

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

Estudo do efeito de extratos do *Ginkgo biloba* e da quercetina no ducto deferente de camundongo

Victória Bessa Alvarenga Lima

São João del-Rei

2022

Victória Bessa Alvarenga Lima

Estudo do efeito de extratos do *Ginkgo biloba* e da quercetina no 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: Prof^a Dr^a Priscila Totarelli Monteforte

São João del-Rei

2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)e Núcleo
de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732e Lima, Victória.
Estudo do efeito de extratos do Ginkgo biloba e
da quercetina no ducto deferente de camundongo /
Victória Lima ; orientadora Priscila Monteforte;
coorientador Joaquim Almeida. -- São João del-Rei,
2022.
79 p.

Dissertação (Mestrado - Ciências Biológicas) --
Universidade Federal de São João del-Rei, 2022.

1. Fitoterápicos;. 2. Ejaculação precoce; . 3.
Ginkgo biloba;. 4. Quercetina; . 5. Ducto
deferente. I. Monteforte, Priscila , orient. II.
Almeida, Joaquim, co-orient. III. Título.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI / UFSJ
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

Aos 10 dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e dois, às 14h, pela plataforma Google Meet (<https://meet.google.com/wiz-hsqs-bev>), foi instalada a banca examinadora de dissertação de mestrado da discente **Victória Bessa Alvarenga Lima**. A banca examinadora foi composta pelo professor Dr. Adolfo Garcia Erustes, (UNIFESP), examinador externo, pela professora Dra. Laila Cristina Moreira Damázio (UFSJ), examinadora interna, pelo professor Dr. Joaquim Maurício Duarte Almeida (UFSJ), coorientador, e pela professora Dra. Priscila Totarelli Monteforte. A professora Dra. Priscila Totarelli Monteforte, Presidente da Banca, fez a abertura dos trabalhos e, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou à candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "**Estudo do efeito de extratos do Ginkgo biloba e da quercetina no ducto deferente de camundongo**", marcando um tempo de até sessenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a Profa. Priscila Totarelli Monteforte, presidente, passou a palavra ao examinador externo, Prof. Adolfo Garcia Erustes, para arguir a candidata, e, em seguida, à examinadora interna, Profa. Laila Cristina Moreira Damázio, e ao coorientador, Prof. Joaquim Maurício Duarte Almeida, para que fizessem o mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o resultado da avaliação da banca, conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del-Rei, foi: APROVADA a defesa SEM a necessidade de alterações. A versão final da dissertação, deverá ser entregue ao programa no prazo de 90 (noventa) dias, a contar a partir da data da defesa. A candidata não terá o título senão cumprir esta exigência.



Emitido em 10/08/2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 5/2022 - PPGCM (13.43)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 11/08/2022 21:11)

JOAQUIM MAURICIO DUARTE ALMEIDA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

CCO (10.02)

Matrícula: 1908201

(Assinado digitalmente em 11/08/2022 08:51)

LAILA CRISTINA MOREIRA DAMAZIO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEMED (12.23)

Matrícula: 1811013

(Assinado digitalmente em 11/08/2022 08:41)

PRISCILA TOTARELLI MONTEFORTE

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DCNAT (12.12)

Matrícula: 2144084

(Assinado digitalmente em 11/08/2022 15:41)

ADOLFO GARCIA ERUSTES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 356.582.168-00

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: **5**, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **11/08/2022** e o código de verificação: **4660522a1b**

Agradecimentos

Eu costumo dizer que sou muito sortuda. Sortuda pela vida, pelas pessoas que me cercam e pelas oportunidades que vêm até mim. Talvez um dos tópicos mais necessários desse manuscrito seja o tópico de “Agradecimentos”, uma vez que afirmo com toda certeza que sozinha nada disso seria possível.

Começo agradecendo imensamente pela minha vida. Agradeço a Deus e profundamente ao Universo, que sempre se encarregou de fornecer o caminho e a direção para guia-la da melhor maneira possível, me enchendo de paixões, de limitações, de prazeres, de sentimentos, de necessidades, de incoerências e de livre arbítrio.

Principalmente aos meus pais, mas à minha família toda, enorme, unida e sempre presente, por terem apoiado e acreditado em mim em todos os momentos da minha vida. Todo o suporte e apoio que me deram desde sempre, foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Todos vocês me fizeram ser a mulher e pessoa que sou hoje, foi com vocês que aprendi os valores da vida.

Em seguida, dedico os meus mais profundos agradecimentos a minha orientadora, Priscila Totarelli Monteforte, sem ela, esse trabalho não seria possível. Escolhi a Priscila desde o momento que ela entrou na UFSJ, ainda na graduação, antes mesmo dela saber da minha existência. E assim, seguimos juntas para o mestrado. Ela é o tipo de orientadora que todo mundo gostaria de ter, sempre respeitou minhas limitações, me motivou e nunca deixou de acreditar em mim e em todo o nosso trabalho, todos esses resultados são nossos. É um grande exemplo pra mim, de pesquisadora, professora e mulher.

A todos meus colegas de laboratório e de mestrado, me faltam palavras pra dizer como sou agradecida por ter tido vocês comigo nessa caminhada, graças à vocês eu falo com convicção que, sozinhos não chegamos a lugar nenhum, não conseguiria sem vocês. Deixo aqui, um agradecimento mais que especial aos meus amigos Matheus Viana, que sempre esteve disposto a me ajudar em diversas situações do mestrado, assim como Alisson e Juan, que foram fundamentais me ajudando ao longo desses dois anos

Sou infinitamente grata aos meus amigos, de São João del-Rei, da Universidade e da vida, aos que estão comigo há anos e aos que chegaram por agora, vocês me mostram todos os dias como a vida é gostosa e leve quando compartilhada. Vejo em vocês que o que importa vai além do que o que temos na vida, mas sim, sobre quem a gente tem na

vida, sobre quem corre ao nosso lado e nos estende a mão em qualquer situação. Vocês são a família que eu escolhi, e agradeço profundamente por vocês terem me escolhido no meio de toda a imensidão da vida, e por falar em vida, a minha é muito melhor com vocês. Obrigada por dividirem a de vocês comigo. “A essas pessoas você não dá e não pede explicação. Para essas pessoas, a gente reserva o que há de melhor no coração. E não só hoje, mas sempre: eu te desejo esse sentimento inexplicável por essas pessoas inexplicáveis.”

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à UFSJ por ter sido minha casa por longos anos, ao PPGCM e aos seus docentes, pela oportunidade e por toda a troca que tivemos nesse período, e também à FAPEMIG como agência de fomento.

Deixo aqui meus mais sinceros votos de agradecimento à cada um de vocês, essa conquista é nossa.

Resumo

As plantas medicinais têm sido utilizadas por exercerem um papel importante no que tange à saúde humana. O *Ginkgo biloba* (GB) é uma das espécies de árvores mais antigas do mundo. O seu extrato (GBE) é utilizado na medicina tradicional chinesa há cerca de 5000 anos, para tratar diferentes enfermidades. Já foi demonstrado, o efeito relaxante do GBE em diferentes órgãos de musculatura lisa, porém, até onde foi possível pesquisar, ainda não há trabalhos que demonstrem o efeito de extrato de *Ginkgo biloba* no ducto deferente. O ducto deferente (DD) conduz os espermatozoides no momento da ejaculação. Esse evento ocorre pela contração das células musculares lisas do DD, que desempenham um papel importante na fase de emissão da ejaculação sendo que alterações nessa contração podem levar a distúrbios ejaculatórios, como a ejaculação precoce (EP). Considerado o distúrbio sexual mais comum na população masculina, a EP é caracterizada pela ejaculação que sempre ou quase sempre ocorre antes ou cerca de 1 minuto após a penetração vaginal. Assim, nosso objetivo foi estudar o efeito dos extratos de GBE sob a contração do ducto deferente, uma vez que alterações nessa contração podem estar associadas à EP. Para isso, foram utilizados camundongos Swiss machos com 60 dias de vida. Os ductos deferentes (DD) foram isolados e imersos em líquido nutritivo em um sistema de banho de órgãos. A estimulação da contração, no DD, foi feita com cloreto de potássio (KCl 80mM). Após a estabilização da resposta contrátil, foram realizadas outras curvas de KCl, porém na presença de concentrações crescentes de um dos extratos de GBE (GB1 ou GB2) ou quercetina, um composto flavonoide presente no GB. Além disso, o efeito destas substâncias também foi testado na presença da nifedipina ou quercetina. Nossos resultados demonstram que os extratos de GB, a quercetina e a nifedipina são capazes de inibir os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl. O efeito de GB1, sob o componente tônico, foi potencializado na presença da nifedipina. O mesmo acontece quando analisamos o efeito do extrato GB2, porém na presença da quercetina. Quando comparamos o componente tônico entre os diferentes grupos experimentais (GB1: Nifedipina+GB1 ou GB2: Nifedipina+GB2 e Quercetina+GB2, observamos que, na presença da nifedipina ou da quercetina, a inibição da contração causada por GB1 ou GB2 foi potencializada quando comparamos com a inibição que ocorre somente na presença dos extratos. Diferente do que ocorreu na comparação dos grupos Quercetina e Nifedipina+Quercetina, onde houve um aumento no efeito inibitório da quercetina na presença da nifedipina sob ambos os componentes,

fásico e tônico. Esses resultados indicam que GB1, GB2 e a quercetina são capazes de inibir algum mecanismo que pode estar envolvido com a geração da contração induzida por KCl em ducto deferente de camundongo. Além disso, também sugerem que este efeito inibitório não é dependente exclusivamente da inibição dos canais de cálcio voltagem dependente. Assim, estes achados apontam que o GBE, bem como a quercetina, podem ser estratégias farmacológicas para o tratamento de EP.

Palavras-chave: Fitoterápicos; Ejaculação precoce; *Ginkgo biloba*; Quercetina; Ducto deferente.

Abstract

Medicinal plants have been used because they play an important role in human health. *Ginkgo biloba* (GB) is one of the oldest tree species in the world. Its extract (GBE) has been used in traditional Chinese medicine for about 5000 years to treat different ailments. It has been demonstrated, the relaxing effect of GBE in different organs of smooth muscle, however, as far as it has been possible to research, there are still no studies demonstrating the effect of *Ginkgo biloba* extract on the vas deferens. The vas deferens (DD) conducts the spermatozoa at the moment of ejaculation. This event occurs by the contraction of the smooth muscle cells of the DD, which play an important role in the emission phase of ejaculation, and changes in this contraction can lead to ejaculatory disorders, such as premature ejaculation (PE). PE is considered the most common sexual disorder in the male population, characterized by ejaculation that always or almost always occurs before or about 1 minute after vaginal penetration. Thus, our objective was to study the effect of GBE extracts on the contraction of the vas deferens, since alterations in this contraction may be associated with PE. For this purpose, 60-day-old male Swiss mice were used. The vas deferens (DD) were isolated and immersed in nutrient fluid in an organ bath system. Stimulation of contraction, in the DD, was done with potassium chloride (KCl 80mM). After stabilization of the contractile response, further KCl curves were performed, but in the presence of increasing concentrations of one of the EGB extracts (GB1 or GB2) or quercetin, a flavonoid compound present in GB. In addition, the effect of these substances was also tested in the presence of nifedipine or quercetin. Our results demonstrate that GB extracts, quercetin and nifedipine are able to inhibit the phasic and tonic components of KCl-induced contraction. The effect of GB1, under the tonic component, was potentiated, in the presence of nifedipine. The same happens when we analyzed the effect of GB2 extract, but in the presence of quercetin. When we compared the tonic component between the different experimental groups (GB1: Nifedipine+GB1 or GB2: Nifedipine+GB2 and Quercetin+GB2, we observed that, in the presence of nifedipine or quercetin, the inhibition of contraction caused by GB1 or GB2 was potentiated when compared with the inhibition that occurs only in the presence of the extracts. Unlike when comparing the Quercetin and Nifedipine+Quercetin groups, where there was an increase in the inhibitory effect of quercetin in the presence of nifedipine under both phasic and tonic components. These results indicate that GB1, GB2 and quercetin are able to inhibit some mechanism that may be involved with the generation

of KCl-induced contraction in mouse ductus deferens. Furthermore, they also suggest that this inhibitory effect is not solely dependent on inhibition of voltage-dependent calcium channels. Thus, these findings point out that GBE as well as quercetin may be pharmacological strategies for the treatment of PE.

Key-words: Herbal medicines; Premature ejaculation; *Ginkgo biloba*; Quercetin; Vas deferens.

Lista de Figuras

Figura 1. Espécime de *Ginkgo biloba*. Fonte: Google Imagens - disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/saude-bem-estar/ginkgo-biloba.htm>

Figura 2. Desenho esquemático do registro típico da contração do ducto deferente (RABELO, 2021).

Figura 3. Representação gráfica do protocolo experimental para o estudo de inibição da contração muscular sob a contração do ducto deferente induzida por KCl (80mM). Figura adaptada de RABELO, 2021.

Figura 4. Cromatografia em Camada Delgada das amostras GB1 e GB2 obtidas por Extração Assistida por Ultrassom. Revelação com NPPEG seguida de luz UV 350nm. Substâncias de referência: ácido fenólico, rutina e quercetina.

Figura 5. Cromatograma do extrato de *Ginkgo biloba* obtido em Cromatógrafo Líquido com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) em 350 nm.

Figura 6. Efeito inibitório de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL) de GB1, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***)).

Figura 7. Efeito inibitório de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL) de GB2, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***)). Inibição estatisticamente significativa entre o componente fásico e o tônico na mesma concentração de GB2, $p < 0,05$ (^). $p < 0,01$ (^ ^). $p < 0,001$ (^ ^ ^).

Figura 8. Efeito inibitório de concentrações crescentes (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 4 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***)). Inibição

estatisticamente significativa entre o componente fásico e o tônico na mesma concentração de quercetina, $p < 0,05$ (^). $p < 0,01$ (^^). $p < 0,001$ (^^^).

Figura 9. Efeito inibitório de concentrações crescentes de GB1, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes foram 0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL e correspondem às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 6 experimentos.

Figura 10. Efeito inibitório de concentrações crescentes de GB2, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes foram 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL e correspondem às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 6 experimentos.

Figura 11. Efeito inibitório de concentrações crescentes de quercetina, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes foram 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 4 experimentos.

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 KCl (80mM). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 6 experimentos.

Figura 13. Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10^{-5} M), e de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7) de GB1. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 8 experimentos.

Figura 14. Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10^{-5} M), e de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85) de GB2. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 7 experimentos.

Figura 15. Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10^{-5} M), e de concentrações crescentes (10^{-8} ,

10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 10 experimentos.

Figura 16. Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da quercetina (10^{-7} M), e de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85) de GB2. Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 9 experimentos.

Figura 17 A. Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7) de GB1 (círculo) e de GB1 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 7 experimentos.

Figura 17 B. Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7) de GB1 (círculo) e de GB1 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 7 experimentos.

Figura 18 A. Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,8) de GB2 (círculo) e de GB2 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado) ou da quercetina (10^{-7} M) (triângulo). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 7 experimentos.

Figura 18 B. Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,8) de GB2 (círculo) e de GB2 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado) ou da quercetina (10^{-7} M) (triângulo). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 7 experimentos.

Figura 19 A. Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina (círculo) e de quercetina na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 4 experimentos.

Figura 19 B. Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina (círculo) e de quercetina na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 4 experimentos.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupos experimentais utilizados.

Tabela 2. Valores da média de pIC_{50} de GB1 sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 3. Valores da média de pIC_{50} de GB2 sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 4. Valores de IC_{50} da quercetina sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 5. Valores da média de pIC_{50} da nifedipina sob o componente fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 6. Valores da média de pIC_{50} de GB1 na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 7. Valores da média de pIC_{50} de GB2 na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 8. Valores da média de pIC_{50} da quercetina na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 9. Valores da média de pIC_{50} de GB2 na presença da quercetina (10^{-7} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 10. Valores da média de pIC_{50} de GB1, na presença ou ausência da nifedipina (10^{-5} M) sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 11. Valores da média de pIC_{50} de GB2, na presença ou ausência da nifedipina (10^{-5} M) ou da quercetina (10^{-7} M) sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 12. Valores da média de pIC_{50} da quercetina, na presença ou ausência da nifedipina (10^{-5} M) sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Tabela 13. Resumo dos resultados na comparação da IC_{50} entre os diferentes tratamentos e os diferentes componentes da contração no ducto deferente.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Plantas medicinais e fitoterapia.....	1
1.1.2 Implementação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS).....	1
1.1.3 <i>Ginkgo biloba</i>	3
1.2 Ducto deferente.....	5
1.3 Contração do músculo liso.....	6
1.3.1 Contração do ducto deferente.....	8
1.4 Disfunção sexual - Ejaculação precoce.....	9
2. Objetivos.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. Material e métodos.....	13
3.1 Drogas.....	13
3.2 Extratos vegetais.....	13
3.2.1 Preparação das amostras de <i>Ginkgo biloba</i>	13
3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	13
3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos – CLAE-DAD).....	14
3.2.4 Dosagem de flavonoides totais por espectrofotometria.....	14
3.3 Animais.....	15
3.4 Isolamento do ducto deferente.....	15
3.5 Montagem da preparação biológica e aparelhagem.....	16
3.6 Avaliação da contração muscular.....	16
3.6.1 Estudo do efeito do extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (GB1 ou GB2) e da quercetina..	16
3.6.2 Estudo da participação dos canais de cálcio voltagem dependente.....	17
3.7 Parâmetros farmacológicos para avaliar a contratilidade do ducto deferente.....	18
3.8 Grupos experimentais.....	19
3.9 Análise estatística.....	19
4. Resultados.....	20
4.1 Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais.....	20
4.2 Relaxamento, dos componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, induzido pelos extratos GB1 e GB2 ou pela quercetina.....	22
4.2.1 Relaxamento, dos componentes da contração, na presença do extrato GB1.....	22

4.2.2 Relaxamento, dos componentes da contração, na presença do extrato GB2	23
4.2.3 Relaxamento, dos componentes da contração, na presença da quercetina	24
4.3 Relaxamento, entre o componente fásico e tônico da contração induzida por KCl, na presença dos extratos GB1 e GB2 ou da quercetina.....	26
4.3.1 Efeito do extrato GB1	26
4.3.2 Efeito do GB2.....	27
4.4 Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl	30
4.5 Efeito dos extratos ou da quercetina, nos componentes fásico e tônico, da contração induzida por KCl, na presença de nifedipina ou da quercetina.....	32
4.5.1 Efeito de GB1 na presença da nifedipina.....	32
4.5.2 Efeito de GB2 na presença da nifedipina.....	33
4.5.3 Efeito da quercetina na presença da nifedipina	34
4.5.4 Efeito de GB2 na presença de quercetina	36
4.6 Comparação do efeito inibitório, induzido pelos extratos de <i>Ginkgo biloba</i> ou de quercetina, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl.....	37
4.6.1 Comparação do efeito inibitório, induzido por GB1, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl	37
4.6.2 Comparação do efeito inibitório, induzido por GB2, na presença ou na ausência da nifedipina ou da quercetina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl	40
4.6.3 Comparação do efeito inibitório, induzido pela quercetina, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl	42
5. Discussão	45
5.1 Avaliação fitoquímica.....	45
5.2 Efeito dos diferentes extratos de <i>Ginkgo biloba</i> ou da quercetina na contração induzida por KCl em ducto deferente.....	46
5.2.1 Efeitos dos extratos.....	46
5.2.2 Efeito da quercetina	47
5.3 Comparação entre o componente fásico e tônico da contração induzida por KCl, na presença dos extratos ou da quercetina.....	48
5.4 Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl	49
5.4.1 Efeitos dos extratos, GB1 e GB2, e da quercetina na presença da nifedipina ...	50
5.5 Efeito do GB2 na presença da quercetina	50
5.6 Comparação do efeito inibitório, induzido pelos extratos de <i>Ginkgo biloba</i> ou de quercetina, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl.....	50

6. Conclusão	51
7. Referências Bibliográficas	52

1. Introdução

1. 1 Plantas medicinais e fitoterapia

A fitoterapia é uma "terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal". Os fitoterápicos são medicamentos caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Já as plantas medicinais são definidas como uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2006; POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SUS: PNPIC-SUS, 2006).

Ao longo da história da humanidade, as plantas medicinais têm sido utilizadas por exercerem um papel importante no que tange à saúde humana. O uso de plantas medicinais teve uma redução com o surgimento da indústria farmacêutica, porém, atualmente, a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos é uma prática que tem se difundido mundialmente, sendo apoiada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), especialmente em países em desenvolvimento (LUZ, 1997, apud MATTOS et al., 2018).

Entre as diferentes formas de sua utilização, podemos destacar os extratos, os óleos essenciais e os chás (KUMAR et al., 2013). O seu emprego oferece vantagens, uma vez que têm sido utilizadas com o intuito de obterem-se novas alternativas terapêuticas – visando sustentabilidade científica, além de menores efeitos adversos bem como menor custo para os pacientes (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2016).

1.1.2 Implementação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS)

Ao final da década de 1970, é criado pela OMS, o Programa de Medicina Tradicional, visando o desenvolvimento de políticas públicas que facilitem a integração da medicina tradicional com a medicina complementar alternativa, nos sistemas nacionais de atenção à saúde, além de promover o uso racional dessa integração. Medida essa importante, uma vez que a OMS reconheceu que, nos países em desenvolvimento, uma significativa parcela da população depende da medicina tradicional para a atenção

primária, sendo que 80% dessa população utiliza em seus cuidados básicos de saúde práticas tradicionais, dos quais, 85% utilizam plantas ou preparações a base dessas (BRASIL, 2016).

Devido à uma carência de ações do governo, dos profissionais das áreas de saúde e desenvolvimento, como também da comunidade mundial para proteger e promover a saúde no mundo, a OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), promoveram em 1978, a Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata (Genebra), onde nela fica recomendado ao estados-membros proceder a:

“formulação de políticas e regulamentações nacionais referentes à utilização de remédios tradicionais de eficácia comprovada e exploração das possibilidades de se incorporar os detentores de conhecimento tradicional às atividades de atenção primária em saúde, fornecendo-lhes treinamento correspondente.” (OMS, 1979 apud MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A OMS destacou a importância da contribuição da medicina tradicional na prestação de assistência social, principalmente às populações com acesso limitado aos sistemas de saúde, e solicitou fortalecimento entre a cooperação de praticantes da medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, especialmente no que diz respeito ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, a fim de reduzir os gastos com medicamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde lançou em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), abrangendo as Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS), que são definidas pela OMS como medicinas tradicionais e complementares, envolvendo diretrizes e responsabilidades institucionais visando ofertar serviços e produtos de homeopatia, medicina tradicional chinesa, acupuntura, plantas medicinais e fitoterapia, entre outras práticas como opções terapêuticas (BRASIL, 2006a, 2018; MATTOS et al., 2018).

Já em 22 de junho de 2006, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), agregando as políticas públicas de saúde, meio ambiente e desenvolvimento econômico e social, com o intuito de promover a melhoria na qualidade de vida da população brasileira, uso sustentável da biodiversidade brasileira,

geração de emprego e renda, fortalecimento da agricultura familiar, desenvolvimento industrial e tecnológico, entre outros. Para essa política ser colocada em prática, foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 09 de dezembro de 2008, objetivando, entre outros assuntos “Inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionadas a Fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em consonância com as diretrizes da PNPIC” (BRASIL, 2006b, 2016).

1.1.3 *Ginkgo biloba*

Originária da China e cultivada em todo mundo, o GB é uma das espécies de árvores mais antigas do mundo. O nome chinês é “Yin-xing” em mandarim, que significa “fruto prateado”; é chamado de "Icho" em japonês. A árvore de *Ginkgo* é uma planta com folhas verdes que ficam douradas no outono. Tem sido cultivada em todo o mundo como árvore ornamental e utilizada na medicina tradicional chinesa há cerca de 5000 anos por apresentar diferentes funções terapêuticas (MEI et al., 2017).



Figura 1 - Espécime de *Ginkgo biloba*. Fonte: Google Imagens - disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/saude-bem-estar/ginkgo-biloba.htm>

Os principais componentes do GB são flavonoides e lactonas terpênicas e estes são sugeridos como constituintes farmacologicamente ativos do GBE (AMIN et al., 2012). No início da década de 1970, a empresa *Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals* (Karlsruhe, Alemanha), desenvolveu um método para a extração e padronização da preparação do extrato de *Ginkgo biloba* e produziu extratos altamente concentrados e

estáveis de folhas de *Ginkgo*. O extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (GBE) é denominado EGb 761 e contém 6% de terpenoides (em que 3,1% são ginkgolides e 2,9% é bilobalide), 24% glicosídeos flavonoides (contendo quercetina, kaempferol, isorhamnetina entre outros.), e 5-10% de ácidos orgânicos (SINGH et al., 2019).

O GBE é derivado de folhas secas de *Ginkgo* que tem uma longa história de uso para fins medicinais (MEI et al., 2017). Em um estudo randomizado, controlado por placebo, duplo-cego e multicêntrico foi demonstrado que o GBE melhorou o desempenho cognitivo de pacientes com comprometimento cognitivo leve (GAVRILOVA et al., 2014). A propriedade antioxidante do GBE já foi demonstrada sobre a toxicidade reprodutiva mediada por cisplatina em ratos machos (AMIN et al., 2012). No trabalho de Nunez et al. (1986) foi testado os efeitos do GBE na agregação de plaquetas humanas, induzida pelo fator de ativação plaquetária e demonstrado que o GBE inibe competitivamente a agregação plaquetária de maneira dependente da concentração. Também foi descrito que o GBE exerceu um papel protetor no coração e no cérebro, diminuindo a inflamação cardíaca e o estresse oxidativo cerebral em ratos (ZHANG et al., 2022).

Entre os flavonoides presentes no *Ginkgo* podemos destacar a quercetina, esta pertence ao grupo dos polifenóis e pode ser encontrada na forma de um glicosídeo em vários vegetais, frutas, nozes, sementes, vinho tinto e chá (MODZELEWSKA et al., 2021), e ganha destaque por possuir diversas propriedades farmacológicas (BALANZ & LEON, 1994; RIVERA et al., 2008; SAKANASHI et al., 2008; MODZELEWSKA et al., 2021). SAKANASHI e colaboradores (2008), demonstraram ação antioxidante da quercetina em tímócitos de ratos, também foi demonstrada ação neuroprotetora em tecido cerebral de humanos com Alzheimer (BALANZ & LEON, 1994), e a administração crônica de quercetina também melhorou a síndrome metabólica e o estado inflamatório em ratos obesos (RIVERA et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado o efeito do GBE e de quercetina na atividade contrátil muscular. A quercetina causou relaxamento do músculo liso uterino de suínos (ZYGUNTOWICZ et al., 2021), e na musculatura gástrica humana (MODZELEWSKA et al., 2021), bem como da contração por estimulação elétrica do ducto deferente (CAPASSO et al., 2006). Em relação ao GBE já foi descrito que é capaz de provocar relaxamento em aorta isolada de coelho (DELAFLOTTE et al., 1984), em anéis aórticos

de ratos machos (KUBOTA et al., 2001) e artérias basílicas suínas (CHEN et al., 1997), além de ter sido demonstrado o seu efeito relaxante em tecidos do corpo cavernoso (KIM et al., 2011).

A partir das evidências científicas dos efeitos de *Ginkgo biloba* em inibir a contração de órgãos de musculatura lisa, surge a necessidade de se conhecer o efeito do extrato, bem como da quercetina, tendo em vista que é um composto importante encontrado no GB, em demais órgãos formados por musculatura lisa, como por exemplo, ducto deferente. Embora já tenha sido relatado na literatura o efeito da quercetina em DD (CAPASSO et al., 2006), neste trabalho não foi demonstrado como a quercetina atua.

1.2 Ducto deferente

O ducto deferente é um tubo longo e fino, que dispõe-se em par, apresentando paredes espessas. Ele origina-se na região caudal do epidídimo, próximo ao escroto, e sua região distal termina no ducto ejaculatório, próximo à uretra prostática (HAMILTON & COOPER, 1978; QUINTAS & NOËL, 2009; BUYS-GONÇALVES et al, 2018). É a partir do ducto deferente que os espermatozoides são conduzidos no momento da ejaculação (BRUSCHINI et al., 1977; KIERSZENBAUM, 2008).

O ducto deferente é dividido anatomicamente em duas regiões, proximal e distal. A região proximal é mais próxima do epidídimo, sendo denominada também de porção epididimal, já a região distal encontra-se próxima da próstata, caracterizada por porção prostática. A porção epididimal é mais estreita que a prostática, devido à sua camada muscular relativamente fina (HAMILTON & COOPER, 1978; HEDLUND et al., 1985).

Este órgão é formado por três camadas, uma mucosa interna com epitélio de revestimento apoiado sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo, uma camada muscular média, que consiste em músculos lisos dispostos circularmente (camada circular) e longitudinalmente (camada longitudinal), sendo essa última mais numerosa e espessa, e uma camada externa serosa, formada por tecido conjuntivo frouxo e células adiposas (KIERSZENBAUM, 2008).

A função do DD é a de conduzir os espermatozoides, para estes serem então, ejaculados. Essa condução se dá através das contrações peristálticas regulares de baixa

amplitude realizada pelas células musculares lisas que compõem o ducto deferente (WESTFALL et al., 1978; KIERSZENBAUM, 2008). 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 (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

1.3 Contração do músculo liso

O acoplamento excitação-contração em células musculares lisas ocorre através de dois mecanismos principais, e esses mecanismos dependem de íons cálcio (Ca^{2+}). Um deles envolve mudanças no potencial de membrana, e outro envolve a estimulação de receptores acoplados à proteína G, que iniciam a contração a partir da ativação de um sistema de segundos mensageiros derivados de diferentes vias de sinalização, como a proteína quinase C (PKC) e Rho-quinase (ROCK) (PEREZ & SANDERSON, 2005; BERRIDGE, 2008; WANG et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2013; LIU & KHALIL, 2018). Seja qual for o estímulo contrátil, o íon Ca^{2+} é de extrema importância para a ocorrência da contração (SILVERTHORN, 2017). No presente trabalho, tomaremos como enfoque a contração pela despolarização da membrana, que pode ocorrer por algumas substâncias, como por exemplo, o cloreto de potássio (KCl) (GUO et al., 2014).

A homeostase de Ca^{2+} é mantida através de canais, transportadores e bombas dependentes de ATP localizados na membrana plasmática e na membrana de organelas intracelulares, bem como pela ligação de cálcio às proteínas celulares. O cálcio está presente em baixas concentrações no citoplasma e em altas concentrações no meio extracelular e nos estoques intracelulares, quando a célula é estimulada ocorre o aumento no nível intracelular de cálcio, e este evento é responsável pela contração (CARAFOLI et al., 2001; BERRIDGE et al., 2003; DONG et al., 2006; SILVERTHORN, 2017). Podemos destacar duas maneiras distintas responsáveis pelo aumento de cálcio intracelular, influxo ou liberação destes íons de estoques intracelulares. A primeira é mediada por diferentes canais que são localizados na membrana plasmática, sendo ativados quando há uma alteração no potencial de membrana ou pela própria alteração do estoque intracelular de cálcio. A segunda, é pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, ocorre especialmente pelo retículo sarcoplasmático, mas também pode ocorrer a partir de outros compartimentos, como mitocôndria, núcleo e outras organelas (BERRIDGE et al., 2003; DONG et al., 2006; SILVERTHORN, 2017).

Os canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática, ativam-se pela despolarização da membrana gerada por KCl, e medeiam o influxo de Ca^{2+} em resposta a potenciais de ação. O influxo de Ca^{2+} se dá por canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cav), atuam como segundo mensageiro da sinalização elétrica, 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).

O término da contração se dá quando há a redução na concentração do cálcio citosólico. O efluxo de cálcio para o meio extracelular é responsável por cessar essa contração. Ele se dá através de bombas e/ou trocadores localizados na membrana plasmática. O armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, na mitocôndria e/ou por ligação às proteínas também reduz a concentração destes íons no citosol (BERRIDGE et al., 2003; DONG et al., 2006).

Os canais para cálcio têm sido caracterizados bioquimicamente e correspondem a proteínas complexas compostas por quatro ou cinco subunidades distintas, que são codificadas por múltiplos genes (ERTEL et al., 2000). A subunidade $\alpha 1$ é a maior subunidade, e é o principal determinante do subtipo de canal de cálcio. Existem três famílias principais de subunidades $\text{Cav}\alpha 1$ (denominadas Cav1, Cav2 e Cav3) e cada uma com vários membros (Cav1.1-1.4, Cav2.1-2.3 e Cav3.1-3.3) (CATTERALL et al., 2005; DONATO, 2008). Existem outras subunidades auxiliares, mas a variedade farmacológica e eletrofisiológica dos canais de cálcio surge principalmente da existência de múltiplas subunidades $\alpha 1$ (CATTERALL et al., 2005).

Na contração induzida por despolarização, são ativados alguns tipos de canais de cálcio, entre eles podemos citar os canais voltagem dependente do tipo L ($\text{Cav}1.x$, tipo L), que são canais que normalmente requerem uma forte despolarização para ativação, mostram atividade de longa duração e são substancialmente bloqueados por baixas concentrações de antagonistas orgânicos dos canais de cálcio do tipo L, incluindo dihidropiridinas (DHP), fenilalquilaminas e benzotiazepinas (HOFMAN et al., 2014). A despolarização da membrana, também ativa canais voltagem dependente denominados canais do tipo T ($\text{Cav}3.x$), descritos por ativarem-se em voltagens próximas ao potencial de membrana em repouso, ou seja, por baixas voltagens e inativarem-se rapidamente (SANTI, DARSZON & HERNANDEZ-CRUZ, 1996; CHUANG et al., 1998).

Então, como existem substâncias que induzem a contração muscular, existem também substâncias que a inibem. Entre estas podemos citar a nifedipina, uma DHP, que inibe os canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L. Ela exerce os seus efeitos se ligando ao interior desses canais, inibindo o influxo de cálcio, resultando na redução dos níveis de cálcio intracelular e consequentemente na inibição/diminuição da contração do músculo liso (MOYNIHAN; SMITH; MORRISON, 2008).

Em relação à inibição dos canais de cálcio do tipo T foi relatado bloqueio farmacológico desses canais por etosuximida e zonisamida (SILVA & CABRAL, 2008), bem como por kurtoxina (CHUANG et al., 1998) níquel e mibefradil (IUPHAR/BPS GUIDE TO PHARMACOLOGY, 2021).

1.3.1 Contração do ducto deferente

A contração do ducto deferente é caracterizada por uma resposta contrátil bifásica clássica, composta por uma contração transitória inicial, rápida, denominada como componente “fásico”, seguida de uma contração secundária sustentada, mais lenta, conhecida como componente “tônico”. Em um registro típico de força, as contrações fásicas surgem como picos rápidos, enquanto as contrações tônicas causam alterações graduais na força que sustentam a contração por um tempo maior, sendo representadas por uma linha contínua horizontal, conforme esquematizado na Figura 2 (LIPSKAIA et al., 2012; WALLACE et al., 2015). Esta contração depende do aumento intracelular de íons cálcio enquanto o relaxamento muscular está na dependência da diminuição destes íons (GUYTON et al., 2006; HOLASH & MACINTOSH, 2019).

Descrevemos previamente que o influxo de cálcio é extremamente importante para o mecanismo de contração. Na contração induzida por KCl, os componentes fásico e tônico, ocorrem por influxo de cálcio pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) que ativam-se pela despolarização da membrana (CHENG, 1976; HUDDART; LANGTON & SAAD, 1984). Entre esses canais, existem os que são inativados lentamente, denominados canais de cálcio voltagem dependente do tipo L, e os que são inativados rapidamente, os canais de cálcio voltagem dependente do tipo T (CATTERALL et al., 2005; CATTERALL et al., 2020). Na literatura é sugerido que o componente fásico depende da ativação de canais de Ca^{2+} do tipo T, enquanto o

componente tônico depende da ativação de canais de Ca^{2+} do tipo L (HUDDART; LANGTON & SAAD, 1984; GARCIA-PASCUAL et al., 1991).

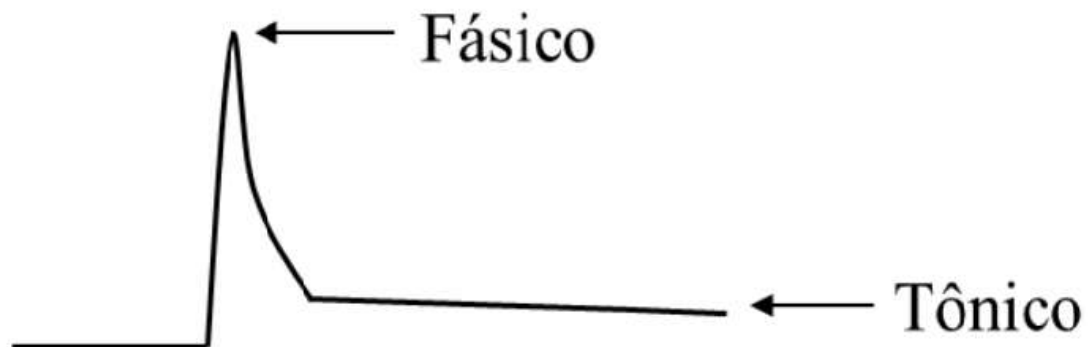


Figura 2 - Desenho esquemático do registro típico da contração do ducto deferente (RABELO, 2021).

1.4 Disfunção sexual - Ejaculação precoce

As disfunções sexuais e/ou reprodutivas têm grande impacto na qualidade de vida dos afetados. Podem ser definidas como distúrbios do comportamento sexual e também da sensação sexual, que apresentam-se como uma anormalidade ou ausência de psicologia sexual e reação fisiológica. O termo “disfunção sexual” é empregado para diversos sintomas distintos que incluem vários aspectos, disfunção erétil (DE), falha na relação sexual e perda de libido/desejo, por exemplo (CHEN et al., 2019). As origens das disfunções sexuais são variadas, podendo ser psicológica, física ou até mesmo, ambas. Entre as disfunções mais conhecidas podemos citar a disfunção erétil e alterações envolvendo a ejaculação, como por exemplo a ejaculação precoce que é bastante recorrente entre os homens (BRASIL, 2018; FRANCISCHI et al., 2011).

A ejaculação precoce (EP) é considerado o distúrbio sexual mais comum na população masculina (CROWDIS & NAZIR, 2021), com uma estimativa de acometimento de 20% a 30% dos homens de qualquer idade em algum momento da vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Segundo o *Committee for Definition of Premature Ejaculation of the International Society for Sexual Medicine*, essa patologia é caracterizada pela ejaculação que sempre ou quase sempre ocorre antes ou cerca de 1 minuto após a penetração vaginal e a incapacidade de retardar a ejaculação em todas ou quase todas as penetrações vaginais, acompanhadas por consequências pessoais

negativas, como sofrimento, aborrecimento, frustração e/ou evitação da intimidade sexual (McMAHON et al., 2008). Alguns estudos relatam que aproximadamente um terço da população masculina global, em todas as faixas etárias, tem algum grau de EP (LAUMANN et al., 2005).

Embora haja uma alta taxa de acometimento, a vergonha e o constrangimento acabam fazendo com que poucos homens procurem tratamento. Atualmente, existem várias abordagens para o manejo e o tratamento para EP, que envolvem uma combinação de terapias farmacológicas, psicológicas e comportamentais. O tratamento farmacológico da EP pode ser feito com anestésicos tópicos, com creme de lidocaína ou prilocaína, com medicamentos orais, sendo eles: antidepressivos (paroxetina e fluoxetina), analgésicos (tramadol) e inibidores da fosfodiesterase-5 (sildenafil e tadalafil) que retardam a ejaculação inibindo o transportador de serotonina (WALDINGER, 2018). Porém, esses tratamentos apresentam, eficácia limitada e efeitos adversos como diminuição da libido, anorgasmia, impotência e disfunção erétil (FRANCISCHI et al., 2011; CROWDIS & NAZIR, 2021).

A ejaculação é composta por duas fases sucessivas distintas: fase de emissão, onde espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo e as secreções das glândulas acessórias sexuais são direcionados para a uretra por contrações dos músculos lisos da cauda do epidídimo, ductos deferentes, vesícula seminal e próstata, e fase de expulsão, na qual o sêmen depositado na uretra prostática é ejetado pelo meato uretral em decorrência das contrações rítmicas dos músculos estriados do assoalho pélvico desencadeadas parcialmente pela distensão da uretra (GIULIANO, 2011; KIGUTI & PUPO, 2012).

Diversos fatores desempenham um papel no controle ejaculatório, Carro-Juarez e Rodriguez-Manzo (2008) descreveram uma estrutura anatômica na medula espinhal conhecida como gerador ejaculatório espinhal (SEG). O SEG é caracterizado como um arco reflexo funcionando em combinação com fibras nervosas parassimpáticas, simpáticas, sensoriais e motoras, que trabalhando em conjunto, resultam em emissão e ejaculação. Os sistemas nervoso central, espinhal e periférico também trabalham juntos para esses eventos (CARRO-JUAREZ & MANZO-RODRIGUEZ, 2008, apud BUTCHER et al., 2019). Além dos estímulos e eventos citados acima, o controle da função ejaculatória masculina envolve também a liberação da resistência ao fechamento do ducto ejaculatório e contração coordenada da vesícula seminal e da musculatura lisa

do ducto deferente, sendo um processo bem regulado, no qual é necessário que haja o funcionamento correto destas estruturas e a integridade tecidual desses órgãos, para que assim os espermatozoides sejam transportados com êxito até sua expulsão (BIROWO et al., 2009; GIULIANO, 2011; BUTCHER et al., 2019).

Conforme descrito acima, as contrações coordenadas da musculatura lisa do ducto deferente impulsionam os espermatozoides do epidídimo em direção à uretra, assumindo um papel crucial na fase de emissão da ejaculação. Dessa maneira, a inibição da contração desse órgão representa um efeito clínico desejável, e conhecer substâncias que exerçam esse papel pode ser uma estratégia farmacológica para o tratamento da ejaculação precoce.

Infelizmente, as terapias e os medicamentos utilizados para tratar EP ainda apresentam limitações e pouca efetividade (GILLMAN & GILLMAN, 2019). Perante a isso, faz-se necessário conhecer substâncias, como por exemplo, plantas medicinais e fitoterápicos, que tenham efeitos positivos na função sexual dos homens, e que possam ser utilizadas para tratar a EP, como medicamentos complementares ou até mesmo único no tratamento.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito dos extratos de *Ginkgo biloba* e da quercetina sob a contração induzida por KCl em ducto deferente de camundongo.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os perfis qualitativos dos extratos de *Ginkgo biloba*;

Verificar se os diferentes extratos de *Ginkgo biloba*, assim como a quercetina, tem efeito relaxante na contração do ducto deferente;

Investigar se a nifedipina ou a quercetina modulam o efeito dos extratos de *Ginkgo biloba*;

Investigar se a nifedipina modula o efeito da quercetina.

3. Material e métodos

3.1 Drogas

Cloreto de potássio (KCl, peso molecular (PM): 74,55 g/mol, Synth), Nifedipina (Nif, N7634, PM: 346,34 g/mol, Sigma-Aldrich Co. LLC), doada gentilmente pelo Prof. Dr. Gustavo José da Silva Pereira, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Quercetina (PM: 302,24 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), doada pelo coorientador do trabalho, Prof. Dr. Joaquim Maurício Duarte Almeida. O KCl foi diluído em água destilada e utilizado para estimular a contração do ducto deferente. A Nifedipina foi utilizada como controle positivo do bloqueio dos canais de cálcio. As amostras de GB, a nifedipina e a quercetina foram diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido).

3.2 Extratos vegetais

As amostras de *Ginkgo biloba* (GB) utilizadas neste estudo foram produzidas com material vegetal adquirido em farmácia de manipulação. O material vegetal foi devidamente registrado no SISBIO (A731577).

3.2.1 Preparação das amostras de *Ginkgo biloba*

A preparação das amostras foi realizada por Extração Assistida por Ultrassom (EAU). Foram utilizados 2,0 gramas do material vegetal, sendo transferidos para um erlenmeyer de 10 ml e adicionados 5 ml de álcool etílico 70% (v/v). O procedimento de extração foi realizado em 25°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas individualmente. O resíduo foi re-extraído conforme descrito acima, adicionando-se mais 5 mL de álcool etílico 70%, pelo mesmo tempo. As amostras assim obtidas foram reunidas e armazenadas para análises posteriores. Os extratos foram denominados GB1 e GB2 após terem sido avaliados quanto ao seu perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e teores de flavonoides totais pelo método espectrofotométrico.

3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A avaliação qualitativa por CCD foi feita em cromatoplasmas com base em alumínio, tendo, como suporte, sílica-gel GF254, espessura de 250 µm. De cada amostra (10 mg.mL⁻¹), foi aplicada 10 µl nas placas. Rutina, quercetina e ácido clorogênico foram

utilizados como padrões de referência, previamente, preparados na concentração de 0,1 mg.ml⁻¹. Após o desenvolvimento da cromatografia, esta placa foi seca ao ar e nebulizada com 0,5 ml das soluções reveladoras (NPPEG): difenilborato de aminoetanol 1% (p/v) e polietilenoglicol 5% (p/v). A avaliação final do comportamento das amostras nas cromatoplasas foi realizada utilizando luz UV – 365 nm (WAGNER, BLADT, 2001).

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos – CLAE-DAD)

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao seu perfil cromatográfico por CLAE-DAD. A análise foi realizada em sistema modular de cromatografia líquida, constituído por duas bombas, um detector de arranjo de diodos e um sistema computadorizado, operado pelo software LabSolution. A separação dos compostos foi realizada em coluna analítica de fase reversa C18, acondicionada à temperatura ambiente. As fases móveis utilizadas, na forma de gradiente são: A – água ultrapurificada e ácido fórmico 0,1%, B – acetonitrila grau HPLC, em fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ (DUARTE ALMEIDA et al., 2011). As amostras foram diluídas em acetonitrila: água (1:1 v/v) em concentração de 10 mg.ml⁻¹ e filtradas em filtro 0,45 µm antes de serem injetadas no cromatógrafo. O volume de injeção utilizado, para cada corrida, foi de 10-20 µl, dependendo da amostra. Os cromatogramas foram monitorados em três comprimentos de onda: 280, 328 e 350 nm. A determinação de compostos presentes nas amostras, foi pela comparação dos tempos de retenção e pelos espectros na região do ultravioleta dos padrões injetados, como também os dados presentes na literatura (SAKAKIBARA et al., 2003).

3.2.4 Dosagem de flavonoides totais por espectrofotometria

Os teores de flavonoides totais foram avaliados pelo método do cloreto de alumínio, presente na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010) com algumas modificações. Quercetina (0,1 mg.mL⁻¹) foi utilizada para a confecção de uma curva analítica. Esse método baseia-se na formação de um complexo flavonoide-alumínio que possui máxima absorção a 425 nm. Em 1.900 µL de uma solução hidroetanólica a 50% (v/v) foram acrescentados 100 µL de extrato (10 mg.mL⁻¹) e 500 µL de solução de AlCl₃ a 5% (p/v). A mistura foi mantida 30 minutos em repouso e a absorvância mensurada em espectrofotômetro UV/Vis a 425 nm. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg,

equivalentes a quercetina por grama (mg EQ g⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata. Desta forma, as amostras **GB1** e **GB2** apresentaram concentrações de 9,84 mg EQ/ml e 21,00 mg EQ/ml, respectivamente.

3.3 Animais

Para a realização do presente trabalho, foram utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss, provenientes do Núcleo de Criação de Animais de Laboratório da Universidade Federal de São João del-Rei (NUCAL/UFSJ).

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial de Camundongos do Departamento de Ciências Naturais (DCNAT) (Praça Dom Helvécio, 74 - Fábricas - CEP 36301-160 - São João del-Rei (MG), bloco B, sala 1.11.) em gaiolas de 41x34x18cm (4 animais/gaiola). Eles receberam água e ração comercial balanceada (Nuvilab®) autoclavadas ad libitum e foram submetidos ao controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro), além de temperatura controlada (21°C) e exaustão de ar.

Após atingirem 60 dias de vida, os camundongos foram eutanasiados com isoflurano e em seguida foi realizado o isolamento dos ductos deferentes para a realização dos experimentos.

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). Além disso, todos os procedimentos e experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ – CEUA (Protocolo N° 9414240521).

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;

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

Os experimentos foram realizados em um sistema de banho de órgãos. Este sistema é formado por cubas de vidro, composta de dupla parede, sendo a parte interna da cuba o compartimento para adaptação do ducto deferente, tendo capacidade para 10 mL de solução nutritiva. Na parte externa da cuba, circula água aquecida a 30°C por um banho maria.

O ducto deferente foi amarrado, em suas extremidades, 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 Avaliação da contração muscular

3.6.1 Estudo do efeito do extrato de *Ginkgo biloba* (GB1 ou GB2) e da quercetina

Os estudos de contração foram realizados em ductos deferentes expostos ou não à pré incubação dos extratos de GB ou da quercetina. Para promover a contração foi utilizado o agente despolarizante cloreto de potássio (KCl).

Após a fixação do órgão ao sistema de registro, o tecido foi deixado em repouso por 30 minutos, mergulhado em solução LNV, para a estabilização da preparação. Findado o período de estabilização da preparação, foi adicionado ao banho KCl 80 mM (indutor da contração) por 5 minutos. Após o tempo de estimulação, a solução nutritiva com o indutor da contração foi retirada da cuba por meio de lavagens sucessivas com solução nutritiva. Posteriormente, o órgão foi deixado em repouso por 30 minutos. Este procedimento repetiu-se por três vezes. No 27º minuto de repouso, entre a terceira e

a quarta curva, foi adicionado ao banho a primeira concentração dos extratos de GB. Após 3 minutos (no 30º minuto) um novo estímulo contrátil com o KCl foi aplicado, tanto na cuba com GB como na cuba controle. Este protocolo foi repetido com doses crescentes de GB, sendo elas 0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL de GB1, ou 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL de GB2, até a obtenção da inibição máxima da contração. A contração que antecede a incubação do órgão com o extrato, foi considerada a curva controle para aquele órgão. A Figura 3 representa os protocolos experimentais realizados.

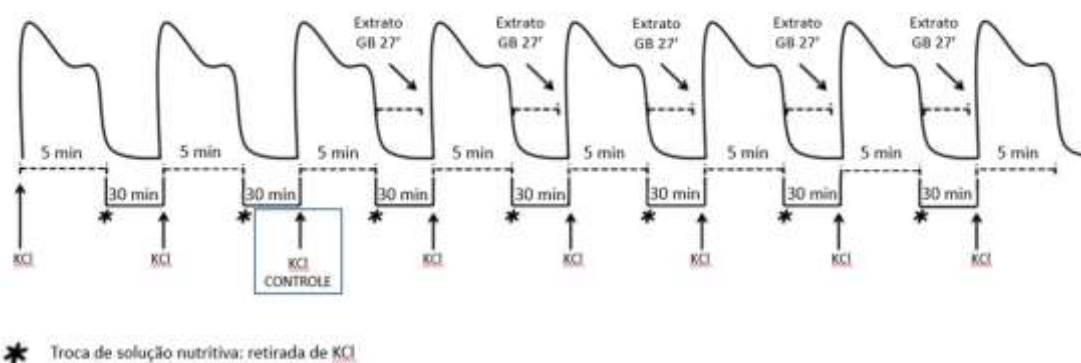


Figura 3 - Representação gráfica do protocolo experimental para o estudo de inibição da contração muscular sob a contração do ducto deferente induzida por KCl (80mM). Figura adaptada de RABELO (2021).

Repetimos o mesmo protocolo descrito acima, porém, a pré-incubação foi feita com um flavonoide isolado presente no *Ginkgo biloba*, denominado quercetina, a mesma foi adicionada no banho em concentrações crescentes (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M). Após realizarmos os experimentos com a quercetina sozinha, também realizamos experimentos utilizando a quercetina em uma única concentração (10^{-7} M) e GB2 em concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL), nos quais a quercetina era pré-incubada no 17º minuto de repouso.

3.6.2 Estudo da participação dos canais de cálcio voltagem dependente

Para tentar elucidar o mecanismo de ação de GB, realizamos experimentos com a nifedipina como um controle positivo, já que é um conhecido inibidor de canais de cálcio de voltagem dependente.

Primeiramente foram realizados experimentos somente com a nifedipina. Neste protocolo, foram adicionadas concentrações crescentes (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) de nifedipina no 17º minuto de repouso.

Feito isso, realizamos os experimentos com GB na presença e na ausência de nifedipina. Os experimentos consistiram no mesmo protocolo de contração descrito anteriormente, porém, com a presença da nifedipina (10^{-5} M), adicionada no 17º minuto de repouso, precedendo a incubação de concentrações crescentes de GB1 (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL) ou GB2 (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL). As curvas obtidas com GB na presença de nifedipina foram comparadas com as curvas obtidas com GB na ausência.

O mesmo protocolo realizado com os extratos foi feito com a quercetina (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) na presença e na ausência da nifedipina (10^{-5} M).

3.7 Parâmetros farmacológicos para avaliar a contratilidade do ducto deferente

As respostas contráteis foram medidas considerando as amplitudes de contração dos componentes fásico e tônico induzido por KCl, na presença e na ausência de GB, quercetina e/ou nifedipina. As medidas foram realizadas em gramas de tensão e transformadas 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 (3º curva) que antecedeu a incubação com GB, quercetina 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 IC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar da droga que produz 50% do efeito inibitório máximo).

3.8 Grupos experimentais

Em nosso estudo utilizamos nove grupos experimentais, o resumo desses grupos é descrito na tabela a seguir:

Tabela 1 - Grupos experimentais utilizados.

KCl Controle			
KCl + GB1	KCl + GB2	KCl + Quercetina	KCl + Nif
KCl + Nif + GB1	KCl + Nif + GB2	KCl + Nif + Quercetina	KCl + Quercetina + GB2

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm 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 *Dunnnett* para comparação entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Prism 7, versão 7.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais

As amostras obtidas são demonstradas na Figura 4. Na cromatoplaca é possível observar que os compostos flavonoídicos característicos da espécie estão presentes em ambas as amostras, destacando as manchas amarelas e esverdeadas. Essas manchas correspondem aos ginkgoflavonoides.



Figura 4 - Cromatografia em Camada Delgada das amostras GB1 e GB2 obtidas por Extração Assistida por Ultrassom. Revelação com NPPEG seguida de luz UV 350nm. Substâncias de referência: ácido fenólico, rutina e quercetina.

Na avaliação por cromatografia líquida foi possível observar a presença dos compostos fenólicos característicos para esse extrato, quercetina, kaempferol e isorhamnetina (Figura 5). A presença desses compostos, comprova a autenticidade e qualidade do extrato preparado para os testes biológicos. Os teores dos compostos fenólicos também foram avaliados para padronização dos extratos.

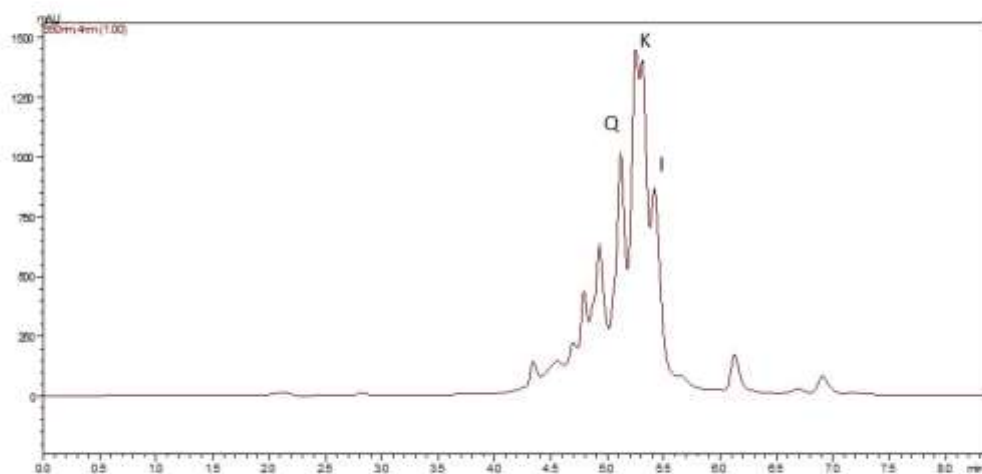


Figura 5 - Cromatograma do extrato de Ginkgo biloba obtido em Cromatógrafo Líquido com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) em 350 nm. Q: quercetina; K: kaempferol; I: isorhamnetina.

4.2 Relaxamento, dos componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, induzido pelos extratos GB1 e GB2 ou pela quercetina

4.2.1 Relaxamento, dos componentes da contração, na presença do extrato GB1

Quando comparamos o componente fásico na presença de GB1 com seu correspondente controle (na ausência), observamos que na presença de determinadas concentrações (3; 4 ou 5 mg/mL) há diferenças estatísticas. A mesma comparação foi feita para o componente tônico e também foi possível observar diferenças estatísticas, porém na presença de outras concentrações (0,3; 4 ou 5 mg/mL) (Figura 6).

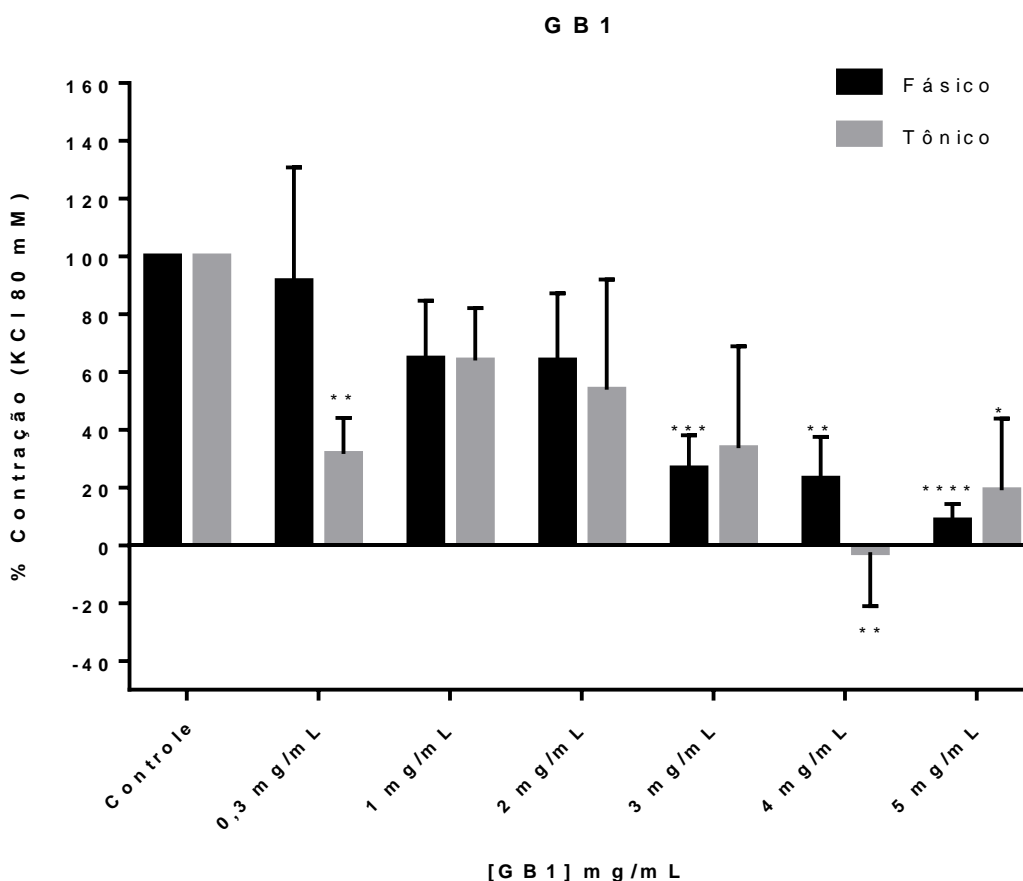


Figura 6 - Efeito inibitório de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL) de GB1, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***)).

4.2.2 Relaxamento, dos componentes da contração, na presença do extrato GB2

Ao compararmos o componente fásico e o tônico com seus respectivos controles (ausência de GB2), observamos que há diferenças estatísticas. No componente fásico, há diferença nas seguintes concentrações: 2; 4; 6 ou 7 mg/mL. E no componente tônico nas concentrações de 1; 2; 5; 6 ou 7 mg/mL. Além disso, também há diferença estatística quando comparamos os componentes, fásico e tônico, entre si na mesma concentração (1 mg/mL) (Figura 7).

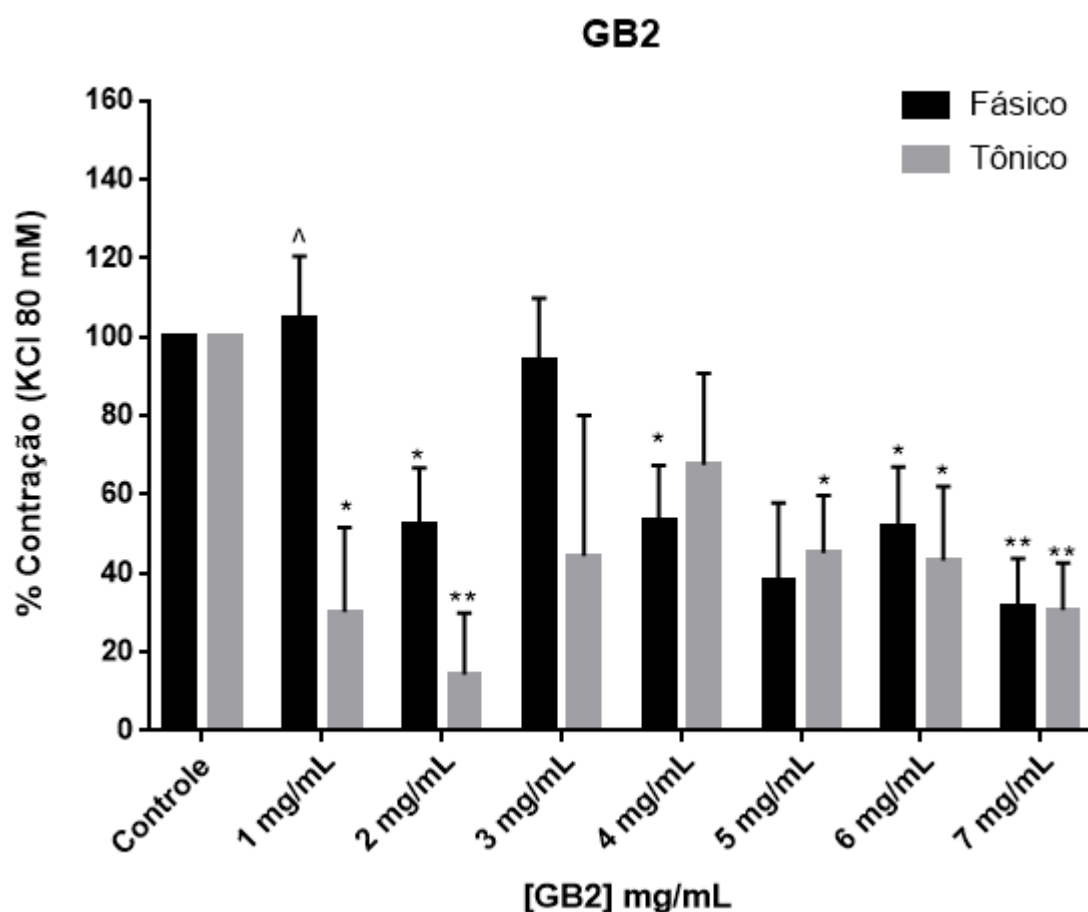


Figura 7 - Efeito inibitório de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL) de GB2, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). Inibição estatisticamente significativa entre o componente fásico e o tônico na mesma concentração de GB2, $p < 0,05$ (^). $p < 0,01$ (^^). $p < 0,001$ (^^^).

4.2.3 Relaxamento, dos componentes da contração, na presença da quercetina

Além dos extratos, utilizamos a quercetina, um composto flavonoide presente no *Ginkgo biloba*. Quando analisamos o componente fásico na presença de quercetina com seu correspondente controle (na ausência), observamos que independente da concentração, há diferença estatística. A mesma comparação foi feita para o componente tônico e também foi possível observar diferenças estatísticas, porém somente nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-4} e 10^{-3} M. Além disso, também há diferença estatística quando comparamos fásico e tônico entre si na mesma concentração (10^{-3} M) (Figura 8).

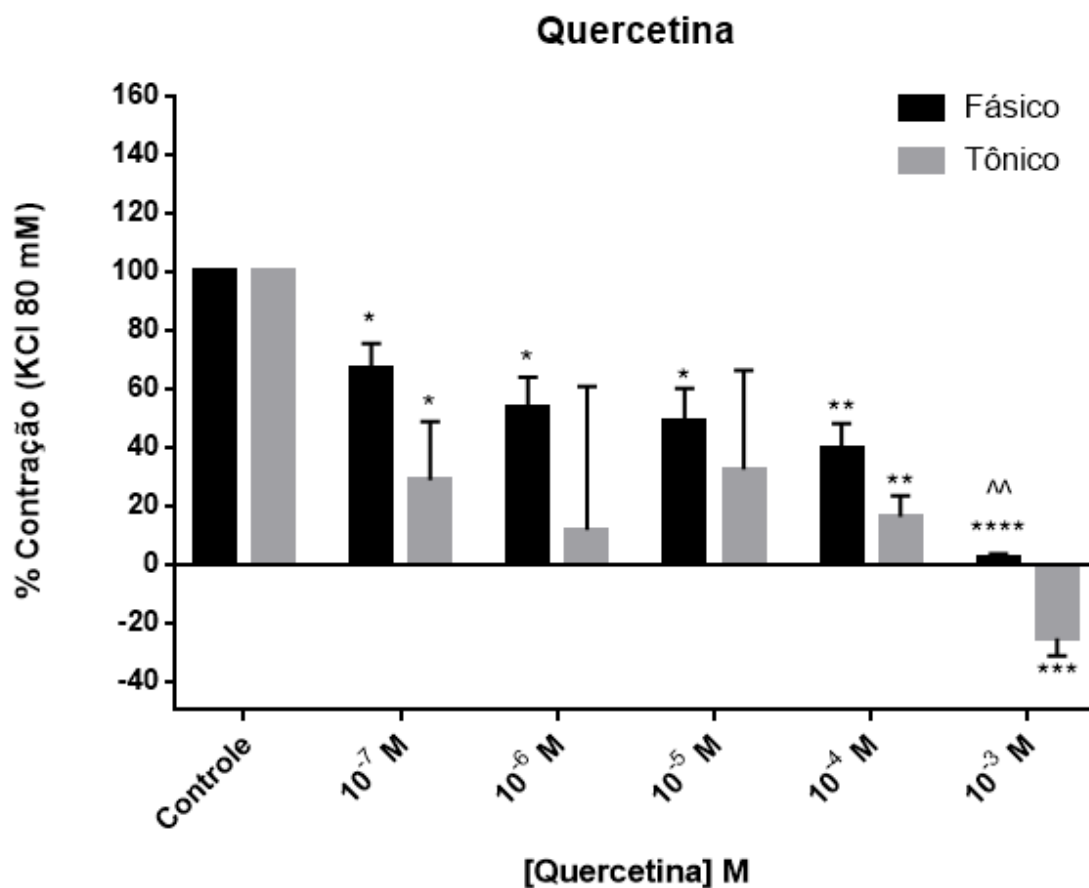


Figura 8 - Efeito inibitório de concentrações crescentes (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza). Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 4 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$ (*). $p < 0,01$ (**). $p < 0,001$ (***). Inibição estatisticamente significativa entre o componente fásico e o tônico na mesma concentração de quercetina, $p < 0,05$ (^). $p < 0,01$ (^^). $p < 0,001$ (^^^).

4.3 Relaxamento, entre o componente fásico e tônico da contração induzida por KCl, na presença dos extratos GB1 e GB2 ou da quercetina

4.3.1 Efeito do extrato GB1

A Figura 9 mostra o efeito inibitório do extrato GB1, sob os componentes fásico e tônico, da contração induzida por KCl. Ambos componentes são sensíveis à ação do GB1, embora não haja diferença estatística entre eles. A Tabela 2 mostra o valor da média de pIC_{50} de cada componente da contração.

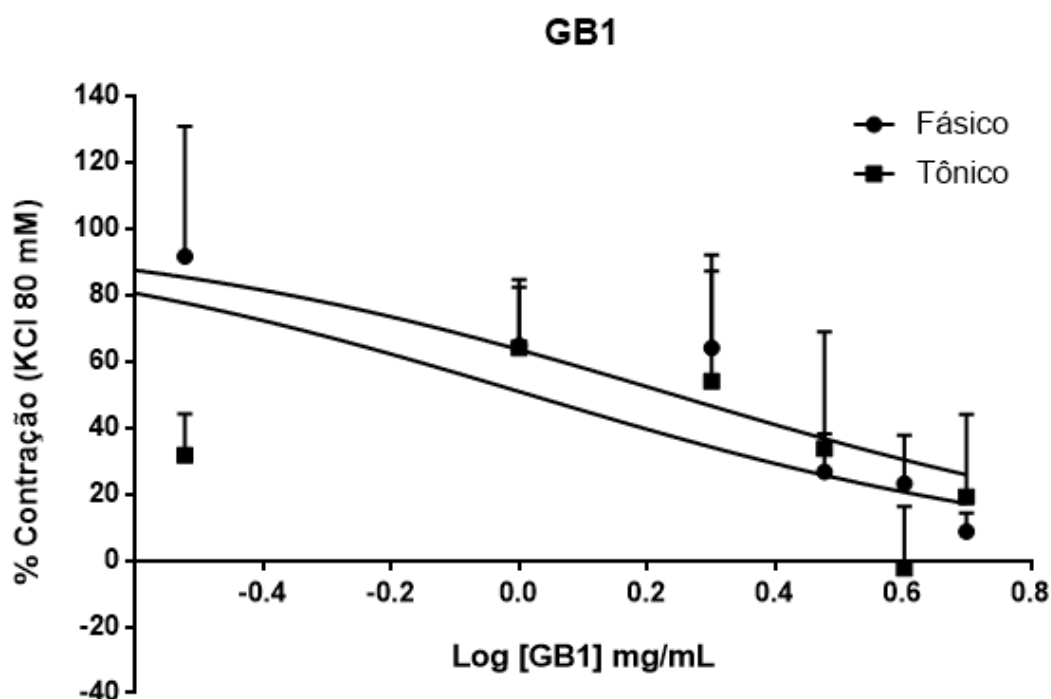


Figura 9 - Efeito inibitório de concentrações crescentes de GB1, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes foram 0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL e correspondem às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos.

Tabela 2 - Valores da média de pIC₅₀ de GB1 sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC ₅₀
Fásico	0,1833
Tônico	-0,002226

4.3.2 Efeito do GB2

Assim como o GB1, o GB2 também demonstrou efeito inibitório sob ambos os componentes, fásico e tônico, da contração induzida por KCl (Figura 10), não havendo diferença estatística entre eles quando comparamos as médias de pIC₅₀ conforme podemos observar na Tabela 3.

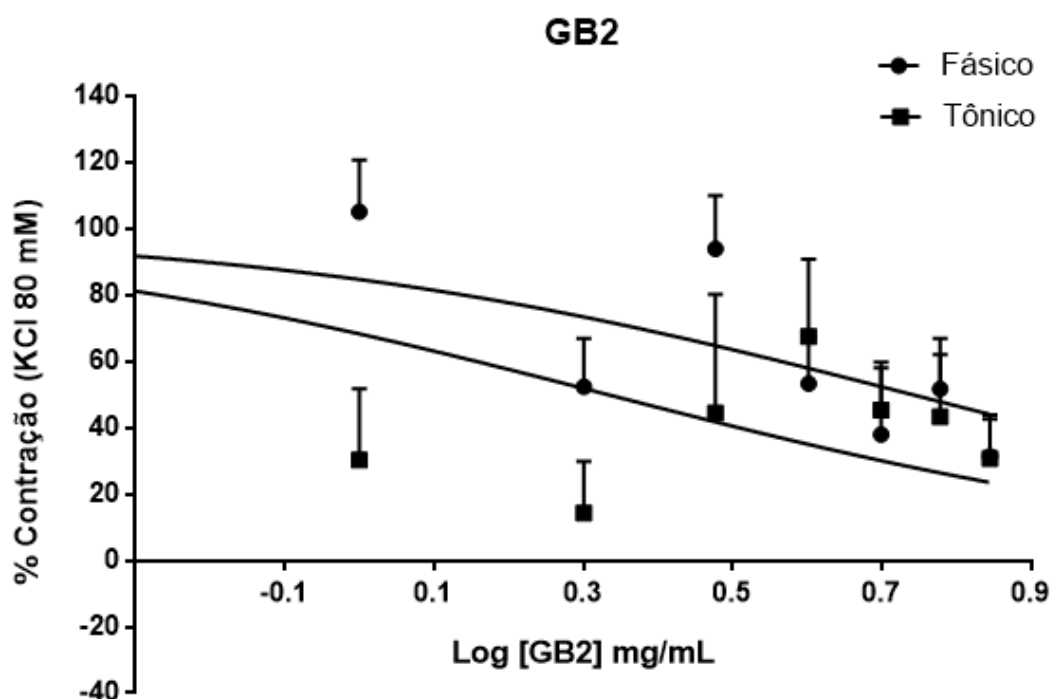


Figura 10 - Efeito inibitório de concentrações crescentes de GB2, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes foram 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL e correspondem às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85. Cada ponto é a média ± erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos.

Tabela 3 - Valores da média de pIC₅₀ de GB2 sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC ₅₀
Fásico	0,8348
Tônico	0,3019

4.3.3 Efeito da quercetina

Ao analisarmos o efeito da quercetina, verificamos um papel inibitório nos componentes fásico e tônico das contrações (Figura 11), porém sem diferença estatística entre eles (Tabela 4).

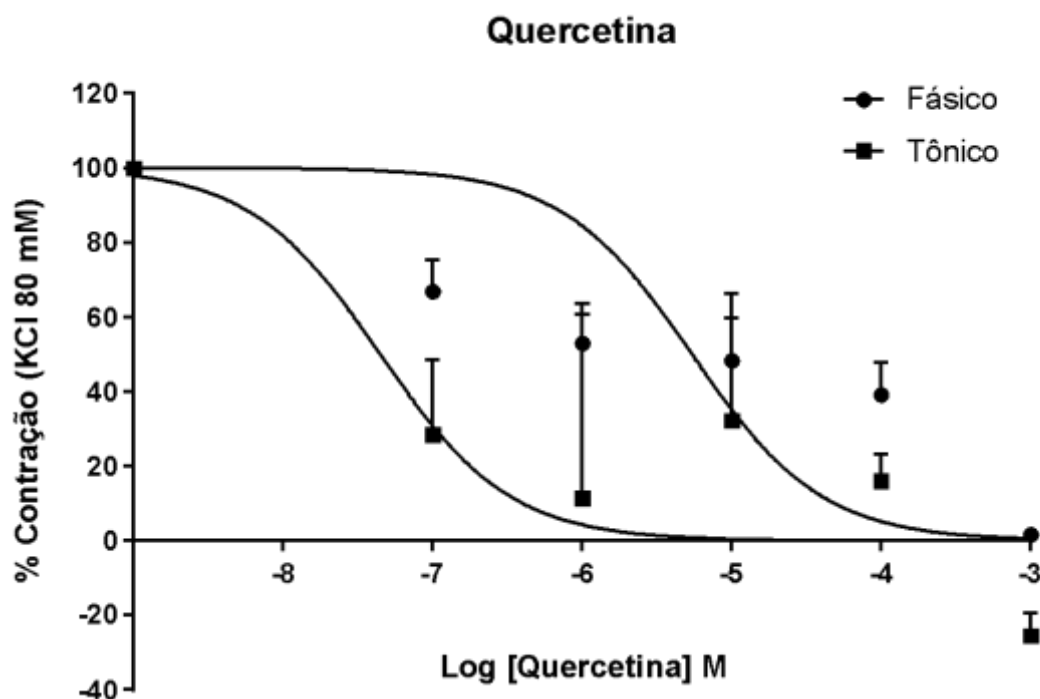


Figura 11- Efeito inibitório de concentrações crescentes de quercetina, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM). As concentrações crescentes foram 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 4 experimentos.

Tabela 4 - Valores de pIC_{50} da quercetina sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC_{50}
Fásico	-5,098
Tônico	-6,848

4.4 Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl

Para verificar a participação de canais de cálcio voltagem dependente na contração induzida por KCl, realizamos experimentos com a nifedipina, que é um inibidor clássico destes canais.

Os componentes fásico e tônico da contração induzida pelo KCl foram inibidos pela incubação prévia de concentrações crescentes de nifedipina (Figura 12). Quando comparamos os valores das médias de pIC_{50} (Tabela 5), observamos que não há diferença significativa entre eles.

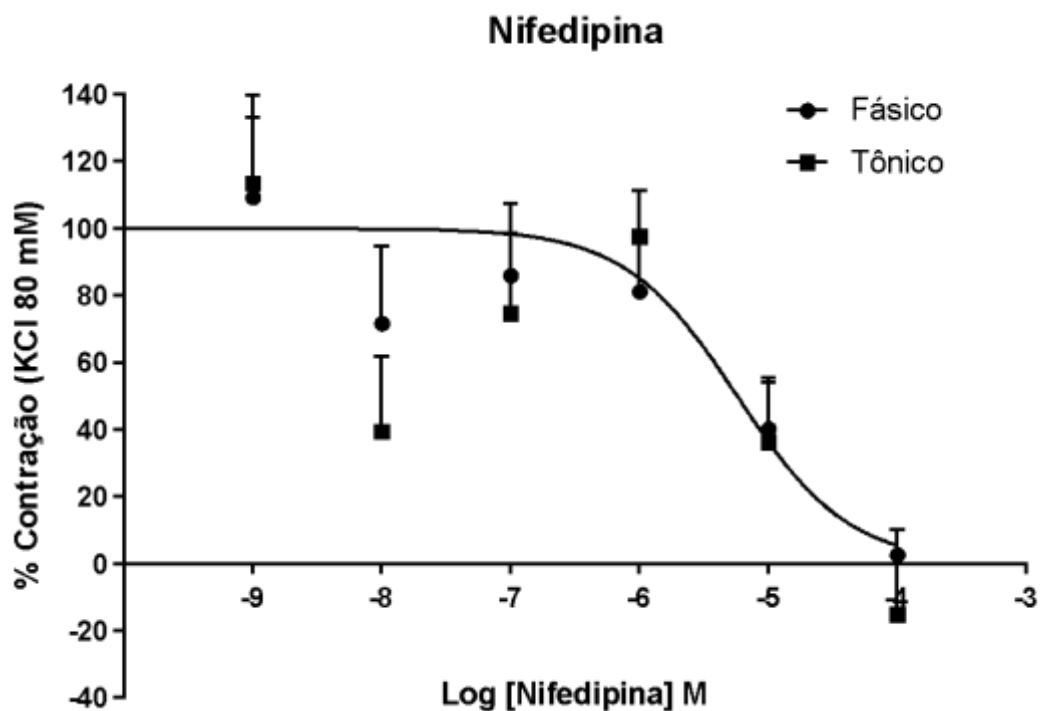


Figura 12 - Efeito inibitório de concentrações crescentes (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) de nifedipina, sob o componente fásico (círculo) e componente tônico (quadrado) da contração, induzida por KCl (80mM). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 6 experimentos.

Tabela 5 - Valores da média de pIC_{50} da nifedipina sob o componente fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC_{50}
Fásico	-5.282
Tônico	-5.711

4.5 Efeito dos extratos ou da quercetina, nos componentes fásico e tônico, da contração induzida por KCl, na presença de nifedipina ou da quercetina

4.5.1 Efeito de GB1 na presença da nifedipina

A Figura 13 representa o efeito de GB1, sob o componente fásico e tônico, na presença da nifedipina. De acordo com a Tabela 6, podemos observar que o componente tônico é estatisticamente mais sensível que o componente fásico.

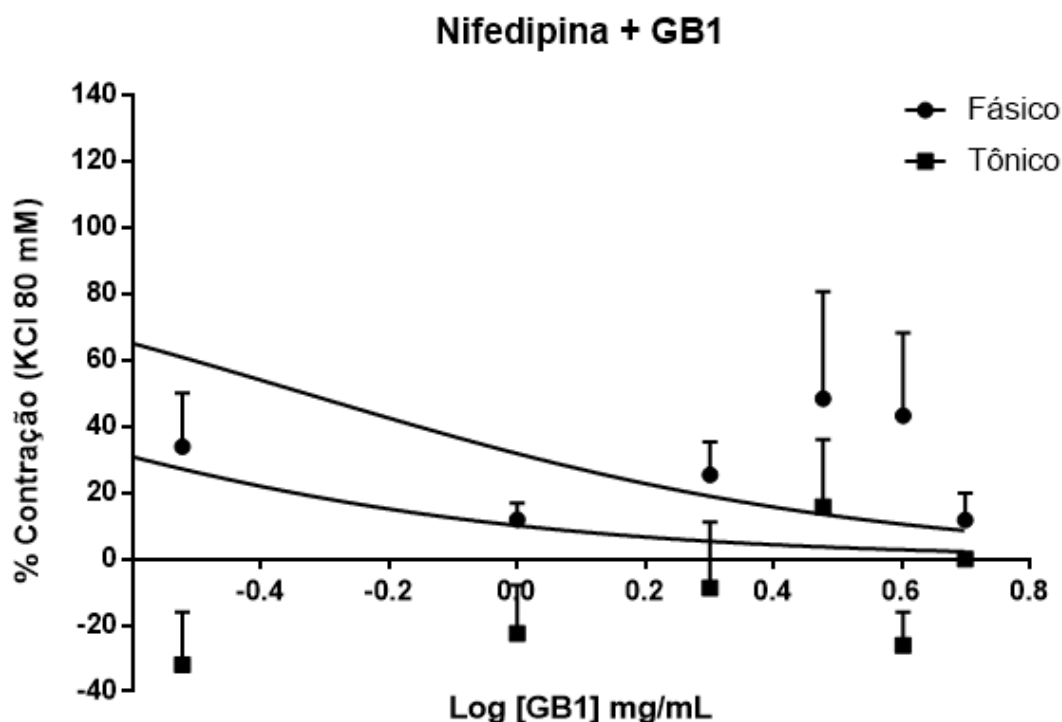


Figura 13 - Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10^{-5} M), e de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7) de GB1. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 8 experimentos.

Tabela 6 - Valores da média de pIC₅₀ de GB1 na presença de nifedipina (10⁻⁵ M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC ₅₀
Fásico	-0,321
Tônico	-0,993*

* Componente tônico diferente estatisticamente do componente fásico, p = 0,0154.

4.5.2 Efeito de GB2 na presença da nifedipina

O efeito de GB2 na presença da nifedipina sob o componente fásico e tônico, da contração induzida por KCl, no ducto deferente é demonstrado na Figura 14. Os componentes são sensíveis à ação do GB2 na presença da nifedipina, porém, sem diferença estatística entre eles (Tabela 7).

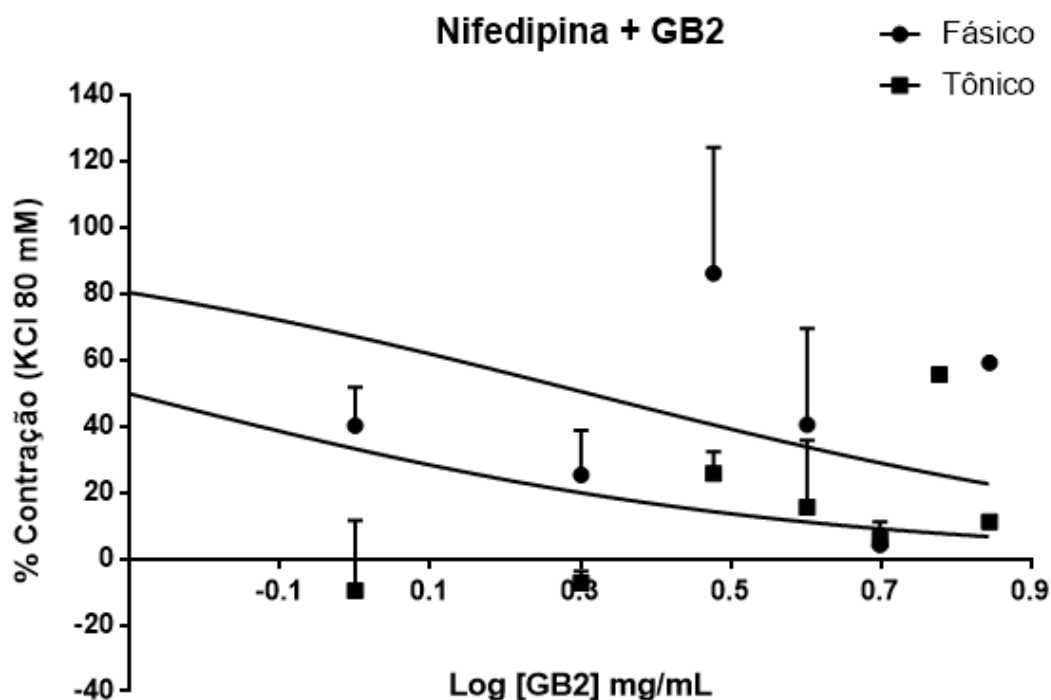


Figura 14 - Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10⁻⁵ M), e de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85) de GB2. Cada ponto é a média ± erro padrão da média, de pelo menos 7 experimentos.

Tabela 7 - Valores da média de pIC₅₀ de GB2 na presença de nifedipina (10⁻⁵ M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC ₅₀
Fásico	0,2533
Tônico	-0,3058

4.5.3 Efeito da quercetina na presença da nifedipina

A Figura15 representa o efeito da quercetina na presença da nifedipina. Podemos observar que ambos os componentes foram inibidos, porém que não há diferença estatística entre eles, conforme demonstrado na Tabela 8.

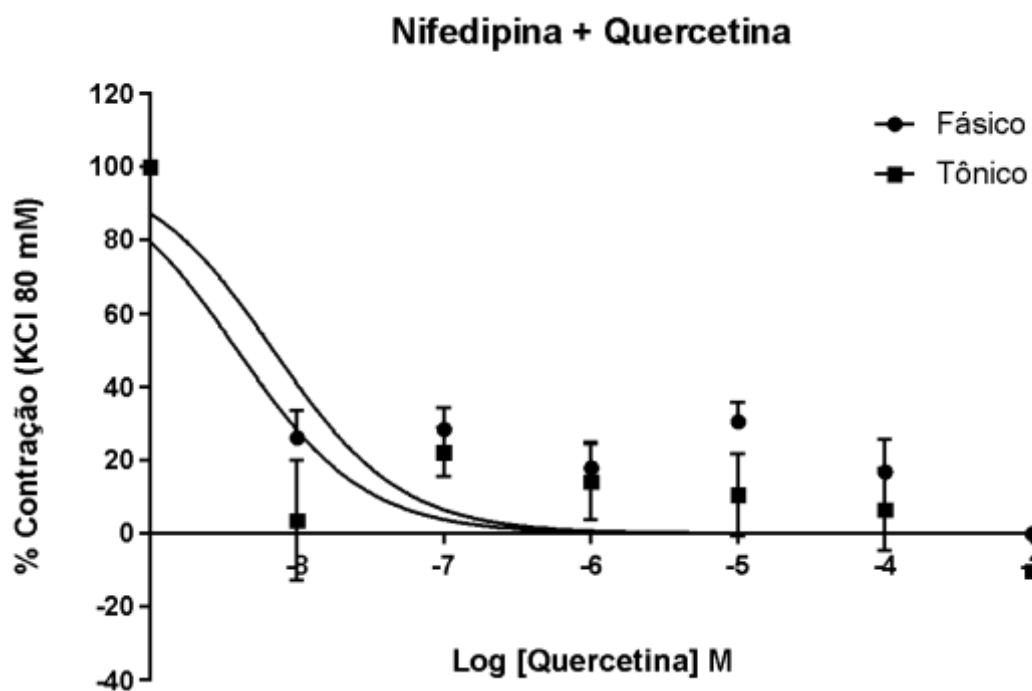


Figura 15 - Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da nifedipina (10⁻⁵ M), e de concentrações crescentes (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ e 10⁻³ M) de quercetina. Cada ponto é a média ± erro padrão da média, de p pelo menos 10 experimentos.

Tabela 8 - Valores da média de pIC_{50} da quercetina na presença de nifedipina (10^{-5} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC_{50}
Fásico	-8,044
Tônico	-8,416

4.5.4 Efeito de GB2 na presença de quercetina

A figura 16 mostra o efeito inibitório, de GB2 na presença da quercetina, sob o componente fásico e o componente tônico, na contração induzida por KCl. O componente tônico é estatisticamente mais sensível que o componente fásico, como demonstrado na Tabela 9.

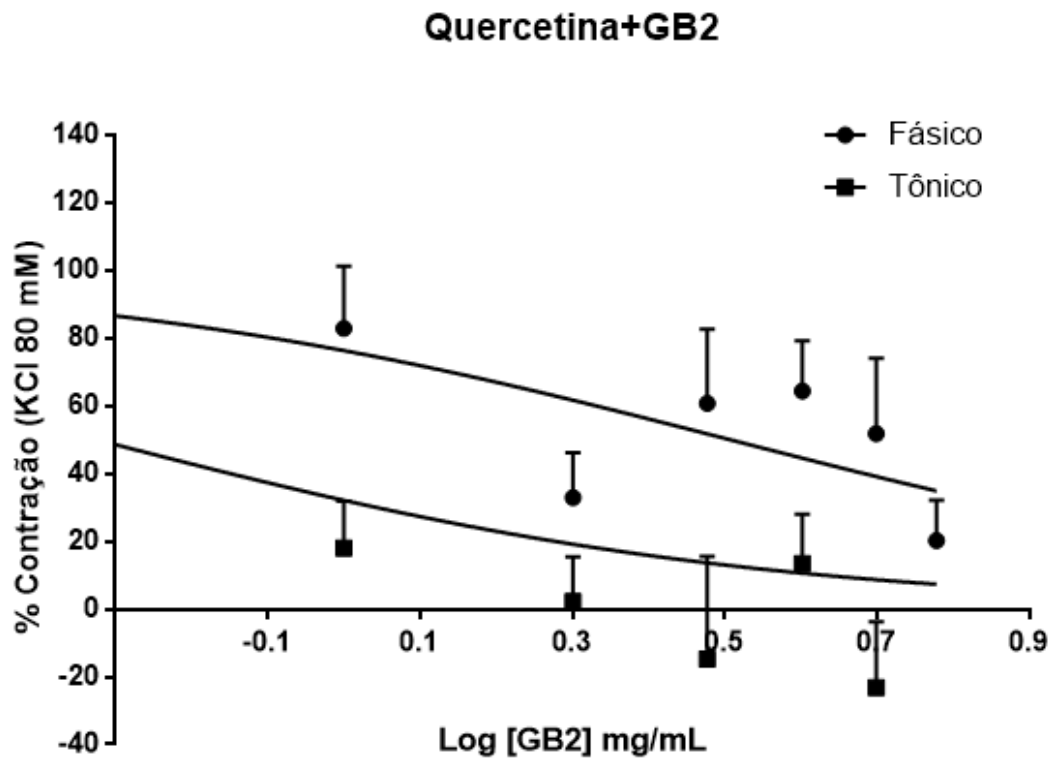


Figura 16 - Componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM) na presença da quercetina (10^{-7} M), e de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85) de GB2. Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 9 experimentos.

Tabela 9 - Valores da média de pIC_{50} de GB2 na presença da quercetina (10^{-7} M), sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	pIC_{50}
Fásico	0,4619
Tônico	-0,3003*

* Componente tônico estatisticamente diferente do componente fásico, $p = 0,0101$

4.6 Comparação do efeito inibitório, induzido pelos extratos de *Ginkgo biloba* ou de quercetina, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

A partir dos dados obtidos anteriormente, construímos novos gráficos, onde demonstramos o efeito dos extratos sob cada componente da contração, porém na presença ou na ausência da nifedipina ou da quercetina.

4.6.1 Comparação do efeito inibitório, induzido por GB1, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

A comparação do componente fásico da contração induzida por KCl, na presença e na ausência da nifedipina é demonstrada na Figura 17 A. A mesma comparação foi feita para o componente tônico (Figura 17 B). Em relação ao componente tônico, na presença da nifedipina, o efeito de GB1 foi potencializado, existindo diferença estatística entre eles (Tabela 10).

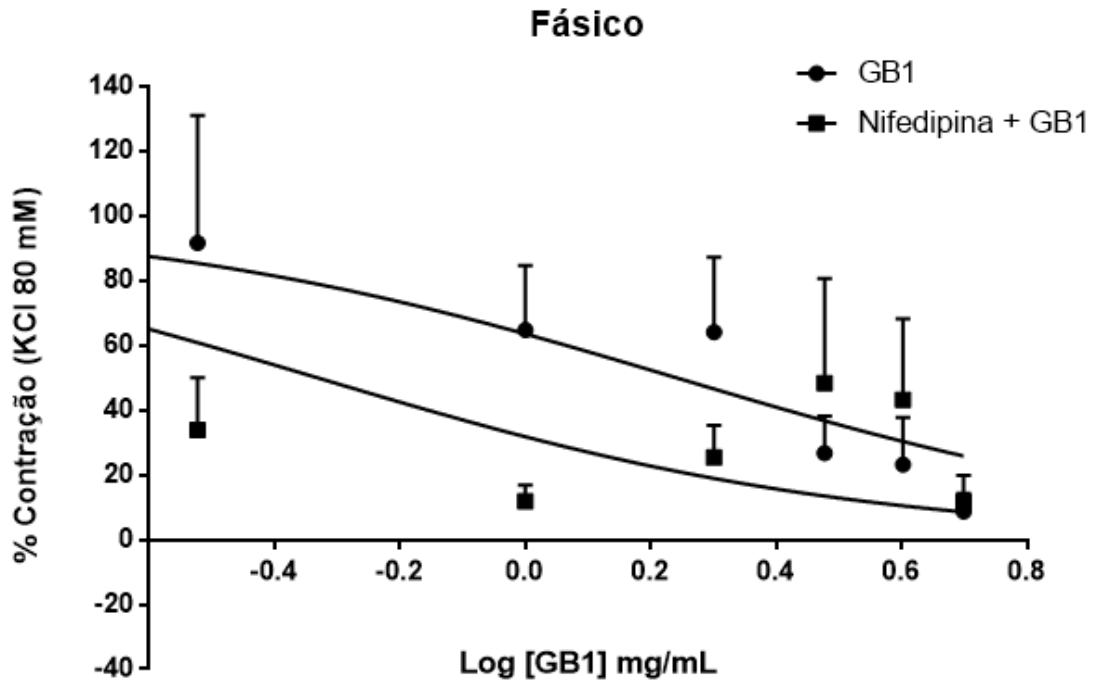


Figura 17 A - Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7) de GB1 (círculo) e de GB1 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 7 experimentos.

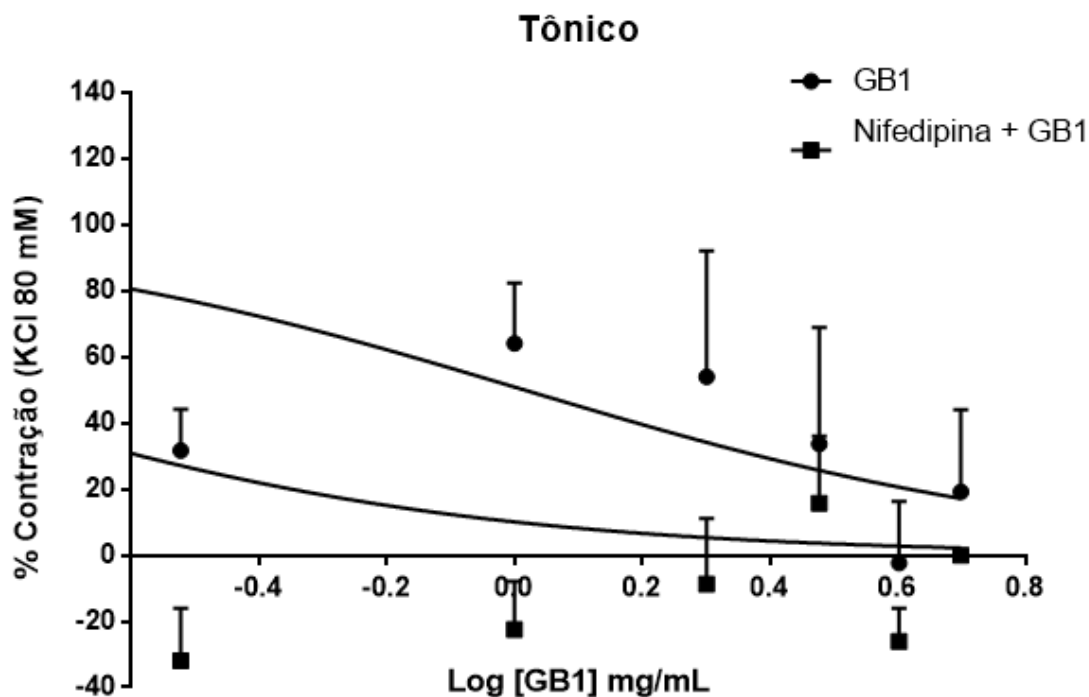


Figura 17 B - Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (0,3; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: -0,52; 0; 0,3; 0,48; 0,6 e 0,7) de GB1 (círculo) e de GB1 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 7 experimentos.

Tabela 10 - Valores da média de pIC_{50} de GB1, na presença ou ausência da nifedipina (10^{-5} M) sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	GB1	Nifedipina + GB1
Fásico	0,1833	-0,321
Tônico	-0,002226	-0,993***

*** Componente tônico de GB1 estatisticamente diferente do componente tônico de Nifedipina + GB1, $p = 0,0005$.

4.6.2 Comparação do efeito inibitório, induzido por GB2, na presença ou na ausência da nifedipina ou da quercetina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

Comparamos o efeito inibitório de GB2, na ausência ou na presença da nifedipina e da quercetina sob ambos os componentes da contração, fásico (Figura 18 A) e tônico (Figura 18 B) no ducto deferente. A partir dos valores das médias de pIC_{50} (Tabela 11), é possível observar que não há diferença significativa entre o componente fásico de GB2 na presença ou ausência da nifedipina ou da quercetina.

Ao contrário do componente fásico, o componente tônico da contração induzida por KCl no ducto deferente na presença de GB2 e na ausência ou na presença da nifedipina ou da quercetina (Figura 18 B) apresentou diferença estatística entre os grupos, conforme demonstrado a partir do valor da média de pIC_{50} na Tabela 11.

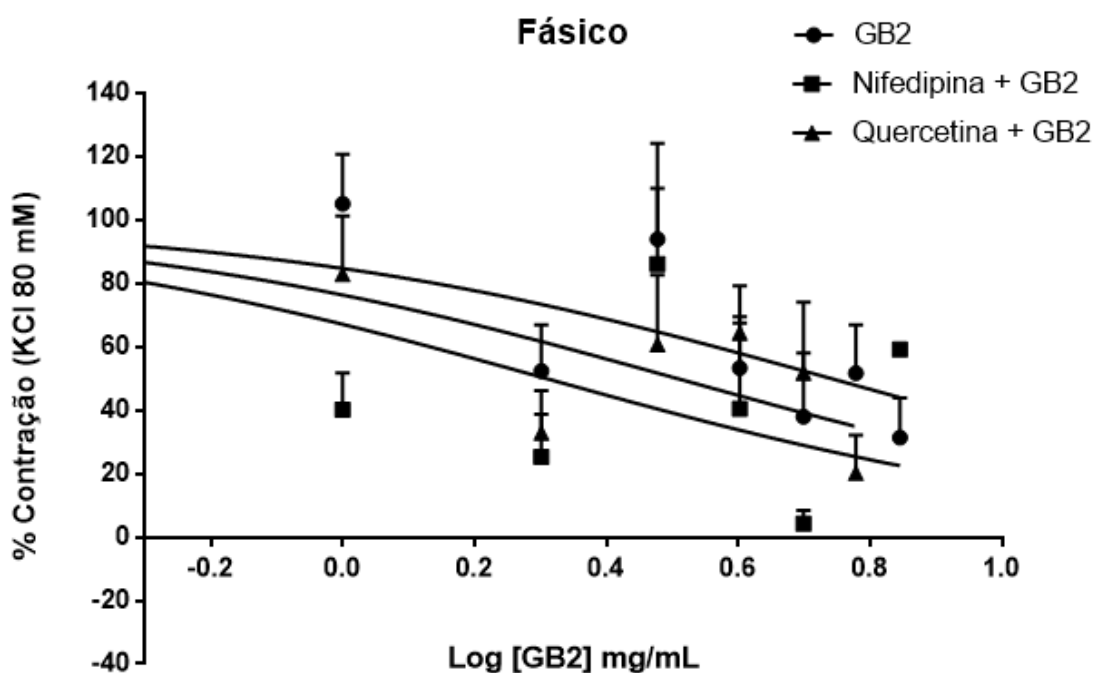


Figura 18 A - Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,8) de GB2 (círculo) e de GB2 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado) ou da quercetina (10^{-7} M) (triângulo). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 7 experimentos.

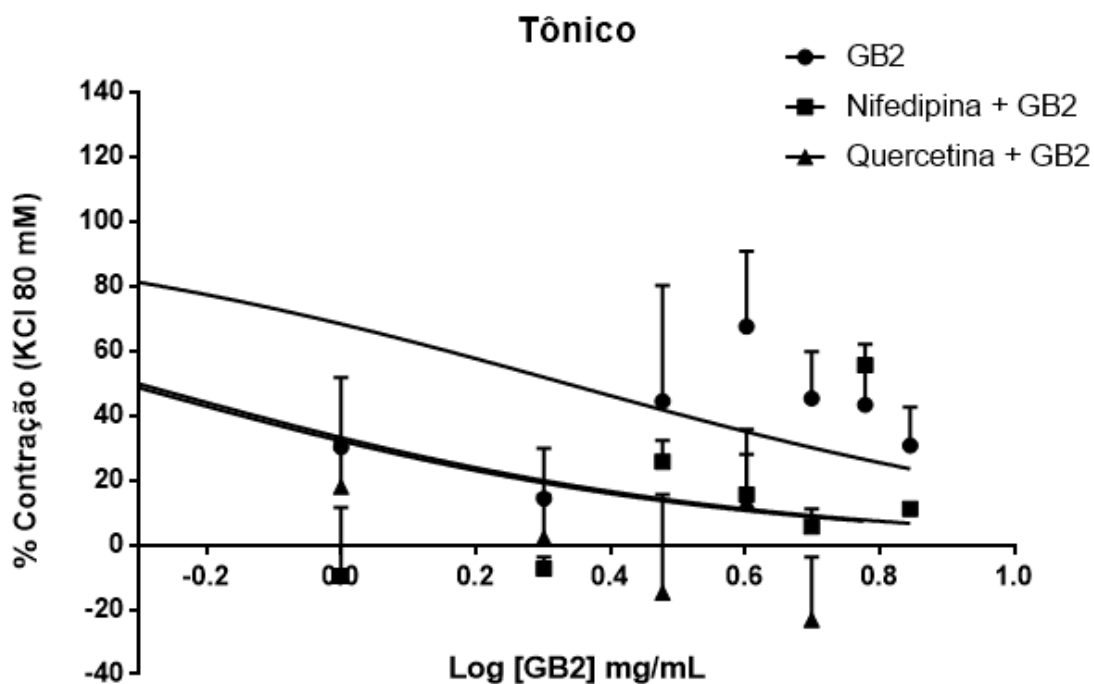


Figura 18 B - Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,8) de GB2 (círculo) e de GB2 na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado) ou da quercetina (10^{-7} M) (triângulo). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 7 experimentos.

Tabela 11 - Valores da média de pIC_{50} de GB2, na presença ou ausência da nifedipina (10^{-5} M) ou da quercetina (10^{-7} M) sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	GB2	Nifedipina + GB2	Quercetina + GB2
Fásico	0,8348	0,2533	0,4788
Tônico	0,3019	-0,3058*	-0,2877*

* Componente tônico de GB2 diferente estatisticamente do componente tônico de Nifedipina + GB2 ($p = 0,0296$) e de Quercetina + GB2 ($p = 0,0251$). ANOVA *one-way* & *Dunnett's multiple comparisons test*.

4.6.3 Comparação do efeito inibitório, induzido pela quercetina, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

O efeito inibitório da quercetina, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, na presença ou ausência da nifedipina é demonstrado, respectivamente, nas Figura 19 A e Figura 19 B. A partir dos valores das médias de pIC_{50} obtidas, é possível observar que na presença da nifedipina há uma potencialização estatisticamente significativa no efeito da quercetina em ambos os componentes (Tabela 12).

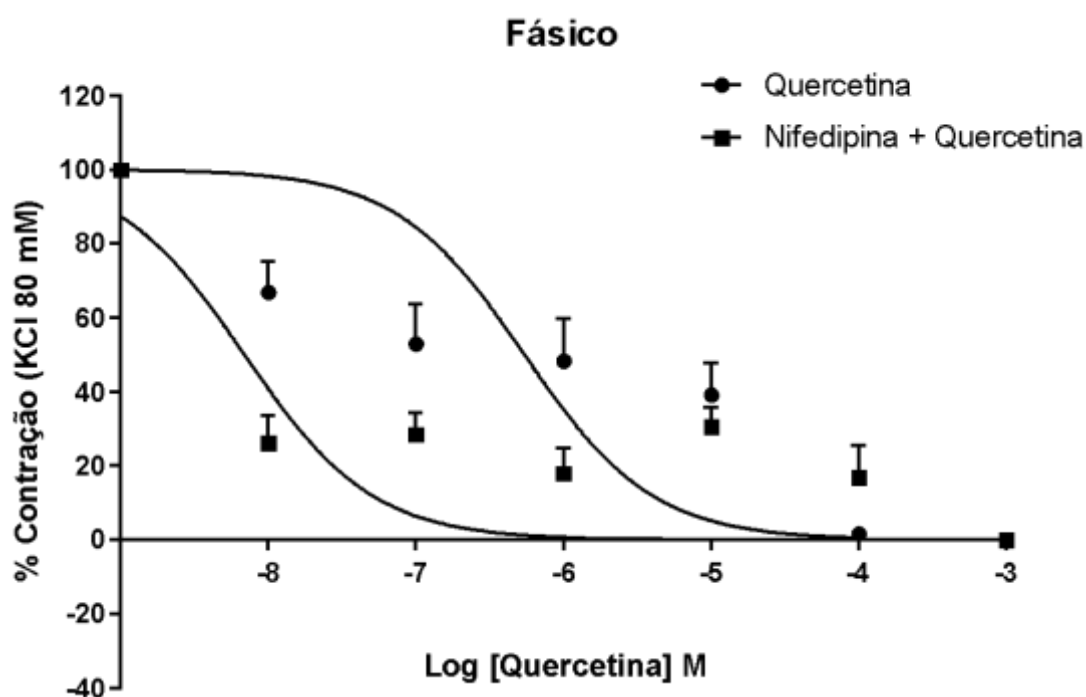


Figura 19 A - Componente fásico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina (círculo) e de quercetina na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 4 experimentos.

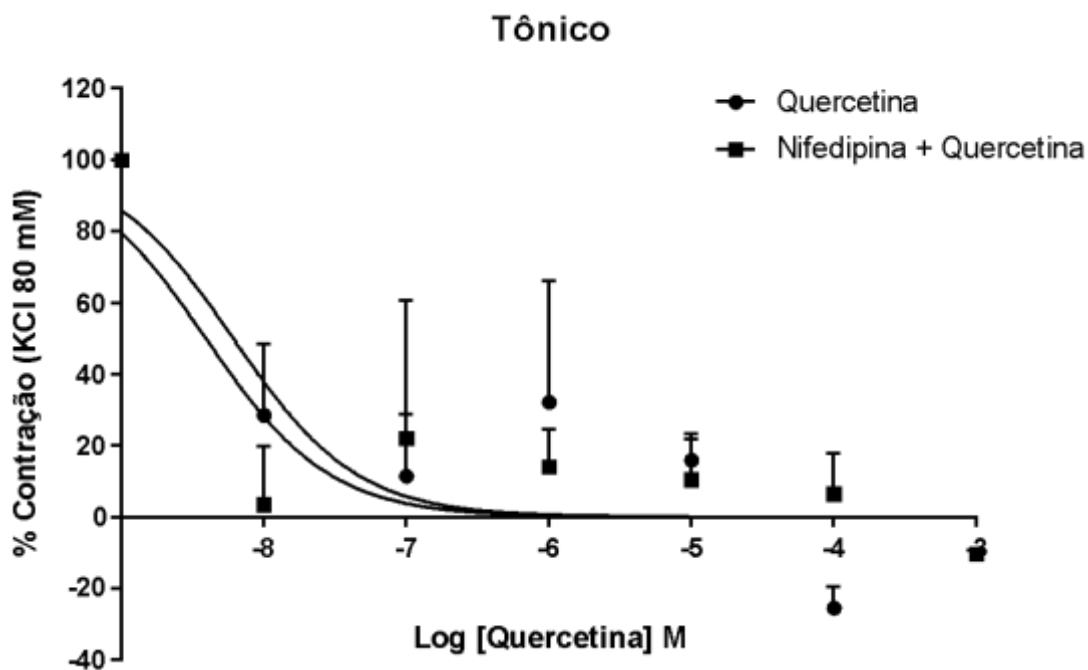


Figura 19 B - Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) de quercetina (círculo) e de quercetina na presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado). Cada ponto é a média \pm erro padrão da média, de pelo menos 4 experimentos.

Tabela 12 - Valores da média de pIC_{50} da quercetina, na presença ou ausência da nifedipina (10^{-5} M) sob os componentes fásico e tônico na contração induzida por KCl (80mM) no ducto deferente.

Componente	Quercetina	Nifedipina + Quercetina
Fásico	-5,098	-8,044****
Tônico	-6,848	-8,416*

** Componente fásico da Quercetina estatisticamente diferente do componente fásico de Nifedipina + Quercetina, $p = 0,0015$. * Componente tônico da Quercetina estatisticamente diferente do componente fásico de Nifedipina + Quercetina, $p = 0,0216$.

A Tabela 13 apresenta, de maneira simplificada, os resultados obtidos.

Tabela 13 – Resumo dos resultados da comparação da IC₅₀ entre os diferentes tratamentos e os diferentes componentes da contração no ducto deferente.

GB1	F = T
GB2	F = T
Quercetina	F = T
Nifedipina	F = T
Nif + GB1	T + sensível que F
Nif + GB2	F = T
Nif + Quer	F = T
Quer + GB2	T + sensível que F
F	GB1 = Nif + GB1
T	Nif + GB1 + sensível que GB1
F	GB2 = NIF+GB2 = Quer+GB2
T	Nif+GB2 e Quer+GB2 + sensível que GB2
F	Nif + Quer + sensível que Quercetina
T	Nif + Quer + sensível que Quercetina

F: fásico; T: tônico; Nif: nifedipina; Quer: quercetina.

5. Discussão

Nossos resultados demonstram que os extratos de *Ginkgo biloba*, GB1 e GB2, tal como um composto flavonoide isolado, a quercetina, são capazes 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. Ao utilizarmos a nifedipina, o componente tônico foi mais sensível do que o componente fásico nos grupos Nifedipina+GB1 e Quercetina+GB2. O mesmo acontece quando o efeito de GB2 foi testado frente à pré-incubação de quercetina. Na comparação dos efeitos inibitórios em cada componente, analisados separadamente, demonstramos que na presença da nifedipina, a inibição do componente tônico foi potencializada quando comparamos com a inibição que ocorre somente na presença de GB1 ou de GB2. Já a inibição causada pela quercetina na presença da nifedipina foi potencializada em ambos os componentes.

5.1 Avaliação fitoquímica

Os extratos de *Ginkgo biloba* são reconhecidos por possuírem compostos que podem desempenhar atividades biológicas, tais como antioxidantes, anti-hipertensivas e neuroprotetoras. Além disso, estão incluídos entre os produtos naturais utilizados como suplementos para disfunções eréteis (WU et al. 2015). Entre os flavonoides encontrados nos extratos GB1 e GB2 que foram utilizados neste estudo estão o kaempferol, quercetina e isoquercetina. Estes flavonoides, assim como as terpenolactonas são reconhecidos como os marcadores de qualidade dos extratos (AMIN et al., 2012; GACHOWSKA et al., 2021) e possuem efeitos biológicos. Os flavonoides são substâncias fenólicas que são estáveis por ressonância e possuem grande número de grupos funcionais hidroxila redutores, que podem prevenir e inibir a toxicidade dos radicais livres de oxigênio, reduzindo os danos da peroxidação de lipídios e outros danos patológicos ao corpo humano (ZHANG et al., 2021). Estes compostos também podem atuar inibindo ou modulando diversos receptores devido às suas características moleculares similares a muitas substâncias endógenas ou sintéticas (FERNANDES et al., 2017). Os extratos de *Ginkgo biloba*, assim como alguns flavonoides isolados, como a quercetina, podem interagir com a nifedipina, pois ambos são metabolizados pela enzima CYP3A (YOSHIOKA et al., 2004).

5.2 Efeito dos diferentes extratos de *Ginkgo biloba* ou da quercetina na contração induzida por KCl em ducto deferente

5.2.1 Efeitos dos extratos

No presente estudo, a contração do ducto deferente foi caracterizada por dois componentes distintos, gerando uma resposta bifásica, sendo uma contração inicial e rápida, denominada componente fásico, sucedida por uma contração sustentada, denominada componente tônico, estando de acordo com o que já foi descrito na literatura e demonstrado em outros trabalhos (HAY & WADSWORTH, 1982; LANGTON & HUDDART, 1988; JURKIEWICZ, et al. 1994; LAFAYETTE et al., 2008).

Os nossos resultados demonstram que tanto o extrato GB1, quanto GB2, são capazes de induzir o relaxamento da musculatura lisa do ducto deferente, uma vez que comparamos o efeito de diferentes concentrações destas substâncias sob os componentes fásico e tônico, com seus respectivos controles e observamos diferença estatística na maioria delas.

Até onde foi possível pesquisar, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* no ducto deferente. Na literatura, há trabalhos que demonstram o efeito relaxante do GBE em órgãos de musculatura lisa (DELAFLLOTTE et al., 1984; CHEN et al., 1997; KUBOTA et al., 2001; KIM et al., 2011), mas não em ducto deferente. O extrato de GB, de maneira concentração-dependente, provocou relaxamento dependente do endotélio pela via do óxido nítrico (NO) tanto em aorta isolada de coelho pré contraída com fenilefrina (DELAFLLOTTE et al., 1984), quanto em artérias basilares suínas seguidas da estimulação nervosa transmural (CHEN et al., 1997). Kim e colaboradores (2011) demonstraram que o GBE desempenhou efeito relaxante em células musculares lisas do corpo cavernoso de coelho, pré-contraídas, com norepinefrina, de uma maneira concentração dependente. Além disso, também demonstraram que o efeito relaxante do GBE foi potencializado em combinação com o mirodenafil, um inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5). Os inibidores da PDE-5 são prescritos como tratamento de primeira linha para disfunção erétil (DE), assim, segundo os autores, a terapia de combinação de GBE com inibidores de PDE-5 podem ser de grande valia para tratamento de DE (DELL'AGLI et al., 2006; SAPONARA & BOSISIO, 1998, apud KIM et al., 2011). Também foi descrito que o GBE produziu um relaxamento concentração-dependente em anéis aórticos, de ratos

machos, pré-contraído com noradrenalina (KUBOTA et al., 2001). Assim, a análise destes trabalhos indica que independente do agente indutor da contração, o GBE é capaz de inibir a contração muscular.

5.2.2 Efeito da quercetina

Assim como os extratos de GBE, a quercetina também desempenhou um efeito relaxante na musculatura lisa do ducto deferente, quando comparamos os componentes fásico e tônico na presença da quercetina com seu correspondente controle (na ausência). Observamos no componente fásico que em todas as concentrações utilizadas, a quercetina apresentou diferenças estatísticas, e no componente tônico, em três (10^{-7} , 10^{-4} e 10^{-3} M) das cinco concentrações utilizadas.

Os nossos achados estão de acordo com o que já vem sendo descrito na literatura (KUBOTA et al., 2001; CAPASSO et al., 2006; LUO et al., 2018; MODZELEWSKA et al., 2021; ZYGMUNTOWICZ et al., 2021), inclusive Capasso e colaboradores já demonstraram o efeito inibitório da quercetina na contração por estimulação elétrica no DD. Estes autores avaliaram a atividade de dez flavonoides sobre a inibição das contrações do DD e concluíram que a potência do efeito estava relacionada com o número de hidroxilas fenólicas existentes nos compostos testados (CAPASSO et al., 2006). No trabalho de Kubota e colaboradores (2001), além de descreverem o relaxamento causado pelo GBE, também demonstraram que a quercetina induz relaxamento no modelo experimental previamente citado (item 1.1.3) e ainda, demonstraram que este relaxamento foi revertido pelo L-NAME, sugerindo um efeito dependente da produção de NO. LUO e colaboradores (2018), demonstraram que a quercetina inibiu a pré-contração por acetilcolina em vias aéreas de camundongos, sendo proposto pelos autores que essa inibição pode ser por meio da inibição de canais de cálcio voltagem dependente do tipo L, já que a quercetina bloqueou completamente as correntes mediadas por estes canais, A quercetina também induziu um relaxamento dependente da concentração em tiras gástricas humanas tratadas com carbacol, sendo essa inibição dependente dos canais K_{ATP} pois seu efeito foi revertido na presença de glibenclamida (MODZELEWSKA et al., 2021). ZYGMUNTOWICZ e colaboradores (2021), relataram que a quercetina causou relaxamento do músculo liso uterino de suínos estimulados com acetilcolina. Os autores sugerem que este efeito é dependente da condição fisiológica da

fêmea, já que o efeito inibitório foi maior nas fêmeas cíclicas e gestantes quando comparado com as imaturas.

5.3 Comparação entre o componente fásico e tônico da contração induzida por KCl, na presença dos extratos ou da quercetina

Ao compararmos, a IC_{50} dos componentes fásico e tônico entre si, na presença de GB1, GB2 ou da quercetina, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os dois componentes. Já na comparação entre os componentes fásico e tônico em cada concentração, individualmente, só observamos diferença estatística na concentração de 1 mg/mL para GB2 e na concentração de 10^{-3} M para a quercetina. Assim, é plausível afirmar que os extratos de *Ginkgo biloba* assim como a quercetina atuam nos mesmos mecanismos de inibição da contração muscular independente do componente avaliado.

É sabido que para essa contração ser gerada, o influxo de cálcio é extremamente importante para o mecanismo de acoplamento excitação-contração, e alguns trabalhos demonstraram que os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl são dependentes desse influxo de cálcio, e isso se dá através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cav) que ativam-se na despolarização da membrana (CHENG, 1976; HUDDART et al., 1984). Na literatura é descrito a ativação de diferentes canais de voltagem, sendo canais de cálcio que são rapidamente inativados, responsáveis pelo componente fásico, ao passo que existem canais de cálcio que são inativados lentamente, responsáveis pela resposta tônica mantida (HUDDART et al., 1984; LANGTON & HUDDART, 1987).

De acordo com a literatura, podemos destacar dois tipos de canais de cálcio dependente de voltagem, os canais do tipo L e do tipo T. Os canais de cálcio ativados por alta voltagem, sensíveis à dihidropiridinas (nifedipina) e que são inativados lentamente, são os do tipo L ($Ca_{v1.x}$); já os canais de cálcio que são ativados por baixa voltagem e que são inativados rapidamente, são os do tipo T ($Ca_{v3.x}$) (CATTERALL et al., 2005; CATTERALL et al., 2020). No trabalho de Garcia-Pascual e colaboradores (1991), os autores sugeriram que na uretra de cordeiro 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). Esses resultados são apoiados pelo trabalho de Langton e Huddart (1987), que concluíram que no ducto deferente de rato, o

componente fásico dependia da ativação de canais de cálcio rápidos que eram prontamente inativados por voltagem, os canais tipo T, enquanto a resposta mantida do componente tônico dependia da ativação de canais lentos dependentes de voltagem, tipo L, que foram inativados lentamente. Esses resultados indicam que há a participação de diferentes subtipos de Ca_v na contração induzida por KCl, embora em nossos experimentos foi demonstrado que fásico e tônico foram inibidos igualmente na presença dos extratos ou da quercetina.

Apesar da literatura descrever a participação de diferentes tipos de canais de cálcio no componente fásico e tônico da contração induzida por KCl, nossos resultados sugerem que independente da sinalização envolvida na geração tanto do componente fásico quanto do componente tônico, GB1, GB2 e quercetina foram capazes de inibir igualmente esses componentes.

5.4 Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl

Como citado anteriormente, a contração de células musculares depende da disponibilidade de íons cálcio, e modificações súbitas e transitórias dessas concentrações e alterações funcionais dos canais de cálcio podem interferir na resposta à contração (DUARTE, 1993).

A nifedipina que é um bloqueador clássico dos canais de cálcio dependentes de voltagem, foi utilizada a fim de avaliar a participação desses canais na contração induzida por KCl. Nossos resultados mostram que a nifedipina é capaz de inibir de maneira concentração dependente tanto o componente fásico quanto o tônico da contração induzida por KCl, confirmando a participação destes canais em ambos os componentes da contração. Estes resultados vão ao encontro do que já foi reportado na literatura, sobre trabalhos que utilizam a nifedipina na inibição das contrações geradas pelo KCl no ducto deferente (HAY & WADSWORTH, 1982a; HAY & WADSWORTH, 1982b; HOY; ASHLEY; CAMERON, 1986; LANGTON & HUDDART, 1988; SHIBATA et al., 1991). Porém, quando comparamos o efeito da nifedipina entre os componentes da contração, demonstramos que não houve diferença significativa entre eles, indicando que há participação de Ca_v -L em ambos os componentes da contração, sendo este nosso resultado, contrário ao que foi observado por alguns autores que demonstraram que o componente tônico é mais sensível à ação da nifedipina (HAY & WADSWORTH, 1982b; HOY; ASHLEY; CAMERON, 1986).

5.4.1 Efeitos dos extratos, GB1 e GB2, e da quercetina na presença da nifedipina

Quando comparamos o efeito inibitório do extrato GB2 ou da quercetina, na presença da nifedipina, sob os componentes da contração, observamos que não há diferenças estatísticas entre eles, diferente do que ocorre com extrato de GB1 na presença da nifedipina, onde demonstramos uma potencialização do efeito de GB1 no componente tônico.

Esses resultados nos indicam que tanto os extratos de GB (GB1, GB2) quanto a quercetina, não atuam exclusivamente por bloqueio de Ca_vL , já que a resposta causada por cada um deles não foi revertida na presença da nifedipina.

5.5 Efeito do GB2 na presença da quercetina

Quando avaliamos o efeito de GB2 na presença da quercetina observamos que o componente tônico foi significativamente mais sensível do que o componente fásico. Esta diferença nos sugere que no componente tônico o GB2 esteja atuando em um mecanismo de inibição adicional ao mecanismo de ação da quercetina. Além disso, em ambos os componentes, também podemos inferir que o GB2 está atuando em um local de ação diferente do local da quercetina, tendo em vista que seu efeito não foi revertido pela mesma.

Como discutido anteriormente, há na literatura trabalhos que explicam os possíveis mecanismos de ação do GBE e da quercetina, porém não há trabalhos que tenham associado estas duas substâncias. Dessa maneira, até onde foi possível pesquisar, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito da associação de GBE com quercetina.

5.6 Comparação do efeito inibitório, induzido pelos extratos de *Ginkgo biloba* ou de quercetina, na presença ou na ausência de nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

Considerando o exposto de que fásico e tônico podem apresentar diferentes mecanismos de indução da contração, analisamos o efeito inibitório de cada extrato, pré-incubados com quercetina ou nifedipina, em cada componente. Aqui, já demonstramos que, em algumas condições, o componente tônico teve uma inibição mais significativa quando comparado com o componente fásico do mesmo grupo experimental. A partir daí, resolvemos comparar os grupos GB1 e Nifedipina+GB1; GB2, Nifedipina+GB2 e

Quercetina+GB2; Quercetina e Nifedipina+Quercetina, nos componentes fásico e tônico separadamente.

Demonstramos no componente tônico, que o efeito de GB1 e de GB2 foi potencializado na presença da nifedipina. Além disso, também no componente tônico, na presença da quercetina, o efeito do GB2 foi potencializado, sugerindo que as substâncias atuam em locais diferentes porém com a mesma função de inibição da contração nesse componente.

Já o efeito da quercetina foi potencializado em ambos os componentes, fásico e tônico, na presença da nifedipina, propondo que a inibição causada pela quercetina não depende unicamente de canais de cálcio dependentes de voltagem.

Apesar de nossos achados serem contrários aos resultados demonstrados por alguns autores (ROTONDO, SERIO & MULÈ, 2009; LUO et al., 2018), onde foi demonstrado que na presença da nifedipina, o efeito inibitório da quercetina sobre a contração gástrica, foi parcialmente revertido, sugerindo assim que a quercetina atua nos canais Ca_v-L , embora não exclusivamente (ROTONDO; SERIO; MULÈ, 2009), e sugerido que a quercetina, em vias aéreas de camundongos, causa relaxamento por meio da inibição de Ca_v-L (LUO et al., 2018), nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a associação dessas duas substâncias em ducto deferente.

6. Conclusão

Nossos resultados indicam que GB1, GB2 e a quercetina são capazes de inibir algum mecanismo envolvido com a geração da contração induzida por KCl em ducto deferente de camundongo. Além disso, também sugerem que este efeito inibitório, de ambas as substâncias não é dependente exclusivamente da inibição dos canais de cálcio voltagem dependente. Assim, estes achados apontam que o GBE, bem como a quercetina, podem ser estratégias farmacológicas para o tratamento de EP.

7. Referências Bibliográficas

AMIN A.; ABRAHAM, C.; HAMZA, A. A.; ABDALLA, Z. A.; AL-SHAMSI, S. B.; HARETHI, S. S. & DAOUD, S. (2012). A standardized extract of *Ginkgo biloba* neutralizes cisplatin-mediated reproductive toxicity in rats. *J Biomed Biotechnol.* May;2012:362049.

BALANZ, L. & LEON, M. (1994). Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res.* 19(9): 1131–1137.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003.

BIROWO, P.; UCKERT, S.; KEDIA, G. T.; SONNENBERG, J.; THON, W. F.; RAHARDJO, D. & KUCZYK, M. A. Characterization of the Effects of Various Drugs Likely to Affect Smooth Muscle Tension on Isolated Human Seminal Vesicle Tissue. *Urology: Erectile and Ejaculatory Function.* Germany, p. 974-978. sep. 2009.

Brasil. Farmacopeia Brasileira. (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 5ª edição. v. 10.

BRASIL. Ministério da Saúde Portaria no 971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2016) Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília (DF).

BRASIL. Ministério da Saúde. (2018). Saúde Sexual e Saúde Reprodutiva: os homens como sujeitos de cuidado. Diário Oficial da União, Brasília (DF).

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2006b.

BRUSCHINI, H.; SCHMIDT, R. A. & TANAGHO, E. A. (1977). Studies on the neurophysiology of the vas deferens. *Investigative Urology*,

BUTCHER, M. J.; ZUBERT, T.; CHRISTIANSEN, K.; CARRANZA, A.; PAWLICKI, P. & SEIBEL, S. (2019). Topical Agents for Premature Ejaculation: A Review. *Sexual Medicine Reviews*.

- BUYS-GONÇALVES, G. F.; SILVA, M. H. A.; GONÇALVES, F. M.; ROCHA, G. A.; PEREIRA-SAMPAIO, M. A. & SOUZA, D. B. The distal vas deferens of spontaneously hypertensive rats a histomorphometric evaluation. *Acta Scientiae Anatomica*, v. 1, n. 1, p. 49–55, 2018.
- CAPASSO, R.; FIORINO, F.; ASCIONE, V.; FRECENTESE, F. & BORRELLI, F. Inhibition of rat vas deferens contractions by flavonoids in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2006 Mar;58(3):381-4.
- CARAFOLI, E.; SANTELLA, L.; BRANCA, D. & BRINI, M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2001.
- CARRO-JUÁREZ, M. & RODRÍGUEZ-MANZO, G. Role of genital sensory information in the control of the functioning of the spinal generator for ejaculation. *Int J Impot Res*. 2005 Mar-Apr;17(2):114-20.
- CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Aug 1;3(8):a003947.
- CATTERALL, W. A.; LENAËUS, M. J. & EL-DIN, T. M. G. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020. Jan 6;60:133-154.
- CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. S. & STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews Pharmacol Rev*. 61, 2005.
- CHEN, C. K. & PACE-ASCIAK, C. R. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*. 1997, Mar;27(2):363-6.
- CHEN, L.; SHI, G.; HUANG, D.; LI, Y.; MA, C.; SHI, M.; SU, B. & SHI, G. (2019). Male sexual dysfunction: A review of literature on its pathological mechanisms, potential risk factors, and herbal drug intervention. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108585.
- CHEN, X.; SALWINSKI, S. & LEE, T.J. Extracts of *Ginkgo biloba* and ginsenosides exert cerebral vasorelaxation via a nitric oxide pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997, Dec;24(12):958-9.

- CHENG, J. T. (1976) Calcium-induced release of calcium in rectal smooth muscle of mice. *Jap. J. Pharmac.* 26, 73-78.
- CHUANG, R. S. I.; 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.
- CROWDIS M. & NAZIR, S. Premature Ejaculation. [Updated 2021 Jul 1]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
- DELAFLOTTE, S.; AUGUET, M.; DEFEUDIS, F.V.; BARANES, J.; CLOSTRE, F.; DRIEU, K. & BRAQUET, P. (1984). Endothelium-dependent relaxations of rabbit isolated aorta produced by carbachol and by *Ginkgo biloba* extract. *Biomed Biochim Acta* 43: S212 - S216.
- DELL'AGLI, M.; GALLI, G. V. & BOSISIO, E. (2006). Inhibition of cGMP-phosphodiesterase-5 by biflavones of *Ginkgo biloba*. *Planta Med.* 72:468–70.
- 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. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.88 no.3.
- DONATO, F. M. Purificação, caracterização bioquímica e eletrofisiológica da toxina Mic6c7NTX da peçonha da serpente *Micrurus ibiboboca* (MERREM, 1820). Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.
- DONG, Z.; Saikumar, P.; Weinberg, J. M. & Venkatachalam, M. A. Calcium in cell injury and death. *Annual Review of Pathology*, 2006.
- DUARTE, J. A. R. (1993). Lesões Celulares do Músculo Esquelético Induzidas pelo Exercício Físico. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física.
- FERNANDES, I.; PÉREZ-GREGORIO, R.; SOARES, S.; MATEUS, N. & DE FREITAS, V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*. 2017, Feb 14;22(2):292

FRANCISCHI, F. B.; AYRES, D. C.; ITAO, R. E.; SPESSOTO, L. C. F.; ARRUDA, J. G. F. & FACIO JUNIOR, F. N. Ejaculação precoce: existe terapia eficiente?. São Paulo. 2011, v. 9, n. 4, p. 545-549, dez.

GACHOWSKA, M.; SZLASA, W.; SACZKO, J. & KULBACKA, J. Neuroregulatory role of ginkgolides. Mol Biol Rep. Jul;48(7):5689-5697, 2021

GARCIA-PASCUAL, O.A.; COSTA G.; ISLA, M.; JIMENEZ E. & GARCIA-SACRISTAN, A. Potassium-induced contraction in the lamb proximal urethra: involvement of norepinephrine and different calcium entry pathways, J. Pharmacol. Exp. Ther. 256, 127, 1991.

GAVRILOVA, S.I.; PREUSS, U.W.; WONG, J.W.; HOERR, R.; KASCHEL, R. & BACHINSKAYA, N. (2014). Efficacy and safety of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in mild cognitive impairment with neuropsychiatric symptoms: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-center trial. Int J Geriatr Psychiatry. Oct;29(10):1087-95.

GILLMAN, N. & GILLMAN, M. Premature Ejaculation: Aetiology and Treatment Strategies. Med Sci (Basel). 2019, Oct 25;7(11):102.

GIULIANO, F. Neurophysiology of Erection and Ejaculation. The Journal of Sexual Medicine, 8, 310-315, 2011.

GUO H.; ZHANG, J.; GAO, W.; QU Z. & LIU, C Anti-diarrhoeal activity of methanol extract of *Santalum album L.* in mice and gastrointestinal effect on the contraction of isolated jejunum in rats. Journal of Ethnopharmacology, 2014.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HAMILTON, D. W. & COOPER, T. G. Gross and histological variations along the length of the rat vas deferens. The Anatomical Record, 1978.

HAY, D. W. P. & WADSWORTH, R. M. (1982a). Effects of some organic calcium antagonists and other procedures affecting Ca²⁺ translocation on KCl-induced contractions in the rat vas deferens. British Journal of Pharmacology, v. 76, n. 1, p. 103–113.

HAY, D. W. P. & WADSWORTH, R. M. (1982b). KCl contractions in the rat intact and bisected vas deferens: contribution of endogenous noradrenaline release. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 10, n. 1.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K. -E & LARSSON, B. Effect of drugs interacting with adrenoreceptors and muscarinic receptors in the epididymal and prostatic parts of the human isolated vas deferens. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 1985.

HOFMANN, F.; FLOCKERZI, V.; KAHL, S. & WEGENER, J. W. L-type Cav1.2 calcium channels: from in vitro findings to *in vivo* function. *Physiol Rev.* 2014 Jan;94(1):303-26.

HOLASH, R. J. & MACINTOSH, B. R. A stochastic simulation of skeletal muscle calcium transients in a structurally realistic sarcomere model using MCell. *PLoS Comput Biol* 15(3). 2019.

HOY, W.; ASHLEY, W. & CAMERON, A. N. (1986). Effect of a Smooth Muscle Relaxant from the Stonefish, *Synanceia Trachynis*, on KCl-induced Responses in the Guinea-pig Vas Deferens. *European Journal of Pharmacology* 129.1.105-12.

HUDDART, H.; LANGTON, P. D. & SAAD, K. H. Inhibition by papaverine of calcium movements and tension in the smooth muscles of rat vas deferens and urinary bladder. *The Journal of Physiology*. 1984, v. 349, n. 1, p. 183–194.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JURKIEWICZ, A.; LAFAYETTE, S.S.; NUNES, S.H.; MARTINI, L.C.; GARCEZ-DO-CARMO, L. & WANDERLEY, A. (1994). Decreased density of binding sites for the Ca²⁺ channel antagonist [³H]isradipine after denervation of rat vas deferens. *Eur J Pharmacol.* 256:329–333.

KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 2º edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KIGUTI, L. R. A. & PUPO, A. S. 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*. Malden: Wiley-blackwell. 2012, v. 9, n. 1, p. 159-168.

KIM, J. J.; HAN, D. H.; LIM, S. H.; KIM, T. H.; CHAE, M. R.; CHUNG, K.J; KAM, S. C.; JEON, J. H.; PARK, J. K. & LEE, S.W. (2011). Effects of *Ginkgo biloba* extracts with mirodenafil on the relaxation of corpus cavernosal smooth muscle and the potassium channel activity of corporal smooth muscle cells. *Asian J Androl.* Sep;13(5):742-6.

KUBOTA, Y.; TANAKA, N.; UMEGAKI, K.; TAKENAKA, H.; MIZUNO, H.; NAKAMURA, K.; SHINOZUKA, K. & KUNITOMO, M. (2001). *Ginkgo biloba* extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level. *Life Sci.* Oct 5;69(20):2327-36.

KUMAR, S.; BAJWA, B. S.; KULDEEP S. & KALIA A. N. Anti-inflammatory activity of herbal plants: A review. *International Journal of Advances in pharmacy, Biology and Chemistry*, v. 2, n. 2, 2013.

LAFAYETTE, S. S.; 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. *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. *Gen. Pharmac.* 18, 47-55.

LANGTON, P. 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: Vascular System*, v. 19, n. 6.

LAUMANN, E. O.; NICOLSI, A.; GLASSER, D. B.; PAIK, A.; GINGELL, C. & MOREIRA, E. Sexual problems among women and men aged 40–80 y: prevalence and correlates identified in the Global Study of Sexual Attitudes and Behaviors. *Int J Impot Res* 2005; 17: 39–57.

LIPSKAIA, L.; LIMON, I.; BOBE, R. & HAJJAR, R. Calcium cycling in synthetic and contractile phasic or tonic vascular smooth muscle cells. In: *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans*. Intech Publishers, Cap. 2: 28–44, 2012.

LIU, Z. & KHALIL, R. A. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 2018.

LUO, X.; XUE, L.; XU, H.; ZHAO, Q. Y.; WANG, Q.; SHE, Y. S.; ZANG, D. A.; SHEN, J.; PENG, Y. B.; ZHAO, P.; YU, M. F.; CHEN, W.; MA, L. Q.; CHEN, S.; CHEN, S.; FU, X.; HU, S.; NIE, X.; SHEN, C.; ZOU, C. & LIU, Q. H. (2018). *Polygonum aviculare* L. extract and quercetin attenuate contraction in airway smooth muscle. *Scientific reports*, 8(1), 3114.

LUZ, M. T. (1997). Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. *Physis* 1997; 7(1):13-43

MATTOS, G.; CAMARGO, A.; SOUSA, C. A. & ZENI, A. L. B. (2018). Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 11, p. 3735-3744, nov.

MCCMAHON, C.G.; ALTHOF, S.E.; WALDINGER, M.D.; PORST, H.; DEAN, J.; SHARLIP, I.D.; ADAIKAN, P.G.; BECHER, E.; BRODERICK, G.A.; BUVAT, J.; DABEES, K.; GIRALDI, A.; GIULIANO, F.; HELLSTROM, W.J.; INCROCCI, L.; LAAN, E.; MEULEMAN, E.; PERELMAN, M.A.; ROSEN, R.C.; ROWLAND, D.L. & SEGRAVES, R. An evidence-based definition of lifelong premature ejaculation: Report of the International Society for Sexual Medicine (ISSM) ad hoc committee for the definition of premature ejaculation. *J Sex Med* 2008;5:1590–606.

MEI, N.; GUO, X.; REN, Z.; KOBAYASHI, D.; WADA, K. & GUO, L. Review of *Ginkgo biloba*-induced toxicity, from experimental studies to human case reports. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2017; 35(1):1-28.

MODZELEWSKA, B.; DRYGALSKI, K.; KLESZCZEWSKI, T.; CHOMENTOWSKI, A.; KORYCIŃSKI, K.; KIELCZEWSKA, A.; PAWŁUSZEWICZ, P. & RAZAK HADY, H. (2021). Quercetin relaxes human gastric smooth muscles directly through ATP-sensitive potassium channels and not depending on the nitric oxide pathway. *Neurogastroenterol Motil.* Jul;33(7):e14093.

MOYNIHAN, A. T.; SMITH, T. J. & MORRISON, J. J. The relaxant effect of nifedipine in human uterine smooth muscle and the BKCa channel. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2008.

MUKHERJEE, S.; TRICE, J.; SHINDE, P.; WILLIS, R. E.; PRESSLEY, T. A. & PEREZ-ZOGHBI, J. F. Ca^{2+} oscillations, Ca^{2+} sensitization, and contraction activated by protein kinase c in small airway smooth muscle. *Journal of General Physiology*, 2013.

NUNEZ, D.; CHIGNARD, M.; KORTH, R.; LE COUEDIC, J.P.; NOREL, X.; SPINNEWYN, B.; BRAQUET, P. & BENVENISTE, J. (1986). Specific inhibition of PAF-acether-induced platelet activation by BN 52021 and comparison with the PAF-acether inhibitors kadsurenone and CV 3988. *Eur J Pharmacol.* Apr 16;123(2):197-205.

PEREZ, J. F. & SANDERSON, M. J. The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *Journal of General Physiology*, 2005.

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*, v. 138.

QUINTAS, L. E. M. & NOËL, F. Mechanisms of adaptive supersensitivity in vas deferens. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2009

RABELO, G. V. Efeito do Ageratum conyzoides sobre órgãos de musculatura lisa. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais para aquisição do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Universidade Federal de São João Del Rei. 2019.

RIVERA, J.O.; HUGHES, H.W. & STUART, A.G. (2004). Herbals and asthma: usage patterns among a border population. *Ann Pharmacother* 38: 220–225.

ROTONDO, A.; SERIO, R. & MULÈ, F. (2009). Gastric relaxation induced by apigenin and quercetin: Analysis of the mechanism of action. *Life Sciences*, 85(1-2), 85–90.

SAKANASHI, Y.; OYAMA, K.; MATSUI, H.; OYAMA, T.B.; OYAMA, T.M.; NISHIMURA, Y.; SAKAI, H. & OYAMA, Y. (2008). Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca^{2+} : a model experiment. *Life Sci.* Aug 1;83(5-6):164-9.

SANTI, C. M.; DARSZON, A. & HERNANDEZ-CRUZ, A. (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5).

SAPONARA, R. & BOSISIO, E. (1998). Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of *Ginkgo biloba* in rat adipose tissue. *J Nat Prod.* 61:1386–7.

SHI, C.; ZHAO, L.; ZHU, B.; LI, Q.; YEW, D.T.; YAO, Z. & XU, J. (2009). Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact.* 181:115–123.

SHIBATA, S.; SATAKE, N.; MORIKAWA, M.; KOWN, S. C.; KARAKI, H.; KURAHASHI, K. & KODAMA, I. (1991). The inhibitory action of okadaic acid on mechanical responses in guinea-pig vas deferens. *European Journal of Pharmacology*, 193(1), 1–7.

Silva, A. V. & Cabral, F. R. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology.* 2008, v. 14, suppl 2, pp. 39-45.

SILVERTHORN, D. U. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.* Artmed, 2017.

SINGH, S. K.; SRIVASTAV, S.; CASTELLANI, R.J.; PLASCENCIA-VILLA, G. & PERRY, G. (2019). Neuroprotective and Antioxidant Effect of *Ginkgo biloba* Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics.* Jul;16(3):666-674.

SMITH, P.F.; MACLENNAN, K. & DARLINGTON, C.L. (1996). The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF) *J Ethnopharmacol.* 50:131–139.

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. Drug treatment options for premature ejaculation, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2018.

WALLACE, A.; GABRIEL, D.; MCHALE, N. G.; HOLLYWOOD, M.; ATHORNBURY, K. D. & GERARD, P. S. Regulation of nerve-evoked contractions of rabbit vas deferens by acetylcholine. *Physiol Rep.*3(9): e12520. 2015.

WANG, T.; KENDIG, D. M.; SMOLOCK, E. M. & MORELAND, R. S. Carbachol-induced rabbit bladder smooth muscle contraction: Roles of protein kinase C and Rho kinase. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 2009.

WESTFALL, D. P.; STITZEL, R. E. & ROWE, J. N. The postjunctional effects and neural release of purine compounds in the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 50: 27–32. 1978

WU, Y. N.; LIAO, C. H.; CHEN, K. C.; LIU, S.P. & CHIANG, H.S. Effect of *Ginkgo biloba* Extract (EGb-761) on Recovery of Erectile Dysfunction in Bilateral Cavernous Nerve Injury Rat Model | *UROLOGY* 85 (5), 2015

YOSHIOKA, M.; OHNISHI, N.; SONE, N.; EGAMI, S.; TAKARA, K.; YOKOYAMA, T. & KURODA, K. (2004). Studies on interactions between functional foods or dietary supplements and medicines. III. Effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on the pharmacokinetics of nifedipine in rats. *Biol Pharm Bull.* Dec;27(12):2042-5.

ZHANG, L.; LI, G.; TAO, S.; XIA, P.; CHAUDHRY, N.; KAURA, S.; STONE, S.S. & LIU, M. (2022). *Ginkgo Biloba* Extract Reduces Cardiac and Brain Inflammation in Rats Fed a HFD and Exposed to Chronic Mental Stress through NF- κ B Inhibition. *Mediators Inflamm.* May 29;2022:2408598.

ZHANG, L.; ZHANG, X.; LI, Q.; XIAO, W.; SU, E.; CAO, F. & ZHAO, L. (2021). Optimizing the Desorption Technology of Total Flavonoids of *Ginkgo Biloba* from Separating Materials of Activated Carbon. *ACS Omega.* Dec 10;6(50):35002-35013.

ZYGMUNTOWICZ, A.; MARKIEWICZ, W.; GRABOWSKI, T.; BURMAŃCZUK, A.; VYNIARSKA, A. & JAROSZEWSKI, J.J. (2021). Quercetin affects uterine smooth muscle contractile activity in gilts. *PLoS One.* Jul 16;16(7):0252438.

