



**Estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme de  
extratos de plantas medicinais e da água mineral natural de  
Chaves em patogénicos e microbiota vaginais**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Saúde, do Instituto Politécnico de Bragança, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo de Biotecnologia

Marlene Monteiro Semedo

**Orientadores**

Prof. Doutora Maria José Gonçalves Alves

Doutora Sandrina Alves Heleno

Doutora Lillian Bouçada de Barros

Bragança, Setembro de 2025

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, por ser a luz que guia meu caminho e a força que me impulsiona todas as vezes que preciso.

Aos meus pais, meus irmãos, meu filho a força que me move, meu companheiro e toda a minha família que com muito carinho, amor, apoio e energias positivas que depositaram em mim, contribuíram que eu chegasse até esta etapa da minha vida, porque a eles devo tudo que sou hoje.

À orientadora Professora Doutora Maria José Gonçalves Alves, coorientadora Doutora Sandrina Alves Heleno e Doutora Lillian Bouçada de Barros pela orientação desta etapa académica.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, Centro de Investigação da Montanha (CIMO) e ao AquaValor – Centro de Valorização e Transferência de Tecnologia da Água – Associação.

A toda equipa do CIMO, em especial às investigadoras Tânia e Izamara, por todo apoio e conhecimentos compartilhados.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

«Pedras no caminho?  
Guardo todas,  
um dia vou construir um castelo...»  
*Fernando Pessoa*

## Resumo

A microbiota vaginal possui um papel importante no equilíbrio e manutenção da saúde vaginal das mulheres, apresentando uma vasta quantidade e variedade de microrganismos. O trato genital feminino é constituído por um ecossistema equilibrado de microrganismos que promovem as defesas contra infeções, nomeadamente infeções causadas por agentes bacterianos, como é o caso da gonorreia, causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*. Um desequilíbrio neste ecossistema pode ainda dar origem a infeções fúngicas do trato genital feminino, como é o caso da candidíase vaginal, causada pela levedura *Candida albicans*.

*N. gonorrhoeae* é uma bactéria gram-negativo que tem a capacidade de infetar o trato genital feminino, causando a doença sexualmente transmissível gonorreia. Esta trata-se de um problema de saúde pública mundial essencialmente devido à sua resistência à maioria dos antibióticos normalmente usados no seu tratamento. Por outro lado, a candidíase vaginal é uma infeção fúngica da mucosa genital, que envolve principalmente a vulva e a vagina, causada pela proliferação excessiva de fungos do género *Candida* spp., sendo a espécie *C. albicans* a mais frequentemente relacionada com este tipo de infeção.

A utilização de produtos naturais como agentes antimicrobianos e antibiofilme torna-se uma alternativa terapêutica que possibilita tratamentos eficazes contra estas infeções, assumindo um papel promissor tendo em conta a crescente resistência destes microrganismos aos antimicrobianos disponíveis para o seu tratamento. Estes produtos possuem uma ampla variedade de compostos com diferentes atividades biológicas.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos sais minerais extraídos da água mineral natural de Chaves e dos extratos das plantas de *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Malva sylvestris* L. (malva) e de *Acacia saligna* L. (acácia), isoladamente ou em combinação, sobre microrganismos patogénicos do TGF e a microbiota vaginal. A avaliação das propriedades antimicrobianas dos sais minerais extraídos da água mineral natural de Chaves e dos extratos das plantas, isoladamente e em combinação, foi feita através do método de microdiluição em microplacas recorrendo ao corante INT, para determinação da concentração mínima inibitória, da concentração mínima bactericida e da concentração mínima fungicida. As capacidades de inibição e redução da formação de biofilmes de *N.*

*gonorrhoeae* e *C. albicans* por parte das diferentes amostras estudadas foram igualmente testadas e analisadas por citometria de fluxo.

Depois de analisados os resultados obtidos verificou-se que a solução com melhor atividade antimicrobiana e com maior capacidade para inibir e reduzir a formação de biofilmes dos microrganismos patogénicos do TGF, enquanto manteve alguma viabilidade das bactérias associadas à saúde vaginal, os *Lactobacillus* spp., foi a mistura de extrato hidroalcoólico de *A. saligna* com os sais minerais da água mineral natural de Chaves, a uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e numa proporção de 50:50.

Com este estudo pode assim concluir-se, tendo em conta as propriedades biológicas demonstradas pelos produtos naturais testados, estes poderão, no futuro, fazer parte da formulação de produtos de higiene íntima focados no controlo de microrganismos patogénicos do TGF, com a capacidade de manter alguma viabilidade da microbiota vaginal.

**Palavras-chave:** infeções do trato genital feminino, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, microbiota vaginal, água mineral natural, plantas medicinais, antimicrobianos, biofilmes.

## Abstract

The vaginal microbiota plays an important role in balancing and maintaining women's vaginal health, presenting a vast amount and variety of microorganisms. The female genital tract is made up of a balanced ecosystem of microorganisms that promote defenses against infections, particularly infections caused by bacterial agents, such as gonorrhoea, which is caused by the bacterium *Neisseria gonorrhoeae*. An imbalance in this ecosystem can also lead to fungal infections of the female genital tract, such as vaginal candidiasis, caused by the yeast *Candida albicans*.

*N. gonorrhoeae* is a gram-negative bacterium that can infect the female genital tract, causing the sexually transmitted disease gonorrhoea. This is a global public health problem mainly due to its resistance to most antibiotics commonly used to treat it. On the other hand, vaginal candidiasis is a fungal infection of the genital mucosa, mainly involving the vulva and vagina, caused by the excessive proliferation of fungi from the genus *Candida* spp., with *C. albicans* being the species most frequently related to this type of infection.

The use of natural products such as plant extracts and natural mineral water as antimicrobial and antibiofilm agents becomes a therapeutic alternative that enables effective treatments against these infections, assuming a promising role considering the increasing resistance of these microorganisms to the antimicrobials available for their treatment.

The present work aimed to study the antimicrobial and antibiofilm activities of the mineral salts extracted from the natural mineral water of Chaves and the plant extracts of *Salvia officinalis* L. (sage), *Malva sylvestris* L. (mallow) and *Acacia saligna* L. (acacia), alone or in combination, on pathogenic microorganisms of female genital tract and vaginal microbiota. The evaluation of the antimicrobial properties of mineral salts extracted from the natural mineral water of Chaves and plant extracts, alone and in combination, was done by the microdilution method in microplates using INT dye and resazurin, to determine the minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration, and the minimum inhibitory concentration of biofilm formation. The inhibition and reduction abilities of *N. gonorrhoeae* and *C. albicans* biofilm formation by the different samples studied were also tested and analysed by flow cytometry.

After analysing the obtained results, it was found that the solution with the best antimicrobial activity and with the greatest ability to inhibit and reduce the formation of biofilms of TGF's pathogenic microorganisms, while maintaining some viability of the bacteria associated with vaginal health, the *Lactobacillus* spp. was the mixture of hydroalcoholic extract of *A. saligna* with natural mineral water from Chaves, at a concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup> and in a 50:50 ratio.

With this study, it is possible to conclude that, knowing the biological properties demonstrated by the natural products tested, they could eventually be used in the formulation of intimate hygiene products aimed at the control of pathogenic microorganisms of TGF, while also preserving some viability of the vaginal microbiota.

**Keywords:** female genital tract infections, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, vaginal microbiota, natural mineral water, medicinal plants, antimicrobials, biofilms.

## Índice

Resumo .....	3
Abstract .....	5
Lista de Abreviaturas .....	8
Lista de Figuras .....	9
Lista de Tabelas .....	10
1. Introdução .....	11
2. Estado da Arte .....	13
2.1 Gonorreia .....	13
2.2 Candidíase vaginal .....	14
2.3 Microbiota vaginal e a importância de <i>Lactobacillus</i> spp. na prevenção de patologias vaginais .....	16
2.3.1. <i>Lactobacillus casei</i> .....	17
2.3.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	17
2.4 Agentes patogênicos do TGF .....	17
2.4.1. <i>Candida albicans</i> .....	17
2.4.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	18
2.5 Produção de biofilmes por agentes patogênicos do TGF .....	18
2.6 Produtos naturais como alternativa terapêutica .....	20
2.6.1. <i>Salvia officinalis</i> L. (sálvia) .....	21
2.6.2. <i>Malva sylvestris</i> L. (malva) .....	22
2.6.3. <i>Acacia saligna</i> (Labill.) H. L. Wendl. (acácia) .....	22
2.6.4. Água mineral natural .....	23
3. Objetivos .....	28
3.1 Objetivo geral .....	28
3.1.1. Objetivos específicos .....	28
4. Metodologia .....	29
4.1 Tipo de estudo .....	29
4.2 Local de estudo .....	29
4.3 Métodos .....	29
4.3.1. Extratos de plantas medicinais e AMN .....	29
4.3.2. Microrganismos e condições de crescimento .....	30
5. Resultados .....	34
6. Discussão .....	38
7. Conclusão e perspectivas futuras .....	43
8. Referências Bibliográficas .....	44

## **Lista de Abreviaturas**

**AMN** - água mineral natural

**CIMO** - Centro de Investigação da Montanha

**CMB** - concentração mínima bactericida

**CMF** - concentração mínima fungicida

**CMI** - concentração mínima inibitória

**CV** - candidíase vaginal

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DO<sub>620nm</sub>** - densidade ótica a 620 nm

**INT** - 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio

**MRS** - De Man, Rogosa e Sharpe (MRS)

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PI** - iodeto de propídio (*propidium iodide*)

**TGF** - trato genital feminino

**TO** - laranja de tiazole (*thiazole orange*)

**TSB** - Tryptic Soy Broth (TSB)

**UFC** - unidades formadoras de colónias

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema ilustrativo do processo de formação de um biofilme microbiano. (1) adesão das células microbianas a uma superfície; (2) colonização, com o crescimento das células aderidas; (3) maturação, na qual o biofilme adquire uma estrutura tridimensional complexa; (4) e dispersão celular, com o destacamento de células que irão colonizar novos locais da superfície. Adaptado de (85). .....	19
<b>Figura 2</b> - <i>Salvia officinalis</i> .....	21
<b>Figura 3</b> - <i>Malva sylvestris</i> .....	22
<b>Figura 4</b> - <i>Acacia saligna</i> .....	23
<b>Figura 5</b> - Distribuição geográfica e classificação físico-química das AMN em Portugal continental .....	25
<b>Figura 6</b> - Distribuição e classificação de acordo com a temperatura de emergência das AMN em Portugal continental. ....	26

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da AMN das Termas de Chaves.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, sobre microrganismos patogénicos do TGF e a microbiota vaginal, pelo método de microdiluição e INT.

**Tabela 3.** Atividade antibiofilme (inibição) de *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, sobre microrganismos patogénicos do TGF e a microbiota vaginal, pelo método de citometria de fluxo.

**Tabela 4.** Atividade antibiofilme (redução) de *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, sobre microrganismos patogénicos do TGF e a microbiota vaginal, pelo método de citometria de fluxo.

## 1. Introdução

Atualmente, o estudo científico da microbiota dos tecidos e órgãos fornece informações relevantes acerca da saúde humana. A maioria das pesquisas efetuadas tem-se vindo a concentrar em métodos de manutenção de uma microbiota saudável. No entanto, nos dias de hoje, a tendência tem sido procurar entender as causas e as origens do desequilíbrio da microbiota, de modo a reduzir as patologias associadas às suas disfunções, e a assegurar a qualidade de vida e a saúde das pessoas afetadas (1). No trato genital feminino (TGF) é possível encontrar uma microbiota específica que, entre outras coisas, é responsável pela proteção daquele contra microrganismos patogénicos. Contudo, alterações na proporção relativa ou no tipo das espécies microbianas presentes nesta microbiota podem levar ao desenvolvimento de doenças do TGF (2). A microbiota vaginal possui uma formação variável e dinâmica de leveduras, bactérias aeróbias, e bactérias anaeróbias facultativas, com predominância de lactobacilos, cujo papel é fundamental na manutenção e preservação da saúde do TGF (3). A ocorrência de desequilíbrios da microbiota do TGF proporciona o crescimento de microrganismos patogénicos oportunistas, levando a manifestações clínicas como a candidíase vaginal (CV) e outras infeções do TGF, como a gonorreia, que afetam principalmente mulheres em idade reprodutiva e sexualmente ativas (4, 5). O desequilíbrio da microbiota do TGF pode ocorrer por uma multiplicidade de fatores como, a fase do ciclo menstrual, gravidez, infeções, comportamentos sexuais, uso de antibióticos, higiene, terapia hormonal, mudanças no pH e até hábitos alimentares (6-8). A CV é a segunda causa mais frequente de vulvovaginite, sendo ainda mais prevalente durante a gravidez (9), e é uma infeção causada pela proliferação excessiva de leveduras do género *Candida* (10). A espécie de *Candida* mais comumente associada à candidíase vaginal é a *Candida albicans*, que normalmente coloniza o TGF de forma assintomática. No entanto, podem surgir sintomas devido a uma exuberante inflamação da mucosa vaginal causada essencialmente pelo crescimento excessivo de *C. albicans*, com subsequente invasão epitelial e produção de fatores de virulência (11). Já a gonorreia é uma infeção causada pela espécie bacteriana *Neisseria gonorrhoeae*, transmissível sexualmente, podendo ocorrer sob a forma assintomática ou sintomática (12). A infeção do TGF por *N. gonorrhoeae* pode levar ao aparecimento de cervicite, ou, com menos frequência, doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica, ou cegueira neonatal resultante da transmissão durante o parto (13). Tanto a *C. albicans* como a *N.*

*gonorrhoeae* são microrganismos preocupantes no que diz respeito aos antimicrobianos mais comumente usados no tratamento de infecções por si causadas devido especialmente ao aumento da sua resistência aos mesmos (14, 15).

O uso de produtos naturais com fins terapêuticos é considerado uma forma terapêutica alternativa viável e importante no combate à resistência microbiana aos tratamentos convencionais. Desde a antiguidade que o homem utiliza plantas medicinais e os seus extratos nas mais diversas indústrias, nomeadamente nas indústrias alimentar, cosmética, e farmacêutica (16). As plantas medicinais têm sido alvo de grande interesse e estudo no ramo da investigação para desenvolvimento de novos fármacos, tendo em conta as atividades biológicas que apresentam (17). Os metabolitos secundários provenientes destas plantas apresentam estruturas químicas complexas importantes, com interações específicas e reconhecimento de alvos moleculares nos microrganismos patogénicos (18).

Para além das plantas medicinais, as águas minerais naturais (AMN) surgem como um produto natural com propriedades terapêuticas interessantes, com aplicação no tratamento de doenças respiratórias, músculo-esqueléticas, metabólicas, entre outras (19). São águas de circulação subterrânea, bacteriologicamente próprias, e com características físico-químicas estáveis na sua origem, isto é, apresentam características que as diferenciam das outras águas subterrâneas, nomeadamente os níveis de estabilidade dos parâmetros físico-químicos que as caracterizam (20). O uso das AMN no tratamento de diferentes patologias tem sido reportado desde tempos antigos, tendo surgido as primeiras termas na Grécia sob o domínio Romano (21). As suas propriedades terapêuticas encontram-se amplamente descritas na literatura (22-25), nomeadamente as suas características antimicrobianas (26), o que se pode revelar útil no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes às terapias antimicrobianas convencionais.

Desta forma, os produtos naturais tornam-se uma alternativa terapêutica natural aos antimicrobianos tradicionais. Com o aumento acentuado da resistência microbiana aos fármacos antimicrobianos usados na clínica, surge a necessidade de investigar e desenvolver alternativas eficazes à terapia existente. Assim, este trabalho teve como principal objetivo estudar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos sais minerais extraídos da AMN de Chaves e de extratos de plantas medicinais, isoladamente ou em combinação, em microrganismos patogénicos do TGF e microbiota vaginal.

## 2. Estado da Arte

O TGF desempenha várias funções relacionadas com a reprodução, mas devido à sua exposição direta ao ambiente externo, podem desenvolver-se infeções microbianas (27). Tanto a parte superior (útero e cérvix) como a inferior (vagina) do TGF estão cobertas por um epitélio, contendo células do sistema imunitário (macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B) que proporcionam uma proteção robusta ao hospedeiro, e diferem entre si em termos das espécies de *Lactobacillus* spp. que são dominantes (28). Uma alteração do equilíbrio fisiológico entre a microbiota vaginal e as células do sistema imunitário conduz a um estado de disbiose que, por sua vez, pode explicar o aparecimento de infeções, como a gonorreia e a candidíase vaginal, que podem levar a complicações graves na reprodução e na gravidez (29).

### 2.1 Gonorreia

A gonorreia trata-se de uma infeção sexualmente transmissível que se tem propagado desde a antiguidade, vindo a tornar-se, nos dias de hoje, num problema de saúde pública. Estirpes da espécie bacteriana *N. gonorrhoeae*, também conhecida como gonococo, têm vindo a adquirir resistência aos antibióticos normalmente usados no tratamento da gonorreia desde os finais dos anos 1930 (15), e já em 2018, foi relatado o primeiro caso de falha no seu tratamento com antibióticos de primeira linha no Reino Unido (30). A par da ameaça relacionada com o aparecimento de estirpes resistentes aos antibióticos, está o aumento contínuo do número de casos a nível global (12, 31, 32) e a inexistência de uma vacina eficaz contra a infeção gonocócica (33).

*N. gonorrhoea* é um patógeno humano obrigatório que infeta predominantemente o epitélio da mucosa do trato urogenital humano, sendo também capaz de infetar outros locais como o reto, a faringe e a conjuntiva (34). Trata-se de uma bactéria Gram-negativo que normalmente se apresenta sob a forma de diplococos. A infeção gonocócica pode surgir tanto em mulheres como homens, sintomática ou assintomaticamente, com taxas mais elevadas de infeção assintomática relatadas nas mulheres (12). Devido à proporção significativa de infeções assintomáticas causadas por *N. gonorrhoeae*, muitas das pessoas acometidas pela doença estão inconscientes da mesma, aumentando assim a probabilidade de transmissão e disseminação. A infeção sintomática apresenta-se geralmente sob a forma de uretrite nos homens e ectocervicite

ou endocervicite nas mulheres. Embora a infecção disseminada para outros locais anatómicos seja rara, uma infecção localizada extensa pode causar complicações graves, incluindo doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica, ou cegueira neonatal resultante da transmissão durante o parto (35).

*N. gonorrhoeae* apresenta um diversificado conjunto de moléculas na superfície bacteriana que lhe permite entrar e invadir diferentes tipos de tecido (34). Adicionalmente, esta bactéria possui a capacidade de submeter os seus antígenos de superfície ao processo de variação de fase e de variação antigénica, conseguindo assim fugir ao sistema imunitário e à formação de memória imunitária (36).

Tendo em conta a incapacidade dos antibióticos de primeira linha em tratar as infeções causadas por *N. gonorrhoeae*, o tratamento normalmente indicado é uma combinação de cefixima (cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração) com azitromicina (macrólido) (37). Contudo, considerando que a toma destes antibióticos pode levar ao aparecimento de vários efeitos secundários, como náuseas, diarreia e vómitos, e o rápido aparecimento de estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes à cefixima e à azitromicina (38), o desenvolvimento de alternativas ao tratamento da gonorreia, que sejam simultaneamente mais eficazes e sustentáveis, tem vindo a tornar-se uma urgência.

## 2.2 Candidíase vaginal

A candidíase é uma infeção oportunista causada por leveduras do género *Candida* spp.. A *C. albicans* é uma espécie de levedura comensal que coloniza em diferentes localizações do corpo humano, nomeadamente o TGF, o trato gastrointestinal, a pele, a mucosa oral, entre outras (39). Uma elevada percentagem de mulheres, cerca de 20%, em idade fértil e sexualmente ativas apresenta *C. albicans* na região do TGF em algum momento da sua vida. Normalmente, não manifestam sintomas ou sinais de infeção, encontrando-se a levedura em baixas quantidades (40). No entanto, *C. albicans* é igualmente considerada uma espécie fúngica oportunista, pois pode levar ao aparecimento de patologia quando ocorrem situações como o desequilíbrio imunológico do hospedeiro ou disbiose causada pela toma de antibióticos (41). Uma das patologias frequentemente causadas por *C. albicans* é a CV. Esta é uma infeção que se caracteriza por um processo inflamatório da mucosa genital, que envolve essencialmente a vulva e a vagina, causada pela proliferação excessiva de *C. albicans* (10). Uma das características de *C. albicans* que lhe permite transitar entre o estado comensal e

patogénico é o seu dimorfismo, isto é, este fungo tem a capacidade de colonizar tecidos sob a forma leveduriforme, quando comensal, ou de um micélio composto por hifas, quando assume a forma patogénica (42). Apesar de *C. albicans* ser a espécie de *Candida* spp. mais reconhecida como a principal responsável pela CV, representando cerca de 85% dos casos, esta patologia pode ser causada por outras espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis*, embora com menos relevância (10, 43).

Os principais fatores relacionados com a ocorrência de CV são a gravidez, idade superior a 45 anos, diabetes tipo 1 não controlada, uso de antibioterapia, e histórico de ocorrência de CV (44). Outros fatores importantes relacionados com a ocorrência desta patologia são, por exemplo, o uso de vestuário justo, contraceptivos orais com doses elevadas de estrogénio, dispositivos intrauterinos, uso de fármacos imunossupressores, obesidade, doenças da tiroide, e ainda predisposição genética (40).

Relativamente à epidemiologia da CV, estima-se que cerca de 75% das mulheres apresentem pelo menos um episódio de CV ao longo da sua vida, e aproximadamente 40-45% entre dois ou mais episódios. Durante a gravidez, cerca de 40% das mulheres são acometidas por esta patologia (45).

A CV apresenta como principais sintomas prurido na região vaginal, ardência na vulva, inchaço dos lábios vaginais, corrimento espesso esbranquiçado, podendo ocorrer também dor durante as relações sexuais e ao urinar, lesões na região da vagina, e ressecamento da pele da vulva (46).

O tratamento de CV passa normalmente pela toma de antifúngicos azólicos (45, 46). Contudo, a resistência de *C. albicans*, bem como de outras espécies de *Candida* spp. causadoras de CV, aos antifúngicos disponíveis no mercado é cada vez mais expressiva (47). Por isso, é necessário encontrar alternativas terapêuticas que permitam combater estes mecanismos de resistência.

### 2.3 Microbiota vaginal e a importância de *Lactobacillus* spp. na prevenção de patologias vaginais

A vagina, parte integrante do TGF, encontra-se colonizada predominantemente por *Lactobacillus* spp., estando estes associados a uma microbiota vaginal saudável. A colonização com estas bactérias é considerada um importante mecanismo de proteção da mucosa vaginal pelo impedimento da multiplicação de microrganismos patogênicos (48). Contudo, a composição da microbiota vaginal não é constante, podendo esta sofrer alterações em resposta a fatores exógenos e endógenos como a idade, produção hormonal, ciclo menstrual, uso de antibióticos, atividade sexual, e aspetos ambientais (49). Um desequilíbrio da microbiota vaginal, nomeadamente uma redução da população de *Lactobacillus* spp., e a colonização por microrganismos patogênicos e/ou oportunistas podem levar ao aparecimento de infeções no TGF (50).

O género *Lactobacillus* é composto por mais de 170 espécies de bactérias Gram-positiva, anaeróbia facultativa, catalase-negativa, com forma de bastonete (51). *Lactobacillus acidophilus* convertem o glicogenio em ácido láctico, que é responsável pela manutenção do pH vaginal saudável que varia entre 3.8 e 5. Concomitantemente, espécies deste género produzem substâncias antimicrobianas como bacteriocinas e peróxido de hidrogénio, que, em conjunto com o pH baixo, previnem a colonização e proliferação de microrganismos patogênicos como a *N. gonorrhoeae*, *C. albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium* spp. e *Prevotella* spp. (52).

As espécies de *Lactobacillus* mais comumente isoladas de microbiotas vaginais saudáveis são *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, e *L. jensenii* (53). A capacidade destas espécies aderirem às células epiteliais e colonizar a vagina é atribuível a fatores hormonais, pH vaginal e teor de glicogénio (54). Além das espécies mencionadas, podem ainda ser encontradas, com menos frequência, *L. casei* e *L. plantarum* no TGF (40, 55). Vários estudos indicam que o uso destas bactérias como probióticos ajudam na manutenção de uma microbiota vaginal saudável e que podem até ser usados no tratamento de infeções associadas ao TGF (56-58).

### **2.3.1. *Lactobacillus casei***

*L. casei* é uma das espécies bacterianas mais estudadas devido ao seu potencial nas indústrias alimentar e farmacêutica (59, 60). São amplamente usados como probióticos, tendo sido demonstrado que alteram a microbiota do trato gastrointestinal e que influenciam a resposta imunitária do hospedeiro (61, 62). Para além disso, verificou-se que o seu consumo regular apresenta efeitos anti-hipertensivo, antioxidantes, melhorando igualmente o perfil lipídico (63). Esta bactéria tem vindo a ser investigada quanto à sua aplicação como probiótico no tratamento de infeções do TGF (64).

### **2.3.2. *Lactobacillus plantarum***

*L. plantarum* é uma das espécies de *Lactobacillus* comumente usada como probiótico, cuja distribuição é bastante variada, podendo ser encontrada em nichos ecológicos díspares que vão desde o TGF até laticínios, vegetais, peixes e carnes (65, 66). Esta diversidade de nichos ecológicos advém da capacidade de *L. plantarum* em se adaptar, consequência da sua tolerância a pH mais baixo, do uso de diversas vias metabólicas, e da produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogénio que inibem o crescimento de bactérias competidoras (65). *L. plantarum* é frequentemente usado na indústria farmacêutica como probiótico, tendo em conta os provados benefícios que trazem à saúde do hospedeiro, nomeadamente para o TGF (66, 67) .

## **2.4 Agentes patogénicos do TGF**

### **2.4.1. *Candida albicans***

*C. albicans* é uma espécie de levedura pertencente ao género *Candida*, cujos integrantes têm a capacidade de crescer polimorficamente em forma de levedura, hifa e pseudohifa, tendo aptidão para crescer aeróbica e anaerobicamente (68). São comuns constituintes da microbiota humana, podendo ser encontradas nas mucosas do trato gastrointestinal e geniturinário, e ocasionalmente na pele (69, 70). A *C. albicans* pode ser considerada um microrganismo comensal ou patogénico oportunista, ou seja, uma colonização assintomática por parte de *C. albicans* pode, dependendo das condições de saúde do hospedeiro, tornar-se numa infeção localizada, como é a CV, ou sistémica (71, 72). A virulência deste fungo depende de um conjunto de fatores de patogenicidade

como a sua versatilidade de adaptação, como a transição entre a forma de levedura, hifa e pseudohifa, e sua capacidade de adesão, expressando adesinas e formando biofilmes em superfícies abióticas, como dispositivos médicos, ou bióticas, como tecidos mucosos (73).

#### **2.4.2. *Neisseria gonorrhoeae***

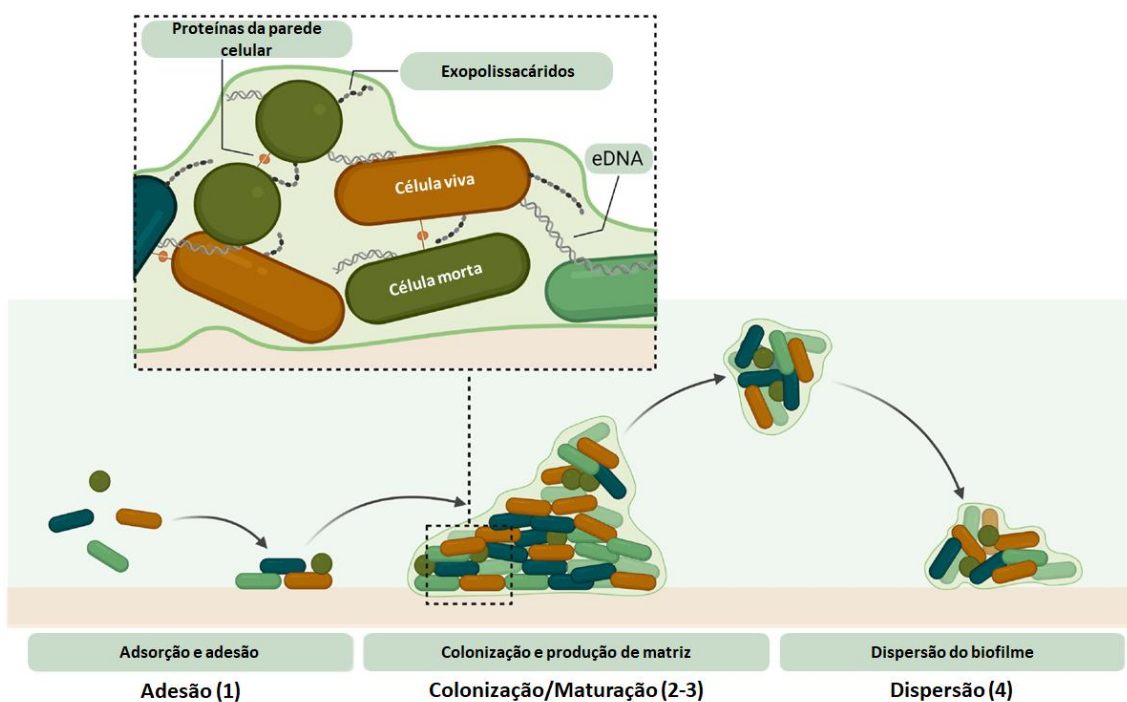
O género *Neisseria* apresenta duas espécies patogénicas principais, a *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*. São bactérias gram-negativas, aeróbicas, não flageladas, produtoras das enzimas catalase e oxidase, tendo a capacidade de produzir ácido a partir da utilização de glucose, o que permite a sua diferenciação das demais espécies (74, 75). *N. gonorrhoeae*, comumente designada por gonococo, é uma bactéria patogénica humana obrigatória, que coloniza no trato urogenital e respiratório, sendo o agente etiológico da gonorreia uma doença sexualmente transmitida (76). As infeções causadas pela *N. gonorrhoeae* têm vindo a tornar-se um problema de saúde pública, não só pela sua elevada incidência, mas pelo desenvolvimento de resistência aos antibióticos usados no seu tratamento (76, 77). Esta bactéria é aquela que mais comumente infeta o TGF, podendo ainda infetar outras superfícies mucosas como a faringe e o reto (78). Nas mulheres, se não tratada, a infeção por *N. gonorrhoeae* pode progredir para estados mais graves como a doença inflamatória pélvica e a infertilidade (79).

O envelope celular de *N. gonorrhoeae* é formado por três camadas diferentes: uma membrana citoplasmática interna, uma parede celular constituída por peptidoglicano, e uma membrana celular externa composta por lipooligosacárido, fosfolípidos e diversas proteínas (80). Alguns destes componentes são considerados fatores de virulência, devido à sua relação com a adesão, a invasão celular e a citotoxicidade de *N. gonorrhoeae*, tanto a nível sistémico como nas mucosas (81).

### **2.5 Produção de biofilmes por agentes patogénicos do TGF**

O biofilme microbiano é uma comunidade estruturada de microrganismos, como bactérias e fungos, que tem a capacidade de aderir a superfícies inertes ou tecidos biológicos. O biofilme encontra-se delimitado por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzida pelos próprios microrganismos, e é composta essencialmente por polissacáridos, mas contendo também ácidos nucleicos e aminoácidos, glicoproteínas e fosfoproteínas, açúcares, fosfolípidos, e compostos

fenólicos (82). Esta comunidade é frequentemente caracterizada por uma arquitetura interna complexa que contém canais que permitem a circulação de nutrientes (83). Áreas distintas dentro do biofilme podem conter células geneticamente idênticas que exibem diferentes padrões de expressão genética, o que resulta numa maior tolerância a condições adversas e persistência em ambientes hostis (84). O biofilme oferece assim proteção contra a desinfecção química, ao tratamento com antimicrobianos, e à resposta do sistema imunitário humano (85, 86). Em geral, a formação do biofilme microbiano é caracterizada por quatro fases: (1) adesão das células microbianas a uma superfície mediada por proteínas da parede celular; (2) colonização, com o crescimento das células aderidas numa microcolônia; (3) maturação, na qual o biofilme adquire uma estrutura tridimensional complexa; (4) e dispersão celular, que ocorre com o destacamento de células do biofilme para que estas colonizem novos locais da superfície (87).



**Figura 1** - Esquema ilustrativo do processo de formação de um biofilme microbiano: (1) - adesão das células microbianas a uma superfície; (2) – colonização; (3) - maturação do biofilme; (4) - dispersão celular. Adaptado de (88).

Bactérias e fungos com capacidade de formar biofilmes são cada vez mais reconhecidos como, desempenhando um papel importante em diversas doenças infecciosas, particularmente devido à sua persistência e recorrência. Tem-se vindo a constatar que estas estruturas microbianas colonizam uma grande variedade de

dispositivos médicos, colocando os doentes em risco de infecções relacionadas com os mesmos (89). Mais recentemente, os biofilmes têm sido implicados em infecções do TGF. *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, agentes patogénicos-chave na gonorreia e CV, respetivamente, e ambas capazes de formar biofilmes, apresentam atributos de virulência importantes e mecanismos de resistência relacionados com a capacidade de estabelecer estas estruturas (90, 91).

A capacidade de *Lactobacillus* spp. interagir e inibir o crescimento de biofilmes de *N. gonorrhoeae* e de *C. albicans* tem sido estudada. No caso do agente etiológico da gonorreia, verificou-se que *L. jensenii* conseguiu inibir a adesão de *N. gonorrhoeae* a células epiteliais, levando à impossibilidade de formação de biofilmes por parte desta bactéria (92, 93). Noutro estudo, *L. crispatus* foi capaz de neutralizar a viabilidade de *N. gonorrhoeae* através de diferentes mecanismos (93). Relativamente a *C. albicans*, demonstrou-se que diferentes espécies de *Lactobacillus* spp. tiveram a capacidade de reduzir a formação de biofilmes por parte desta levedura (94). Observou-se ainda noutro estudo que *L. casei* reduziu os componentes da matriz do biofilme de *C. albicans* (95). Estes estudos indicam assim o poder que algumas espécies de *Lactobacillus* têm na inibição da formação de biofilmes de *N. gonorrhoeae* e de *C. albicans*, podendo eventualmente ser usados na prevenção e tratamento da gonorreia e da CV.

## **2.6 Produtos naturais como alternativa terapêutica**

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana. Assim, a fitoterapia é encarada como uma alternativa mais económica, eficiente e menos agressiva no tratamento de diversas patologias, quando comparada com os tratamentos convencionais (96). A utilização de plantas medicinais e dos seus extratos como agentes antimicrobianos no combate de infecções tem assumido um papel promissor, principalmente numa altura em que as resistências a antimicrobianos se tornam cada vez mais preocupantes (97). Estas plantas possuem uma ampla diversidade de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, que lhes conferem várias atividades biológicas, nomeadamente as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, e entre outras (98-100). O uso de extratos de plantas medicinais ou dos seus compostos bioativos isoladamente tem-se revelado uma potencial ferramenta no combate de microrganismos patogénicos, com especial

importância para infecções causadas por bactérias e fungos resistentes aos antimicrobianos disponíveis (101, 102).

### 2.6.1. *Salvia officinalis* L. (sálvia)

A *S. officinalis* L., popularmente conhecida por sálvia, salva-das-boticas e salva-dos-jardins, é uma planta da família Lamiaceae, nativa do Médio Oriente e das áreas do Mediterrâneo, e que atualmente se encontra distribuída por todo o mundo (103). As partes aéreas de *S. officinalis* L. são usadas em preparações culinárias e na medicina tradicional, sendo conhecida pelos seus efeitos antiespasmódico, antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante (104-106).

Os principais compostos bioativos presentes nas folhas, flores e caule da *S. officinalis* L. são os compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides, ácidos gordos, esteróides, flavonóides, taninos e derivados glicosídicos (107). Tendo em conta a presença destes compostos, os extratos de sálvia têm sido objeto de estudo com o intuito de investigar os seus potenciais efeitos terapêuticos nomeadamente as propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antimutagénicos, entre outras (107). Os efeitos antimicrobianos de extratos desta planta têm sido amplamente descritos, nomeadamente contra bactérias e fungos como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus fumigatus*, e *C. albicans* (108-110). Encontram-se disponíveis para venda várias soluções à base de sálvia, nomeadamente suplementos alimentares, com o intuito de reduzir o desconforto vaginal.



**Figura 2** - *Salvia officinalis* (Fonte: <https://encurtador.com.br/tyY36>)

### 2.6.2. *Malva sylvestris* L. (malva)

A *Malva sylvestris* L., geralmente conhecida por malva, pertence a família Malvaceae, sendo nativa da Europa, Norte de África e Ásia (111). O seu uso tradicional tem vindo a ser documentado há vários anos. As raízes, folhas, flores, frutos e sementes desta planta podem ser usadas na preparação de infusões, decocções, cataplasmas, loções, banhos e gargarejos (112-114). As atividades biológicas da malva estão relacionadas com a sua composição química da qual fazem parte os polifenóis, flavonóides, terpenóides, taninos, vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno, tocoferóis, malvona A, entre outros (111, 115, 116). Os compostos químicos presentes na malva têm sido usados no tratamento de diversas patologias tendo em conta as suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante e antifúngica. No que diz respeito à sua capacidade antimicrobiana, existem vários estudos que a comprovam contra microrganismos como *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli* (117, 118).

Neste momento, existem no mercado vários produtos de higiene íntima à base desta planta, nomeadamente o Barral® Higiene Íntima Conforto, enriquecido com extrato de malva, e que atua como um coadjuvante de tratamentos infecciosos da zona vulvovaginal.

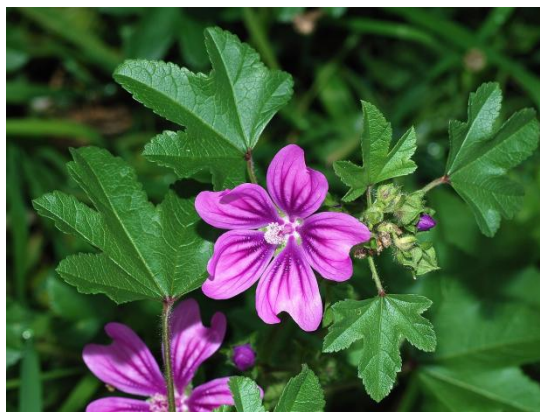


Figura 3 - *Malva sylvestris* (Fonte: <https://encurtador.com.br/boZER>)

### 2.6.3. *Acacia saligna* (Labill.) H. L. Wendl. (acácia)

*A. saligna* (Labill.) H. L. Wendl., popularmente designada por acácia, é uma planta da família Fabaceae, nativa da Austrália Ocidental, tendo-se posteriormente tornado numa espécie invasora (119). Na sua composição química os compostos maioritários identificados nas várias partes da planta são os compostos fenólicos, taninos,

flavonóides, fenóis e proantocianinas (120, 121). Derivado da sua composição química, a acácia possui propriedades antiulcerativa (122), antifúngica, antibacteriana e antioxidante (121). Um estudo realizado por Jalab et al (2021) revelou que os extratos de sálvia apresentaram uma excelente atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureu* e *E. coli* (123).

Existem atualmente alguns suplementos alimentares à base de acácia que funcionam como prebióticos e facilitam a digestão.



**Figura 4** - *Acacia saligna* (Fonte: <https://encurtador.com.br/IJRZ6>)

#### **2.6.4. Água mineral natural**

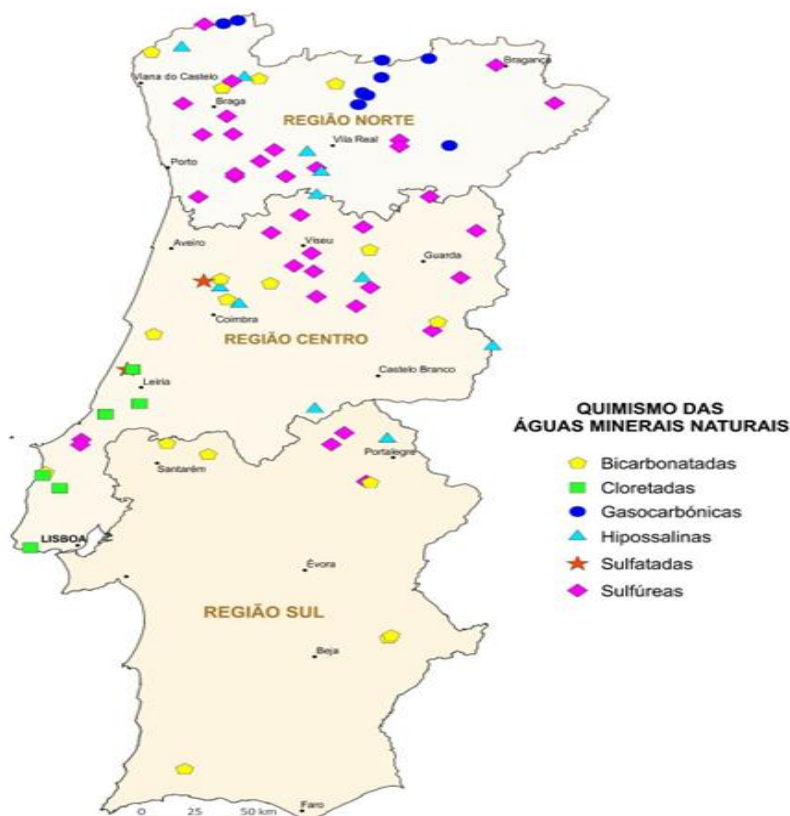
Segundo a legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 90/90 de 16 de março de 1990) “Recursos Hidrominerais” consistem em águas com interesse económico devido às suas características físico-químicas, nas quais estão incluídas as AMN. De acordo com o mesmo documento, a AMN é uma água “bacteriologicamente própria, de circulação profunda, com particularidades físico-químicas estáveis na origem, dentro da gama de flutuações naturais, de que resultam propriedades terapêuticas ou simplesmente efeitos favoráveis à saúde” (124). Estas águas distinguem-se das ditas “normais” por apresentarem uma mineralização total ou determinadas características específicas, como pH, sílica, sulfuração, dióxido de carbono, diferentes dos valores correntes ou temperaturas mais altas que a temperatura média do ar (125). A importância e uso da AMN para fins terapêuticos, como é o caso do termalismo, remete para os tempos antigos (126), sendo que as primeiras termas surgiram na Grécia sob o domínio do Império Romano (127). A qualidade e temperatura da água estão intimamente relacionadas com a morfologia do solo do qual emergem. Devido à sua diversidade

geológica, Portugal é um dos países mais ricos em águas minerais naturais, estando grande parte destas localizada na zona norte do país, e sendo a sua distribuição relacionada com grandes acidentes tectónicos, como a falha Penacova-Régua-Verin (128, 129). As Termas de Chaves, localizadas no território do Alto Tâmega, ocupam o segundo lugar do ranking nacional das termas mais frequentadas, sendo o primeiro lugar ocupado pelas Termas de São Pedro do Sul. As Termas de Chaves contam com uma tradição milenar e a sua fundação data da época em que os romanos fundaram a cidade de Aquae Flaviae, Chaves na atualidade, tendo em conta a existência de água quente que brotava naturalmente (130).

No que diz respeito à caracterização das AMN, as características geológicas, físicas, químicas e terapêuticas são algumas das propriedades nas quais se baseiam as várias classificações existentes (131-133). Em 1993, Simões (132) propôs uma classificação baseada na composição química, agrupando as AMN em seis classes (Figura 5):

- Águas hipossalinas: águas cuja mineralização total é inferior a  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ . Podem distinguir-se as que têm mineralização total até  $\approx 50 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} < 6$ , dureza  $< 1$  e percentagem de sílica  $> 30\%$ , daquelas cuja mineralização total é  $> 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} > 6$ , dureza  $> 1$  e cuja percentagem de sílica é muito mais baixa;
- Águas sulfúreas: contêm formas reduzidas de enxofre. Neste grupo podem diferenciar-se as sulfúreas primitivas, as que não apresentam valores característicos das sulfúreas primitivas, e as sulfúreas de transição. As sulfúreas primitivas têm como iões dominantes o ião bicarbonato e o ião sódio, altas percentagens de sílica e flúor, são fracamente mineralizadas e têm dureza muito baixa;
- Águas gasocarbónicas: caracterizam-se por terem mais de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  livre. São hipersalinas, sendo o anião dominante o bicarbonato e o catião dominante o sódio. O ião cálcio é raro nestas águas, têm baixa percentagem de sílica ( $< 4\%$ ) e baixa percentagem de flúor ( $< 1,5 \%$ ). Podem ainda distinguir-se as hipotermas com  $\text{pH} = 6$  (sódicas ou cálcicas) das hipertermas com  $\text{pH} = 7$  (sódicas);
- Águas bicarbonatadas: o ião dominante é o bicarbonato. São hipotermas, com  $\text{pH} = 7$ , dureza total com valores elevados e percentagens de sílica e flúor muito baixas. Podem distinguir-se as cálcicas, fracamente mineralizadas, das mistas (sódico-cálcicas), mesossalinas;
- Águas cloretadas: o ião dominante é o cloreto e o catião dominante o sódio, com percentagens de sílica e flúor muito baixas. Há a distinguir as hipersalinas com  $\text{pH} = 7$  das fracamente mineralizadas de  $\text{pH} > 7$ ;

- Águas sulfatadas: o ião dominante é o sulfato. São hipersalinas, hipotermiais, o catião dominante é o cálcio, têm percentagens de sílica e flúor muito baixas e muita dureza.



**Figura 5** - Distribuição geográfica e classificação físico-química das AMN em Portugal continental: adaptado de (134)

As águas minerais naturais podem ainda ser classificadas consoante a sua temperatura de emergência, seguindo a classificação feita em 1961 por Herculano Carvalho (133), dentro da qual se distinguem quatro grupos:

- Águas hipotermiais ou frias, com temperatura de emergência inferior a 20 °C;
- Águas mesotermiais, com temperatura de emergência entre 20 °C e 30 °C;
- Águas termais, com temperatura de emergência entre 30 °C e 45 °C;
- Águas hipertermiais, com temperatura de emergência superior a 45 °C.

Normalmente atribui-se a designação “termal” a toda a água cuja temperatura de emergência exceda os 20 °C. Em Portugal continental, de acordo com esta classificação, a maioria das águas minerais naturais são hipotermiais. A AMN das Termas de Chaves é, neste âmbito, uma água hipertermal (Figura 6).

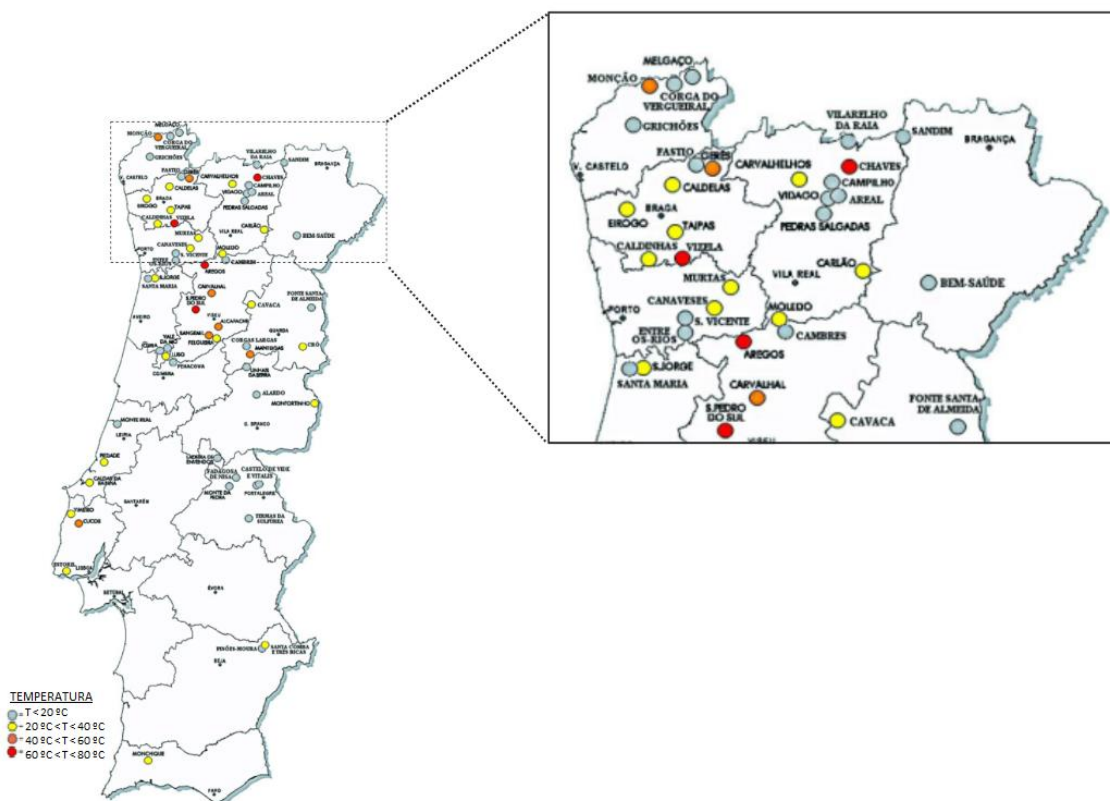


Figura 6 - Distribuição e classificação de acordo com a temperatura de emergência das AMN em Portugal continental: adaptado de (128).

O uso das AMN com finalidade terapêutica tem sido empírico e, durante muito tempo, o seu valor medicinal foi questionado (135). Na atualidade, estas águas estão indicadas para prevenção e tratamento de doenças do sistema gastrointestinal (136), doenças e condições dermatológicas (137-139), reumáticas e músculo-esqueléticas (140, 141), cardiovasculares (142), urológicas e nefrológicas (143), entre outras. No Manual de Boas Práticas dos Estabelecimentos Termais, de 2009, pode ainda encontrar-se uma divisão segundo a indicação terapêutica da AMN em doenças metabólico-endócrinas (diabetes, hiperuricemia), doenças do sistema respiratório (rinite, sinusite, laringite, doença pulmonar obstrutiva crónica) e doenças ginecológicas (125).

A AMN de Chaves é reconhecida pelas suas características únicas (Tabela 1), sendo muito rica em potássio, magnésio, bicarbonato e manganês. É a presença destes elementos que conferem a estas águas diversas propriedades terapêuticas, sendo-lhe atribuídas indicações para o tratamento de patologias músculo-esqueléticas degenerativas, inflamatórias e para a recuperação pós-traumática de fraturas, luxações ou entorses. É igualmente indicada para patologias do sistema gastrointestinal, bem como para patologias das vias respiratórias (144).

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da AMN das Termas de Chaves: adaptado de (145)

<b>Caracterização físico-química</b>	
Temperatura	76 °C
pH (a 20 °C)	6,8
Condutividade elétrica (a 20 °C)	2320 $\mu\text{Scm}^{-1}$
Alcalinidade (em mL.L <sup>-1</sup> de HCl 0,1M)	288,9
Resíduos secos (a 180 °C)	1744 mg.L <sup>-1</sup>
Dureza Total (em p.p 105 de CaCO <sub>3</sub> )	7,4
Sílica	77 mg.L <sup>-1</sup>
Fluoreto	8,3 mg.L <sup>-1</sup>
Mineralização total	2625 mg.L <sup>-1</sup>
Dióxido de carbono (média anual)	600 mg.L <sup>-1</sup>
Bicarbonato	1762 mg.L <sup>-1</sup>
Sódio	623 mg.L <sup>-1</sup>
Fosfato	0,22 mg.L <sup>-1</sup>
Ferro	0,17 mg.L <sup>-1</sup>
Carbonato	<2 mg.L <sup>-1</sup>
Cloreto	36 mg.L <sup>-1</sup>
Fluor	7,2 mg.L <sup>-1</sup>
Silicato	<1 mg.L <sup>-1</sup>
Sulfato	21 mg.L <sup>-1</sup>
Potássio	65 mg.L <sup>-1</sup>
Magnésio	5,5 mg.L <sup>-1</sup>
Cálcio	22 mg.L <sup>-1</sup>
Manganês	23 mg.L <sup>-1</sup>

Apesar de ainda não ser reconhecida o uso da AMN de Chaves para patologias do TGF, existe já no mercado um produto de limpeza da Uriage, à base de AMN, denominado Gyn-Phy. Segundo a descrição do produto, este limpa e refresca sem secar e equilibra a mucosa vaginal, reduz a sensação de desconforto, e o ácido láctico que contém respeita e mantém o equilíbrio da flora genital.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar as atividades antimicrobiana e antibiofilme da AMN de Chaves e dos extratos das plantas *S. officinalis*, *M. sylvestris* e de *A. saligna*, isoladamente ou em combinação, contra os microrganismos patogênicos do TGF *C. albicans* e *N. gonorrhoeae*, e as bactérias da microbiota vaginal *L. casei* e *L. plantarum*.

##### 3.1.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- Avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme da AMN de Chaves, isoladamente, contra os microrganismos patogênicos do TGF *C. albicans* e *N. gonorrhoeae*, e as bactérias da microbiota vaginal *L. casei* e *L. plantarum*;
- Avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme dos extratos *S. officinalis* L., *M. sylvestris*, e *A. saligna*, isoladamente, contra os microrganismos patogênicos do TGF *C. albicans* e *N. gonorrhoeae*, e as bactérias da microbiota vaginal *L. casei* e *L. plantarum*;
- Avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme da associação da AMN de Chaves com os extratos *S. officinalis*, *M. sylvestris*, ou *A. saligna* contra os microrganismos patogênicos do TGF *C. albicans* e *N. gonorrhoeae*, e as bactérias da microbiota vaginal *L. casei* e *L. plantarum*.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Tipo de estudo**

Este tratou-se de um estudo experimental, laboratorial e analítico, onde foram estudadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme de diferentes produtos naturais (AMN de Chaves e extratos de plantas medicinais).

### **4.2 Local de estudo**

O estudo em questão realizou-se no Centro de Investigação da Montanha (CIMO), do Instituto Politécnico de Bragança, e no AquaValor - Centro de Valorização e Transferência de Tecnologia da Água, em Chaves.

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1. Extratos de plantas medicinais e AMN**

Os extratos hidroalcoólicos de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* foram obtidos a partir das folhas secas e moídas das respetivas plantas através do processo de maceração. Misturaram-se 2 g de cada amostra com 30 mL do solvente (80% etanol + 20% água destilada; 80:20 v.v<sup>-1</sup>), agitando por 1 h na placa agitadora. Os extratos foram filtrados com um papel de filtro (Whatman nº 4) para um novo recipiente, sendo de seguida evaporados para remover o solvente. Foram depois liofilizados (-47 °C, 0,045 bar; Freezone 4,5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para obtenção do extrato bruto em forma de pó, a partir do qual se prepararam diluições para avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme. Os extratos foram obtidos em duplicado.

A AMN foi cedida pelas Termas de Chaves, Portugal. Para a caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos sais minerais presentes nesta água, a mesma foi colocada numa estufa a 50 °C, para que ocorresse evaporação da parte líquida, obtendo-se, deste modo, os sais minerais. Estes sais foram armazenados ao abrigo da luz para posterior utilização.

### **4.3.2. Microrganismos e condições de crescimento**

Neste estudo foram usadas duas espécies de microrganismos comumente relacionados com infeções do TGF, nomeadamente a *N. gonorrhoeae*, o agente causador da gonorreia, e *C. albicans*, levedura responsável pela CV. Ambos os isolados clínicos foram cedidos pela Unidade Local de Saúde do Nordeste EPE (ULSNE), Bragança, Portugal. Estes microrganismos foram crescidos em meio de cultura líquido Tryptic Soy Broth (TSB) com incubação durante 24 h a 37 °C.

Relativamente às bactérias pertencentes à microbiota vaginal usadas neste estudo, *L. casei* e *L. plantarum*, foram crescidas em meio de cultura líquido De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com incubação durante 48 h a 37 °C.

### **4.3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana/ antibiofilme**

#### **4.4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos isolados de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente, em microrganismos patogénicos do TGF e da microbiota vaginal**

A concentração mínima inibitória (CMI), a concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) dos extratos de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves sobre *N. gonorrhoeae*, *C. albicans*, *L. casei* e *L. plantarum* foram determinadas através do método de microdiluição e ensaio colorimétrico com INT [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio]. Foram pesadas 500 mg de cada extrato, dissolvidos em 5% DMSO (1,25 mL) e em meio de cultura (23,75 mL) de acordo com o tipo de microrganismo (MRS ou TSB) de forma a obter uma solução-mãe de 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram igualmente pesados 500 mg de sais minerais e dissolvidos em 25 mL de meio de cultura líquido de acordo com o tipo de microrganismo (MRS e TSB), de forma a obter uma solução-mãe de 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Em microplacas de 96 poços, foram colocados 90 µL de meio de cultura de acordo com o tipo de microrganismo em todos os poços com exceção da primeira linha, à qual foram adicionados 190 µL da solução-mãe (20 mg.mL<sup>-1</sup>). Foram retirados 90 µL do primeiro para a segunda linha de poços até à última, fazendo-se assim diluições sucessivas, de forma a obter um intervalo de concentrações testadas entre 0,15625 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram adicionados a todos os poços 10 µL dos microrganismos correspondentes,

padronizados a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. As microplacas foram incubadas numa estufa a 37 °C por 24 h, para *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, e 48 h, para *Lactobacillus* spp., com agitação (150 rpm). Após o período de incubação, foram adicionados a cada poço 40 µl de corante INT a uma concentração de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>. As microplacas foram incubadas novamente durante 30 minutos, a 37 °C. Após este período, verificou-se a alteração da cor do conteúdo dos poços de amarelo para cor-de-rosa, demonstrando-se a viabilidade dos microrganismos. Foi efetuado um controlo positivo (microrganismo mais o meio correspondente) e controlo negativo (extratos mais meio).

A CMI está definida como sendo a menor concentração de agente antimicrobiano que provoca a inibição do crescimento microbiano visível, a CMB como sendo a concentração mínima de agente antimicrobiano que resulta na morte da bactéria, e a CMF como sendo a concentração mínima de agente antimicrobiano que resulta na morte do fungo.

#### **4.4.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos isolados de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* em conjugação com os sais minerais da AMN de Chaves sobre microrganismos patogénicos do TGF e da microbiota vaginal**

A determinação das CMI, CMB e CMF dos extratos de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* em associação com sais minerais da AMN de Chaves numa proporção de 50:50 efetuou-se tal como descrito no ponto anterior.

#### **4.4.3.3 Avaliação da atividade antibiofilme do extrato isolado de *A. saligna* isoladamente e em conjugação com os sais minerais da AMN de Chaves sobre microrganismos patogénicos do TGF e da microbiota vaginal por citometria de fluxo**

##### **• Inibição do biofilme**

A capacidade de inibição do biofilme de microrganismos patogénicos do TGF e da microbiota vaginal por parte das amostras em estudo foi determinada por citometria de fluxo. Para tal, a adição de amostra nas microplacas foi feita antes da incubação das mesmas, ou seja, no momento antes do início da formação de biofilme. Numa primeira fase, foi preparada uma suspensão de microrganismo em 20 mL de meio de cultura

líquido (TSB ou MRS), a qual foi incubada a 37 °C *overnight*. Após incubação, a DO<sub>620nm</sub> das suspensões foi ajustada a  $2 \pm 0,02$  com meio de cultura líquido (TSB ou MRS). Em microplacas estéreis de 96 poços, de fundo achatado e com tampa, foram distribuídos 196 µL de amostra em estudo e, de seguida, adicionados 4 µL de suspensão de microrganismo (concentração final de aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Aos controlos positivos foram adicionados 196 µL de cetoconazole a 1 mg.mL<sup>-1</sup> ou ampicilina a 10 mg.mL<sup>-1</sup>, consoante se tratasse de fungos ou bactérias, respetivamente, e 4 µL de suspensão de microrganismo. Os controlos negativos foram preparados adicionando a mesma quantidade de microrganismo a 196 µL de meio de cultura líquido (TSB ou MRS). As microplacas foram fechadas, seladas com parafilme e incubadas a 37 °C durante 24 h ou 48 h, consoante o microrganismo em questão, com agitação (150 rpm). Após incubação, os poços foram lavados com NaCl a 0,9% (m.v<sup>-1</sup>) estéril, de modo a remover todas as células não aderidas. De seguida, os biofilmes foram raspados durante 1 min com adição de 200 µL de NaCl a 0,9% (m.v<sup>-1</sup>) estéril, para ressuspender todas as células aderidas. O conteúdo de cada poço foi transferido para o tubo de Eppendorf de 1,5 mL correspondente, ao qual foram adicionados 300 µL de solução de Tween 20 a 0,01% (v.v<sup>-1</sup>) em PBS 1x. Por fim, foram adicionados 5 µL de laranja de tiazole (TO) e 5 µL de iodeto de propídio (PI) ao conteúdo de cada tubo e, de seguida, estes foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos no escuro. Após incubação, o conteúdo de cada tubo foi analisado por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, BD™Biosciences). De modo a obter resultados uniformes e de fácil comparação, foram adquiridos 5 µL do conteúdo total de cada tubo, previamente homogeneizado.

O kit de viabilidade celular utilizado (BD™ Cell Viability Kit) disponibiliza uma solução de TO (*Thiazole Orange*), que cora todas as células, e uma de PI (*Propidium Iodide*), que cora apenas células mortas. As células vivas apresentam membranas íntegras, as quais são impermeáveis a corantes como o PI, o qual se liga a células com membranas danificadas. Por sua vez, o TO é um corante permeável, o que lhe permite entrada em todas as células, vivas, mortas ou danificadas, em graus variáveis. Assim, a combinação destes corantes permite distinguir células vivas e mortas, eucariotas ou procariotas, em análises por citometria de fluxo.

## • Redução de biofilme

A capacidade de redução do biofilme de microrganismos patogénicos do TGF e da microbiota vaginal por parte das amostras em estudo foi determinada por citometria de fluxo. Para tal, a adição de amostra nas microplacas foi feita após incubação das mesmas, ou seja, após formação de biofilmes. Neste sentido, foram adicionados, em microplacas estéreis de 96 poços, de fundo achatado e com tampa, 196  $\mu\text{L}$  de meio de cultura líquido (TSB ou MRS) de acordo com o microrganismo e, de seguida, 4  $\mu\text{L}$  de suspensão de microrganismo a uma  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  de  $2 \pm 0,02$ . Os controlos foram preparados de acordo com os controlos preparados para avaliação da capacidade de inibição de biofilme. Após incubação a 37 °C durante 24 h ou 48 h, consoante o microrganismo, com agitação (150 rpm), para formação de biofilme, o conteúdo de cada poço foi removido e os poços lavados com NaCl a 0,9% (m.v<sup>-1</sup>) estéril. De seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de amostra em estudo e as placas foram novamente incubadas a 37 °C durante 24 h com agitação (150 rpm). A preparação e a análise dos biofilmes por citometria de fluxo foi realizada de acordo com a preparação feita para a avaliação da capacidade de inibição de biofilmes.

## 5. Resultados

Na tabela 2 encontram-se registados os valores de CMI e CMB/CMF para *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* e sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, relativamente aos microrganismos patogénicos do TGF e à microbiota vaginal usados neste estudo, obtidos através do método de microdiluição e ensaio colorimétrico com INT. Assim, verificou-se que para o extrato de *S. officinalis* os valores de CMI variaram entre 1,25 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo a maior atividade antimicrobiana desta amostra observada contra *N. gonorrhoeae*. Os valores de CMB/CMF foram todos superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Para o extrato de *M. sylvestris* observaram-se valores de CMI de 10 mg.mL<sup>-1</sup> para todos os microrganismos testados, e valores de CMB/CMF sempre superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Relativamente ao extrato de *A. saligna* verificaram-se valores de CMI a variar entre 2,5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo, mais uma vez, observada uma maior atividade antimicrobiana contra *N. gonorrhoeae*, e valores de CMB/CMF superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. O tratamento dos diferentes microrganismos com a amostra contendo sais minerais de AMN de Chaves levou à obtenção de valores de CMI variando entre 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>, com *L. plantarum* a apresentar a maior suscetibilidade a esta amostra.

No que diz respeito aos resultados obtidos usando as misturas de sais minerais de AMN de Chaves com os diferentes extratos de plantas, verificou-se que para mistura de sais minerais com extrato de *S. officinalis* os valores de CMI obtidos variaram entre 2,5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>, com *N. gonorrhoeae* e *L. plantarum* a serem os microrganismos mais suscetíveis, e os valores de CMB/CMF a mostrarem ser superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Para a mistura de sais minerais com extrato de *M. sylvestris* observaram-se valores de CMI a variar entre 5 e > 10 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo esta combinação mais eficaz contra *L. plantarum*. Já os valores de CMB/CMF foram superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Finalmente, a mistura de sais minerais com extrato de *A. saligna* apresentou valores de CMI entre 2,5 e > 10mg.mL<sup>-1</sup>, com *N. gonorrhoeae* a demonstrar ser o microrganismo mais suscetível a esta mistura, e com valores de CMB/CMF sempre superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

Depois de analisados os resultados verificou-se que a mistura mais promissora a ser usada em estudos posteriores era a de sais minerais da AMN de Chaves com extrato de *A. saligna*, considerando que ambos os microrganismos patogénicos do TGF, nomeadamente *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, mostraram ser suscetíveis a esta mistura a uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, sobre microrganismos patogênicos do TGF e a microbiota vaginal, pelo método de microdiluição e INT.

Fungos	<i>S. officinalis</i>		<i>M. sylvestris</i>		<i>A. saligna</i>		Sais minerais		Sais + <i>S. officinalis</i>		Sais + <i>M. sylvestris</i>		Sais + <i>A. saligna</i>	
	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB/CMF (10 mg.mL <sup>-1</sup> )
<i>C. albicans</i>	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	>10	>10	5	>10
<b>Bactérias Gram-negativo</b>														
<i>N. gonorrhoeae</i>	1,25	>10	10	>10	2,5	>10	10	>10	2,5	>10	10	>10	2,5	>10
<b>Bactérias Gram-positivo</b>														
<i>L. casei</i>	5	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	>10	>10
<i>L. plantarum</i>	5	>10	10	>10	10	>10	5	>10	2,5	>10	5	>10	5	>10

A capacidade de inibição da formação de biofilmes de microrganismos patogênicos do TGF e da microbiota vaginal por parte do extrato de *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, foi avaliada por citometria de fluxo. Segundo os resultados registrados na tabela 3 verificou-se que o extrato de *A. saligna* a 10 mg.mL<sup>-1</sup> teve a capacidade de inibir a formação de biofilmes de *C. albicans* em 79,2%, de *N. gonorrhoeae* em 99,3%, de *L. casei* em 95,2%, e de *L. plantarum* em 85,8%. Já a amostra contendo sais minerais da AMN de Chaves a 10 mg.mL<sup>-1</sup> demonstrou ser capaz de inibir a formação de biofilmes de *C. albicans* em 53,2%, de *N. gonorrhoeae* em 97,1%, de *L. casei* em 92,6%, e de *L. plantarum* em 99,9%. No que diz respeito à mistura de extrato de *A. saligna* e sais minerais numa proporção de 50:50, observou-se que esta conseguiu inibir a formação de biofilmes de *C. albicans* em 99,6%, de *N. gonorrhoeae* em 99,9%, de *L. casei* em 79,9%, e de *L. plantarum* em 71,4%. Estes resultados demonstram que a mistura de extrato *A. saligna* com sais minerais de AMN de Chaves teve uma capacidade bastante elevada de inibir a formação de biofilmes dos microrganismos patogênicos do TGF, atingindo uma percentagem de inibição de quase 100%, conseguindo manter os biofilmes da microbiota vaginal viáveis em cerca de 20-30% (figura 7).

Tabela 3. Atividade antibiofilme (inibição) de *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, sobre microrganismos patogênicos do TGF e a microbiota vaginal, pelo método de citometria de fluxo.

	<i>A. saligna</i>	Sais minerais	Mistura (50/50)	Antimicrobiano*
10 mg.mL <sup>-1</sup>				
Fungos	% inibição de biofilme em relação ao controlo negativo			
<i>C. albicans</i>	79.2	53.2	99.6	78.6
<b>Bactérias Gram-negativo</b>				
<i>N. gonorrhoeae</i>	99.3	97.1	99.9	96.6
<b>Bactérias Gram-positivo</b>				
<i>L. casei</i>	95.2	92.6	79.9	96.4
<i>L. plantarum</i>	85.8	99.9	71.4	98.4

Mistura – *A. saligna* + Sais Minerais (50:50, mg.mL<sup>-1</sup>)

\* Antimicrobiano: fungos – cetoconazol a 1 mg.mL<sup>-1</sup>; bactérias – ampicilina a 10 mg.mL<sup>-1</sup>

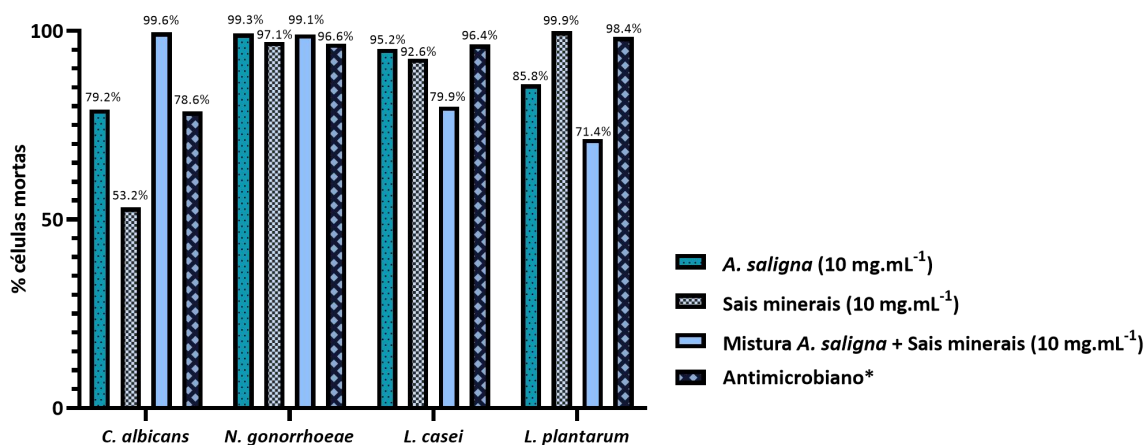


Figura 7 - Atividade antibiofilme (inibição) da mistura (50:50) de *A. saligna* e sais minerais da AMN de Chaves a 10 mg.mL<sup>-1</sup>, sobre biofilmes de microrganismos patogênicos do TGF e da microbiota vaginal, pelo método de citometria de fluxo.

O extrato de *A. saligna* e os sais minerais de AMN de Chaves foram avaliados, isoladamente e em associação, por citometria de fluxo relativamente à sua capacidade de redução da formação de biofilmes de microrganismos patogênicos do TGF e da microbiota vaginal. Tendo em conta os resultados obtidos (tabela 4) observou-se que o extrato de *A. saligna* a 10 mg.mL<sup>-1</sup> teve a capacidade de reduzir a formação de biofilmes de *C. albicans* em 52,1%, de *N. gonorrhoeae* em 79,1%, de *L. casei* em 99,8%, e de *L. plantarum* em 99,7%. A amostra contendo sais minerais da AMN de Chaves a 10 mg.mL<sup>-1</sup> demonstrou ser capaz de reduzir a formação de biofilmes de *C. albicans* em 93,4%, de *N. gonorrhoeae* em 16,6%, de *L. casei* em 20,3%, e de *L. plantarum* em 96,8%. Relativamente à mistura de extrato de *A. saligna* e sais minerais

numa proporção de 50:50, verificou-se que esta teve a capacidade de reduzir a formação de biofilmes de *C. albicans* em 98,9%, de *N. gonorrhoeae* em 96,9%, de *L. casei* em 47,9%, e de *L. plantarum* em 17,7%. Desta forma, os resultados obtidos demonstram que a mistura de extrato *A. saligna* com sais minerais de AMN de Chaves foi capaz de reduzir com sucesso a formação de biofilmes dos microrganismos patogénicos do TGF, ao atingir uma percentagem de redução de quase 100%, enquanto conseguiu manter os biofilmes da microbiota vaginal viáveis em cerca de 50-80% (figura 7).

Tabela 4. Atividade antibiofilme (redução) de *A. saligna* e dos sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, sobre microrganismos patogénicos do TGF e a microbiota vaginal, pelo método de citometria de fluxo.

	<i>A. saligna</i>	Sais Minerais	Mistura (50/50)	Antimicrobiano*
	10 mg.mL <sup>-1</sup>			
<b>Fungos</b>	<b>% redução de biofilme em relação ao controlo negativo</b>			
<i>C. albicans</i>	52.1	93.4	<b>98.9</b>	94.1
<b>Bactérias Gram-negativo</b>				
<i>N. gonorrhoeae</i>	79.1	16.6	<b>96.9</b>	98.4
<b>Bactérias Gram-positivo</b>				
<i>L. casei</i>	99.8	20.3	<b>47.9</b>	99.6
<i>L. plantarum</i>	99.7	96.8	<b>17.7</b>	99.9

Mistura – *A. saligna* + Sais Minerais (50:50, mg.mL<sup>-1</sup>)

\* Antimicrobiano: fungos – cetoconazol a 1 mg.mL<sup>-1</sup>; bactérias – ampicilina a 10 mg.mL<sup>-1</sup>

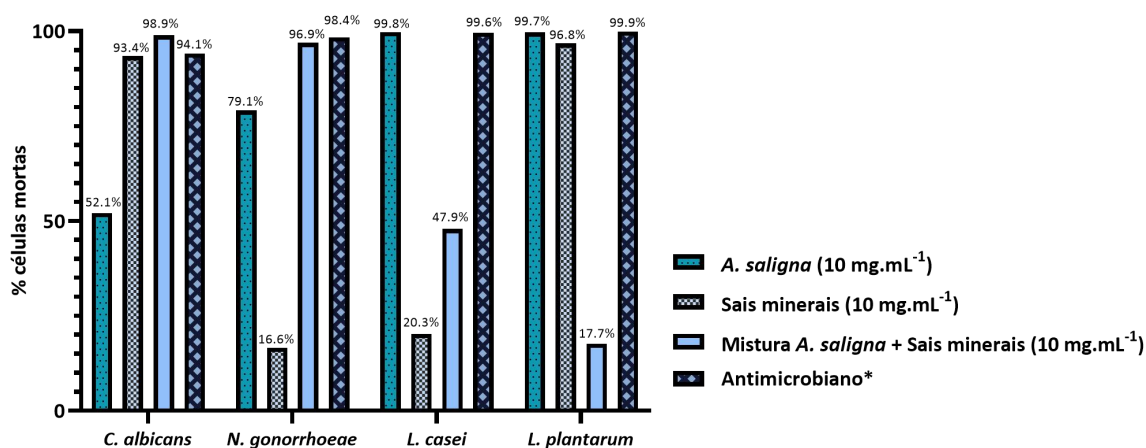


Figura 8 - Atividade antibiofilme (redução) da mistura (50:50) de *A. saligna* e sais minerais da AMN de Chaves a 10 mg.mL<sup>-1</sup>, sobre biofilmes de microrganismos patogénicos do TGF e da microbiota vaginal, pelo método de citometria de fluxo.

## 6. Discussão

O presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme dos sais minerais da AMN da água de Chaves, bem como dos extratos de *S. officinalis*, *M. sylvestris*, e *A. saligna*, isoladamente e em associação, em microrganismos patogênicos do TGF e sobre a microbiota vaginal, de forma a procurar novos agentes terapêuticos que previnam e combatam infecções associadas ao TGF, em particular a gonorreia e a CV. A *N. gonorrhoeae* é o agente infeccioso causador da gonorreia, patologia que afeta mais de 85 milhões de pessoas em todo o mundo todos os anos (12). Esta bactéria tem a capacidade de provocar inflamação aguda do TGF que se caracteriza pelo recrutamento de células fagocitárias para o local de infecção (12). No entanto, *N. gonorrhoeae* é igualmente reconhecido por infectar o reto, a garganta os olhos, e mais raramente a corrente sanguínea, o que pode levar ao estabelecimento de colonização da pele e articulações (146-149). Por outro lado, a candidíase vaginal, comumente causada por *C. albicans*, afeta aproximadamente 30-50% da população feminina mundial (150, 151). A seguir às infecções bacterianas, é o segundo tipo de infecção vaginal mais comum (11, 152). O quadro clínico observado nesta patologia pode variar, mas, na maioria das vezes, os sintomas incluem comichão, ardor e corrimento vaginal anormal (153). *C. albicans* pode ainda provocar infecções superficiais, nomeadamente na pele e unhas, e nas mucosas da boca, garganta, esófago e intestinos (152), e infecções sistêmicas, como a septicémia (154).

A microbiota vaginal é atualmente reconhecida como sendo um ecossistema equilibrado, predominantemente dominado por espécies do género *Lactobacillus* (7, 155). Sob condições fisiológicas normais, a presença destas bactérias é considerada como um indicador de saúde vaginal (156, 157). A produção de ácido láctico, biosurfactantes, bacteriocinas e peróxido de hidrogénio por parte de *Lactobacillus* spp. resulta na acidificação do ambiente vaginal, na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, promovendo assim a manutenção de uma microbiota saudável (6, 158). No entanto, o surgimento de uma microbiota vaginal pobre em lactobacilos pode resultar numa disbiose, o que está relacionado com infecções vaginais como a CV e a gonorreia (2).

Uma das características comuns a *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, e que lhes permite colonizar tecidos provocando infecção, é a sua capacidade de formar biofilmes. O biofilme é uma estrutura tridimensional e multifuncional que, através de diversos

mecanismos, oferece proteção e defesa aos microrganismos nele presente, limitando o contacto dos mesmos com elementos do sistema imunitário humano e agentes antimicrobianos e, conseqüentemente, conferindo-lhes elevada resistência a estes. Considera-se assim que os microrganismos pertencentes a um biofilme são fenotipicamente distintos das formas plantónicas, e como consequência, que a ação de antimicrobianos sobre microrganismos livres é, por norma, distinta da que é exercida sobre microrganismos em biofilme.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), qualquer planta que tenha potencial terapêutica ou que sejam precursoras de fármacos são consideradas plantas medicinais (159). Desde que há memória que as plantas medicinais têm sido usadas no tratamento de diversas patologias, e com o acentuado aumento da resistência de microrganismos patogénicos aos antimicrobianos disponíveis, torna-se urgente procurar alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infeções por estes agentes (160). *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* são três plantas medicinais facilmente encontradas em Portugal, e cujo valor terapêutico é amplamente reconhecido. Encontra-se descrito na literatura que os extratos e óleos essenciais de *S. officinalis* são agentes antimicrobianos bastante eficazes contra bactérias, fungos, vírus e insetos, sendo esta planta caracterizada por propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória (107, 161-163). *M. sylvestris*, comumente designada por malva, é uma planta com larga aplicação na medicina tradicional, nomeadamente no tratamento da tosse, constipações, diarreia e obstipação (164), e cujas propriedades biológicas incluem as atividades anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antissética, analgésico, antitússica e antiexpectorante (165-170). A acácia, cujo nome científico é *A. saligna*, tem sido estudada devido às suas propriedades antifúngica, antibacteriana e antioxidante (121).

Considerando o exposto anteriormente, entende-se a importância do estudo de novos agentes antimicrobianos que por um lado tenham a capacidade de inibir e reduzir a formação de biofilmes de *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, mantendo por outro a viabilidade de biofilmes de *Lactobacillus*. Neste estudo procedeu-se então à avaliação da atividade antimicrobiana dos sais minerais da AMN de Chaves e dos extratos hidroalcoólicos de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna*, isoladamente e em associação, pelo método de microdiluição e ensaio colorimétrico com INT, de forma a determinar as CMI, CMB e CMF de cada amostra para cada microrganismo em estudo.

De um modo geral, este ensaio revelou melhores valores de CMI para as misturas de sais minerais com extratos de plantas do que para as amostras isoladamente. No entanto, o extrato de *S. officinalis* demonstrou ter a melhor atividade antimicrobiana contra *N. gonorrhoeae*. Das misturas preparadas para este ensaio, aquela que mostrou ser mais promissora foi a de sais minerais e *A. saligna* (50:50), visto que revelou valores de CMI inferiores para os microrganismos patogênicos *N. gonorrhoeae* e *C. albicans* (2,5 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente), e mais elevados para as bactérias da microbiota vaginal *L. casei* e *L. plantarum* (> 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente). Assim, esta amostra permitiu o controlo dos microrganismos patogênicos do TGF sem interferir de forma tão letal com os microrganismos associados à saúde vaginal, quando usada a uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Considerando os resultados obtidos para a mistura de sais minerais e *A. saligna* (50:50), foi esta a selecionada para prosseguir com os ensaios seguintes, tendo sido igualmente tidas em consideração as amostras de sais minerais e *A. saligna* isoladamente.

O método de avaliação da atividade antibiofilme das amostras selecionadas foi a citometria de fluxo, visto que este é bastante sensível, pois recorre a corantes fluorescentes que marcam especificamente todas as células (TO) ou células mortas (PI), sendo atualmente, o método de referência usado no estudo de células procariotas. Esta técnica possibilitou, recorrendo à contagem de células, precisar a percentagem de células mortas presente em cada ensaio. Estes resultados demonstraram que a mistura em avaliação teve a capacidade de inibir a formação de biofilmes de *N. gonorrhoeae* e *C. albicans* em quase 100%, permitindo manter a viabilidade dos biofilmes de *Lactobacillus* em cerca de 20-30%. Por outro lado, a mistura em causa foi capaz de reduzir a formação de biofilmes de *N. gonorrhoeae* e *C. albicans* em cerca de 97-99%, tendo a capacidade de manter viáveis os biofilmes de *Lactobacillus* em aproximadamente 50-80%.

Tendo em conta o potencial antimicrobiano de *A. saligna*, extratos desta planta têm vindo a ser testados contra diferentes microrganismos, mas, que seja do nosso conhecimento, nunca em *N. gonorrhoeae*. Num estudo desenvolvido por El-Toumy et al (171), foi testado o extrato de acetato de etilo de folhas de *A. saligna* contra *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans*. Verificou-se que os valores de CMI variavam entre 0,14 e 0,46 µg.mL<sup>-1</sup>, para as bactérias, e para *C. albicans* o valor de CMI foi de 3,7 µg.mL<sup>-1</sup>. Quando comparados com os valores de CMI obtidos para os microrganismos testados no presente trabalho, observa-se que estes

são bastante mais elevados que os obtidos em (171). Este resultado pode dever-se ao facto de a extração usando o acetato de etilo como solvente levar à obtenção de uma maior concentração de compostos antimicrobianos do que a extração hidroalcoólica. Gumgumjee and Hajar (172) testaram o extrato etanólico de *A. saligna* nos microrganismos patogénicos *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*, verificando, através do método de difusão em disco, a sua atividade antimicrobiana. O extrato metanólico de folhas de *A. saligna* foi testado quanto à sua capacidade antimicrobiana contra as bactérias patogénicas *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus*, e a levedura *C. albicans* (120). Neste estudo, verificaram-se valores de CMI entre 0,30 e 0,47 mg.mL<sup>-1</sup>, para as bactérias, e de 0,58 mg.mL<sup>-1</sup> para *C. albicans*. Estes valores de CMI foram bastante inferiores aos obtidos no presente estudo, o que se pode dever ao facto de a extração metanólica ser mais eficaz na extração de moléculas antimicrobianas quando comparada com a extração hidroalcoólica. Infelizmente, os estudos encontrados que abordam a atividade antimicrobiana de extratos de *A. saligna* focam-se apenas no efeito destes sobre células planctónicas e nunca sobre células em biofilmes.

Atualmente, o número de estudos que abordam a atividade antimicrobiana e antibiofilme da AMN é bastante limitado, sendo inexistente para *N. gonorrhoeae*. Num estudo realizado por Oliveira et al. (26), no qual foram analisadas diversas AMN do Centro de Portugal, verificou-se que algumas destas apresentavam atividade antimicrobiana contra microrganismos patogénicos da pele, incluindo *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *C. albicans*. Akiyama et al (173) testaram AMN de uma fonte termal contra *S. aureus*, e observaram um decréscimo de dez vezes na contagem de colónias crescidas em TSB contendo AMN quando comparada com a contagem de colónias crescidas em TSB com água desionizada. Verificaram ainda que o número de células em biofilmes imaturos de *S. aureus* crescidos em plasma contendo AMN era oito vezes menor que aqueles crescidos em plasma apenas. Noutro estudo, os investigadores observaram que AMN em contacto com células planctónicas de *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* provocava uma redução no número de bactérias em 24 e 22%, respetivamente (174). Adicionalmente, o uso desta água em biofilmes de *S. aureus* e *S. pneumoniae* provocou uma diminuição na sua viabilidade em 13 e 9%, respetivamente, após uma exposição de 10 minutos à AMN.

Considerando os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, a mistura de extrato hidroalcoólico de *A. saligna* e AMN de Chaves, a uma concentração

de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e numa proporção de 50:50, poderá eventualmente ser usada no desenvolvimento de futuras formulações de produtos de higiene íntima, essencialmente devido às suas atividades antimicrobiana e antibiofilme contra agentes patogénicos do TGF, como *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, mas também tendo em conta a sua capacidade de manter alguma viabilidade das bactérias associadas à saúde do TGF, *L. casei* e *L. plantarum*.

## 7. Conclusão e perspectivas futuras

Os objetivos deste estudo foram cumpridos com sucesso, visto que a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos dois produtos naturais, o extrato de *A. saligna* e os sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente e em associação, foi avaliada em microrganismos patogénicos do TGF, *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, e na microbiota vaginal, nomeadamente em *L. casei* e *L. plantarum*.

Os resultados obtidos revelaram que tanto os extratos de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna* como os sais minerais da AMN de Chaves, isoladamente, apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos em estudo. Contudo, foi obtida uma mistura promissora (*A. saligna* mais sais minerais), a qual apresenta atividade antimicrobiana e capacidade de inibição e redução de biofilmes dos microrganismos patogénicos do TGF *N. gonorrhoeae* e *C. albicans*, interferindo pouco com a microbiota vaginal.

Este estudo permitiu ainda aprofundar o conhecimento acerca da bioatividade da AMN de Chaves, valorizar este recurso endógeno e, como consequência, acrescentar valor económico à região. Os resultados obtidos possibilitaram ainda corroborar a atividade biológica dos extratos de *S. officinalis*, *M. sylvestris* e *A. saligna*, plantas bastante usadas no âmbito da medicina tradicional. De grande relevância foi o estabelecimento de uma relação sinérgica entre os produtos naturais estudados, de forma a aumentar o seu potencial e obter uma mistura com forte possibilidade para aplicação na indústria farmacêutica, nomeadamente na elaboração de formulações de higiene íntima.

Em estudos futuros será relevante perceber os mecanismos de ação destes produtos naturais isoladamente e em mistura e analisar, *in vitro*, o estudo da atividade antimicrobiana e capacidade de inibição e redução de biofilme mistos, isto é, biofilmes compostos por microrganismos patogénicos do TGF e pela microbiota vaginal. Poderão ainda ser realizados ensaios que avaliem, *in vitro* e *in vivo*, a atividade anti-inflamatória e o efeito citotóxico desta mistura.

## 8. Referências Bibliográficas

- 1.Pramanick R, Mayadeo N, Warke H, Begum S, Aich P, Aranha C. Vaginal microbiota of asymptomatic bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis: Are they different from normal microbiota? *Microbial Pathogenesis*. 2019;134:103599. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103599>.
- 2.Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12. doi: 10.3389/fmicb.2021.643422. PubMed Central PMCID: PMC8249587.
- 3.Tozzo AC, Santos IGD, Mattiuzi FF, &Santos ADOD. Fatores associados à candidíase vaginal recorrente. *Revista Multidisciplinar Em Saúde*. 2021;2(4)(32).
- 4.Balakrishnan SN, Yamang H, Lorenz MC, Chew SY, Than LTL. Role of Vaginal Mucosa, Host Immunity and Microbiota in Vulvovaginal Candidiasis. *Pathogens*. 2022;11(6). Epub 20220525. doi: 10.3390/pathogens11060618. PubMed PMID: 35745472; PubMed Central PMCID: PMC9230866.
- 5.Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):35-47. Epub 20180503. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.019. PubMed PMID: 29729331; PubMed Central PMCID: PMC7362580.
- 6.Das S, Bhattacharjee MJ, Mukherjee AK, Khan MR. Recent advances in understanding of multifaceted changes in the vaginal microenvironment: implications in vaginal health and therapeutics. *Crit Rev Microbiol*. 2023;49(2):256-82. Epub 20220321. doi: 10.1080/1040841X.2022.2049696. PubMed PMID: 35312419.
- 7.Lehtoranta L, Ala-Jaakkola R, Laitila A, Maukonen J. Healthy Vaginal Microbiota and Influence of Probiotics Across the Female Life Span. *Front Microbiol*. 2022;13:819958. Epub 20220408. doi: 10.3389/fmicb.2022.819958. PubMed PMID: 35464937; PubMed Central PMCID: PMC9024219.
- 8.Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl

1(Suppl 1):4680-7. Epub 20100603. doi: 10.1073/pnas.1002611107. PubMed PMID: 20534435; PubMed Central PMCID: PMC3063603.

**9.**Disha T, Haque F. Prevalence and Risk Factors of Vulvovaginal Candidosis during Pregnancy: A Review. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2022;2022:6195712. Epub 20220720. doi: 10.1155/2022/6195712. PubMed PMID: 35910510; PubMed Central PMCID: PMC9329029.

**10.**Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1). Epub 20200225. doi: 10.3390/jof6010027. PubMed PMID: 32106438; PubMed Central PMCID: PMC7151053.

**11.**Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):253-73. doi: 10.1128/CMR.00076-09. PubMed PMID: 20375352; PubMed Central PMCID: PMC2863365.

**12.**Unemo M, Seifert HS, Hook EW, Hawkes S, Ndowa F, Dillon JR. Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):79. Epub 20191121. doi: 10.1038/s41572-019-0128-6. PubMed PMID: 31754194.

**13.**Walker E, van Niekerk S, Hanning K, Kelton W, Hicks J. Mechanisms of host manipulation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Microbiol.* 2023;14:1119834. Epub 20230203. doi: 10.3389/fmicb.2023.1119834. PubMed PMID: 36819065; PubMed Central PMCID: PMC9935845.

**14.**Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. *Front Microbiol.* 2016;7:2173. Epub 20170112. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173. PubMed PMID: 28127295; PubMed Central PMCID: PMC5226953.

**15.**Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):587-613. doi: 10.1128/CMR.00010-14. PubMed PMID: 24982323; PubMed Central PMCID: PMC4135894.

**16.**Gurib-Fakim A. Novel Plant Bioresources: Applications in Food, Medicine and Cosmetics: Wiley-Blackwell; 2014.

- 17.**Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(3):200-16. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z.
- 18.**Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants-Natural Health Products for Human Health. *Molecules*. 2023;28(4). Epub 20230215. doi: 10.3390/molecules28041845. PubMed PMID: 36838831; PubMed Central PMCID: PMC9960276.
- 19.**DGEG. Termalismo e Geotermia <https://hidrogenoma.javali.pt/agua-mineral-natural/caldas-de-chaves2021> [cited 2021 25.05.2021].
- 20.**Ministério da Agricultura dDRedP. Decreto-Lei n.º 156/98, de 6 de junho. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas; 1998.
- 21.**Barata A, Filipe M. Roteiro das termas de Portugal. Primeira edição ed. Lisboa: Editorial Caminho; 1999.
- 22.**Tamás B, Gabriella K, Kristóf Á, Anett I, János Pál K, Bálint T, et al. The Effects of Lakitelek Thermal Water and Tap Water on Skin Microbiome, a Randomized Control Pilot Study. *Life (Basel)*. 2023;13(3). Epub 20230309. doi: 10.3390/life13030746. PubMed PMID: 36983902; PubMed Central PMCID: PMC10051609.
- 23.**Kulisch Á, Mándó Z, Sándor E, Lengyel Z, Illés A, Kósa J, et al. Evaluation of the effects of Lake Hévíz sulfur thermal water on skin microbiome in plaque psoriasis: An open label, pilot study. *Int J Biometeorol*. 2023;67(4):661-73. Epub 20230303. doi: 10.1007/s00484-023-02443-1. PubMed PMID: 36864227.
- 24.**Maccarone MC, Magro G, Albertin C, Barbetta G, Barone S, Castaldelli C, et al. Short-time effects of spa rehabilitation on pain, mood and quality of life among patients with degenerative or post-surgery musculoskeletal disorders. *Int J Biometeorol*. 2023;67(1):29-36. Epub 20221008. doi: 10.1007/s00484-022-02381-4. PubMed PMID: 36207541; PubMed Central PMCID: PMC9546417.
- 25.**Maccarone MC, Masiero S. Can spa rehabilitative interventions play a role for patients suffering from neurodegenerative disorders at the early stages? A scoping review. *Int J Biometeorol*. 2022;66(12):2369-77. Epub 20220921. doi: 10.1007/s00484-022-02369-0. PubMed PMID: 36129582; PubMed Central PMCID: PMC9684286.

- 26.**Oliveira AS, Vaz CV, Silva A, Ferreira SS, Correia S, Ferreira R, et al. Chemical signature and antimicrobial activity of Central Portuguese Natural Mineral Waters against selected skin pathogens. *Environmental geochemistry and health*. 2020;42(7):2039-57.
- 27.**Santacroce L, Palmirotta R, Bottalico L, Charitos IA, Colella M, Topi S, Jirillo E. Crosstalk between the Resident Microbiota and the Immune Cells Regulates Female Genital Tract Health. *Life (Basel)*. 2023 Jul 9;13(7):1531. doi: 10.3390/life13071531. PMID: 37511906; PMCID: PMC10381428.
- 28.**Miller EA, Beasley DE, Dunn RR, Archie EA. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Front Microbiol*. 2016 Dec 8;7:1936. doi: 10.3389/fmicb.2016.01936.
- 29.**Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. *Front Microbiol*. 2021 Jun 18;12:643422. doi: 10.3389/fmicb.2021.643422.
- 30.**Eyre DW, Sanderson ND, Lord E, Regisford-Reimmer N, Chau K, Barker L, et al. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Euro Surveill*. 2018;23(27). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1800323. PubMed PMID: 29991383; PubMed Central PMCID: PMC6152157.
- 31.**Kirkcaldy RD, Weston E, Segurado AC, Hughes G. Epidemiology of gonorrhoea: a global perspective. *Sex Health*. 2019;16(5):401-11. doi: 10.1071/SH19061. PubMed PMID: 31505159; PubMed Central PMCID: PMC7064409.
- 32.**Whelan J, Abbing-Karahagopian V, Serino L, Unemo M. Gonorrhoea: a systematic review of prevalence reporting globally. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1152. Epub 20211111. doi: 10.1186/s12879-021-06381-4. PubMed PMID: 34763670; PubMed Central PMCID: PMC8582208.
- 33.**McIntosh EDG. Development of vaccines against the sexually transmitted infections gonorrhoea, syphilis, *Chlamydia*, herpes simplex virus, human immunodeficiency virus and Zika virus. *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2020;8:2515135520923887. Epub 20200627. doi: 10.1177/2515135520923887. PubMed PMID: 32647779; PubMed Central PMCID: PMC7325543.

- 34.**Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(4):226-40. Epub 20180212. doi: 10.1038/nrmicro.2017.169. PubMed PMID: 29430011; PubMed Central PMCID: PMC6329377.
- 35.**Whelan J, Eeuwijk J, Bunge E, Beck E. Systematic Literature Review and Quantitative Analysis of Health Problems Associated with Sexually Transmitted *Neisseria gonorrhoeae* Infection. *Infect Dis Ther.* 2021;10(4):1887-905. Epub 20210717. doi: 10.1007/s40121-021-00481-z. PubMed PMID: 34279817; PubMed Central PMCID: PMC8572915.
- 36.**Hill SA, Masters TL, Wachter J. Gonorrhea - an evolving disease of the new millennium. *Microb Cell.* 2016;3(9):371-89. Epub 20160905. doi: 10.15698/mic2016.09.524. PubMed PMID: 28357376; PubMed Central PMCID: PMC5354566.
- 37.**Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC Infectious Diseases.* 2015;15(1):364. doi: 10.1186/s12879-015-1029-2.
- 38.**Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Med Microbiol Immunol.* 2020;209(2):95-108. Epub 20191204. doi: 10.1007/s00430-019-00651-4. PubMed PMID: 31802195; PubMed Central PMCID: PMC7125254.
- 39.**Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Rev Argent Microbiol.* 2022. Epub 20221118. doi: 10.1016/j.ram.2022.08.003. PubMed PMID: 36411138.
- 40.**Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(6):905-27. Epub 20151221. doi: 10.3109/1040841X.2015.1091805. PubMed PMID: 26690853.
- 41.**Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022;13(1):89-121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950. PubMed PMID: 34964702; PubMed Central PMCID: PMC9728475.

- 42.**Kalia N, Singh J, Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2020;19(1):5. doi: 10.1186/s12941-020-0347-4.
- 43.**Sustr V, Foessleitner P, Kiss H, Farr A. Vulvovaginal Candidosis: Current Concepts, Challenges and Perspectives. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4). Epub 20201107. doi: 10.3390/jof6040267. PubMed PMID: 33171784; PubMed Central PMCID: PMC7712750.
- 44.**Rodrigues MT, Gonçalves AC, Alvim MCT, Castellano-Filho DS, Zimmermann JB, da Silva VL, et al. Association between vaginal secretion culture, socio-demographic characteristics and clinical manifestations of patients with vulvovaginal candidiasis. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;35(12). doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-72032013001200005>.
- 45.**CDC. Vulvovaginal Candidiasis (VVC) 2021 [26/04/2023]. Available from: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/candidiasis.htm>.
- 46.**Nyirjesy P, Brookhart C, Lazenby G, Schwebke J, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2022;74(Suppl\_2):S162-S8. doi: 10.1093/cid/ciab1057. PubMed PMID: 35416967.
- 47.**Rodríguez-Castaño GP, Rosenau F, Ständker L, Firacative C. Antimicrobial Peptides: Avant-Garde Antifungal Agents to Fight against Medically Important. *Pharmaceutics*. 2023;15(3). Epub 20230227. doi: 10.3390/pharmaceutics15030789. PubMed PMID: 36986650; PubMed Central PMCID: PMC10053530.
- 48.**Auriemma RS, Sciarati R, Del Vecchio G, Liccardi A, Verde N, Pirchio R, et al. The Vaginal Microbiome: A Long Urogenital Colonization Throughout Woman Life. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:686167. Epub 20210706. doi: 10.3389/fcimb.2021.686167. PubMed PMID: 34295836; PubMed Central PMCID: PMC8290858.
- 49.**Holdcroft AM, Ireland DJ, Payne MS. The Vaginal Microbiome in Health and Disease-What Role Do Common Intimate Hygiene Practices Play? *Microorganisms*. 2023;11(2). Epub 20230123. doi: 10.3390/microorganisms11020298. PubMed PMID: 36838262; PubMed Central PMCID: PMC9959050.

- 50.** Saraf VS, Sheikh SA, Ahmad A, Gillevet PM, Bokhari H, Javed S. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Arch Microbiol.* 2021;203(7):3793-802. Epub 20210613. doi: 10.1007/s00203-021-02414-3. PubMed PMID: 34120200.
- 51.** Salvetti E, Torriani S, Felis GE. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2012;4(4):217-26. doi: 10.1007/s12602-012-9117-8. PubMed PMID: 26782181.
- 52.** Lin YP, Chen WC, Cheng CM, Shen CJ. Vaginal pH Value for Clinical Diagnosis and Treatment of Common Vaginitis. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(11). Epub 20211027. doi: 10.3390/diagnostics11111996. PubMed PMID: 34829343; PubMed Central PMCID: PMC8618584.
- 53.** Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):203. Epub 20201107. doi: 10.1186/s12934-020-01464-4. PubMed PMID: 33160356; PubMed Central PMCID: PMC7648308.
- 54.** Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:181. Epub 20180613. doi: 10.3389/fmed.2018.00181. PubMed PMID: 29951482; PubMed Central PMCID: PMC6008313.
- 55.** Adeosun FG, Ruppitsch W, Allerberger F, Ayeni FA. Prevalence and Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria in Nigerian Women During the Menstrual Cycle. *Pol J Microbiol.* 2019;68(2):203-9. doi: 10.33073/pjm-2019-020. PubMed PMID: 31250590; PubMed Central PMCID: PMC7256855.
- 56.** Oerlemans EFM, Bellen G, Claes I, Henkens T, Allonsius CN, Wittouck S, et al. Impact of a lactobacilli-containing gel on vulvovaginal candidosis and the vaginal microbiome. *Sci Rep.* 2020;10(1):7976. Epub 20200514. doi: 10.1038/s41598-020-64705-x. PubMed PMID: 32409699; PubMed Central PMCID: PMC7224289.
- 57.** Silva JA, De Gregorio PR, Rivero G, Abraham GA, Nader-Macías MEF. Immobilization of vaginal *Lactobacillus* in polymeric nanofibers for its incorporation in vaginal probiotic products. *Eur J Pharm Sci.* 2021;156:105563. Epub 20200923. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105563. PubMed PMID: 32976956.

- 58.**Asadi A, Lohrasbi V, Abdi M, Mirkalantari S, Esghaei M, Kashanian M, et al. The probiotic properties and potential of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from healthy women against some vaginal pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2022;74(5):752-64. Epub 20220211. doi: 10.1111/lam.13660. PubMed PMID: 35080271.
- 59.**Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol.* 2018;9:2107. Epub 20180910. doi: 10.3389/fmicb.2018.02107. PubMed PMID: 30298055; PubMed Central PMCID: PMC6160870.
- 60.**Buriti FC, Saad SM. [Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health]. *Arch Latinoam Nutr.* 2007;57(4):373-80. PubMed PMID: 18524322.
- 61.**Aktas B, De Wolfe TJ, Tandee K, Safdar N, Darien BJ, Steele JL. The Effect of *Lactobacillus casei* 32G on the Mouse Cecum Microbiota and Innate Immune Response Is Dose and Time Dependent. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145784. Epub 20151229. doi: 10.1371/journal.pone.0145784. PubMed PMID: 26714177; PubMed Central PMCID: PMC4705108.
- 62.**Ivory K, Chambers SJ, Pin C, Prieto E, Arqués JL, Nicoletti C. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(8):1282-9. Epub 20080528. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03025.x. PubMed PMID: 18510694.
- 63.**Sperry MF, Silva HLA, Balthazar CF, Esmerino EA, Verruck S, Prudencio ES, et al. Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods.* 2018;45:435-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.015>.
- 64.**He Y, Na R, Niu X, Xiao B, Yang H. *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* Affect Various Stages of *Gardnerella* Species Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:568178. Epub 20210219. doi: 10.3389/fcimb.2021.568178. PubMed PMID: 33680986; PubMed Central PMCID: PMC7933028.
- 65.**Siezen RJ, van Hylckama Vlieg JE. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb Cell Fact.* 2011;10 Suppl

1(Suppl 1):S3. Epub 20110830. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S3. PubMed PMID: 21995294; PubMed Central PMCID: PMC3271238.

**66.**De Seta F, Parazzini F, De Leo R, Banco R, Maso GP, De Santo D, et al. *Lactobacillus plantarum* P17630 for preventing *Candida vaginitis* recurrence: a retrospective comparative study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2014;182:136-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.09.018>.

**67.**Fidanza M, Panigrahi P, Kollmann TR. *Lactiplantibacillus plantarum* -Nomad and Ideal Probiotic. *Front Microbiol*. 2021;12:712236. Epub 20211006. doi: 10.3389/fmicb.2021.712236. PubMed PMID: 34690957; PubMed Central PMCID: PMC8527090.

**68.**Prasad P, Tippana M. Morphogenic plasticity: the pathogenic attribute of *Candida albicans*. *Curr Genet*. 2023. Epub 20230322. doi: 10.1007/s00294-023-01263-5. PubMed PMID: 36947241.

**69.**Kühbacher A, Burger-Kentischer A, Rupp S. Interaction of *Candida* Species with the Skin. *Microorganisms*. 2017;5(2). Epub 20170607. doi: 10.3390/microorganisms5020032. PubMed PMID: 28590443; PubMed Central PMCID: PMC5488103.

**70.**Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiol*. 2012;2012:538694. Epub 20120929. doi: 10.5402/2012/538694. PubMed PMID: 23762753; PubMed Central PMCID: PMC3671685.

**71.**Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol*. 2013;5. Epub 20131021. doi: 10.3402/jom.v5i0.22434. PubMed PMID: 24155995; PubMed Central PMCID: PMC3805843.

**72.**Shukla M, Chandley P, Rohatgi S. The Role of B-Cells and Antibodies against *Candida* Vaccine Antigens in Invasive Candidiasis. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(10). Epub 20211010. doi: 10.3390/vaccines9101159. PubMed PMID: 34696267; PubMed Central PMCID: PMC8540628.

- 73.**Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11). Epub 20220524. doi: 10.3390/ijms23115895. PubMed PMID: 35682581; PubMed Central PMCID: PMC9179972.
- 74.**Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16(1):15-25. doi: 10.1155/2005/323082. PubMed PMID: 18159523; PubMed Central PMCID: PMC2095009.
- 75.**Rouphael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol Biol.* 2012;799:1-20. doi: 10.1007/978-1-61779-346-2\_1. PubMed PMID: 21993636; PubMed Central PMCID: PMC4349422.
- 76.**Kreisel KM, Spicknall IH, Gargano JW, Lewis FMT, Lewis RM, Markowitz LE, et al. Sexually Transmitted Infections Among US Women and Men: Prevalence and Incidence Estimates, 2018. *Sex Transm Dis.* 2021;48(4):208-14. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001355. PubMed PMID: 33492089.
- 77.**Unemo M, Shafer WM. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1230:E19-28. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06215.x. PubMed PMID: 22239555; PubMed Central PMCID: PMC4510988.
- 78.**Lovett A, Duncan JA. Human Immune Responses and the Natural History of. *Front Immunol.* 2018;9:3187. Epub 20190219. doi: 10.3389/fimmu.2018.03187. PubMed PMID: 30838004; PubMed Central PMCID: PMC6389650.
- 79.**Darville T. Pelvic Inflammatory Disease Due to *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*: Immune Evasion Mechanisms and Pathogenic Disease Pathways. *J Infect Dis.* 2021;224(12 Suppl 2):S39-S46. doi: 10.1093/infdis/jiab031. PubMed PMID: 34396413; PubMed Central PMCID: PMC8365118.
- 80.**Schaub RE, Dillard JP. The Pathogenic *Neisseria* Use a Streamlined Set of Peptidoglycan Degradation Proteins for Peptidoglycan Remodeling, Recycling, and Toxic Fragment Release. *Front Microbiol.* 2019;10:73. Epub 20190131. doi: 10.3389/fmicb.2019.00073. PubMed PMID: 30766523; PubMed Central PMCID: PMC6365954.

- 81.**Lim KYL, Mullally CA, Haese EC, Kibble EA, McCluskey NR, Mikucki EC, et al. Anti-Virulence Therapeutic Approaches for. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2). Epub 20210121. doi: 10.3390/antibiotics10020103. PubMed PMID: 33494538; PubMed Central PMCID: PMC7911339.
- 82.**Guimarães R, Milho C, Liberal Â, Silva J, Fonseca C, Barbosa A, et al. Antibiofilm Potential of Medicinal Plants against. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(9). Epub 20210921. doi: 10.3390/antibiotics10091142. PubMed PMID: 34572724; PubMed Central PMCID: PMC8464735.
- 83.**Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol*. 2019;59(1):3-12. Epub 20180821. doi: 10.1007/s12088-018-0757-6. PubMed PMID: 30728625; PubMed Central PMCID: PMC6328408.
- 84.**Gahlot DK, Taheri N, MacIntyre S. Diversity in Genetic Regulation of Bacterial Fimbriae Assembled by the Chaperone Usher Pathway. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1). Epub 20221222. doi: 10.3390/ijms24010161. PubMed PMID: 36613605; PubMed Central PMCID: PMC9820224.
- 85.**Sanchez-Vizuete P, Orgaz B, Aymerich S, Le Coq D, Briandet R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol*. 2015;6:705. Epub 20150714. doi: 10.3389/fmicb.2015.00705. PubMed PMID: 26236291; PubMed Central PMCID: PMC4500986.
- 86.**Cangui-Panchi SP, Ñacato-Toapanta AL, Enríquez-Martínez LJ, Salinas-Delgado GA, Reyes J, Garzon-Chavez D, et al. Battle royale: Immune response on biofilms - host-pathogen interactions. *Curr Res Immunol*. 2023;4:100057. Epub 20230328. doi: 10.1016/j.crimmu.2023.100057. PubMed PMID: 37025390; PubMed Central PMCID: PMC10070391.
- 87.**Armbruster CR, Parsek MR. New insight into the early stages of biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(17):4317-9. Epub 20180409. doi: 10.1073/pnas.1804084115. PubMed PMID: 29632199; PubMed Central PMCID: PMC5924939.
- 88.**van Hoogstraten SWG, Kuik C, Arts JJC, Cillero-Pastor B. Molecular imaging of bacterial biofilms-a systematic review. *Crit Rev Microbiol*. 2023 Jul 15:1-22. doi: 10.1080/1040841X.2023.2223704.

- 89.**Yu Mi Wi and Robin P. Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2018;32(4):915-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.06.009>.
- 90.**Greiner LL, Edwards JL, Shao J, Rabinak C, Entz D, Apicella MA. Biofilm Formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*. 2005;73(4):1964-70. doi: 10.1128/IAI.73.4.1964-1970.2005. PubMed PMID: 15784536; PubMed Central PMCID: PMC1087446.
- 91.**Steichen CT, Shao JQ, Ketterer MR, Apicella MA. Gonococcal cervicitis: a role for biofilm in pathogenesis. *J Infect Dis*. 2008;198(12):1856-61. doi: 10.1086/593336. PubMed PMID: 18973432; PubMed Central PMCID: PMC2682323.
- 92.**Spurbeck RR, Arvidson CG. *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect Immun*. 2010;78(7):3103-11. Epub 20100412. doi: 10.1128/IAI.01200-09. PubMed PMID: 20385752; PubMed Central PMCID: PMC2897381.
- 93.**Foschi C, Salvo M, Cevenini R, Parolin C, Vitali B, Marangoni A. Vaginal Lactobacilli Reduce. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:502. Epub 20171206. doi: 10.3389/fcimb.2017.00502. PubMed PMID: 29270390; PubMed Central PMCID: PMC5723648.
- 94.**Parolin C, Croatti V, Giordani B, Vitali B. Vaginal Lactobacillus Impair *Candida* Dimorphic Switching and Biofilm Formation. *Microorganisms*. 2022;10(10). Epub 20221021. doi: 10.3390/microorganisms10102091. PubMed PMID: 36296367; PubMed Central PMCID: PMC9609122.
- 95.**Panariello BHD, Klein MI, Dias LM, Bellini A, Costa VB, Barbugli PA, et al. reduces the extracellular matrix components of fluconazole-susceptible. *Biofouling*. 2021;37(9-10):1006-21. Epub 20211118. doi: 10.1080/08927014.2021.2001645. PubMed PMID: 34789040.
- 96.**Al Mahmud A, Shafayet Ahmed Siddiqui, Karim MR, Al-Mamun MR, Akhter S, Sohel M, et al. Clinically proven natural products, vitamins and mineral in boosting up immunity: A comprehensive review. *Heliyon*. 2023;9(4):e15292. Epub 20230407. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e15292. PubMed PMID: 37089292; PubMed Central PMCID: PMC10079597.

- 97.**Subramani R, Narayanasamy M, Feussner KD. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech.* 2017;7(3):172. Epub 20170629. doi: 10.1007/s13205-017-0848-9. PubMed PMID: 28660459; PubMed Central PMCID: PMC5489455.
- 98.**Yoo SR, Ha H, Shin HK, Seo CS. Anti-Inflammatory Activity of Neolignan Compound Isolated from the Roots of *Saururus chinensis*. *Plants (Basel).* 2020;9(8). Epub 20200723. doi: 10.3390/plants9080932. PubMed PMID: 32717911; PubMed Central PMCID: PMC7466048.
- 99.**Saher U, Ovais Omer M, Javeed A, Ahmad Anjum A, Rehman K, Awan T. Soluble laticifer proteins from *Calotropis procera* as an effective candidates for antimicrobial therapeutics. *Saudi J Biol Sci.* 2023;30(6):103659. Epub 20230423. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103659. PubMed PMID: 37181638; PubMed Central PMCID: PMC10172833.
- 100.**Dong R, Pan J, Zhao G, Zhao Q, Wang S, Li N, et al. Antioxidant, antihyperglycemic, and antihyperlipidemic properties of. *Front Nutr.* 2023;10:1168049. Epub 20230428. doi: 10.3389/fnut.2023.1168049. PubMed PMID: 37187875; PubMed Central PMCID: PMC10176510.
- 101.**Ahmed Alrasheed A, Ahmed Alrasheid A, Mohamed Abdalla W, Mohammed Saeed S, Haidar Ahmed H. Antimicrobial and Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of *Rosmarinus officinalis* L. Pod and *Thymus vulgaris* L. Leaf Ethanolic Extracts on *Escherichia coli* Urinary Isolates. *Int J Microbiol.* 2023;2023:4171547. Epub 20230425. doi: 10.1155/2023/4171547. PubMed PMID: 37144024; PubMed Central PMCID: PMC10154087.
- 102.**Tchinang FTK, Ndoyé Foé FM, Keumoe R, Zeuko'o EM, Fekam FB, Etoa FX. In vitro anti-yeast activity, kinetics and mechanism of action of essential oils from two cameroonian medicinal plants. *BMC Complement Med Ther.* 2023;23(1):115. Epub 20230412. doi: 10.1186/s12906-022-03827-3. PubMed PMID: 37046251; PubMed Central PMCID: PMC10091556.
- 103.**Radosavljević I, Satovic Z, di Pietro R, Jug Dujaković M, Varga F, Škrtić D, et al. Phylogeographic structure of common sage (*Salvia officinalis* L.) reveals microrefugia throughout the Balkans and colonizations of the Apennines. *Scientific Reports.* 2022;12(1):15726. doi: 10.1038/s41598-022-20055-4.

- 104.**Khan A, Rehman NU, AlKharfy K, Gilani A-u. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* (Sage) are mediated through activation of K<sup>+</sup> channels. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2011;6:111-6. doi: 10.3329/bjp.v6i2.9156.
- 105.**Mendes FSF, Garcia LM, Moraes TDS, Casemiro LA, Alcântara CB, Ambrósio SR, et al. Antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. *Anaerobe*. 2020;63:102194. Epub 20200320. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102194. PubMed PMID: 32205191.
- 106.**Brindisi M, Bouzidi C, Frattaruolo L, Loizzo MR, Cappello MS, Dugay A, et al. New Insights into the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Italian. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2). Epub 20210219. doi: 10.3390/antiox10020311. PubMed PMID: 33669555; PubMed Central PMCID: PMC7922507.
- 107.**Ghorbani A, Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med*. 2017;7(4):433-40. Epub 20170113. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014. PubMed PMID: 29034191; PubMed Central PMCID: PMC5634728.
- 108.**Malik MA, Albeladi SS, Al-Maaqar SM, Alshehri AA, Al-Thabaiti SA, Khan I, et al. Biosynthesis of Novel Ag-Cu Bimetallic Nanoparticles from Leaf Extract of *Salvia officinalis* and Their Antibacterial Activity. *Life (Basel)*. 2023;13(3). Epub 20230227. doi: 10.3390/life13030653. PubMed PMID: 36983809; PubMed Central PMCID: PMC10099723.
- 109.**Sookto T, Srithavaj T, Thaweboon S, Thaweboon B, Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(5):376-80. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60080-5. PubMed PMID: 23646301; PubMed Central PMCID: PMC3642447.
- 110.**Ahangari F, farshbaf-khalili A, Javadzadeh Y, Adibpour M, Sadeghzadeh B. Comparing the effectiveness of *Salvia officinalis*, clotrimazole and their combination on vulvovaginal candidiasis: A randomized, controlled clinical trial. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019;45. doi: 10.1111/jog.13918.
- 111.**Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(6):1466-72. Epub 20100315. doi: 10.1016/j.fct.2010.03.012. PubMed PMID: 20233600.

- 112.** Camejo-Rodrigues J, Ascensão L, Bonet MÀ, Vallès J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;89(2):199-209. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00270-8).
- 113.** Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J Ethnopharmacol*. 2004;93(2-3):183-95. doi: 10.1016/j.jep.2004.02.015. PubMed PMID: 15234752.
- 114.** Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araújo ME. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*. 2006;108(1):31-7. Epub 20060428. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.010. PubMed PMID: 16737790.
- 115.** Razavi SM, Zarrini G, Molavi G, Ghasemi G. Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2011;14(6):574-9. PubMed PMID: 23493458; PubMed Central PMCID: PMC3586856.
- 116.** Sharifi-Rad J, Melgar-Lalanne G, Hernández-Álvarez AJ, Taheri Y, Shaheen S, Kregiel D, et al. *Malva* species: Insights on its chemical composition towards pharmacological applications. *Phytother Res*. 2020;34(3):546-67. Epub 20191111. doi: 10.1002/ptr.6550. PubMed PMID: 31713320.
- 117.** Almasian A, Najafi F, Eftekhari M, Ardekani MRS, Sharifzadeh M, Khanavi M. Polyurethane/carboxymethylcellulose nanofibers containing *Malva sylvestris* extract for healing diabetic wounds: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;114:111039. Epub 20200501. doi: 10.1016/j.msec.2020.111039. PubMed PMID: 32994005.
- 118.** Alizadeh F, Khodavandi A, Faraji F. *Malva sylvestris* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. *Journal of Herbmед Pharmacology*. 2017;6:62-8.
- 119.** Thompson GD, Robertson MP, Webber BL, Richardson DM, Le Roux JJ, Wilson JR. Predicting the subspecific identity of invasive species using distribution models: *Acacia saligna* as an example. *Diversity and Distributions*. 2011;17(5):1001-14. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00820.x>.
- 120.** Elansary HO, Szopa A, Kubica P, Ekiert H, Al-Mana F, Al-Yafarsi MA. Antioxidant and Biological Activities of *Acacia saligna* and *Lawsonia inermis* Natural

Populations. *Plants (Basel)*. 2020;9(7). Epub 20200717. doi: 10.3390/plants9070908. PubMed PMID: 32709119; PubMed Central PMCID: PMC7411707.

**121.**Al-Huqail AA, Behiry SI, Salem MZM, Ali HM, Siddiqui MH, Salem AZM. Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities of *Acacia Saligna* (Labill.) H. L. Wendl. Flower Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Compounds. *Molecules*. 2019;24(4). Epub 20190215. doi: 10.3390/molecules24040700. PubMed PMID: 30781352; PubMed Central PMCID: PMC6412425.

**122.**Abdallah HMI, Ammar NM, Abdelhameed MF, Gendy AE, Ragab TIM, Abd-ElGawad AM, et al. Protective Mechanism of *Acacia saligna* Butanol Extract and Its Nano-Formulations against Ulcerative Colitis in Rats as Revealed via Biochemical and Metabolomic Assays. *Biology (Basel)*. 2020;9(8). Epub 20200730. doi: 10.3390/biology9080195. PubMed PMID: 32751448; PubMed Central PMCID: PMC7463518.

**123.**Jalab J, Abdelwahed W, Kitaz A, Al-Kayali R. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Acacia cyanophylla* and its antibacterial activity. *Heliyon*. 2021;7(9):e08033. Epub 20210920. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08033. PubMed PMID: 34611564; PubMed Central PMCID: PMC8477989.

**124.**Decreto-Lei nº 90/90 de 16 de Março do Ministério da Indústria e Energia. *Diário da República: I série, No 63 1990 p. 1296–304.*

**125.**Oliveira L, Teixeira F, Carvalho J, Monteiro C, Cantista P. *Manual de Boas Práticas dos Estabelecimentos Termais*. 2009.

**126.**Dalla Via G. *A Hidroterapia: a cura pela água*. 1st ed. Lisboa: Estampa; 1997.

**127.**Barata A, Filipe M. *Roteiro das termas de Portugal*. 1st ed. Lisboa: Caminho; 1999.

**128.**Midões C, Fernandes J, Costa C. *Água subterrânea: conhecer para proteger e preservar*. 2001.

**129.**Picoto A. Mineral water and spas in Portugal. *Clin Dermatol*. 1996;14(6):637–46.

**130.**Schlesinger H, Porto H. *Líderes religiosos da humanidade - Volume I*. 1st ed. São Paulo: Edições Paulinas; 1986.

**131.**Carvalho J, et al. Prospeção e pesquisa de recursos hidrominerais e de água de nascente do Maciço Antigo Português. *Boletim de minas*. 2007;42(2):161–96.

- 132.** Simões MM. Águas minerais portuguesas - da sua caracterização físico-química ao esboço duma classificação. *Boletim de minas*. 1993;30(1):13–26.
- 133.** Carvalho H. Guia de análise química das águas. Lisboa; 1961.
- 134.** Lourenço, C. Águas Minerais Naturais - do Conhecimento à Gestão, Exploração e Valorização. Congresso Internacional de Termalismo. Chaves, 2019.
- 135.** Aires-Barros L, Marques J, Graça R. Elemental and isotopic geochemistry in the hydrothermal area of Chaves, Vila Pouca de Aguiar (northern Portugal). *Environ Geol*. 1995;25(4):232–8.
- 136.** Quattrini S, Pampaloni B, Brandi ML. Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2016;13(3):173-80. Epub 2017 Feb 10. doi: 10.11138/ccmbm/2016.13.3.173.
- 137.** Merial-Kieny C, Mengual X, Guerrero D, Sibaud V. Clinical efficacy of Avène hydrotherapy measured in a large cohort of more than 10,000 atopic or psoriatic patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(1):30–4.
- 138.** Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, Nakajima S, Nomura T, Kaplan D, et al. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol*. 2018;19(12):1286–98.
- 139.** Eliasse Y, Redoules D, Espinosa E. Impact of Avène Thermal Spring Water on immune cells. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2020;34(S5):21–6.
- 140.** Wynn E, Raetz E, Bruckhardt P. The composition of mineral waters sourced from Europe and North America in respect to bone health: composition of mineral water optimal for bone. *Br J Nutr*. 2009;101(8):1195–204.
- 141.** Roux S, Baudoin C, Boute D, Brazier M. Biological effects of drinking-water mineral composition on calcium balance and bone remodeling markers. *J Nutr Health Aging*. 2004;8(5):380–4.
- 142.** Jiang L, He P, Chen J, Liu Y, Liu D. Magnesium Levels in Drinking Water and Coronary Heart Disease Mortality Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients*. 2016;8(1):5.
- 143.** Stoots S, Kamphuis G, Geraghty R, Vogt L, Henderickx M, Hameed B, et al. Global variations in the mineral content of bottled still and sparkling water and a

description of the possible impact on nephrological and urological diseases. *J Clin Med*. 2021;10(13):2807.

**144.**Chaves - Termas & SPA. Indicações terapêuticas [Internet]. [cited 2023 Jul 31]. Available from: <https://www.termasdechaves.com/indicacoes-terapeuticas/>.

**145.**Chaves - Termas & SPA. As águas termais [Internet]. [cited 2023 Jul 31]. Available from: <http://www.termasdechaves.com/medico-termal/as-aguas-termais/>.

**146.**Belkacem A, Caumes E, Ouanich J, Jarlier V, Dellion S, et al. Changing patterns of disseminated gonococcal infection in France: cross-sectional data 2009–2011. *Sex Transm Infect*. 2013;89:613–615. doi: 10.1136/sextrans-2013-051119.

**147.**Liu Y, Perez J, Hammer LA, Gallagher HC, De Jesus M, et al. Intravaginal administration of interleukin 12 during genital gonococcal infection in mice induces immunity to heterologous strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *mSphere*. 2018;3:e00421-17. doi: 10.1128/mSphere.00421-17.

**148.**Kraus SJ. Incidence and therapy of gonococcal pharyngitis. *Sex Transm Dis*. 1979;6:143–147. doi: 10.1097/00007435-197904000-00019.

**149.**Bernstein KT, Marcus JL, Nieri G, Philip SS, Klausner JD. Rectal gonorrhea and chlamydia reinfection is associated with increased risk of HIV seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53:537–543. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181c3ef29.

**150.**Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;110(1):66–72.

**151.**Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17(3):340–5.

**152.**Mayer F.L., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4:119–128. doi: 10.4161/viru.22913.

**153.**Zeng X., Zhang Y., Zhang T., Xue Y., Xu H., An R. Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. *Biomed Res. Int*. 2018;2018:9703754. doi: 10.1155/2018/9703754.

- 154.**Duggan S, Leonhardt I, Hünninger K, Kurzai O. Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis. *Virulence*. 2015;6(4):316-26. doi: 10.4161/21505594.2014.988096. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25785541; PMCID: PMC4601378.
- 155.**Armstrong E, Kaul R. Beyond bacterial vaginosis: vaginal lactobacilli and HIV risk. *Microbiome*. 2021 Dec 10;9(1):239. doi: 10.1186/s40168-021-01183-x. PMID: 34893070; PMCID: PMC8665571.
- 156.**Cappello C., Acin-Albiac M., Pinto D., Polo A., Filannino P., Rinaldi F., et al.. (2023). Do nomadic lactobacilli fit as potential vaginal probiotics? the answer lies in a successful selective multi-step and scoring approach. *Microb. Cell Fact.* 22, 27. doi: 10.1186/s12934-023-02030-4.
- 157.**Shen X., Xu L., Zhang Z., Yang Y., Li P., Ma T., et al.. (2023). Postbiotic gel relieves clinical symptoms of bacterial vaginitis by regulating the vaginal microbiota. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 13. doi: 10.3389/fcimb.2023.1114364.
- 158.**Chee W. J. Y., Chew S. Y., Than L. T. L. (2020). Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb. Cell Fact.* 19, 203. doi: 10.1186/s12934-020-01464-4.
- 159.** Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2013 Aug 12;10(5):210-29. doi: 10.4314/ajtcam.v10i5.2. PMID: 24311829; PMCID: PMC3847409.
- 160.**Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C, Bezirtzoglou E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*. 2021 Sep 27;9(10):2041. doi: 10.3390/microorganisms9102041. PMID: 34683362; PMCID: PMC8541629.
- 161.**Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti I, Gambari R, Cinatl J, Doerr HW. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chem. Biodivers.* 2008;5:461–470. doi: 10.1002/cbdv.200890045.
- 162.**Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Gerothanassis IP, Tzakos AG. Phytochemical profile of *Rosmarinus*

*officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. Food Chem. 2013;136:120–129. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.091.

**163.** Farimani MM, Bahadori MB, Koulaei SA, Salehi P, Ebrahimi SN, Khavasi HR, Hamburger M. New ursane triterpenoids from *Salvia urmiensis* Bunge: Absolute configuration and anti-proliferative activity. Fitoterapia. 2015;106:1–6. doi: 10.1016/j.fitote.2015.07.017.

**164.** Batiha GE, Tene ST, Teibo JO, Shaheen HM, Oluwatoba OS, Teibo TKA, Al-Kuraishy HM, Al-Garbee AI, Alexiou A, Papadakis M. The phytochemical profiling, pharmacological activities, and safety of malva sylvestris: a review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2023 Mar;396(3):421-440. doi: 10.1007/s00210-022-02329-w.

**165.** Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. Food Chem. Toxicol. 2010, 48, 1466–1472. 10.1016/j.fct.2010.03.012.

**166.** Daniela A, Pichichero E, Canuti L, Cicconi R, Karou D, D’Arcangelo G, Canini A. Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic activity in cancer cells. Caryologia 2007, 60, 90–95. 10.1080/00087114.2007.10589552.

**167.** Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett B. C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 2008, 118, 418–428. 10.1016/j.jep.2008.05.005.

**168.** Sleiman N, Daher C. Malva sylvestris water extract: a potential anti-inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. Planta Med. 2009, 75, PH10 10.1055/s-0029-1234727.

**169.** DellaGreca M, Cutillo F, Abrosca BD, Fiorentino A, Pacifico S, Zarrelli A. Antioxidant and radical scavenging properties of *Malva sylvestris*. Nat. Prod. Commun. 2009, 4, 893–896. 10.1177/1934578X0900400702.

**170.** Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F, Della Loggia R. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant

activities of Mediterranean dietary plants. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 116, 144–151. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.015.

**171.**El-Toumy S, Salib J, Mohamed W, Morsy F. Phytochemical and Antimicrobial Studies on *Acacia saligna* Leaves. *Egyptian Journal of Chemistry.* 2010;53(5):705-17. doi: 10.21608/ejchem.2010.1259.

**172.**Gumgumjee N, Hajar A. Antimicrobial efficacy of *Acacia saligna* (Labill.) H.L.Wendl. and *Cordia sinensis* Lam. leaves extracts against some pathogenic microorganisms. *International Journal of Microbiology and Immunology Research.* 2015;3(4).

**173.**Akiyama H, Yamasaki O, Tada J, Kubota K, Arata J. Antimicrobial effects of acidic hot-spring water on *Staphylococcus aureus* strains isolated from atopic dermatitis patients. *J Dermatol Sci.* 2000;24(2):112–8.

**174.**Ionescu AC, Mattina R, Brambilla E, Ralli M, Passali FM, Passali D. Antibacterial and antibiofilm effects of radioactive thermal water. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021 May;25(9):3576-3584. doi: 10.26355/eurrev\_202105\_25840.