵M) sob o componente tônico da contração induzida por KCl (80 mM).

Tônico	pIC ₅₀
EAcCI	-1,984
Nifedipina + EAcCI	-2,281*

* Componente estatisticamente diferente, p = 0,0332

4.3. Efeito inibitório de *C. iguanaea* na contração induzida por Adrenalina.

Realizamos experimentos para verificar o efeito de extrato de *C. iguanaea* na contração induzida por adrenalina. A Figura 11 mostra o efeito inibitório do extrato de *C. iguanaea*, sob ambos os componentes (fásico e tônico) da contração induzida por adrenalina. Podemos observar que ambos são sensíveis à ação do extrato, embora o componente fásico tenha sido muito mais resistente a ação inibitória de *C. iguanaea* quando comparamos com o componente tônico. Ao compararmos os valores de IC₅₀ observamos diferença estatística entre eles sendo o componente tônico mais sensível (Tabela 5).

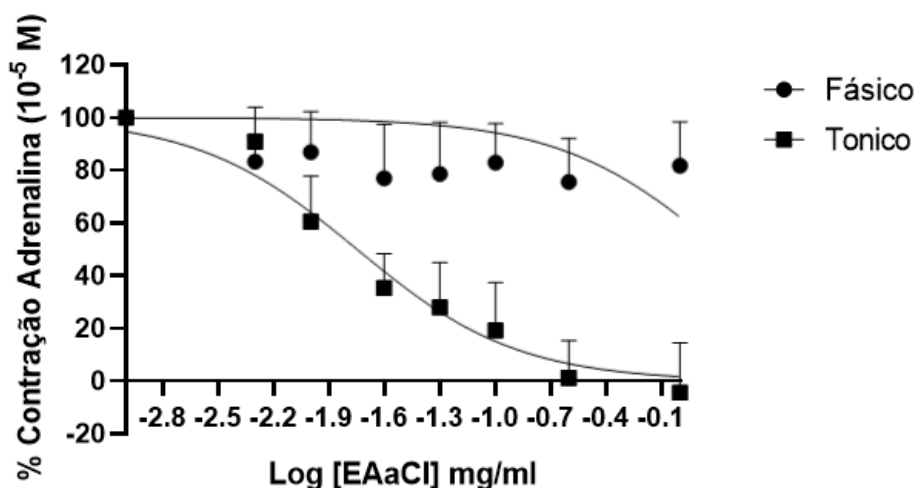


Figura 11: Efeito inibitório de concentrações crescentes de extrato de *C. iguanaea*, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por adrenalina. As concentrações crescentes utilizadas foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -3; -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1; -0,60 e 0. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 8 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 5 - Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* sob o componente fásico e tônico na contração induzida por Adrenalina ($10^{-5}M$).

Componente	pIC_{50}
Fásico	0,2167
Tônico	-1,748*

*Componente tônico diferente estatisticamente do componente fásico, $p < 0,0001$.

4.3.1. Efeito da nifedipina na contração induzida por adrenalina

Para tentar elucidar o mecanismo de ação de *Celtis iguanaea*, realizamos experimentos com a nifedipina, que é um inibidor clássico dos canais de cálcio voltagem dependente. Inicialmente realizamos experimentos com concentrações crescentes de nifedipina para determinar o valor de IC_{50} , para em seguida testar o efeito de EAcCI na presença de nifedipina. Na figura 12, demonstramos que as concentrações crescentes de nifedipina inibiram ambos os componentes da contração induzida pela adrenalina. Quando comparamos os valores das médias de pIC_{50} dos componentes fásico e tônico (Tabela 6), observamos que houve diferença significativa entre eles.

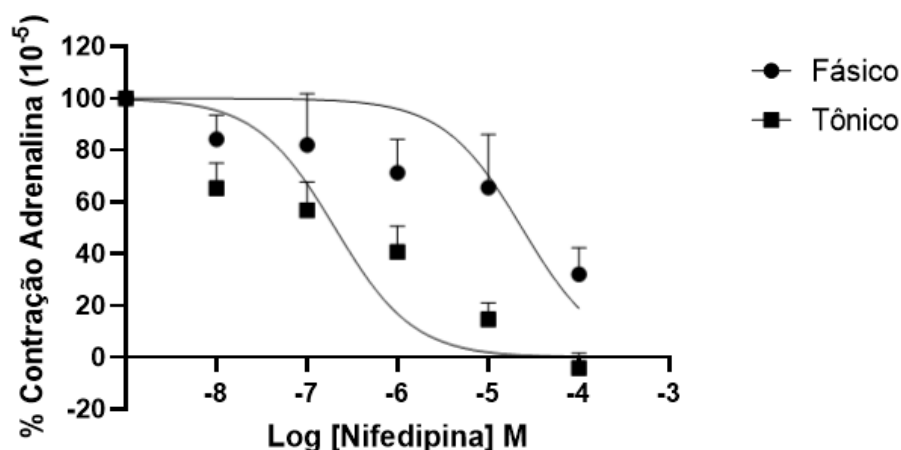


Figura 12 - Efeito inibitório de concentrações crescentes (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) de nifedipina, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração, induzida por adrenalina (10^{-5}). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 6 - Valores da média de pIC_{50} da nifedipina sob o componente fásico e tônico na contração induzida por adrenalina (10^{-5} M) no ducto deferente.

Componente	pIC_{50}
Fásico	-4,629
Tônico	-6,692*

* Componente tônico diferente estatisticamente do componente fásico, $p = 0,0024$.

4.3.2. Efeito de *Celtis iguanaea*, na presença de nifedipina (10^{-7} M) sobre a contração induzida por adrenalina.

A partir dos resultados do item 4.3.1. observamos que a IC_{50} do efeito da nifedipina é diferente para cada componente da contração, assim, realizamos experimentos de concentrações crescentes de *Celtis iguanaea* na presença de duas concentrações de nifedipina (10^{-7} M) e (10^{-5} M).

Primeiro vamos demonstrar o efeito do *Celtis iguanaea* na presença da concentração de 10^{-7} M de nifedipina (Figura 13). Ambos os componentes são sensíveis ao efeito inibitório de EAcCI na presença de nifedipina, apresentando diferença estatística entre eles (Tabela 7).

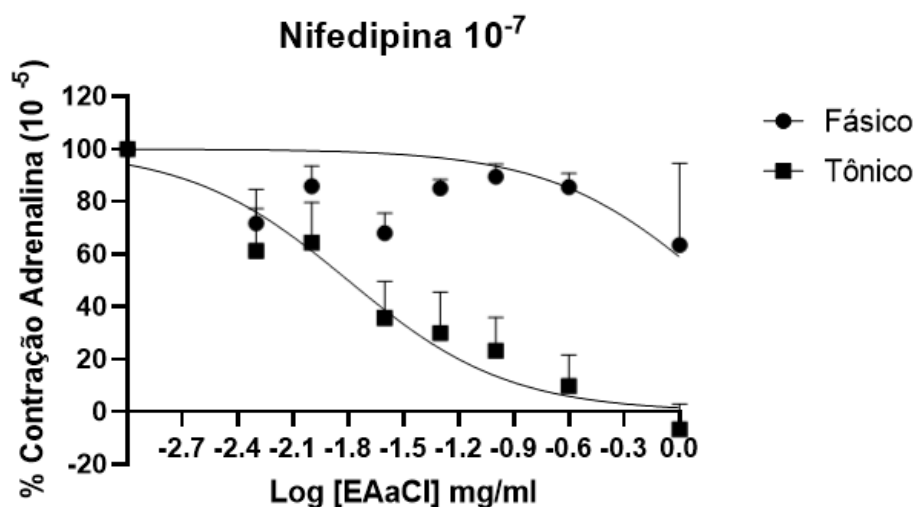


Figura 13: Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por adrenalina (10^{-5} M) na presença da nifedipina (10^{-7} M). As concentrações crescentes foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -3; -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1; -0,60 e 0. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Tabela 7 - Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10^{-7} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por adrenalina.

Componente	pIC_{50}
Fásico	0,1557
Tônico	-1,807*

* Componente tônico estatisticamente diferente do componente fásico, $p < 0,0001$

4.3.3. Comparação do efeito inibitório de *Celtis iguanaea*, na presença e na ausência da nifedipina (10^{-7} M), sob o componente fásico e tônico da contração induzida por adrenalina.

De acordo com os dados obtidos nos itens 4.3., 4.3.1. e 4.3.2. foram construídos os gráficos abaixo (Figura 14A e 14B).

A figura 14(A), mostra a comparação do efeito de EAcCl, na presença e na ausência de nifedipina (10^{-7} M), sob o componente fásico da contração, onde observamos que não houve diferença estatística entre elas. Já a figura 14(B), mostra a comparação do efeito de EAcCl, na

presença e na ausência de nifedipina ($10^{-7}M$) no componente tônico, onde foi possível observar que o efeito foi estatisticamente potencializado somente na menor concentração.

Além de compararmos o efeito de cada concentração do extrato sob o componente fásico e tônico, na presença ou ausência da nifedipina, também analisamos a IC_{50} e observamos que na presença da nifedipina, não há diferença estatística no efeito de EAcCl, independentemente do componente avaliado (Tabela 8A e 8B, respectivamente).

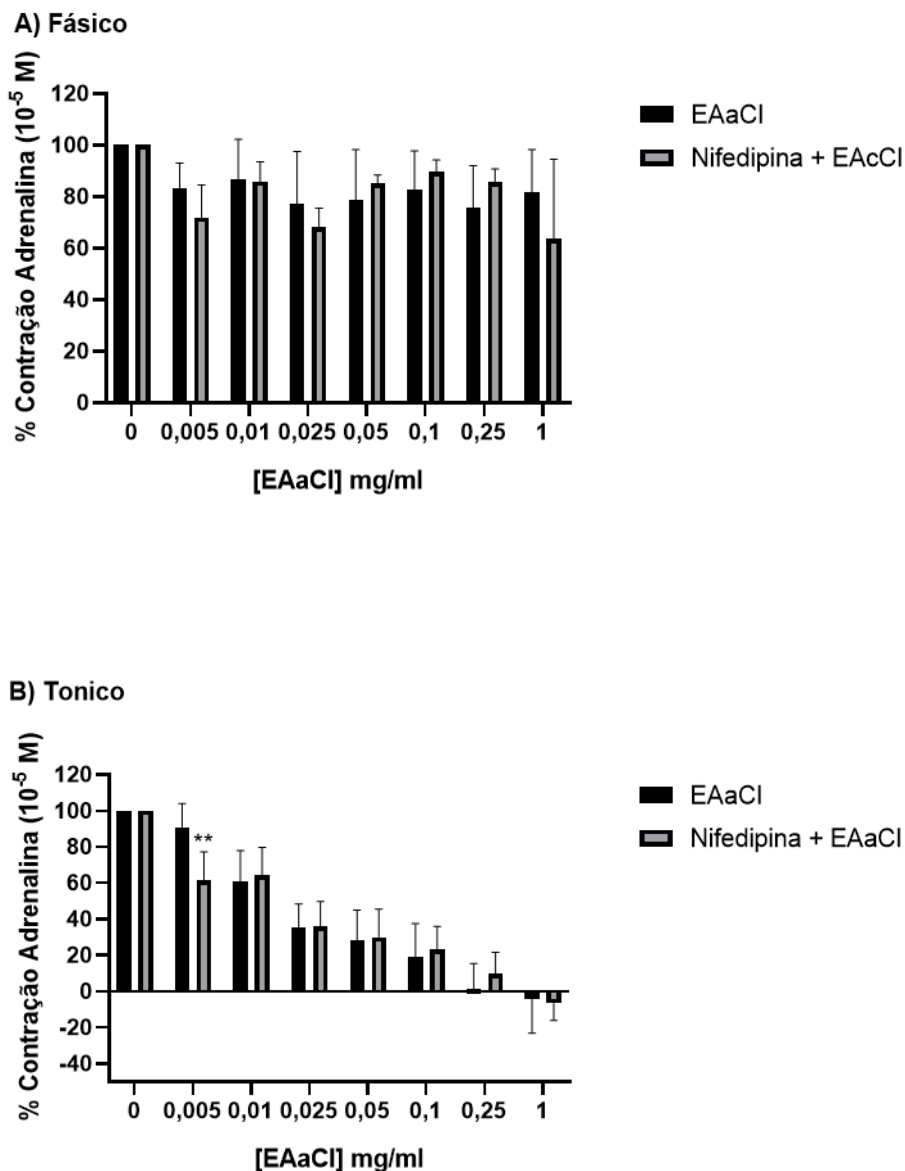


Figura 14: Efeito inibitório do EAcCl sob os componentes fásico e tônico da contração, induzida por adrenalina, na presença e ausência de nifedipina ($10^{-7}M$). A: Componente fásico da contração induzida por adrenalina, na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina ($10^{-5} M$) (cinza). B: Componente tônico da contração induzida por adrenalina, na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25

e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-7} M) (cinza). Inibições estatisticamente significativas na comparação entre fásico/fásico e tônico/tônico (Teste t Student não pareado), $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 8A - Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-7} M) sob o componente fásico na contração induzida por adrenalina (10^{-5} M).

Fásico	pIC_{50}
EAcCI	0,2167
Nifedipina + EAcCI	0,1557

Tabela 8B - Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-7} M) sobre o componente tônico na contração induzida por adrenalina (10^{-5} M).

Tônico	pIC_{50}
EAcCI	-1,748
Nifedipina + EAcCI	-1,801

4.3.4. Efeito de *Celtis iguanaea*, na presença de nifedipina (10^{-5} M) sobre a contração induzida por adrenalina.

Como dito anteriormente, realizamos experimentos de concentrações crescentes de *Celtis iguanaea* na presença de duas concentrações de nifedipina (10^{-7} M) e (10^{-5} M). A figura 15 representa o efeito de *Celtis iguanaea* na presença da concentração de 10^{-5} M de nifedipina sob o componente fásico e o componente tônico da contração induzida por adrenalina. Ambos os componentes são sensíveis à associação do EAcCI com a nifedipina, apresentando diferença estatística entre eles (Tabela 9).

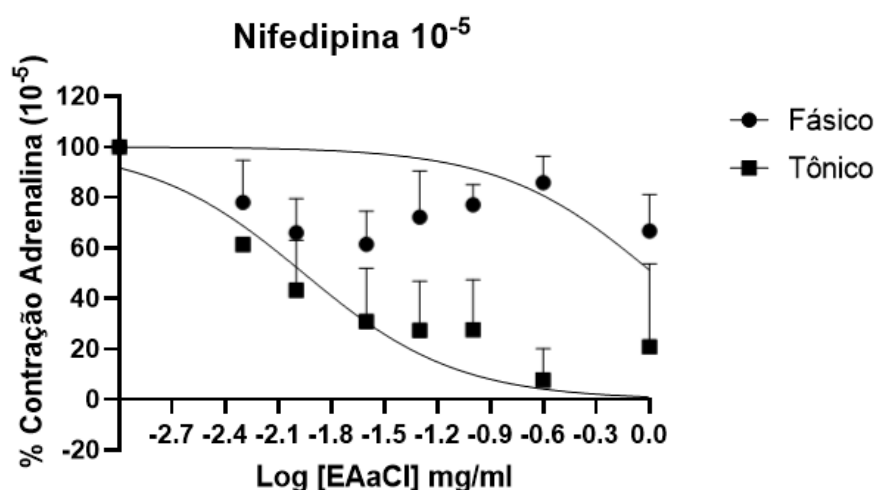


Figura 15: Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por adrenalina (10^{-5} M) na presença da nifedipina (10^{-5} M). As concentrações crescentes foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml e correspondem às seguintes concentrações em log: -3; -2,30; -2; -1,60; -1,30; -1; -0,60 e 0. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) , $p < 0,0001$ (****).

Tabela 9 - Valores da média de pIC_{50} do extrato de *C. iguanaea* na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por adrenalina.

Componente	pIC_{50}
Fásico	0,02052
Tônico	-1,957*

* Componente tônico estatisticamente diferente do componente fásico, $p < 0,0001$

4.3.5. Comparação do efeito inibitório de *Celtis iguanaea*, na presença e na ausência da nifedipina (10^{-5} M), sob o componente fásico e tônico da contração induzida por adrenalina.

De acordo com os dados obtidos nos itens 4.3., 4.3.1. e 4.3.4. foram construídos os gráficos abaixo (Figura 16A e 16B).

A figura 16(A), mostra a comparação do efeito de EAcCl, na presença e na ausência de nifedipina (10^{-5} M), sob o componente fásico da contração, onde observamos que houve diferença estatística entre elas somente em uma concentração (0,01mg/ml). Já figura 16(B), mostra a comparação do efeito de EAcCl, na presença e na ausência de nifedipina (10^{-5} M) sob

o componente tônico. O efeito do EAaCI foi estatisticamente potencializado somente na menor concentração utilizada quando comparamos com seu efeito na ausência de nifedipina.

Além de compararmos o efeito de cada concentração do extrato sob o componente fásico e tônico, na presença ou ausência da nifedipina, também analisamos a IC_{50} e observamos que na presença da nifedipina, não há diferença estatística no efeito de EAaCI, independentemente do componente avaliado (Tabela 10A e 10B, respectivamente).

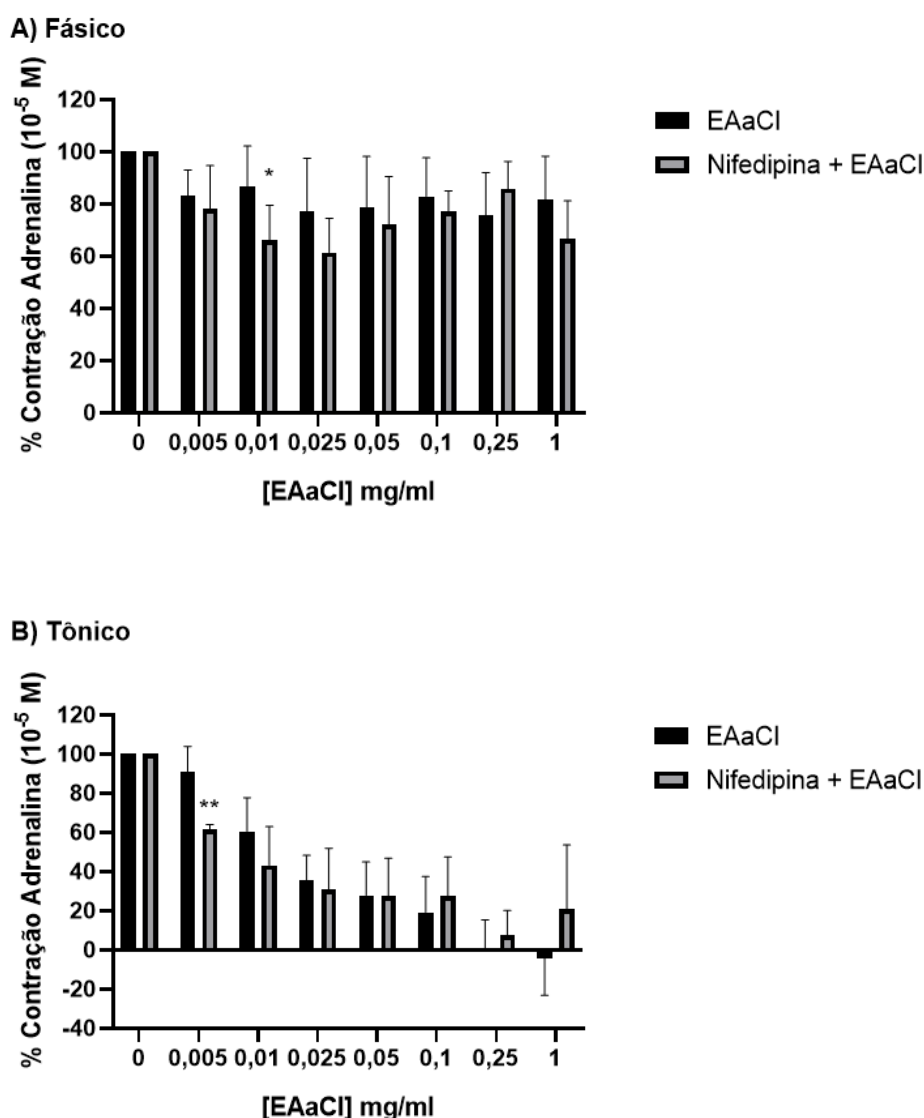


Figura 16: Efeito inibitório de EAaCI sob os componentes fásico e tônico da contração, induzida por adrenalina, na presença e ausência de nifedipina ($10^{-5}M$). A: Componente fásico da contração induzida por adrenalina, na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina ($10^{-5} M$) (cinza). B: Componente tônico da contração induzida por adrenalina (80mM), na presença de concentrações crescentes (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05;

0,1; 0,25 e 1 mg/ml) de *C. iguanaea* (preto) e de *C. iguanaea* na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (cinza). Inibições estatisticamente significativas na comparação entre fásico/fásico e tônico/tônico Teste t Student não pareado, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Tabela 10A - Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-5} M) sobre o componente fásico contração induzida por adrenalina (10^{-5} M).

Fásico	pIC₅₀
EAcCI	0,2167
Nifedipina + EAcCI	0,02052

Tabela 10B - Valores da média de IC_{50} de *Celtis iguanaea* na presença ou ausência de nifedipina (10^{-5} M) sobre o componente tônico contração induzida por adrenalina (10^{-5} M).

Tônico	pIC₅₀
EAcCI	-1,748
Nifedipina + EAcCI	-1,957

O quadro 1 mostra o resumo dos resultados obtidos. Ele mostra qual componente da contração foi mais sensível (>) a ação de *Celtis iguanaea* na presença e na ausência de nifedipina quando comparamos a IC_{50} .

Quadro 1 – Resumo dos resultados obtidos na comparação da IC₅₀ entre os diferentes protocolos e os diferentes componentes da contração no ducto deferente.

KCl		ADRENALINA	
<i>Celtis iguanaea</i>	F > T	<i>Celtis iguanaea</i>	F > T
Nif + EAcCl	F > T	Nif (10 ⁻⁷) + EAcCl	F > T
Comparação <i>Celtis</i> x Nif + EAcCl	F (EAcCl) > F (Nif + EAcCl). T (EAcCl) > T (Nif + EAcCl)	Comparação EAcCl x Nif (10 ⁻⁷) + <i>Celtis</i>	F (EAcCl) = F (Nif + EAcCl). T (EAcCl) = T (Nif + EAcCl)
		Nif (10 ⁻⁵) + EAcCl	F > T
		Comparação EAcCl x Nif (10 ⁻⁵) + EAcCl.	F (EAcCl) = F (Nif + EAcCl). T (EAcCl) = T (Nif + EAcCl)

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que *Celtis iguanaea*, foi capaz de induzir o relaxamento da contração induzida por KCl no ducto deferente de camundongo. Este relaxamento foi observado tanto no componente fásico quanto no componente tônico da contração, sendo o componente tônico mais sensível. Ao utilizarmos a *C. iguanaea* na presença de nifedipina, percebemos que o efeito do *C. iguanaea* foi potencializado, especialmente o componente tônico. Na comparação dos efeitos inibitórios em cada componente, analisados separadamente, e demonstramos que na presença da nifedipina, o efeito de EAcCI foi potencializado somente nas menores concentrações utilizadas, no componente fásico. E quando analisamos o componente tônico, o efeito de EAcCI foi estatisticamente potencializado em algumas concentrações quando comparamos com seu efeito na ausência de nifedipina.

Além disso, quando realizamos a indução da contração por adrenalina, o *Celtis iguanaea* apresentou efeito inibitório tanto no componente fásico como no tônico da contração, sendo o componente tônico estatisticamente mais sensível à ação de EAcCI. E ao analisar o efeito de EAcCI, na presença da nifedipina, percebemos que ele foi mantido. E comparando os componentes separadamente, o efeito de EAcCI, na presença e na ausência de nifedipina, observamos que, no componente fásico da contração, não houve diferença estatística. Já no componente tônico, foi possível observar que o efeito foi estatisticamente potencializado em concentrações mais baixas de EAcCI.

5.1. Avaliação da caracterização do extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea*.

5.1.1. Perfil fitoquímico cromatográfico

Os espectros obtidos para os picos 2, 5, 10 11, 12, e 18 sugerem a ocorrência de ácidos fenólicos no EAcCI. Normalmente, os fenóis simples absorvem no comprimento de onda UV curto, ou seja, na região UVC (100-280 nm) (HARBORNE, 1998). Estes compostos são provavelmente derivados do ácido cinâmico ou do ácido benzoico (SAKAKIBARA et al, 2003), uma vez que apresentam uma banda com máximos de absorção em torno de 280 nm (VINOD et al, 2015) e 230 nm (KARIMOVA et al, 2020), respectivamente. Os desvios nestes comprimentos de onda de absorção máxima (ou seja, desvios batocrômicos ou hipsocrômicos) podem ocorrer devido ao grau de ionização ou ao padrão de substituição da fração principal.

Os fitoquímicos representados pelos picos 20, 25, 31, 40, 42 e 56 apresentaram duas bandas nos espectros, o que é consistente com os flavonóides, ou seja, a banda I na faixa de 300 nm a 400 nm do anel aromático do benzopirano (anel B) e a banda II entre 240 nm e 285 nm

correspondente ao anel aromático (anel A) do substituinte fenil da estrutura principal C6-C3-C6 básica do sistema fenil-benzopirano (SIMÕES et al, 2017).

No seu conjunto, este perfil fitoquímico corrobora os dados resultantes da análise por HPLC-PDA do extrato hidroetanólico a granel (70 %) das folhas de *C. iguanaea*, no qual foram identificados três ácidos fenólicos (i.e., ácido gálico, ácido clorogénico e ácido elágico) e dois flavonóides (rutina e quercetina) (HAAS DA SILVA & FROEDER, 2016). Uma vez que o acetato de etila também é um solvente com polaridade intermediária (HAMINIUK et al, 2014), nossos achados indicam que foram capazes de arrastar agliconas semipolares (e.g., flavonas, flavonóis, flavanonas e outras agliconas com grande grau de metilação) ao lado de outros polifenóis para a amostra. Portanto, sugerimos que esses fitoquímicos contidos no EAcCI podem ser responsáveis pelos efeitos farmacológicos aqui evidenciados. No entanto, ainda são necessárias mais análises de elucidação estrutural utilizando técnicas de detecção mais selectivas (por exemplo, espectrometria de massa) para determinar com precisão quais são os principais fitoquímicos no EAcCI.

5.2. O efeito do *Celtis iguanaea* na contração induzida por KCl.

O ducto deferente, e os demais órgãos de musculatura lisa, dependem do influxo de Ca^{2+} , pela membrana plasmática, para iniciar a contração, assim como, da liberação de cálcio de estoques armazenados em organelas, como as mitocôndrias e retículo sarcoplasmático. Esse influxo de Ca^{2+} extracelular é mediado principalmente pela abertura de Ca^{2+} do tipo L voltagem dependentes. E esses canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática, ativam-se pela despolarização da membrana gerada por KCl, e medeiam a entrada de Ca^{2+} em resposta a potenciais de ação, iniciando a contração diretamente pelo aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} e também pela ativação da liberação de cálcio dependente de cálcio (CICR), pelos canais de liberação de Ca^{2+} sensíveis à rianodina no retículo sarcoplasmático (CATTERALL, 2011)

Em nossos experimentos o KCl induziu uma contração bifásica, assim como é descrito na literatura. A resposta ao KCl é constituída por uma contração inicial, transitória e rápida, conhecida como componente “fásico”, que apresenta em um registro de força, um pico rápido, seguida de uma contração secundária lenta e sustentada, denominada componente “tônico”, que é representada, em um registro de força, por uma linha contínua horizontal (HAY & WADSWORTH, 1983; LIPSKAIA et al., 2012; WALLACE et al., 2015; PERANTONI et al., 2020; LIMA et al., 2022).

Quando comparamos os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, na presença do *Celtis iguanaea*, observamos que os dois componentes são sensíveis a ação do

EAcCl. E analisando os valores da IC₅₀, verificamos diferença estatística entre os componentes. Os nossos resultados demonstram que o *Celtis iguanaea* foi capaz de induzir o relaxamento da musculatura lisa do ducto deferente, uma vez que comparamos o efeito de diferentes concentrações do mesmo sob os componentes fásico e tônico, com seus respectivos controles e observamos diferença estatística entre elas.

Não há trabalhos na literatura que associam o *Celtis iguanaea* com a contração de músculo liso, sendo assim, buscamos trabalhos que correlacionem o efeito de outras plantas à musculatura lisa e observamos que o efeito de diferentes extratos sobre a contração induzida por KCl foi demonstrado em diferentes trabalhos (RIBEIRO et al., 2003; FLEER & VERSPOHL, 2007; SANDRAEI et al., 2011; SANDRAEI et al., 2013; PERANTONI et al., 2020; LIMA et al., 2022). No canal deferente do rato, o aumento do cálcio intracelular induzido pelo KCl é causado principalmente pela despolarização da membrana e pelo influxo de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem do tipo L (Jurkiewickz et al., 1994).

Trabalhos anteriores também mostraram que, o efeito de *Ageratum conyzoides* e *Ginkgo biloba* foi maior sobre o componente tônico da contração, assim como neste trabalho (PERANTONI et al., 2020; LIMA et al., 2022). Ribeiro et al., também demonstraram em ducto deferente que a nantenina, um alcaloide isolado de *Ocotea macrophylla* apresentou efeito inibitório na contração induzida por KCl (RIBEIRO et al., 2003). Em relação a outros órgãos, também foi demonstrado o efeito relaxante de extratos sobre a contração induzida por KCl (FLEER & VERSPOHL, 2007; SANDRAEI et al., 2011; SANDRAEI et al., 2013). O íleo de ratos também foi testado frente a extratos vegetais com possível ação relaxante, como o extrato de acetona de *Prangos ferulacea* e os extratos da raiz e da parte aérea de *Pycnocycla spinosa* e também apresentaram efeitos antiespasmódicos concentração dependente na contração (SANDRAEI et al., 2011; SANDRAEI et al., 2013). E o extrato etanólico das partes aéreas de *Plantago lanceolata* L. demonstrou efeito relaxante sobre íleo e traqueia isolados de cobaia (FLEER & VERSPOHL, 2007).

Só há um trabalho com o gênero *Celtis* porém com outra espécie, mas ainda assim este trabalho corrobora com nossos resultados, *Celtis durandii*, induziu relaxamento da aorta, também na contração induzida por KCl (DIMO et al., 2005).

5.2.1. Efeitos do *Celtis iguanaea* na presença da nifedipina, na contração induzida por KCl.

Como a contração está intimamente ligada a entrada de cálcio nas células, utilizamos a nifedipina que é um bloqueador clássico dos canais de cálcio dependentes de voltagem, a fim de avaliar a inibição desses canais frente a concentrações crescentes de *Celtis iguanaea*.

Na presença de nifedipina, o relaxamento induzido por *Celtis iguanaea*, em algumas concentrações, foi aumentado e o pIC50 foi reduzido, indicando que o efeito foi potencializado. Esse resultado vai ao encontro dos resultados encontrados por Langton e Huddart (1988), que demonstraram que o componente fásico e tônico da contração induzida por KCl é dependente de íons cálcio provenientes do meio extracelular e que a presença da nifedipina causa inibição dos componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, tanto na porção epididimal quanto na porção prostática do ducto deferente. E quando as porções foram comparadas, os autores observaram que a porção prostática é mais sensível ao efeito da nifedipina, quando comparado o componente fásico e tônico, com a porção epididimal (LANGTON; HUDDART, 1988). O mesmo achado foi demonstrado por Huddart e Langton (1984) porém em experimentos realizados em íleo de ratos (HUDDART; LANGTON; SAAD, 1984). A nifedipina inibiu totalmente a resposta do KCl, indicando envolvimento dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo-L, em contração induzida pelo KCl, no íleo de ratos Wistar machos (SNDRAEI *et al.*, 2013).

Os nossos resultados mostram que a *Celtis iguanaea* na presença de nifedipina tem seu efeito potencializado e este achado vai ao encontro dos resultados encontrados por outros autores (MEHMOOD *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2010; KIM, 2015; LIMA *et al.*, 2022).

Lima *et al.* (2022), demonstraram que o extrato de *Ginkgo biloba*, e na presença da nifedipina, teve seu efeito potencializado, porém somente no componente tônico. Este grupo também testou o efeito da quercetina, na presença da nifedipina, e observaram potencialização o efeito da quercetina em ambos os componentes, fásico e tônico, propondo que a inibição causada pela quercetina não depende unicamente de canais de cálcio dependentes de voltagem (LIMA *et al.*, 2022).

De forma semelhante ao que foi mostrado em nossos resultados, o extrato de *Ligusticum jeholense* apresentou seu efeito vasorrelaxante potencializado na presença da nifedipina, na aorta torácica de ratos em uma contração induzida por fenilefrina, um indutor diferente do que utilizado em nossos resultados (KIM, 2015). E na contração induzida por acetilcolina, foi observado por Mehmood *et al.* (2010), que o efeito relaxante da *Phyllanthus emblica* foi potencializado pela nifedipina, no jejuno e íleo de camundongos. Esses resultados são semelhantes ao

que observamos na contração induzida por KCl (MEHMOOK et al., 2010). E o óleo essencial de *Mentha peperita* exibiu atividade antiespasmódica na traqueia de rato pré-contraída por carbachol e a pré-incubação com tetraetilamônio não modificou o efeito do óleo de hortelã-pimenta, mas mostrou claramente uma resposta potenciada (SOUSA et al, 2010).

No entanto, há trabalhos mostram efeito contrário ao que foi apresentado em nossos resultados, onde o efeito do extrato na presença da nifedipina foi atenuado. Como o trabalho de Amato et al (2014) observou que outra o mentol, que é capaz de reduzir a atividade mecânica do cólon distal humano bloqueando o influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} do tipo L dependentes da voltagem do sarcolema (AMATO et al, 2014). E Lafayette et al. (2008), que mostraram que a 5α -dihidrotestosterona é capaz de induzir o relaxamento da contração de KCl no canal deferente. Este efeito não foi afetado pela presença de glibenclamida, 4-aminopiridina e caribdotoxina (bloqueador do canal de K^+) e nem por ODQ (inibidor da guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico), à semelhança dos nossos resultados com a nifedipina, mas quando testaram a 5α -dihidrotestosterona na presença de nifedipina, o efeito foi revertido, sugerindo o envolvimento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (LAFAYETTE et al., 2008).

Em suma, os nossos resultados indicam que o efeito inibitório do *Celtis iguanaea* é independente dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem do tipo L, uma vez que a nifedipina não conseguiu reverter o efeito relaxante.

5.3. O efeito do *Celtis iguanaea* na contração induzida por adrenalina.

Após investigar um possível mecanismo de ação do extrato acetato de etila de *Celtis iguanaea* sobre a contração induzida por KCl, decidimos estudar o efeito do *Celtis* sobre a contração do mesmo órgão, porém induzida por adrenalina, além de estudar o possível efeito a partir da inibição dos canais de cálcio voltagem dependente.

Em relação à contração induzida por adrenalina, assim como no nosso trabalho, foi demonstrado por HUANG et al. (2001), que a contração do ducto deferente é caracterizada por uma resposta bifásica, sendo que a contração fásica foi considerada rápida inicial seguida por uma contração tônica (HUANG et al., 2001). No entanto, diferente da contração observada em nossos resultados, Boselli e colaboradores (1997), apontam que a resposta do ducto deferente de rato à noradrenalina é caracterizada por três componentes, sendo um componente fásico inicial, seguido por um componente tônico, e sobreposto a este o que os autores nomearam de picos intermitentes de contração (BOSELLI; BIANCHI; GRANA, 1997).

Quando comparamos os componentes fásico e tônico da contração induzida por adrenalina, na presença do *Celtis iguanaea*, observamos que os dois componentes são sensíveis a ação do *Celtis*. E analisando os valores da IC₅₀, verificamos que não há diferença estatística entre os componentes. A *Celtis iguanaea* induziu um relaxamento dependente da concentração na contração induzida pela adrenalina. No entanto, a componente fásica é mais resistente quando comparada com a componente tônica.

Não há relatos da utilização de *Celtis iguanaea* na contração induzida por adrenalina, mas observamos, que outras plantas apresentaram uma ação espasmolítica na contração do ducto deferente. A nantenina, um alcaloide isolado de *Ocotea macrophylla* e *Morinda ifolia* Linn e seus princípios bioativos Scopoletina e hidrato de rutina apresentaram efeito relaxante na contração induzida por noradrenalina. (RIBEIRO *et al.*, 2003; PANDY *et al.*, 2014).

5.3.1. Efeitos do *Celtis iguanaea* na presença da nifedipina, na contração induzida por adrenalina.

O aumento de cálcio intracelular é importante para a contração do ducto deferente, por isso decidimos verificar se o efeito de EAcCI seria modulado pela presença de nifedipina. E como a literatura relacionando o *Celtis iguanaea* frente a contração de músculos liso ainda é escassa, na tentativa de determinar a dosagem ideal de nifedipina, que interaja com os canais de cálcio, na contração induzida por adrenalina para ser utilizada juntamente com o *Celtis iguanaea*, realizamos uma curva de dose-efeito da nifedipina na contração induzida pela adrenalina e observamos que o componente fásico teve pIC₅₀ -4,629 e o componente tônico apresentou pIC₅₀ -6,692, apresentando diferença estatística entre eles.

Sendo assim, observamos que o efeito da nifedipina é diferente em cada componente da contração, e por isso, realizamos experimentos de concentrações crescentes de *Celtis iguanaea* na presença de duas concentrações de nifedipina (10⁻⁷M e 10⁻⁵M). E independentemente da dosagem na nifedipina, observamos que os componentes são sensíveis à associação do EAcCI com a nifedipina, apresentando diferença estatística entre eles. Essa inibição indica que na contração induzida pela adrenalina, pelo menos em parte é causada pelo influxo de íons Ca²⁺ dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L. E alguns trabalhos já demonstraram o efeito da nifedipina sobre a contração induzida por noradrenalina (OHMURA *et al.*, 1992; KIGUTI, 2011). Ohmura *et al.* (1992), demonstraram este efeito inibitório nas porções prostática e epididimal, enquanto Kiguti (2011), que mostrou o efeito no órgão inteiro (OHMURA *et al.*, 1992; KIGUTI, 2011). O trabalho de Boselli *et al.* (1998), apresenta que a nifedipina foi responsável por inibir o componente fásico e o componente tônico da contração induzida por noradrenalina

($3 \times 10^{-6}M$), em ductos deferentes de ratos Wistar. Os autores propõem que esse resultado pode ser explicado pela existência de dois tipos de canais de cálcio que são abertos quando há estimulação dos adrenoceptores. O primeiro canal, sensível à nifedipina, permite a entrada do cálcio que começa a contrair. Esse canal é responsável pelo componente fásico e, parcialmente, pelo componente tônico. O segundo canal, que também é sensível à nifedipina, permite a entrada de cálcio, o que é responsável pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares. Sendo que o componente tônico será mantido por meio da mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. (BOSELLI et al., 1998). Já o trabalho de Huang et al. (2001), demonstra que o pré-tratamento com nifedipina não afetou o componente fásico da contração induzida por noradrenalina na porção epididimal do ducto deferente de rato, demonstrando que o cálcio intracelular possui uma contribuição substancial para este componente da contração (HUANG et al., 2001).

Analisando os componentes fásico e tônico separadamente, na presença da nifedipina, observamos que, como esperado, a nifedipina inibiu tanto o componente fásico como o tônico. No entanto, a resposta de relaxamento à *Celtis iguanaea* não foi significativamente modificada pela pré-incubação com nifedipina. E buscamos trabalhos que ocoberem com esse resultado e vimos que o trabalho de Amato et al. (2014), testou o efeito do Menthol frente diferentes substâncias para tentar elucidar o seu possível mecanismo de ação. Na presença de tetrodotoxina (bloqueador da transmissão neural), ODQ (inhibitor of NO-sensitive guanylate cyclase) ou tetraetilamonio (bloqueador de canais de K^+) o efeito do Menthol não foi revertido sugerindo que o Menthol não causa inibição da contração por atuação nesta via de sinalização. Estes resultados são parecidos com o que encontramos, porém com nifedipina, mas neste mesmo trabalho quando foi testado o efeito do Menthol na presença da nifedipina, o efeito foi revertido, sugerindo que Menthol inibe os canais de Ca^{2+} voltagem dependente do tipo L, sendo este resultado diferente do que obtivemos (AMATO et al., 2014).

Já Bertin et al., (2011), apresentou que após a incubação dos tecidos arteriais com nifedipina, o vasorrelaxamento induzido pelo extrato metanólico da semente de *Casimiroa edulis* não foi afetada, tanto em tecidos arteriais jovens como velhos, da pré-contração induzida pela fenilefrina. Esse resultado é semelhante ao nosso, onde na presença da nifedipina, o efeito não foi alterado, excluindo a possibilidade de interação do extrato de *Casimiroa edulis* ou *Celtis iguanaea* nos canais de cálcio do tipo L (BERTIN et al., 2011). Já o trabalho de Wu et al. (2014), mostra um efeito contrário ao que foi apresentado em nossos resultados, onde a vindorosina, o principal componente da *Catharanthus roseus* teve seu efeito relaxante atenuado na artéria renal de ratos, em uma contração induzida por fenilefrina (WU et al., 2014).

Sendo assim, uma vez que o pré-tratamento com nifedipina não alterou os valores IC_{50} para o relaxamento da *Celtis iguanaea*, é evidente que os canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem do tipo L não são responsáveis pelo efeito relaxante da *Celtis iguanaea*.

6. CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que a *Celtis iguanaea* é capaz de inibir algum mecanismo envolvido na sinalização da contração do canal deferente. Estes resultados contribuem para a elucidação do seu mecanismo de ação. Uma vez que a inibição da contração deste órgão pode retardar a ejaculação, esta poderia ser uma estratégia terapêutica para o tratamento da ejaculação precoce e os seus possíveis usos fitoterapêuticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amato, A., Liotta, R., & Mulè, F. (2014). Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: Analysis of the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 295–301.
- Amobi, I. B., & Smith, I. C. H. (Orgs.). (1999). 271-278 Different actions in the rat prostatic and epididymal vas deferens of cyclopiazonic acid or ryanodine on noradrenaline-induced contractions N. *General Pharmacology*, 32.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Bertin, R., Garcia-Argaéz, A., Martínez-Vázquez, M., & Frolidi, G. (2011). Age-dependent vasorelaxation of *Casimiroa edulis* and *Casimiroa pubescens* extracts in rat caudal artery in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 934–936.
- Billington, C. K., & Penn, R. B. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*.
- Birowo, P., Uckert, S., Kedia, G. T., Sonnenberg, J. E., Thon, W. F., Rahardjo, D., & Kuczyk, M. A. (2010). Characterization of the effects of various drugs likely to affect smooth muscle tension on isolated human seminal vesicle tissue. *Urology*, 75(4), 974–978.
- Borges, F. F. V., Machado, T. C., Cunha, K. S., Pereira, K. C., Costa, E. A., Paula, J. R. D. E., & Chen-Chen, L. (2013). Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3), 955–964.
- Boselli, C., Bianchi, L., Barbieri, A., & Grana, E. (1998). Effect of calcium antagonists on the response to noradrenaline in the whole and bisected rat vas deferens. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 18(5), 297–306.

- Boselli, C., Bianchi, L., & Grana, E. (1997). Profiles of the response to noradrenaline in the whole and bisected rat vas deferens. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 17(2), 97–107.
- Bruschini, H., Schmidt, R. A., & Tanagho, E. A. (1977). Studies on the neurophysiology of the vas deferens. *Investigative urology*, 15(2).
- Carafoli, E. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*.
- Catterall, W. A. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews Pharmacol Rev*.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8).
- Catterall, W. A., Lenaeus, M. J., & El-Din, T. M. (2020). Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.
- Cheng, J.-T. (1976). “calcium-induced release of calcium” in rectal smooth muscle of mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 26(1), 73–78.
- Chuang, R. S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., & Swartz, K. J. (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature Neuroscience*, 1(8), 668–674.
- Costa, E. A. Souza, F. B. Efeito gastroprotetor do extrato aquoso de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão de galo). Disponível em: <http://www.fesbe.org.br/regional2008/?resumos/36.019> em 01 de novembro de 2008.

- de Sousa, A. A. S., Soares, P. M. G., de Almeida, A. N. S., Maia, A. R., de Souza, E. P., & Assreuy, A. M. S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 433–436.
- Decreto nº 5.813, de 22 de junho de. (2006). *Aprova Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União.*
- Del-Vechio-Vieira, G., Santos, B. C. S., Alves, M. S., Araújo, A. L. A., Yamamoto, C. H., Pinto, M. A. O., Kaplan, M. A. C., & Sousa, O. V. (2016). Bioactivities of the ethanol extract from *Ageratum fastigiatum* branches: antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88(3), 1471–1484.
- Dimo, T., Ntchapda, F., Atchade, A. T., Yewah, M. P., Kamtchouing, P., & Ngassam, P. (2005). Effects of methylene chloride/methanol leaf extract of *Celtis durandii* engler (Ulmaceae) on constriction of rat aorta. *Die Pharmazie*, 60(7), 548–550.
- Donato, F. M. (2008). *Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.*
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (2006). Calcium in cell injury and death. *Annual Review of Pathology*, 1(1), 405–434.
- 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. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533–535.
- Fleer, H., & Verspohl, E. J. (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(6), 409–415.
- Fry, C. H., & Jabr, R. I. (2014). T-type Ca²⁺ channels and the urinary and male genital tracts. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 466(4), 781–789.

- García-Pascual, A., Costa, G., Isla, M., Jimenez, E., & García-Sacristán, A. (1991). Potassium-induced contraction in the lamb proximal urethra: involvement of norepinephrine and different calcium entry pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(1), 127–134.
- Giuliano, F. (2011). Neurophysiology of erection and ejaculation. *The Journal of Sexual Medicine*, 8 Suppl 4(Supplement_4), 310–315.
- Gonçalves, N. Z., Júnior, R. S. L., Rodrigues, C. R., Rodrigues, A. R., & Cunha, L. C. (2015). Toxicidade oral aguda do extrato de folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent em ratos e camundongos. *Rev. Bras. Plantas Med*, 17(4), 1118–1124.
- Guerra, P. M.; Nodari, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre. 2001.
- Gur, S., & Sikka, S. C. (2015). The characterization, current medications, and promising therapeutics targets for premature ejaculation. *Andrology*, 3(3), 424–442.
- Haas da, S. A. R., & Forbrig, F. A. L. (2016). Safety assessment of esporão de Galo (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent) crude extract from leaves: Acute and subacute toxicity studies in male rats. *Journal of glycomics & lipidomics*, 06(01).
- Hamilton, D. W., & Cooper, T. G. (1978). Gross and histological variations along the length of the rat vas deferens. *The Anatomical Record*, 190(4), 795–809.
- Haminiuk, C. W. I., Plata-Oviedo, M. S. V., de Mattos, G., Carpes, S. T., & Branco, I. G. (2014). Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2862–2866.
- Harborne, J. B. (1973). Methods of Plant Analysis. Em *Phytochemical Methods* (p. 1–32). Springer Netherlands.

- Hay, D. W., & Wadsworth, R. M. (1983). KCl contractions in the rat intact and bisected vas deferens: contribution of endogenous noradrenaline release. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 10(1), 77–86.
- Hedlund, H., Andersson, K. E., & Larsson, B. (1985). Effect of drugs interacting with adreno-receptors and muscarinic receptors in the epididymal and prostatic parts of the human isolated vas deferens. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 5(3), 261–270.
- Huang, Y., Pai, R. K., Lau, C. W., Chan, F. L., Chen, Z. Y., & Yao, X. Q. (2001). Modulatory effect of protein kinase C activator on contractility of rat Vas deferens. *Pharmacology*, 62(1), 2–9.
- Huddart, H., Langton, P. D., & Saad, K. H. (1984). Inhibition by papaverine of calcium movements and tension in the smooth muscles of rat vas deferens and urinary bladder. *The Journal of Physiology*, 349(1), 183–194.
- Jurkiewicz, A., Lafayette, S. S., Nunes, S. H., Martini, L. C., Do Carmo, L. G., Wanderley, A. G., & Jurkiewicz, N. H. (1994). Decreased density of binding sites for the Ca²⁺ channel antagonist [3H]isradipine after denervation of rat vas deferens. *European Journal of Pharmacology*, 256(3), 329–333.
- Karimova, N. V., Luo, M., Grassian, V. H., & Gerber, R. B. (2020). Absorption spectra of benzoic acid in water at different pH and in the presence of salts: insights from the integration of experimental data and theoretical cluster models. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 22(9), 5046–5056.
- Kierszenbaum, A. L. (2008). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Elsevier.
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (2012). *Histologia e Biologia Celular Uma Introdução à Patologia*. 3ed. Elsevier.

- Kiguti, L. R. A., & Pupo, A. S. (2012). Investigation of the Effects of $\alpha 1$ -Adrenoceptor Antagonism and L-Type Calcium Channel Blockade on Ejaculation and Vas Deferens and Seminal Vesicle Contractility In Vitro. *Journal of Sexual Medicine*, 9, 159–168.
- Kim, B., Lee, K., Chinannai, K., Ham, I., Bu, Y., Kim, H., & Choi, H.-Y. (2015). Endothelium-independent vasorelaxant effect of Ligusticum jeholense root and rhizoma on rat thoracic aorta. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(6), 10721–10733.
- Koslov, D. S., & Andersson, K.-E. (2013). Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens-an update. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 101.
- Kumar, S., Bajwa, B. S., Kuldeep, S., & Kalia, A. N. (2013). Anti-inflammatory of Herbal Plants: A Review. *International Journal of Advances in Pharmacy*, 2.
- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a006023.
- Lafayette, S. S. L., Vladimirova, I., Garcez-do-Carmo, L., Monteforte, P. T., Caricati Neto, A., & Jurkiewicz, A. (2008). Evidence for the participation of calcium in non-genomic relaxations induced by androgenic steroids in rat vas deferens: Non-genomic effects of androgens in vas deferens. *British Journal of Pharmacology*, 153(6), 1242–1250.
- Langton, P. D., & Huddart, H. (1987). The involvement of fast calcium channel activity in the selective activation of phasic contractions by partial depolarization in rat vas deferens smooth muscle. *General Pharmacology*, 18(1), 47–55.
- Langton, Philip D., & Huddart, H. (1988). Voltage and time dependency of calcium mediated phasic and tonic responses in rat vas deferens smooth muscle—The effect of some calcium agonist and antagonist agents. *General Pharmacology*, 19(6), 775–787.
- Li, G., Chang, D., Chen, D., Zhang, P., You, Y., Huang, X., & Cai, J. (2020). Selective dorsal neurotomy in the treatment of premature ejaculation: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 99(34), e21866.

- Lima, V. B. A., Almeida, J. M. D., & Monteforte, P. T. (2022). Estudo do efeito de extratos do Ginkgo biloba e da quercetina no ducto deferente de camundongo. *Research, Society and Development*, 11(12), e88111233441.
- Lipskaia, L. (2012). Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans. *Cap*, 2, 28–44.
- Lorenzi, H., & Souza, H. M. (1999). Plantas ornamentais do Brasil 2. Em *Nova Odessa: Instituto Plantarum*.
- Luiz, M. T. (1997). Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. *Physis (Rio de Janeiro, Brazil)*, 7(1), 13–43.
- Martins, J. L. R., Sousa, F. B., Fajemiroye, J. O., Ghedini, P. C., Ferreira, P. M., & Costa, E. A. (2014a). Anti-ulcerogenic and antisecretory effects of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent hexane leaf extract. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 16(2), 250–255.
- Martins, José Luís Rodrigues, Rodrigues, O. R. L., da Silva, D. M., Galdino, P. M., de Paula, J. R., Romão, W., da Costa, H. B., Vaz, B. G., Ghedini, P. C., & Costa, E. A. (2014b). Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3), 1616–1624.
- Mattos, G., Camargo, A., Sousa, C. A. de, & Zeni, A. L. B. (2018). Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. *Ciencia & saude coletiva*, 23(11), 3735–3744.
- Mehmood, M. H., Siddiqi, H. S., & Gilani, A. H. (2011). The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca²⁺ channels. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 856–865.
- Moraes, W. F. D. E., Silva, D. P. B. D. A., Florentino, I. F., Almeida, D. S., Moreira, L. K. S., Nascimento, M. V. M., Carvalho, P. M. G. D. E., Couto, R. O. D. O., Paula, J. R. D. E., & Costa, E. A. (2022). Efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do extrato de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent de ratos. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94.

- Moraes, Weuller Filho D. E., Silva, D. P. B. D. A., Florentino, I. F., Almeida, D. S., Moreira, L. K. S., Nascimento, M. V. M., Carvalho, P. M. G. D. E., Couto, R. O. D. O., Paula, J. R. D. E., & Costa, E. A. (2022). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of extract of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 94(suppl 3).
- Moynihan, A. T., Smith, T. J., & Morrison, J. J. (2008). The relaxant effect of nifedipine in human uterine smooth muscle and the BKCa channel. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Mukherjee, S., Trice, J., Shinde, P., Willis, R. E., Pressley, T. A., & Perez-Zoghbi, J. F. (2013). Ca²⁺ oscillations, Ca²⁺ sensitization, and contraction activated by protein kinase C in small airway smooth muscle. *The Journal of General Physiology*, 141(2), 165–178.
- Ohmura, T. (1992). Identification of α 1-adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens: binding and functional studies. *British Journal of Pharmacology*, 697–704.
- Pandy, V., Narasingam, M., Kunasegaran, T., Murugan, D. D., & Mohamed, Z. (2014). Effect of Noni (*Morinda citrifolia* Linn.) fruit and its bioactive principles scopoletin and rutin on rat Vas deferens contractility: An *in vivo* study. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–11.
- Perantoni, L. G. Z. (2020). Spasmolytic effects of *Ageratum conyzoides* in vas deferens. *Medicinal & Aromatic Plants*, 3–5.
- Pereira, K. C. S. (2008). Ausência de efeito genotóxico do extrato de esporão-de-galo em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Resumo do 54º Congresso Brasileiro de Genética*.
- Perez, J. F., & Sanderson, M. J. (2005). The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *The Journal of General Physiology*, 125(6), 535–553.

- Picarelli, Z. P., Hyppolito, N., & Valle, J. R. (1962). Synergistic effect of 5-hydroxytryptamine on the response of rats's seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*.
- Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. (2016). *Diário Oficial da União*.
- Portaria no 971, de 03 de maio de 2006. (2006). *Diário Oficial da União*.
- Ribeiro, R. de A., Garcez do Carmo, L., Vladimirova, I., Jurkiewicz, N. H., & Jurkiewicz, A. (2003). Nantenine blocks muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens. *European Journal of Pharmacology*, 470(1–2), 37–43.
- Sadraei, H., Asghari, G., & Poorkhosravi, R. (2011). Spasmolytic effect of root and aerial parts extract of *Pycnocycla spinosa* on neural stimulation of rat ileum. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 43–50.
- Sadraei, H., Shokoohinia, Y., Sajjadi, S. E., & Mozafari, M. (2013). Antispasmodic effects of *Prangos ferulacea* acetone extract and its main component osthole on ileum contraction. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 137–144.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571–581.
- Saúde Sexual e Saúde Reprodutiva : os homens como sujeitos de cuidado / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas* (Vol. 56). (2018). Ministério da Saúde.
- Shin, Y. S., Zhao, C., Zhang, L. T., & Park, J. K. (2015). Current status and clinical studies of oriental herbs in sexual medicine in Korea. *The World Journal of Men's Health*, 33(2), 62–72.
- Silva, A. V., & Cabral, F. R. (2008). epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 14(2), 39–45.

- Silva Ar, H., & Al, F. (2016). Safety Assessment of Esporão de Galo (*Celtisguanaea* (Jacq.) Sargent) Crude Extract from Leaves: Acute and Subacute Toxicity Studies in Male Rats. *J. GlycomicsLipidomics*, 01.
- Silverthorn, D. U. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. Artmed, 2017.
- Simões, C., Schenkel, E. P., & Mello, J. (2017). *Farmacognosia Do Produto Natural Ao Medicamento*. Artmed.
- Tortora, Gerard J. *Princípios de anatomia e fisiologia / Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson; tradução Ana Cavalcanti C. Botelho... [et al.]*. – 14. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C., & Maciel, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Quimica nova*, 28(3), 519–528.
- Vinod, K. S., Periandy, S., & Govindarajan, M. (2015). Spectroscopic analysis of cinnamic acid using quantum chemical calculations. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 808–817.
- Voltage-gated calcium channels (CaV) in GtoPdb v.2021.3. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2021; 2021(3). Available from <<https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=80>>
- Waldinger, M. D. (2018). Drug treatment options for premature ejaculation. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(10), 1077–1085.
- Wallace, A., Gabriel, D., Mchale, N. G., Hollywood, M., Athornbury, K. D., & Gerard, P. S. (2015). Regulation of nerve-evoked contractions of rabbit vas deferens by acetylcholine. *Physiol Rep*, 3(9).
- Wang, T., Kendig, D. M., Smolock, E. M., & Moreland, R. S. (2009). Carbachol-induced rabbit bladder smooth muscle contraction: roles of protein kinase C and Rho kinase. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 297(6), F1534–F1542.

- Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, 27(4), 201–206.
- Westfall, D. P., Stitzel, R. E., & Rowe, J. N. (1978). The postjunctional effects and neural release of purine compounds in the guinea-pig vas deferens. *European Journal of Pharmacology*, 50(1), 27–38.
- Wu, X.-L., Cheang, W., Zhang, D.-M., Li, Y., Lau, C.-W., Wang, G.-C., Huang, Y., & Ye, W.-C. (2014). Antagonism of Ca²⁺ influx via L-type Ca²⁺ channels mediates the vasorelaxant effect of Catharanthus roseus-derived vindorosine in rat renal artery. *Planta Medica*, 80(18), 1672–1677.
- Yi, Z.-M., Chen, S.-D., Tang, Q.-Y., Tang, H.-L., & Zhai, S.-D. (2019). Efficacy and safety of sertraline for the treatment of premature ejaculation: Systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 98(23), e15989.
- Zanchet, B., Gomes, D. B., Corralo, V. S., Diel, K. A. P., Schönell, A. P., Faust, C., Nicola, P., Muller, L. G., Zanatta, A. P., Wildner, S. M., Bevilaqua, F., Chitolina, R., Sachett, A., Zanatta, L., Duarte, M. M. M. F., Conterato, G. M. M., Rocha, C. Q., Peretti, C., Brumelhaus, T., ... Junior, W. A. R. (2018). Effects of hydroalcoholic extract of *Celtis iguanaea* on markers of cardiovascular diseases and glucose metabolism in cholesterol-fed rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia: Orgao Oficial Da Sociedade Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 80–91.
- Zanchet, B., Miorando, D., Gomes, D. B., Locateli, G., Vecchia, C. A. D., Serpa, P. Z., Ruiz, A. L. T. G., Wagner, T. M., & Junior, W. A. R. (2019). In vitro Antiproliferative Potential of *Celtis iguanaea* against Ovarian (OVCAR-3) and Colon (HT-29) Tumor Cell. *European journal of medicinal plants*, 1–9.
- ([S.d.]). Gov.br. Recuperado 9 de janeiro de 2024, de <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centrais-deconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/orientacoes-sobre-o-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais.pdf>