



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Actividade antimicrobiana do Chá Verde dos
Açores e sobre *Gardnerella vaginalis* e
Lactobacillus spp.**

Daniela Patrícia Abrantes Marques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira
Co-Orientador: Professora Doutora Branca Maria Cardoso Monteiro da Silva

Covilhã, Outubro de 2014

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Apesar de este trabalho ser individual, há contributos de diversas formas que tornaram possível a elaboração do mesmo, desde já o meu muito obrigado.

À Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira pela disponibilidade e atenção na orientação do trabalho, assim como pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de integração numa equipa de investigação.

À Professora Doutora Branca Silva pela disponibilidade e oportunidade de elaborar investigação numa área que me fascina.

Ao Professor Doutor Nuno Cerca (U. Minho) pela gentil cedência das estirpes de *Gardnerella*.

A toda a equipa do CICS, em especial aos colegas e amigos, Carlos Gaspar, Ana Oliveira, Tiago Barata, Diana Sousa e Daniela Machado (U. Minho), por todo o apoio, conhecimentos e cumplicidade que partilhámos.

Aos meus pais por serem quem são e por me terem ensinado todos os valores, por estarem presentes e por todo o apoio possível. Impossível agradecer tudo o que fazem por mim.

Ao Jajão e Sandra M., à Nininha e Luís, por todo o apoio, carinho e força que me deram em todas as etapas da minha vida. À Sandra S. por isto tudo também desde que entrou na família. Aos meus sobrinhos Mariana e Tiago por não me fazerem esquecer como é bom ser criança.

A todos os que me acompanharam, em especial à Andreia, Diana G., Pedro V., Diana R., Melissa, Gonçalo P., Liliana, Filipe, Guilherme, Gonçalo S., Sílvio, Francisco, Edgar, Rodrigo, Carolina e Jorge, Denise, Tânia, Marco e Gonçalo P. por toda a amizade, carinho e paciência (muita), por me fazerem sorrir e por nunca me deixarem desistir. Sem vocês nada era igual. Obrigada.

Resumo

A maior causa de consulta médica por parte das mulheres são as infecções vaginais e tem sido descrita uma procura maior de produtos com base em compostos naturais para o seu tratamento. A bacteriose vaginal é a infecção genital mais comum considerando-se que a presença de *Gardnerella vaginalis* parece ser a principal causa etiológica visto estar descrita em 95% dos casos. Esta bactéria é anaeróbia, Gram negativa mas com alguma variabilidade na coloração, dependendo da fase de crescimento em que se encontra e possui uma grande capacidade de adesão importante na patologia e diagnóstico de bacteriose vaginal pela formação de células epiteliais vaginais esfoliadas revestidas com *G. vaginalis*, conhecidas como "clue cells". Diversos estudos têm como objecto a actividade antimicrobiana de compostos naturais devido ao aumento das resistências dos microrganismos aos antibióticos convencionais, criando assim uma terapêutica alternativa. Por outro lado a população lactobacilar parece desempenhar um papel protector, visto o seu papel probiótico, sendo a sua presença utilizada como um dos marcadores de flora vaginal normal. O uso de chá de *Camellia sinensis* em estudos científicos indica que é uma fonte natural e pouco dispendiosa de polifenóis, tais como os derivados de catequinas, que são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. Os benefícios do chá estão relacionados com a elevada quantidade de catequinas que constituem cerca de 30% do peso seco das folhas, sendo as principais a (-) epicatequina (EC), (-) epicatequina-3-galhato (ECG), (-) epigalocatequina (EGC) e (-) epigalocatequina-3-galhato (EGCG), sendo esta última catequina a que se encontra em maior quantidade no chá verde. Neste trabalho laboratorial avaliou-se o potencial antimicrobiano do extrato aquoso de chá verde dos Açores sobre estirpes de *Gardnerella vaginalis*, verificou-se a sobrevivência dos *Lactobacillus* spp. aquando da aplicação deste extrato aquoso e avaliou-se o mecanismo de acção do extrato aquoso de chá verde em *Gardnerella vaginalis* por citometria de fluxo. Os resultados sugerem que as estirpes de *Lactobacillus* spp. sobrevivem na presença do extrato aquoso de chá verde e as estirpes de *Gardnerella vaginalis* são susceptíveis ao mesmo extracto em concentração de CMI de 0,63mg/mL. Os resultados de citometria mostraram-se inconclusivos para este estudo. Deste modo, o extrato aquoso de chá verde dos Açores apresenta-se como um potencial agente terapêutico natural e de baixo custo, com potencial interesse nomeadamente na bacteriose vaginal.

Palavras-chave

Gardnerella vaginalis; bacteriose vaginal; *Camellia sinensis*; chá verde dos Açores; actividade antimicrobiana.

Abstract

Vaginal infections are the biggest cause of medical counsel by women and has been described an increased on demand for products based on natural compounds for their treatment. Bacterial vaginosis is the most frequent genital infection and the main etiological cause seems to be the presence of *Gardnerella vaginalis*, described in 95% of clinical cases. This is an anaerobic bacteria and Gram negative with coloration variable depending its growth stage and its adhesion capacity have an important role on diagnosis and pathology of bacterial vaginosis on formation of revested exfoliated vaginal epithelial cells with *G. vaginalis*, known as clue cells. Several studies are focused in antimicrobial activity of natural compounds due to increasing resistance of microorganisms to conventional antibiotics thus originate an alternative therapy. The lactobacilar population plays an importante role on protection due to its probiotic activity and its presence has been used as marken on normal vaginal flora. The use of *Camellia sinensis* tea on cientific studies presents that this tea is a natural and inexpensive source of polyphenols, as catechins derivates, known by its antimicrobial properties. Tea benefits are related with high amount of catechins, representing 30% of their dry weight of leaves, which the principals catechins are epicatechin (EC), (-) epicatechin-3-gallate (ECG), (-) epigallocatechin (EGC) and (-) epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the last one is present in large amount in green tea. On this laboratorial study the antimicrobial potencial of aquous green tea from Azores extract has been rated on *G. vaginalis* strains and on *Lactobacillus* spp. survival and the action mechanism of green tea extract has been tested by flux cytometry. The results sugest strains of *Lactobacillus* spp. survive on green tea extract presence and strains of *Gardnerella vaginalis* present susceptibility at this extract which MIC value is 0,63mg/mL. The results of flux cytometry were inconclusive on this study. Thus, aquous green tea from Azores extract can be a potential natural terapeuthical agent and inexpensive against genital infections, mainly in bacterial vaginosis.

Keywords

Gardnerella vaginalis; bacterial vaginosis; *Camellia sinensis*; Green tea from Azores; antimicrobial activity.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Palavras-chave	vi
Abstract	viii
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Bacteriose Vaginal	2
2.1. Aspectos Gerais	2
2.2. Gardnerella vaginalis	3
2.3. Importância dos <i>Lactobacillus</i> spp. na bacteriose vaginal	4
2.4. Estratégias terapêuticas	5
Capítulo 3 - O Chá Verde como agente terapêutico	7
3.1. Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	7
3.1.3. Mecanismo de Acção	9
3.1.4. Chá verde dos Açores	10
Capítulo 4 - Objectivos	11
Capítulo 5 - Materiais e Métodos	12
5.1. Microrganismos	12
5.2. Preparação do extrato aquoso de Chá Verde dos Açores	12
5.3. Actividade antimicrobiana	13
5.3.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	13
5.3.2. Avaliação da concentração mínima letal (CML)	14
5.4. Citometria de Fluxo	15
5.5. Equipamento	16
5.6. Reagentes	17
Capítulo 6 - Resultados e Discussão	18
Capítulo 7 - Conclusões e Perspectivas Futuras	20
Referências Bibliográficas	21

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura das principais catequinas presentes no chá verde. (-) Epigalhocatequina, (-) epicatequina, (+) catequina, (-) epicatequina 3-galhato, (-) epigalhocatequina 3-galhato. Adaptado de [34]. 8

Figura 2 - Embalagem das Plantações de Chá Gorreana, Lda (S. Miguel, Açores) 13

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos equipamentos utilizados	16
Tabela 2 - Lista de reagentes usados ao longo do trabalho experimental	17
Tabela 3 - Actividade anti-Gardnerella vaginalis do extrato aquoso de Chá Verde. CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CML (Concentração Mínima Letal) foram determinados por microdiluição e estão expressos em mg/mL (w/v). Os ensaios foram realizados em duplicado e os resultados foram obtidos com bases em três experiências independentes concordantes.	18
Tabela 4 - Classificação da actividade antimicrobiana de um extracto vegetal em valores de CMI (mg/mL). Adaptado de [71]	19

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BV	Bacteriose vaginal
BHI	Brain Heart Infusion
sBHI	Brain Heart Infusion suplementado
CBA	Columbia Blood Agar
CDC	Citolisina dependente de colesterol
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
CML	Concentração mínima letal
CVV	Candidose vulvovaginal
EC	(-) epicatequina
ECG	(-)epicatequina-3-galhato
EGC	Epigalhocatequina
EGCG	(-)epigalhocatequina-3-galhato
FDA	Food and Drug Administration
IP	Iodeto de propídeo
IST	Infecção sexual transmissível
LAB	Lactic acid bactéria
UFC	Unidades formadoras de colónias
VIH	Vírus imunodeficiência humana
VLY	Vaginolisina

Capítulo 1 - Introdução

As infecções genitais são a maior causa de consulta médica por parte das mulheres, uma vez que tendem a causar desconforto [1]. Este tipo de infecções pode provocar doença inflamatória pélvica, cancro cervical, infertilidade, aborto espontâneo e gravidez ectópica que poderá levar ao óbito materno. A bacteriose vaginal (BV) é a infecção genital mais comum em mulheres, sendo mais prevalente que a candidose vulvovaginal (CVV) e que a tricomoníose [2]. A BV é uma infecção caracterizada pela substituição de *Lactobacillus* spp. vaginais por várias bactérias endógenas anaeróbias, tais como *Mobiluncus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Mycoplasma hominis* e *Peptostreptococcus* spp., contudo a presença de *Gardnerella vaginalis* em 95% dos casos clínicos, parece ser a principal bactéria patogénica. Dado que esta infecção é polimicrobiana, o seu tratamento é mais complexo, uma vez que há aumento da resistência dos microrganismos envolvidos [3], [4]. O aumento da resistência de BV à terapia com antibióticos clássicos (metronidazol e clindamicina) e a elevada frequência de recorrências mesmo após tratamento clínico, sugerem a necessidade de explorar melhor a evolução desta doença antes, durante e a após o tratamento com estes fármacos. Assim, é importante desenvolver e validar novas estratégias terapêuticas que apresentem outros mecanismos de acção ou mecanismos de prevenção de resistência [5].

Uma estratégia de tratamento pode ser o uso de probióticos para colonizar o tracto vaginal e prevenir ou tratar infecções, pois esta foi considerada uma excelente medida segura. [6]. Contudo, a estabilidade de produtos probióticos é questionada e a documentação de efeitos específicos nas estirpes é limitada, impedindo a recomendação para a terapia de BV [7], [8]. Outra das terapêuticas possíveis é a utilização de plantas medicinais que têm sido consideradas uma fonte de agentes antimicrobianos, pois contêm inúmeros metabolitos secundários que são usados como fonte de fármacos e que aumentam a eficácia dos antibióticos [9], [10]. Assim, os produtos naturais tornam-se uma alternativa terapêutica aos antibióticos clássicos. Os efeitos terapêuticos do chá verde são reconhecidos cientificamente e tem sido usado como fonte antimicrobiana devido à elevada concentração de catequinas na sua composição. A catequina que se encontra em maior quantidade no chá verde é a (-) epigalocatequina-3-galato e está ligada com a actividade antimicrobiana deste chá [11], [12]. A utilização de chá verde para tratamento de infecções vaginais tem sido estudada e há evidências da sua aplicabilidade terapêutica [13], [14].

O crescente aumento da resistência aos antibióticos leva à necessidade de investigar novos agentes microbianos que consigam disseminar as infecções genitais. Assim, este estudo contempla a actividade antimicrobiana do chá verde sobre a *Gardnerella vaginalis* e espécies de *Lactobacillus* spp. probióticas vaginais.

Capítulo 2 - Bacteriose Vaginal

2.1. Aspectos Gerais

A bacteriose vaginal é, actualmente, a infecção vaginal mais comum e é frequente em mulheres sexualmente activas. Grávidas e mulheres com doenças sexualmente transmissíveis constituem o grupo de risco na BV, mas esta infecção também pode surgir após a menopausa [15]. A BV é uma infecção resultante da alteração polimicrobiana na ecologia vaginal onde existe um desequilíbrio microbiano complexo, pertencendo aos *Lactobacillus* spp. desempenhar um papel importante neste processo [16]. A BV não é causada por um só agente infeccioso, embora a *Gardnerella vaginalis* esteja presente em 95% dos casos clínicos tendo sido atribuído um papel significativo na etiologia da infecção. A etiologia da BV ainda não está totalmente compreendida, mas é reconhecido o envolvimento de espécies de microrganismos como *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Mycoplasma hominis* e *Peptostreptococcus* spp., para além da *Gardnerella vaginalis*, na patofisiologia desta infecção [3], [17], [18]. A bacteriose vaginal é caracterizada pela substituição dos *Lactobacillus* spp. vaginais por estes microrganismos anaeróbios mencionados [4], [19].

O diagnóstico da BV baseia-se na verificação de três em quatro critérios clínicos descritos por Amsel *et al.* (1983) conhecidos pelo mesmo nome que incluem: um pH vaginal superior a 4.5; corrimento vaginal branco, fino e homogéneo aderente à parede vaginal; presença de "clue cells" e teste positivo para aminas no fluido vaginal quando adicionado KOH a 10%, revelado pelo odor a peixe podre [20]. Um outro critério de diagnóstico distinto do anterior é o de conceito microbiológico conhecido como índice de Nugent. Este método consiste na observação microscópica do esfregaço do fluido vaginal em lâmina corada pela técnica de Gram, o que permite classificar a amostra segundo uma escala de pontuação, de 0 a 10 pontos, baseada na contagem no campo microscópico observado de células bacterianas de *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp. e *G. vaginalis*. Todos os pontos são somados de modo a obter a classificação final que permite a avaliação do estado clínico sendo que de 0-3 pontos é considerada flora lactobacilar normal; 4-6 pontos flora intermediária e ≥ 7 pontos será diagnóstico positivo de bacteriose vaginal [21].

2.2. *Gardnerella vaginalis*

A *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*) foi descrita inicialmente como sendo o único patógeno associado a BV [22]. Esta bactéria continua a estar muito relacionada com a causa etiológica desta infecção e tem sido alvo de estudo associado a complicações do tracto vaginal [23], [24]. A *G. vaginalis* é um bacilo pequeno e pleomórfico, Gram negativo mas com variabilidade na coloração, pois depende da fase de crescimento em que se encontra. Em fase exponencial observa-se que retém o cristal violeta, mas na fase de crescimento com o decréscimo da parede de peptidoglicano apresenta-se Gram negativa [25].

A microscopia electrónica revelou que a *G. vaginalis* possui fímbrias consideradas responsáveis pela adesão das bactérias à superfície das células epiteliais vaginais esfoliadas, formando então as "clue cells" características da BV. Esta adesão torna-se num factor de patogenicidade, visto que, permite a colonização de *G. vaginalis*, minimizando assim o contacto com enzimas extracelulares tóxicas e anticorpos locais reduzindo a probabilidade de eliminação pelo fluido vaginal ou pela urina [25]. Outro factor de virulência descrito para a *G. vaginalis* e que poderá estar na causa da recorrência da BV é a elevada capacidade para formação de biofilmes [24]. Um biofilme é considerado uma comunidade microbiana composta por células que estão ligadas a uma interface e incorporadas numa matriz de expopolissacarídeos, este nível de organização estrutural confere eficiência metabólica aos biofiomes e confere, também, resistência natural a agentes antimicrobianos [26]. Esta bactéria apresenta sensibilidade ao peróxido de hidrogénio e ao ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus* spp., surgindo como mecanismo natural de defesa do organismo no equilíbrio da flora vaginal; com a formação de biofilmes essa sensibilidade está diminuída e foi sugerido num estudo que poderia ser um mecanismo de patogenicidade assim como uma explicação para a recorrência da infecção [27]. A *G. vaginalis* produz uma toxina proteica que actua como a hemolisina, a sua actividade lítica é específica para eritrócitos humanos, neutrófilos e células endoteliais, pois reconhece a molécula regulatória do complemento CD59. A toxina é da família das citolisinas dependentes de colesterol (CDC) e foi sugerido o nome de vaginolisina (VLY) [28], [29].

De modo a permitir uma melhor explicação acerca da epidemiologia de BV na ocorrência de *G. vaginalis* em mulheres assintomáticas, foram estudadas as diferenças no biótipo baseadas na lipase, hidrólise do hipurato e nas reacções β -galactosidase. Estes estudos permitiram o estabelecimento de uma relação entre biótipos e uma ecologia vaginal saudável onde se observou aquisição de uma nova estirpe de *G. vaginalis*. Os autores verificaram que as estirpes envolvidas neste processo eram capazes de expressar a síntese da lipase que é considerada factor de virulência noutras espécies. Assim, para além do crescimento elevado

de estirpes de *G. vaginalis* colonizadoras, a BV parece estar relacionada com a aquisição de uma estirpe mais virulenta que as anteriormente presentes [30], [31].

2.3. Importância dos *Lactobacillus* spp. na bacteriose vaginal

Os microrganismos que se encontram no corpo humano na presença de hospedeiros intrínsecos podem sofrer alterações ao nível do estágio do ciclo de vida, dos níveis hormonais, das respostas imunitárias, do estado nutricional ou de estados de doença. Assim, o microambiente vaginal também pode ser alterado por factores externos como a exposição ambiental, a competição microbiana interespecies ou comensalismo ou hábitos de higiene [32]. A importância dos *Lactobacillus* spp. na manutenção de uma ecologia saudável é consensual e estão envolvidos na prevenção de doenças, incluindo a BV, infecções do tracto urinário, vaginites e doenças sexualmente transmissíveis incluindo o vírus da imunodeficiência humana (VIH). Na realidade, a ausência ou diminuição da colonização vaginal por *Lactobacillus* spp. produtores de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é frequentemente considerada causa do desenvolvimento de BV [33].

Os mecanismos pelos quais os *Lactobacillus* spp. promovem uma flora vaginal saudável baseiam-se na produção de compostos antimicrobianos (peróxido de hidrogénio, ácido láctico, bacteriocinas) e na capacidade de aderir e competir pelos locais de adesão na vagina. Os *Lactobacillus* spp. possuem a capacidade de acidificar o tracto vaginal pela produção de ácido láctico, esta capacidade permite a prevenção da colonização e proliferação de organismos estranhos na vagina [6]. Reconhecendo a incapacidade da produção de catalase das espécies patogénicas envolvidas na BV, a toxicidade natural do peróxido de hidrogénio é proposto como um mecanismo de defesa [34]. As bacteriocinas são proteínas ou péptidos antimicrobianos produzidos por todos os *Lactobacillus* spp.. Este tipo de proteínas tem a capacidade de formação de poros nas membranas citoplasmáticas, interfere com as reacções enzimáticas celulares (incluindo a síntese da parede celular) e na actividade da nuclease. Estes mecanismos todos inibem o crescimento de outras espécies vaginais e interferem na aderência dessas espécies estranhas às células epiteliais vaginais [35]. A aderência é a preparação para a colonização e o primeiro passo para a formação de biofilmes tendo um papel crítico na patogénese das infecções. Os *Lactobacillus* spp. inibem a aderência da *G. vaginalis* causadora de BV pelo impedimento esteriouquímico ou pela dissimulação de receptores [35].

2.4. Estratégias terapêuticas

Tendo em conta a sua natureza polimicrobiana, o tratamento, a cura e o controlo das recorrências da BV são muito mais complexos e difíceis de alcançar do que no caso das infecções causadas por um único patogénio. Os antibióticos geralmente utilizados no tratamento de BV são o metronidazol e a clindamicina, sendo a administração oral ou tópica [36].

Sendo conhecida a elevada taxa de resistência à antibioterapia, têm surgido novas terapêuticas para a bacteriose vaginal.

Uma das estratégias propostas é o uso de terapia com base em probióticos tendo vindo a ser discutido pela comunidade científica se as estirpes específicas de *Lactobacillus* spp. são mais vantajosamente administradas oralmente ou intravaginal, se são capazes de colonizar as vaginas de mulheres com bacteriose vaginal sintomática ou não sintomática, se têm a capacidade de reduzir a colonização de patogénicos e se melhoram os sintomas ou sinais de bacteriose vaginal quando estão presentes [37]. Num estudo baseado neste tema, observou-se que a administração de *Lactobacillus* spp. foi associada com a taxa de cura de bacteriose vaginal quando comparada com a terapêutica clássica de antibióticos. A combinação destes agentes protectores com antibióticos foi associada a um aumento da taxa de cura de bacteriose vaginal relativamente a terapia apenas com administração oral de metronidazole [7].

Uma outra alternativa terapêutica válida é a utilização de comprimidos vaginais de vitamina C, que por redução do pH vaginal induz a inibição dos microrganismos incapazes de crescer a pH ácido, como é o caso das espécies envolvidas na patogenia da bacteriose vaginal. Verificou-se que após o tratamento com antibiótico clássico para a bacteriose vaginal, a utilização deste composto reduziu o risco de recorrência provavelmente pelo restabelecimento da flora normal de *Lactobacillus* spp. capaz de manter o pH vaginal [38], [39].

Adicionalmente, tem vindo a ser descrito o recurso ao uso de produtos com base natural pelas mulheres com vaginites ou vaginoses [40]. Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objectivo de encontrar novos compostos naturais capazes de solucionar as condições clínicas das infecções genitais como alternativa à terapêutica com antibióticos clássicos [13], [14].

Os medicamentos comercializados com base em plantas, tais como *Zataria multiflora* em creme vaginal (Loucorex®) demonstrou ser tão efectivo como o tratamento de bacteriose vaginal com gel de metronidazol [41]. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é utilizado tradicionalmente na Austrália pelas suas características antimicrobianas, no tratamento da bacteriose vaginal [9] .

Visto ter vindo a ser demonstrada a eficácia de alguns extractos de plantas, a sua utilização como substância activa no desenvolvimento de novos produtos terapêuticos de base natural tem surgido como uma interessante estratégia [9], [42], [43]. A existência de produtos à base de plantas já comercializados, com vista ao tratamento de infecções genitais, vem provar que estudos mais aprofundados na aplicação de extratos naturais para o tratamento de bacteriose vaginal, deverão ser efectuados, de modo a aumentar e diversificar as alternativas terapêuticas [14], [41].

Capítulo 3 - O Chá Verde como agente terapêutico

3.1. Chá Verde (*Camellia sinensis* L.)

O chá é conhecido como a bebida mais consumida no mundo e é descrito como uma infusão de um conjunto de folhas processadas da planta *Camellia sinensis* [44]. Ao longo dos tempos foram surgindo estudos que comprovam os efeitos biológicos do chá tanto a nível fisiológico como a nível farmacológico tendo como principais efeitos antioxidante, antimicrobiano, anti-cancerígeno e prevenção de doenças cardiovasculares [45]-[47].

3.1.1. Composição Química

A composição química do chá é muito complexa, uma vez que possui uma elevada quantidade de compostos, dos quais se salientam os compostos fenólicos (catequinas e seus derivados), cafeína, o aminoácido L-teanina, vitaminas e carboidratos [48]. Esta composição depende da época de colheita, da espécie, idade da folha, do clima, do tipo de solo e das práticas agrícolas [49]. Os benefícios do chá estão relacionados com a elevada quantidade de catequinas que constituem cerca de 30% do peso seco das folhas, sendo as principais a (-) epicatequina (EC), (-) epicatequina-3-galhato (ECG), (-) epigallocatequina (EGC) e (-) epigallocatequina-3-galhato (EGCG). Esta última catequina é a que se encontra em maior quantidade no chá verde [48]. A composição do chá depende ainda do processo de fermentação, pois existem três tipos de chás: os não fermentados (chá verde e branco), os parcialmente fermentados (chá vermelho e oolong) e os completamente fermentados (chá preto). Durante o processo de fermentação das folhas frescas, algumas das catequinas são oxidadas ou condensadas em moléculas polifenólicas maiores, tais como as teaflavinas (3-6%) e as tearubiginas (12-18%). Estes polímeros são responsáveis pela cor escura do chá preto e pelo seu sabor amargo [45], [50]. O chá verde não sofre um processo de fermentação, apresentando assim uma composição semelhante às folhas de *Camellia sinensis*.

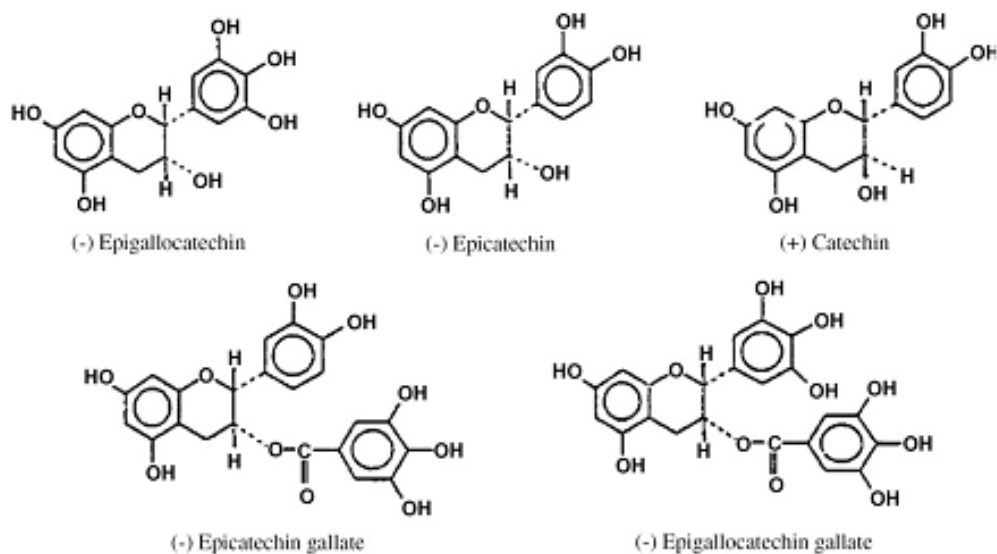


Figura 1 - Estrutura das principais catequinas presentes no chá verde. (-) Epigalhocatequina, (-) epicatequina, (+) catequina, (-) epicatequina 3-galhato, (-) epigalhocatequina 3-galhato. Adaptado de [34].

3.1.2. Efeitos terapêuticos do Chá Verde

De todos os chás antes referidos, o chá verde é o que possui os melhores efeitos para a saúde humana [51]. O chá verde é reconhecido por ser uma potente fonte antioxidante, pois é rico em catequinas que são consideradas dos maiores antioxidantes entre os fenóis naturais conhecidos, havendo informação científica que comprova que são melhores antioxidantes do que as vitaminas C e E, tocoferol e que o caroteno [52]. A actividade antioxidante dos polifenóis do chá não está só relacionada com a defesa ao superóxido, mas também ao aumento da actividade de algumas enzimas destoxicantes como a glutathione peroxidase, a glutathione reductase, glutathione-S-transferase, a catalase e a quinina reductase no intestino delgado, fígado e pulmões [51], [52]. Esta característica dos polifenóis do chá verde está também relacionada com o efeito pró-oxidativo que tem sido alvo de estudo pelo efeito consequentemente quimiopreventivo, apesar de ainda necessitar de alguma investigação [46]. Está provado ainda que a ingestão de chá verde auxilia na redução de gordura corporal e dos níveis de colesterol LDL, sugerindo então que contribui na diminuição da obesidade e nos riscos de doença cardiovascular nos humanos [53]. As catequinas do chá verde têm também efeito na regeneração da pele, tratamento de feridas e no tratamento de determinadas condições epiteliais, tais como, a psoríase ou rosácea. Um estudo realizado com uma mistura de EGCG em queratinócitos sugeriu que quando estes foram estimulados com EGCG, ocorreu

uma potenciação da diferenciação celular com o mínimo de impacto na síntese de ADN ou nos níveis de energia, durante um período de 24 horas [54]. O chá verde é conhecido também, por facilitar a indigestão, diarreia e outras formas de disfunções gastrointestinais, tornando-o útil na medicina tradicional caseira em problemas digestivos [51]. Outro dos efeitos terapêuticos do chá verde consiste na protecção hepática relativamente a intoxicação por álcool e outras substâncias químicas. O metabolismo do álcool produz radicais livres que danificam as células hepáticas. Em investigação, sujeitaram-se ratos a uma intoxicação crónica com álcool durante 4 semanas, com a aplicação de chá verde observou-se um melhoramento no sistema antioxidante e diminuição da quantidade de produtos resultantes na peroxidação lipídica, prevenindo danos no fígado [55]. Este tipo de chá tem ainda o efeito antimicrobiano contra uma variedade de bactérias gram positivas e gram negativas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp.), alguns fungos (*Candida albicans*) e em vírus (HIV, herpes simplex, influenza) [56], [57].

Em trabalhos prévios realizados neste grupo de investigação, foi demonstrada a actividade anti-*Candida albicans* do extrato de chá verde dos Açores [58].

3.1.3. Mecanismo de Acção

A maioria dos efeitos directos das catequinas do chá verde resulta da ligação das catequinas à bicamada lipídica da membrana celular causando danos na membrana [59]. Quando a membrana celular bacteriana está danificada, as bactérias perdem a habilidade de se ligar às células do hospedeiro; perdem também a habilidade de se ligarem umas às outras de maneira a formar um biofilme e ficam impossibilitadas de secretar de toxinas. A homeostase da membrana celular bacteriana está directamente relacionada com a síntese de ácidos gordos [12]. Alguns estudos demonstram que os componentes do chá verde (especialmente EGCG) inibem redutases específicas em bactérias que sintetizam ácidos gordos do tipo II e que a inibição da síntese de ácidos gordos pelo chá verde está também relacionada com a inibição dos metabolitos tóxicos produzidos pelas bactérias [60]-[62].

3.1.4. Chá verde dos Açores

Relativamente ao chá verde produzido em Portugal (Ilha de S. Miguel - Açores) ainda há poucas publicações que demonstrem a sua importância científica. Estudos feitos por Batista *et al.* demonstram que este chá apresenta elevados níveis de L- teanina e de (-) epigallocatequina-3-galato (EGCG) e uma concentração baixa de cafeína quando comparado com chá verde de outras origens geográficas [49], [63].

Capítulo 4 - Objectivos

Este trabalho laboratorial teve como principal objectivo o estudo da susceptibilidade das estirpes de *Lactobacillus* spp. e das estirpes de *Gardnerella vaginalis* ao extrato de chá verde dos Açores. Assim, pretende-se:

- Avaliar o potencial tóxico do extracto de chá verde dos Açores sobre espécies de *Lactobacillus* spp. presentes na microbiota vaginal;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato aquoso de chá verde sobre *Gardnerella vaginalis*;
- Verificar o mecanismo de acção do extrato aquoso de chá verde em *Gardnerella vaginalis* pela citometria de fluxo.

Capítulo 5 - Materiais e Métodos

5.1. Microrganismos

Neste trabalho utilizaram-se sete estirpes de *Lactobacillus* spp. (*L.acidophilus*, *L. crispatus*, *L.vaginalis*, *L.reuteri*, *L.gasseri*, *L. jensenii* e *L. helveticus*) da colecção da Professora Doutora Ana Palmeira da Universidade da Beira Interior e sete estirpes de *Gardnerella vaginalis* (TR11, MM19I, UM 22I47, UM23I58, SH71-6, SH92B1, SH254B) gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Nuno Cerca da Universidade do Minho. Todas as estirpes envolvidas neste estudo correspondem a isolados vaginais. As estirpes foram conservadas a -80°C em meio de cultura líquido apropriado. Antes das experiências as estirpes foram repicadas para meio MRS no caso dos *Lactobacillus* spp. e em meio de Columbia Blood Agar (CBA) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo no caso das estirpes de *Gardnerella vaginalis* e incubadas a 37°C em atmosfera humidificada e com 10% de dióxido de carbono (CO₂) durante 72h.

5.2. Preparação do extrato aquoso de Chá Verde dos Açores

Amostras de chá verde dos Açores produzidas pela empresa Plantações de Chá Gorreana, Lda (S. Miguel, Açores - lote 12 N 272 11G/L) foram utilizadas neste estudo. As folhas de chá verde foram sujeitas a infusão (1g/100mL) durante cerca de 5 minutos, conforme as instruções do rótulo. De seguida o extrato aquoso foi filtrado através de uma membrana de acetado de celulose (0.2µm) (VWR, Pensilvânia, EUA) utilizando uma seringa estéril. Após arrefecimento, o extrato foi congelado (-20°C) e de seguida liofilizado recorrendo a um liofilizador ScanVac CoolSafe Freeze Dryer TM (Labogene, Dinamarca). Para a realização dos ensaios, preparou-se uma solução *stock* de 40mg/mL que foi obtida por redissolução do extrato de chá verde dos Açores liofilizado em água desmineralizada.



Figura 2 - Embalagem das Plantações de Chá Gorreana, Lda (S. Miguel, Açores)

O chá verde tem sido caracterizado pelo seu alto teor de derivados em catequinas [49], [63]. Segundo um estudo anteriormente efectuado no nosso grupo de investigação verificamos que o composto maioritário do extrato utilizado neste estudo é a EGCG, pelo que vai de encontro ao referido pelos outros autores [58].

5.3. Actividade antimicrobiana

5.3.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Para avaliar a susceptibilidade de *Lactobacillus* spp. e de *Gardnerella vaginalis* ao extracto de chá verde dos Açores usou-se o teste de microdiluição em meio líquido para bactérias, tal como recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) na norma M7-A6 [64]. Esta norma define que a concentração mínima inibitória é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo [64].

Na realização do ensaio para *Lactobacillus* spp. utilizou-se meio líquido MRS com 0,1% de Tween 80 e para o ensaio com as estirpes de *G. vaginalis* foi usado meio líquido Brain Heart Infusion (BHI) suplementado (sBHI) com 2% de gelatina (Guinama), 1% de extracto de levedura (Sigma - Aldrich) e 0,1% de amido solúvel (Sigma - Aldrich). A partir da solução *stock* (40mg/mL) de extrato de chá verde dos Açores, realizaram-se diluições sucessivas (1:2) num intervalo de concentrações de 20-0,08 mg/mL em água desmineralizada para *Lactobacillus* spp. e em meio líquido sBHI para *Gardnerella vaginalis*. Os *Lactobacillus* spp. foram repicados em meio sólido MRS e incubados durante 24 horas a 37°C; as estirpes de *G. vaginalis* foram

repicadas em meio sólido CBA suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e incubadas durante 72 horas a 37°C em ambiente humidificado com 10% de CO₂. Após o crescimento das bactérias, preparou-se uma suspensão no meio líquido correspondente acertando-se a sua densidade óptica a 0,5 Unidades de McFarland. De modo a obter a suspensão de concentração celular 5x10⁵ UFC/mL, segundo indicações da norma, realizou-se uma diluição de 1:100 em meio líquido MRS para *Lactobacillus* spp. e em meio sBHI para *G. vaginalis* e posteriormente uma segunda diluição de 1:10 no mesmo meio líquido, adequado para cada bactéria. A microplaca foi inoculada com 100µL da suspensão bacteriana diluída.

Os poços sem inóculo foram usados como controlo negativo; os poços sem o extrato de chá verde dos Açores foram considerados como controlo positivo e foi incluído ainda um controlo de esterilidade do meio. Posteriormente a placa inoculada com *Lactobacillus* spp. foi incubada numa estufa a 37°C durante 48 horas e a placa inoculada com *G. vaginalis* foi colocada numa estufa a 37°C, em ambiente humidificado e com 10% de CO₂ durante 72 horas. O ensaio foi feito em duplicado realizando-se pelo menos três ensaios independentes.

As leituras foram realizadas após 24 horas e 48 horas para *Lactobacillus* spp. e após 48 horas e 72 horas para *G. vaginalis*, tendo-se avaliado visualmente o crescimento em cada concentração de trabalho testada. A CMI foi definida como a menor concentração de extrato de chá verde no qual não se observou crescimento dos microrganismos em estudo.

5.3.2. Avaliação da concentração mínima letal (CML)

Está descrito que a concentração mínima letal (CML) é a menor concentração de droga capaz de lesar irreversivelmente o microrganismo, matando-o [65]. Neste estudo foi determinada a CML do extrato aquoso de chá verde dos Açores em *Gardnerella vaginalis* segundo o método descrito num estudo recente [66].

Após a incubação das placas de 96 poços durante 72 horas, foram inoculados em CBA 20µL de todos os poços que não apresentavam crescimento, em triplicado. As placas inoculadas foram incubadas segundo as condições descritas anteriormente, sendo considerada a CML a menor concentração na qual não se observou a formação de colónias, após o período de incubação.

5.4. Citometria de Fluxo

Alguns autores têm-se dedicado ao estudo da propriedade antimicrobiana do chá verde, contudo o mecanismo de acção pelo qual actua ainda não está totalmente descrito [67], [68]. A fim de elucidar melhor qual o mecanismo de acção foi testado em citometria de fluxo.

A avaliação rápida e simples da viabilidade de um microrganismo é um aspecto importante no uso da citometria de fluxo. A integridade da membrana pode ser detectada por retenção ou exclusão dos corantes que conseguem distinguir as células viáveis das não viáveis ou inactivas [69], [70]. Neste trabalho foi usado o iodeto de propídio para esse efeito.

O iodeto de propídio (IP) também se liga às cadeias do ADN, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática íntegra. O bis-oxonol (BOX) é um corante lipofílico e aniónico que acumula intracelularmente desde que a membrana da célula se encontre despolarizada. A utilização da mistura destes corantes permite a diferenciação dos estados metabólicos funcionais das células [70].

A interacção entre o extrato de chá verde dos Açores e a *Gardnerella vaginalis* (SH71-6) foi estudada utilizando a citometria de fluxo. Para isso preparou-se uma solução com o extracto de chá verde para a diluição correspondente ao dobro da concentração de CMI. A solução foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose (0.2 µm) (VWR, Pensilvânia, EUA) e foi usada para preparar as diluições do extrato de chá verde em concentrações de 2xCMI; 1xCMI e 1/2xCMI. Todas as soluções foram diluídas com água destilada. Preparou-se uma suspensão de bactérias e acertou-se a densidade óptica a 0,5 unidades de McFarland. A suspensão bacteriana foi incubada, a 37°C em ambiente humidificado na presença de 10% de CO₂ durante 1 hora, numa proporção de 1:10 em cada uma das soluções de chá verde nas concentrações referidas. Este procedimento foi realizado em duplicado de modo a serem utilizados dois fluocromos diferentes. Após o período de incubação as suspensões foram centrifugadas a 10G durante 5 minutos (Gyrozen mini); tendo-se descartado o sobrenadante e adicionado cerca de 950µL de tampão fosfato-salino (PBS) filtrado. Esta suspensão de células em PBS foi tratada com os dois fluocromos seleccionados: o ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico), BOX ou Bis-oxonol, para verificar a despolarização da membrana e o iodeto de propídio (IP) para detecção da integridade da membrana celular. Este tratamento foi realizado na ausência de luz e durante 15 minutos. Após a coloração das células, estas foram adquiridas em citómetro de fluxo (CyAn ADP (Beckman Coulter, USA)) e analisadas pelo *software* Summit 4.3 (Beckman Coulter, USA).

5.5. Equipamento

Para além do material corrente de laboratório, para realizar o trabalho experimental também foram utilizados os equipamentos, apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Características dos equipamentos utilizados

Designação	Marca/modelo
Autoclave	Uniclave/88
Balança analítica	Sartorius
Balança analítica	KERN
Citometro de fluxo	CyAn ADP (Beckman Coulter, USA)
Densiómetro	Biomérieux
Espectofotómetro	Ultrospec U/V 3000
Estufa (37°C)	Binder
Estufa (37°C com injeção de 10% CO ₂)	Binder
Micro centrífuga	Gyrozen mini
Microscópio óptico	Olympus
Liofilizador	ScanVac CoolSafe Freeze Dryer TM (Labogene, Dinamarca)

5.6. Reagentes

Ao longo do trabalho experimental foram usados diversos produtos químicos, que se apresentam na tabela, com os respectivos graus de pureza e fornecedores.

Tabela 2- Lista de reagentes usados ao longo do trabalho experimental

Reagente	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico)	≥95%	Sigma - Aldrich
Ácido Nalidíxico	98%	Sigma - Aldrich
Amido Solúvel	-	Sigma - Aldrich
Agar	-	Conda
Brain Heart Infusion	-	Conda
Colistina	-	Sigma - Aldrich
Columbia Agar (Base)	-	Merck
Extracto de levedura	-	Sigma - Aldrich
Gelatina Polvo 100-120° Blom 30 Mesh	-	Guinama
Glicerol	99,5%	Himedia
Iodeto de propídio	≥94%	Sigma - Aldrich
MRS Broth	-	VWR
Polysorbate 80(Tween 80)	-	Sigma - Aldrich

Capítulo 6 - Resultados e Discussão

Visto que no nosso grupo de investigação o extrato aquoso de chá verde dos Açores já foi estudado e testado para observar o efeito antifúngico contra *Candida* spp. [58], decidiu-se usar a mesma gama de concentrações de diluição do chá verde (20-0,08 mg/mL) para verificar o efeito antimicrobiano do extrato sobre a *Gardnerella vaginalis* e posterior comparação entre o efeito em ambos os microrganismos. A concentração mais elevada (40mg/mL) corresponde à solução saturada de chá verde e foi utilizada anteriormente no estudo acima referido.

O extrato aquoso de chá verde dos Açores mostrou não ter actividade antimicrobiana nas estirpes testadas de *Lactobacillus* spp., mesmo quando foi testada a concentração mais elevada do extrato. Assim, pode-se afirmar que os *Lactobacillus* spp. são resistentes a todas as concentrações testadas do extrato aquoso.

Por outro lado verificou-se que o mesmo extrato foi capaz de inibir o crescimento das estirpes de *Gardnerella vaginalis* a uma concentração de 0,63 mg/mL (Tabela 3). O efeito induzido nas células foi do tipo bactericida visto que para a mesma concentração de inibição do crescimento ocorreu também morte celular, correspondendo por isso ao valor de CML (CMI=CML).

Tabela 3 - Actividade anti-*Gardnerella vaginalis* do extrato aquoso de Chá Verde. CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CML (Concentração Mínima Letal) foram determinados por microdiluição e estão expressos em mg/mL (w/v). Os ensaios foram realizados em duplicado e os resultados foram obtidos com bases em três experiências independentes concordantes.

Estirpe	CMI	CML
SH254B	0,63	0,63
SH71-6	0,63	0,63
SH92B1	0,63	0,63
TR11	0,63	0,63
UM23158	0,63	0,63

Segundo os critérios de classificação da actividade antimicrobiana [71] de um extrato vegetal, de acordo com os valores de CMI (Tabela 4) e analisando os resultados obtidos podemos considerar que o chá verde dos Açores é um inibidor moderado para as estirpes de *Gardnerella vaginalis* estudadas.

Tabela 4 - Classificação da actividade antimicrobiana de um extracto vegetal em valores de CMI (mg/mL). Adaptado de [71]

Classificação dos inibidores	Valores CMI (mg/mL)
Fortes	CMI ≤ 0,5
Moderados	0,6 ≤ CMI ≤ 1,5 mg/mL
Fracos	CMI ≥ 1,6 mg/mL

Os resultados relativos à avaliação do mecanismo de acção por citometria de fluxo foram inconclusivos por se verificar, após análise dos gráficos, que embora as soluções de chá verde dos Açores tenham sido filtradas previamente à sua utilização neste ensaio, os constituintes do extrato se sobrepõem às colónias de *G. vaginalis*, impossibilitando a selecção da população bacteriana e a avaliação do efeito da marcação por fluorescência.

O efeito antimicrobiano contrastante referente à ausência de toxicidade sobre *Lactobacillus* spp. e o efeito bactericida sobre as estirpes de *Gardnerella vaginalis* apresenta-se como sendo vantajosa pois prevê que este extrato *in vivo* possa, ao mesmo tempo controlar o sobre crescimento das estirpes patogénicas para bacteriose vaginal, maioritariamente *Gardnerella vaginalis*, e manter a flora probiótica preservada.

De acordo com trabalhos realizados anteriormente pelo nosso grupo de investigação verificou-se que o mesmo extrato produziu um efeito anti-*Candida*. Deste modo, pela comparação de resultados de concentração mínima inibitória do chá verde nas estirpes de *Gardnerella vaginalis* com os resultados de CMI das estirpes de *Candida* spp. testadas anteriormente, observou-se que algumas das estirpes (*C. albicans* MP24, *C. albicans* AP25A, *C. albicans* AP26B e *C. papapsilosis* MP12) apresentam o mesmo valor de CMI. Pode-se deste modo afirmar que o extrato aquoso de chá verde dos Açores poderá ser efectivamente uma boa alternativa à antibioterapia clássica, uma vez que está demonstrado a actividade tanto antifúngica contra *Candida* spp. como a actividade antimicrobiana contra *Gardnerella vaginalis*, os agentes patogénicos relacionados com as duas infecções vaginais mais prevalentes, sendo o extracto classificado como moderadamente activo.

Capítulo 7 - Conclusões e Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o chá verde dos Açores é uma excelente fonte de compostos com propriedades antimicrobianas. Este é um produto natural, de baixo custo e com elevado potencial de aplicação medicinal, nomeadamente no tratamento e/ou prevenção da bacteriose vaginal causada pelo sobrecrecimento de *Gardnerella vaginalis*.

O extrato aquoso de chá verde apresentou-se como inactivo contra os *Lactobacillus* spp. considerados microrganismos probióticos vaginais por excelência e moderadamente activo contra *Gardnerella vaginalis*. O efeito anti- *Gardnerella* deste mesmo extrato é do tipo bactericida pois verificou-se que a concentração mínima letal apresenta o mesmo valor que a concentração mínima inibitória. Os efeitos antimicrobianos referidos foram obtidos para concentrações similares às já anteriormente descritas para estirpes de *Candida* spp., apresentando-se o extrato aquoso de chá verde dos Açores como um promissor agente antimicrobiano para o controlo e/ou prevenção das duas infecções vaginais mais comuns, a candidose vulvovaginal e a bacteriose vaginal.

Futuramente, o estudo poderá ser alargado para outros microrganismos responsáveis por infecções vaginais, tais como: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis*, *Atopobium vaginae*, entre outros.

Testes de toxicidade e testes de segurança *in vivo*, também poderiam ser efectuados para verificar a utilização deste extrato em fármacos. Outras abordagens futuras poderão ser o estudo de EGCG juntamente com antibióticos clássicos para tratamento de bacteriose vaginal e verificar se existe sinergismo entre os compostos e ainda a aplicação do extrato de chá verde dos Açores em biofilmes de *Gardnerella vaginalis*.

Referências Bibliográficas

- [1] H. L. Kent, "Epidemiology of vaginitis.," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 165, no. 4 Pt 2, pp. 1168-76, Oct. 1991.
- [2] M. Barcelos and P. Vargas, "Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: prevalência e fatores de risco," *Rev bras ginecol ...*, pp. 3-8, 2008.
- [3] Y. Turovskiy, K. Sutyak Noll, and M. L. Chikindas, "The aetiology of bacterial vaginosis.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 110, no. 5, pp. 1105-28, May 2011.
- [4] C. H. Livengood, "Bacterial vaginosis: an overview for 2009.," *Rev. Obstet. Gynecol.*, vol. 2, no. 1, pp. 28-37, Jan. 2009.
- [5] A. Tomusiak, M. Strus, and P. B. Heczko, "[Antibiotic resistance of Gardnerella vaginalis isolated from cases of bacterial vaginosis].," *Ginekol. Pol.*, vol. 82, no. 12, pp. 900-4, Dec. 2011.
- [6] S. Borges, J. Silva, and P. Teixeira, "The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health.," *Arch. Gynecol. Obstet.*, Oct. 2013.
- [7] R. Barrons and D. Tassone, "Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review.," *Clin. Ther.*, vol. 30, no. 3, pp. 453-68, Mar. 2008.
- [8] M. Kechagia, D. Basoulis, S. Konstantopoulou, D. Dimitriadi, K. Gyftopoulou, N. Skarmoutsou, and E. M. Fakiri, "Health benefits of probiotics: a review.," *ISRN Nutr.*, vol. 2013, p. 481651, Jan. 2013.
- [9] B. M. Silva, "Are Plant Extracts a Potential Therapeutic Approach for Genital Infections ?," 2013.
- [10] A. C. Abreu, A. J. McBain, and M. Simões, "Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 29, no. 9, pp. 1007-21, Sep. 2012.
- [11] P. W. Taylor, J. M. T. Hamilton-miller, and P. D. Stapleton, "Europe PMC Funders Group Antimicrobial properties of green tea catechins," pp. 71-81, 2009.
- [12] W. C. Reygaert, "The antimicrobial possibilities of green tea.," *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. August, p. 434, Jan. 2014.
- [13] B. M. Silva, "Tea (*Camellia sinensis* (L .)): a putative antimicrobial agent in sexually transmitted infections," 2013.
- [14] S. Tatti, E. Stockfleth, K. R. Beutner, H. Tawfik, U. Elsasser, P. Weyrauch, and a Mescheder, "Polyphenon E: a new treatment for external anogenital warts.," *Br. J. Dermatol.*, vol. 162, no. 1, pp. 176-84, Jan. 2010.

- [15] R. E. M. Mascarenhas, M. S. C. Machado, B. F. B. da Costa e Silva, R. F. W. Pimentel, T. T. Ferreira, F. M. S. Leoni, and M. F. R. Grassi, "Prevalence and risk factors for bacterial vaginosis and other vulvovaginitis in a population of sexually active adolescents from Salvador, Bahia, Brazil.," *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, vol. 2012, p. 378640, Jan. 2012.
- [16] N. M. Gilbert, W. G. Lewis, and A. L. Lewis, "Clinical features of bacterial vaginosis in a murine model of vaginal infection with *Gardnerella vaginalis*.,," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e59539, Jan. 2013.
- [17] E. Holst, B. Wathne, B. Hovelius, and P. a Mårdh, "Bacterial vaginosis: microbiological and clinical findings.,," *Eur. J. Clin. Microbiol.*, vol. 6, no. 5, pp. 536-41, Oct. 1987.
- [18] M. J. Ferris, A. Masztal, K. E. Aldridge, J. D. Fortenberry, P. L. Fidel, and D. H. Martin, "Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis.,," *BMC Infect. Dis.*, vol. 4, p. 5, Mar. 2004.
- [19] P. G. Larsson and U. Forsum, "Bacterial vaginosis - a disturbed bacterial flora and," no. 1, pp. 305-316, 2005.
- [20] R. Amsel, P. A. Totten, C. A. Spiegel, K. C. S. Chen, D. Eschenbach, and K. K. Holmes, "Nonspecific vaginitis," *Am. J. Med.*, vol. 74, no. 1, pp. 14-22, Jan. 1983.
- [21] J. H. H. M. van de Wijgert, H. Borgdorff, R. Verhelst, T. Crucitti, S. Francis, H. Verstraelen, and V. Jaspers, "The Vaginal Microbiota: What Have We Learned after a Decade of Molecular Characterization?," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e105998, Aug. 2014.
- [22] H. L. GARDNER and C. D. DUKES, "Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis.,," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 69, no. 5, pp. 962-76, May 1955.
- [23] R. T. Gergova, T. V Strateva, and I. G. Mitov, "Gardnerella vaginalis-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women.,," *Braz. J. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 3, pp. 313-8, 2013.
- [24] M. Pleckaityte, M. Janulaitiene, R. Lasickiene, and A. Zvirbliene, "Genetic and biochemical diversity of Gardnerella vaginalis strains isolated from women with bacterial vaginosis.,," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 69-77, Jun. 2012.
- [25] B. W. Catlin, "Gardnerella vaginalis: characteristics, clinical considerations, and controversies.,," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 5, no. 3, pp. 213-37, Jul. 1992.
- [26] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. Debeer, D. Caldwell, and D. Korber, "MINIREVIEW Biofilms , the Customized Microniche," vol. 176, no. 8, pp. 2137-2142, 1994.
- [27] J. L. Patterson, P. H. Girerd, N. W. Karjane, and K. K. Jefferson, "Effect of biofilm phenotype on resistance of Gardnerella vaginalis to hydrogen peroxide and lactic acid.,," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 197, no. 2, pp. 170.e1-7, Aug. 2007.

- [28] S. E. Gelber, J. L. Aguilar, K. L. T. Lewis, and A. J. Ratner, "Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 11, pp. 3896-903, Jun. 2008.
- [29] C. J. Yeoman, S. Yildirim, S. M. Thomas, a S. Durkin, M. Torralba, G. Sutton, C. J. Buhay, Y. Ding, S. P. Dugan-Rocha, D. M. Muzny, X. Qin, R. a Gibbs, S. R. Leigh, R. Stumpf, B. a White, S. K. Highlander, K. E. Nelson, and B. a Wilson, "Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential.," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, p. e12411, Jan. 2010.
- [30] P. Piot, E. Van Dyck, P. Godts, and J. Vanderheyden, "The vaginal microbial flora in non-specific vaginitis.," *Eur. J. Clin. Microbiol.*, vol. 1, no. 5, pp. 301-6, Oct. 1982.
- [31] a M. Briselden and S. L. Hillier, "Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 12, pp. 2761-4, Dec. 1990.
- [32] M. Bolton, A. van der Straten, and C. R. Cohen, "Probiotics: potential to prevent HIV and sexually transmitted infections in women.," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 214-25, Mar. 2008.
- [33] G. Reid, "The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 189, no. 4, pp. 1202-1208, Oct. 2003.
- [34] D. a Eschenbach, P. R. Davick, B. L. Williams, S. J. Klebanoff, K. Young-Smith, C. M. Critchlow, and K. K. Holmes, "Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 27, no. 2, pp. 251-6, Feb. 1989.
- [35] J. Castro, A. Henriques, A. Machado, M. Henriques, K. K. Jefferson, and N. Cerca, "Reciprocal interference between *Lactobacillus* spp. and *Gardnerella vaginalis* on initial adherence to epithelial cells.," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 1193-8, Jan. 2013.
- [36] C. S. Bradshaw, M. Pirotta, D. De Guingand, J. S. Hocking, A. N. Morton, S. M. Garland, G. Fehler, A. Morrow, S. Walker, L. a Vodstrcil, and C. K. Fairley, "Efficacy of oral metronidazole with vaginal clindamycin or vaginal probiotic for bacterial vaginosis: randomised placebo-controlled double-blind trial.," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34540, Jan. 2012.
- [37] M. E. Falagas, G. I. Betsi, and S. Athanasiou, "Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 13, no. 7, pp. 657-64, Jul. 2007.
- [38] E. E. Petersen, M. Genet, M. Caserini, and R. Palmieri, "Efficacy of vitamin C vaginal tablets in the treatment of bacterial vaginosis: a randomised, double blind, placebo controlled clinical trial.," *Arzneimittelforschung.*, vol. 61, no. 4, pp. 260-5, Jan. 2011.
- [39] P. C. Trial, V. N. Krasnopolsky, V. N. Prilepskaya, F. Polatti, and N. V Zarochentseva, "Efficacy of Vitamin C Vaginal Tablets as Prophylaxis for Recurrent Bacterial Vaginosis : A Randomised ," vol. 5, no. 4, pp. 309-315, 2013.

- [40] K. Van Kessel, N. Assefi, J. Marrazzo, and L. Eckert, "Common complementary and alternative therapies for yeast vaginitis and bacterial vaginosis: a systematic review.," *Obstet. Gynecol. Surv.*, vol. 58, no. 5, pp. 351-8, May 2003.
- [41] M. Simbar, Z. Azarbad, F. Mojab, and H. A. Majd, "A comparative study of the therapeutic effects of the Zataria multiflora vaginal cream and metronidazole vaginal gel on bacterial vaginosis.," *Phytomedicine*, vol. 15, no. 12, pp. 1025-31, Dec. 2008.
- [42] D. Naidoo, S. F. van Vuuren, R. L. van Zyl, and H. de Wet, "Plants traditionally used individually and in combination to treat sexually transmitted infections in northern Maputaland, South Africa: antimicrobial activity and cytotoxicity.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 149, no. 3, pp. 656-67, Oct. 2013.
- [43] A. Palmeira-de-oliveira, "Potencial terapêutico de extractos de plantas em infecções genitais," vol. 12, no. 2, pp. 135-144, 2012.
- [44] B. Effects and O. F. Tea, "MINIREVIEW Antimicrobial Properties of Tea (Camellia sinensis L.)," vol. 39, no. 11, pp. 2375-2377, 1995.
- [45] M. P. Almajano, R. Carbó, J. A. L. Jiménez, and M. H. Gordon, "Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions," *Food Chem.*, vol. 108, no. 1, pp. 55-63, May 2008.
- [46] J. D. Lambert and R. J. Elias, "The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 501, no. 1, pp. 65-72, Sep. 2010.
- [47] R. J. Moore, K. G. Jackson, and A. M. Minihane, "Green tea (Camellia sinensis) catechins and vascular function.," *Br. J. Nutr.*, vol. 102, no. 12, pp. 1790-802, Dec. 2009.
- [48] M. S. El-Shahawi, a Hamza, S. O. Bahaffi, a a Al-Sibaai, and T. N. Abduljabbar, "Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography.," *Food Chem.*, vol. 134, no. 4, pp. 2268-75, Oct. 2012.
- [49] J. a. B. Baptista, J. F. da P Tavares, and R. C. B. Carvalho, "Comparative Study and Partial Characterization of Azorean Green Tea Polyphenols," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 12, no. 4, pp. 273-287, Dec. 1999.
- [50] J. Oh, H. Jo, A. R. Cho, S.-J. Kim, and J. Han, "Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas," *Food Control*, vol. 31, no. 2, pp. 403-409, Jun. 2013.
- [51] A. B. Sharangi, "Medicinal and therapeutic potentialities of tea (Camellia sinensis L.) - A review," *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 5-6, pp. 529-535, Jun. 2009.
- [52] M. Bancirova, "Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 5, pp. 1379-1382, Jun. 2010.

- [53] T. Nagao, T. Hase, and I. Tokimitsu, "Diet and Physical Activity A Green Tea Extract High in Catechins Reduces Body Fat and Cardiovascular Risks," vol. 15, no. 6, pp. 1473-1483, 2007.
- [54] S. Hsu, W. B. Bollag, J. Lewis, Q. Huang, B. Singh, M. Sharawy, T. Yamamoto, and G. Schuster, "Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 306, no. 1, pp. 29-34, Jul. 2003.
- [55] J. Ostrowska, W. Łuczaj, I. Kasacka, A. Rózański, and E. Skrzydlewska, "Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs.," *Alcohol*, vol. 32, no. 1, pp. 25-32, Jan. 2004.
- [56] A. Jigisha, R. Nishant, K. Navin, and G. Pankaj, "Review Article GREEN TEA: A MAGICAL HERB WITH MIRACULOUS OUTCOMES," vol. 3, no. 5, pp. 139-148, 2012.
- [57] J. Steinmann, J. Buer, T. Pietschmann, and E. Steinmann, "Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 168, no. 5, pp. 1059-73, Mar. 2013.
- [58] B. M. S. Claudia Costa, Ana Palmeira-de-Oliveira, Carlos Gaspar, Marco G. Alves, Pedro F. Oliveira, José Martinez-de-Oliveira, "Azorean green tea : phytochemical screening and anti- candida activity," *Atas do 11º Encontro Química dos Aliment. Inst. Politécnico Bragança (Bragança)*. ISBN 978-972-745-141-8., pp. 5-8, 2013.
- [59] T. W. Sirk, E. F. Brown, A. K. Sum, and M. Friedman, "Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 17, pp. 7750-8, Sep. 2008.
- [60] Y.-M. Zhang and C. O. Rock, "Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 30994-1001, Jul. 2004.
- [61] M. Li, J.-T. Liu, X.-M. Pang, C.-J. Han, and J.-J. Mao, "Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin II and interleukin-6-induced C-reactive protein production in macrophages.," *Pharmacol. Rep.*, vol. 64, no. 4, pp. 912-8, Jan. 2012.
- [62] S. Sakanaka and Y. Okada, "Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 6, pp. 1688-92, Mar. 2004.
- [63] J. Baptista, E. Lima, L. Paiva, A. L. Andrade, and M. G. Alves, "Comparison of Azorean tea theanine to teas from other origins by HPLC/DAD/FD. Effect of fermentation, drying temperature, drying time and shoot maturity," *Food Chem.*, vol. 132, no. 4, pp. 2181-2187, Jun. 2012.
- [64] N. document M7-A6, "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition," vol. 23, no. 2, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- [65] L. M. Prescott and P. H. Klein, *Microbiology 5th Edition*. 2002.

- [66] E. Cantón, J. Pemán, A. Viudes, G. Quindós, M. Gobernado, and A. Espinel-Ingroff, "Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 45, no. 3, pp. 203-206, Mar. 2003.
- [67] W. Reysgaert and I. Jusufi, "Green tea as an effective antimicrobial for urinary tract infections caused by *Escherichia coli*," *Front. Microbiol.*, vol. 4, no. June, p. 162, Jan. 2013.
- [68] A. Sharma, S. Gupta, I. P. Sarethy, S. Dang, and R. Gabrani, "Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens.," *Food Chem.*, vol. 135, no. 2, pp. 672-5, Nov. 2012.
- [69] J. Arroyo, R. Canto, S. A. R. Nombela, and M. Sa, "Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology †," vol. 13, no. 2, pp. 167-195, 2000.
- [70] T. Lopes, A. Reis, C. Hewitt, and C. Roseiro, "Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos."
- [71] M. C. T. Duarte, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. G. Rehder, and C. Delarmelina, "Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 97, no. 2, pp. 305-11, Feb. 2005.