



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ester Martins de Oliveira

Relatório de Estágio sob orientação da Dra. Maria Isabel Belchior e Monografia intitulada “Contribuição da Fitoterapia em infeções por *Candida albicans*” sob orientação do Professor Doutor António Paranhos, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ester Martins de Oliveira

Relatório de Estágio sob orientação da Dra. Maria Isabel Belchior e Monografia intitulada
“Contribuição da Fitoterapia em infeções por *Candida albicans*” sob a orientação do
Professor Doutor António Paranhos, referentes à Unidade Curricular “Estágio”,
apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na
prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2023

Eu, Ester Martins de Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº.2018278182, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Contribuição da Fitoterapia em infeções vaginais por *Candida albicans*” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer informação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 2 de setembro de 2023.

Ester Martins de Oliveira

(Ester Martins de Oliveira)

Agradeço...

À minha mãe, Mónica por todo o amor e atenção dada, por sempre me atender o telefone e me acalmar nas alturas de maior *stress*, por me ajudar a desanuviar a cabeça e a nunca duvidar das minhas capacidades. Por também me dar na cabeça e repreender e fazer com que estes 5 anos fossem 5 anos de crescimento académico e pessoal.

Ao meu pai, José por me ajudar a ver sempre o lado bom das coisas e por me acalmar relativizando sempre todos os possíveis obstáculos.

Ao meu irmão, Bernardo por ser uma pessoa atenta, por sempre me animar e puxar para cima, por todos os cafés pagos que fiquei de eventualmente pagar depois e por todos os desabaços, risos e conversas motivacionais.

Ao meu namorado Duarte por me lembrar constantemente das minhas capacidades, por ter sido um incrível companheiro em todos os sentidos, por me acompanhar em diversas atividades de lazer como também de estudo tentando sempre ajudar-me no que podia e não podia mesmo não estudando na mesma área que eu. Por ser a diversão e energia contagiante em pessoa e por me soltar um sorriso com a maior das facilidades mesmo nos dias mais stressantes.

A todas as minhas amigas e amigos, colegas ou não de curso, que me ensinaram o que é ser estudante em Coimbra, o verdadeiro significado de companheirismo e entreajuda e que me permitiram vivenciar a experiência universitária em Coimbra que tanta saudade vai deixar.

À minha madrinha, prima, padrinho e avós Paula, Bárbara e Francisco, Clara e António por sempre me acolherem tão bem nas suas casas, por me ensinarem a ser mais resiliente e a ver as situações com outros olhos.

À equipa da Farmácia Silcar pelo acolhimento, simpatia, disponibilidade e bom ambiente que proporcionaram durante o meu estágio. Agradeço em especial à minha orientadora externa Dra. Maria Isabel Belchior por todo o acompanhamento próximo e por todos os conhecimentos e orientação transmitidos no meu estágio, por ser sempre atenciosa comigo e dedicada fazendo com que sempre me sentisse bem e em casa.

Ao meu orientador interno, Professor Doutor António Paranhos, por toda a ajuda, disponibilidade e brevidade em retirar-me todas as dúvidas que me foram surgindo ao longo da escrita da monografia e por me encaminhar sempre no sentido de vir a obter o melhor desempenho possível.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que sempre foram capazes de transmitir durante estes 5 anos todos os ensinamentos e me prepararem para a vida profissional.

O mais sincero obrigada.

Índice

Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

1. Introdução.....	3
2. Farmácia Silcar.....	3
3. Análise SWOT	4
3.1. Pontos Fortes	4
3.1.1. Sistema Informático (Sifarma).....	4
3.1.2. Equipa técnica.....	5
3.1.3. Serviços prestados	6
3.1.4. Etapas do estágio	7
3.1.5. Utentes fidelizados	9
3.2. Pontos Fracos.....	9
3.2.1. Localização da Farmácia.....	9
3.2.2. Preparação de poucos manipulados	9
3.2.3. Lacunas e falhas na formação académica	10
3.3. Oportunidades	10
3.3.1. Aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos.....	10
3.3.2. Formações fornecidas	11
3.4. Ameaças.....	11
3.4.1. Crescente conhecimento por parte do utente e dificuldade em filtrar a informação	11
3.4.2. Medicamentos Esgotados	11
3.4.3. Venda em parafarmácias e grandes superfícies comerciais	12
4. Casos Clínicos.....	12
4.1. Primeiro caso clínico: Automedicação	12
4.2. Segundo Caso Clínico: Infecção vaginal	13
4.3. Terceiro Caso Clínico: Obstipação	14
4.4. Quarto Caso Clínico: Contraceção Oral Emergência.....	14
4.5. Quinto Caso Clínico: Pé de atleta.....	16
5. Conclusão.....	16
6. Bibliografia	17

Parte II: Monografia "Contribuição da fitoterapia em infeções vaginais provocadas por *Candida albicans*"

1. Introdução.....	22
2. <i>Candida spp.</i> : microbiologia e infeções	22
3. Fatores de Virulência.....	24
4. Candidíase Vulvovaginal	27
4.1. Microbiota vaginal.....	27
4.2. Grupos de risco	28
4.3. Sintomas e tratamento farmacológico.....	29

5.	Mecanismos de resistência.....	31
6.	Plantas medicinais.....	32
6.1.	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel.....	33
6.2.	<i>Mentha arvensis</i> L. e <i>Lavandula x intermedia</i>	37
6.3.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	40
6.4.	<i>Satureja montana</i> L.	44
6.5.	<i>Salvia officinalis</i>	47
7.	Conclusão.....	49
8.	Bibliografia	51

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Silcar

Estágio orientado pela Dra. Maria Isabel Belchior



Lista de siglas e acrónimos:

AMI: Assistência Médica Internacional

ANF: Associação Nacional das Farmácias

FS: Farmácia Silcar

INR: International normalized ratio

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM: Medicamento não sujeito a receita médica

MSRM: Medicamento sujeito a receita médica

SAMS: Serviço de Assistência Médico-Social

SNS: Sistema Nacional de Saúde

VIH: Vírus da imunodeficiência humana

I. Introdução

A Unidade Curricular “Estágio” representa uma das últimas etapas do culminar de 5 anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Permite aos alunos um primeiro contacto com o mercado de trabalho colocando em prática os conhecimentos teóricos adquiridos bem como o desenvolvimento de novas aptidões.

A profissão de farmacêutico comunitário tem vindo cada vez mais a centrar-se no utente, surgindo o farmacêutico como agente de saúde pública e como a primeira linha de saúde de orientação e aconselhamento do paciente e a farmácia, em alguns casos, como a única estrutura de saúde disponível capaz de prestar cuidados. Desde há muito tempo que a função do farmacêutico deixou de se restringir apenas ao ato de dispensa do medicamento e passando a centrar-se mais no aconselhamento farmacoterapêutico e na prestação de serviços de saúde. O meu estágio foi realizado na Farmácia Silcar, em Coimbra, entre 1 de março e 26 de julho de 2023, num total de 810 horas, sob a orientação da diretora técnica Dra. Maria Isabel Belchior e com o apoio de toda a restante equipa.

Numa primeira fase irei proceder à análise do estágio curricular analisando os fatores internos, que se traduzem em pontos fortes e pontos fracos, bem como os fatores externos que constituíram as forças e as fraquezas observadas, irei posteriormente apresentar cinco casos clínicos com os quais me deparei ao longo desta experiência e que considerarei relevante relatar.

2. Farmácia Silcar

A Farmácia Silcar (FS) associada da Associação Nacional das Farmácias (ANF), situa-se atualmente na Rua do Brasil, em Coimbra, encontrando-se aberta de segunda a sexta-feira das 9h às 20h e aos sábados das 9h às 13h.

Para além do horário mencionado está ainda incluída na escala de serviços permanentes do concelho de Coimbra.

A construção desta farmácia deu-se em 1930 sendo o nome da mesma uma conjugação dos apelidos dos sócios fundadores: Silva e Cardoso.

Este estabelecimento começou por se localizar inicialmente na Rua Ferreira Borges, em Coimbra onde se manteve até à data de 2011. Em 2011 as suas instalações passaram para a Rua do Brasil onde se mantém até aos dias de hoje.

3. Análise SWOT

PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
<ul style="list-style-type: none">- Sistema Informático- Equipa técnica- Serviços prestados- Etapas do estágio- Utentes fidelizados	<ul style="list-style-type: none">- Localização da farmácia- Preparação de poucos manipulados- Falhas na formação académica
OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
<ul style="list-style-type: none">- Aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos- Formações fornecidas	<ul style="list-style-type: none">- Crescente conhecimento por parte do utente- Medicamentos esgotados- Concorrência por parte das parafarmácias e <i>websites</i>

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Sistema Informático (Sifarma)

O sistema informático utilizado pela Farmácia Silcar é o Sifarma Modo Automático 2000[®], desenvolvido pela Associação Nacional das Farmácias (ANF), é uma ferramenta valiosa permitindo uma adequada gestão e funcionamento eficiente do estabelecimento permitindo que o profissional de saúde esteja apto a promover um serviço de qualidade assegurando o uso seguro e racional do medicamento.

As principais funcionalidades deste programa informático passam pela:

1. Gestão de compras: fornece informações sobre o *stock* mínimo e o *stock* máximo garantindo um controlo adequado e evitando falha ou excesso de produtos.
2. Controlo de *stock* de todos os produtos desde a sua entrada até à sua saída mantendo-nos sempre informados sobre quantidades de *stock*, preços e prazos de validade.
3. Gestão de prazos de validade: permite ao farmacêutico garantir que os medicamentos são vendidos ou eliminados antes do prazo expirar.

4. Aconselhamento farmacêutico: o sistema informático permite também ao farmacêutico ter acesso imediato a informações cruciais do medicamento (interações medicamentosas, contra-indicações, posologia, reações adversas) permitindo ao mesmo prestar um atendimento o mais completo possível.

3.1.2. Equipa técnica

A equipa técnica é constituída pela diretora técnica, dois farmacêuticos e três técnicos de farmácia.

Desde o primeiro dia de estágio que sempre senti que fui bem recebida e orientada por todos os membros da equipa.

Tive um acompanhamento constante por parte da diretora técnica, Dra. Isabel Belchior, que sempre se demonstrou disponível e prestável retirando-me todas as dúvidas e esclarecendo todas as questões que me fossem surgindo ao longo dos dias. Para além disso, desafiava-me a querer saber sempre mais, a desenvolver o meu espírito crítico e a colocar em prática os conhecimentos adquiridos criando casos clínicos hipotéticos diferentes daqueles com que ia lidando ao balcão para que pudesse treinar o aconselhamento prestado ao utente.

Também a restante equipa esteve sempre muito presente no meu percurso:

- A Dra. Maria João Duro a esclarecer-me todas as dúvidas na área dermocosmética dando-me sempre a conhecer as diferentes marcas, gamas e tipos de cuidado relembrando-me de como se realizava desde um simples cuidado de rosto diário a cuidados especiais a ter com peles com psoríase, dermatite atópica, ...
- O Dr. Nuno Duro que me acompanhou mais na parte do *back office*, ensinando tudo o que era necessário saber sobre a receção de encomendas, controlo de prazos de validade e arrumação de medicamentos no seu devido lugar.
- A Dr. Andreia com quem passei a maioria do meu estágio a assistir aos seus atendimentos numa primeira instância. Após cada atendimento lembrava-me sempre a função de cada medicamento mencionado e sempre que possível o seu mecanismo de ação, medidas não farmacológicas que deveria aconselhar em cada caso, interações medicamentosas que deveria ter em consideração,...
- O Dr. Nuno Valentim e a Dra. Elisabete Dias que me faziam sempre chegar algumas informações sobre alguns dos seus atendimentos com o intuito de me transmitirem mais saber e conhecimento e alertar para pontos em que poderia melhorar como futura profissional de saúde.

Todo o apoio e atenção dada ao longo do meu estágio contribuiu indubitavelmente para o meu desenvolvimento pessoal e profissional bem como para o meu sucesso como futura farmacêutica.

3.1.3. Serviços prestados

A FS fornece aos seus utentes serviços gratuitos e não gratuitos.

Dentro dos serviços gratuitos prestados incluímos o *Valormed*, o Programa de Troca de Seringas e o Programa de reciclagem de radiografias promovido pela Assistência Médica Internacional (AMI).

O *Valormed* é uma empresa sem fins lucrativos que se destina a recolher os medicamentos usados pelo utente, medicamentos fora de prazo ou que eventualmente o utente não terminou a embalagem tendo como objetivo colocar os medicamentos fora de uso no sítio certo de forma a preservar o meio ambiente. São aceites tanto folhetos como as próprias caixas mesmo que contenham *blisters*, frascos, bisnagas e não sendo aceites agulhas e seringas, termómetros de mercúrio, pilhas, aparelhos eletrónicos, material de penso e cirúrgico, produtos químicos e radiografias [1].

O programa de reciclagem de radiografias prestado pela AMI é um programa realizado anualmente sendo que esporadicamente em alguns anos ocorre uma segunda edição desta campanha. Está presente há cerca de 5 anos e o principal propósito é evitar a deposição de radiografias em aterros diminuindo o impacto ambiental. A prata resultante desta mesma reciclagem é posteriormente vendida pela AMI no mercado de metais preciosos evitando a sua extração da natureza e, mais uma vez o impacto ambiental [2].

O programa troca de seringas consiste num programa destinado a toxicodependentes que teve início em 1993 cujo principal objetivo foi reduzir o número de casos diagnosticados com VIH e hepatite C.

Este programa consiste no fornecimento de seringas limpas e esterilizadas por parte das farmácias em troca de seringas utilizadas e contaminadas evitando a transmissão das doenças infecciosas e assegurando que as seringas não são descartadas em sítios inapropriados evitando a contaminação tanto da comunidade como do próprio ambiente [3].

Considero todos os serviços mencionados como um ponto forte porque permite mais uma vez que o farmacêutico esteja mais próximo da comunidade realizando serviços de consciencialização da população e permitem ao farmacêutico exercer também o seu papel de prevenção, educação, aconselhamento e promoção de saúde.

A medição de parâmetros bioquímicos como INR, glicémia, pressão arterial, colesterol total e triglicerídeos. A medição destes parâmetros em alguns utentes é algo consistente o que

permite à farmácia ter uma maior proximidade para com o utente bem como exercer um acompanhamento dos mesmos e controlo adequado destes parâmetros.

Para além de efetuar estas medições oferece ainda consultas de nutrição e de podologia a um preço acessível com profissionais de saúde especializados nestas mesmas áreas. Proporciona uma maior fidelização do cliente e permite ao próprio farmacêutico o contacto com estes mesmos profissionais semanalmente a fim de lhes colocar questões em áreas nas quais não teve uma formação tão intensiva e não se sente tão confortável mantendo também assim a sua formação atualizada e promovendo a cooperação entre os diferentes profissionais de saúde.

Também a visita por parte de conselheiras de dermocosmética das linhas Caudalie® e Sensilis® são promovidas ao utente e a realização de rastreios como por exemplo rastreio da insuficiência venosa.

3.1.4. Etapas do estágio

O meu estágio foi dividido em 4 etapas. Iniciou-se com uma etapa de aprendizagem e revisão de conhecimentos num dos gabinetes da FS onde, com a ajuda da diretora técnica, resolvi diversos casos clínicos onde o farmacêutico poderia intervir diretamente no aconselhamento. Foram estudados casos clínicos de constipação, doença hemorroidária, obstipação, febre, contraceção oral de emergência, entre outros,...

Posteriormente passei para o *back office* onde dei entrada de encomendas e, visto a FS não estar equipada com um *robot* tive também como tarefa a arrumação dos medicamentos no seu devido lugar segundo o lema "*first in, first out*". Este lema consistia em garantir que eram sempre dispensados primeiro os medicamentos que chegavam primeiro à farmácia e que tinham prazos de validade anteriores, as unidades de um produto acabadas de chegar numa encomenda eram assim arrumadas por baixo ou por de trás das que já se encontravam na farmácia e identificadas com um elástico, de modo que sejam vendidos posteriormente às mais antigas, cujos prazos de validade estão mais próximos do fim.

Assim, através do controlo de prazos de validade, códigos e *stocks* aprendi a arrumar cada medicamento no seu devido lugar tendo sempre em conta a sua classificação (se medicamento sujeito ou não a receita médica, se medicamento original ou genérico, se medicamento psicotrópico ou se produto de beleza e bem estar), formula galénica (se era comprimido ou cápsula, pós, injetáveis, loções, xaropes, supositórios, aerrossóis...) e consoante a sua conservação (se tinha ou não necessidade de ser armazenado a temperaturas mais baixas no frigorífico).

Os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) estavam arrumados longe do alcance dos utentes, na parte do *back office* da farmácia em gavetas deslizantes, estando como já referi separados de acordo com as suas formas farmacêuticas e classificação e ordenados por ordem alfabética e dosagem de princípio ativo.

Os psicotrópicos e estupefacientes estão arrumados numa gaveta à parte dos restantes medicamentos sujeitos a receita médica, também na parte do *back office* e mais uma vez longe do alcance do utente.

Já os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) encontram-se em prateleiras e lineares por detrás dos balcões de atendimento estando à vista do utente, mas não ao seu alcance.

Esta fase foi também muito importante no decorrer do meu estágio porque me permitiu um primeiro contacto com o medicamento e a sua embalagem e associar o princípio ativo ao respetivo nome comercial. Possibilitou-me ainda aprender mais sobre cada medicamento que me passava pelas mãos uma vez que sempre que arrumava um medicamento que desconhecia realizava um trabalho de pesquisa sobre indicações terapêuticas, efeitos adversos, precauções e posologia.

A terceira etapa do meu estágio passou por assistir ao atendimento dos meus colegas. Assim, ao assistir aos seus atendimentos pude aprender como melhorar e adequar a minha linguagem tanto verbal como postural ao utente que tinha à minha frente. Na postura verbal privilegiar sempre um discurso claro, simples de forma a garantir que a informação que tento transmitir é perceptível. Na postura corporal tentar sempre que a mesma seja uma postura aberta, recetiva, demonstrando sempre empatia para com o utente e um papel de escuta ativa durante todo o atendimento. Tive oportunidade de observar como os meus colegas se adequavam às diferentes situações com que se deparavam e assim preparar-me para situações semelhantes com que me deparei na quarta e última etapa do meu estágio. Nesta etapa foi-me ainda ensinado o funcionamento do sistema informático (Sifarma Modo Automático), foi-me explicado o tipo de receitas existentes e a diferença entre as mesmas (manuais ou eletrónica materializada e não materializada), os diferentes tipos e regimes de comparticipação (Sistema Nacional de Saúde: SNS, SAMS,...), os procedimentos para validação da receita (data, assinatura do médico, número de beneficiário, vinheta, número de embalagens (no caso de receitas manuais e eletrónicas materializadas)).

Na quarta etapa passei a realizar o aconselhamento e dispensa de medicamentos lentamente sempre acompanhada por um dos elementos da FS. Com o passar do tempo fui-me sentindo mais segura e independente passando já a realizar alguns atendimentos sozinha e por mim

sendo que sempre que necessário pedia ajuda aos meus colegas em situações mais complicadas e invulgares nas quais não me sentia tão confortável e capaz.

3.1.5. Utentes fidelizados

Grande parte dos utentes da FS são clientes habituais e fidelizados da farmácia, alguns deles tendo sido clientes das antigas instalações. Esta fidelização para além de permitir à farmácia uma maior retenção de clientes demonstra ainda confiança depositada na equipa técnica e permite ao próprio farmacêutico realizar um acompanhamento personalizado através das informações e histórico clínico do utente aumentando o grau de satisfação e de proximidade.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Localização da Farmácia

Apesar da FS estar localizada no centro da cidade e numa zona bastante movimentada a inexistência de estacionamento e a proximidade a uma rotunda muitas vezes faz com que o atendimento prestado a certos utentes tenha de ser um atendimento apressado pelos mesmos terem deixado os carros “em segunda fila” e mal posicionados. Estes clientes grande parte das vezes exercem alguma pressão no farmacêutico para que termine o atendimento o mais rapidamente possível impossibilitando o mesmo de realizar o aconselhamento da melhor forma possível.

3.2.2. Preparação de poucos manipulados

O interesse em medicamentos manipulados cuja preparação é realizada em pequena escala tem vindo a decrescer ao longo do tempo, estes medicamentos podem ser classificados em oficiais e magistrais.

Os medicamentos manipulados podem ser classificados em fórmulas magistrais ou preparados oficiais.

O preparado oficial trata-se de um medicamento preparado segundo indicações compendiais, de uma Farmacopeia ou Formulário.

Uma fórmula magistral é preparada de acordo com uma prescrição médica personalizada, específica para um determinado utente e que não segue necessariamente uma formulação padronizada havendo a possibilidade de ajuste de dosagens, ingredientes, forma farmacêutica. Ao preparar um medicamento manipulado, independentemente de se tratar de uma Fórmula Magistral ou Preparado Oficial, o farmacêutico tem a função de se assegurar da qualidade da sua preparação, observando para o efeito as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar. Deve ainda garantir que são fornecidas todas as informações relevantes ao utente aquando da sua dispensa,

nomeadamente no que concerne à posologia/modo de utilização, condições de conservação e prazo de validade.

Relativamente ao preço de venda ao público dos medicamentos manipulados, este é calculado conforme os critérios estabelecidos na Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho, e reflete as seguintes parcelas:

- Valor dos honorários da preparação: tem por base um factor (F) cujo valor é atualizado periodicamente, na proporção do crescimento do índice de preços ao consumidor, sendo divulgado pelo Instituto Nacional de Estatística.
- Preço das matérias-primas
- Preço dos materiais de embalagem [4][5].

Ao longo do meu estágio só tive oportunidade de realizar um manipulado de vaselina salicilada que consistia numa pomada esfoliante com ação queratolítica para remoção de células mortas. Considero a realização de poucos manipulados como um ponto fraco nesta experiência, uma vez que, os mesmos continuam a ser bastante fundamentais em determinadas situações como é o caso de pacientes que exijam dosagens muito limitadas (como crianças), pacientes que exigem medicação desprovida de certos alergénios, pacientes com a absorção ou a excreção comprometida, pacientes que necessitam de medicamentos já descontinuados, ...

3.2.3. Lacunas e falhas na formação académica

No atendimento ao público em farmácia comunitária raros são os casos em que um utente se refere a um determinado medicamento pelo nome do seu princípio ativo estando o futuro farmacêutico obrigado a estabelecer a associação nome comercial-princípio ativo. Ao longo do curso poucas são as unidades curriculares que nos apresentam estas mesmas associações. Considero o ponto referido como um ponto fraco pois era uma dificuldade sentida por mim durante o aconselhamento para com o utente que me levava a não estar tão confiante e segura quando realizava o atendimento acabando inevitavelmente por condicionar o meu desempenho.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos

O estágio na FS permitiu-me colocar em prática tudo aquilo que foi aprendido ao longo dos meus 5 anos de curso no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

As unidades curriculares que sinto que mais contribuíram para a minha experiência de atendimento e aconselhamento foram: farmácia clínica, indicação farmacêutica, dermocosmética e serviços clínicos.

As áreas que sinto que poderiam ser mais aprofundadas nestes 5 anos são o conhecimento sobre medicamentos oftálmicos e auriculares, ortopedia, dietética e nutrição.

3.3.2. Formações fornecidas

Durante o período de estágio tive oportunidade de assistir a diversas formações das várias linhas que a FS tinha disponível para venda. Assisti a formações mais rápidas dadas no próprio estabelecimento da farmácia pela Abocca® e Elgidium® e assisti a outras formações mais longas fora do estabelecimento da farmácia dadas pela marca Bioactivo® e Uriage®.

É sempre uma mais-valia tanto para o estagiário que contacta pela primeira vez com muitas destas marcas como também para o farmacêutico comunitário que se encontra constantemente em aprendizagem mantendo a sua formação atualizada para que seja capaz de prestar o melhor dos aconselhamentos ao doente.

3.4. Ameaças

3.4.1. Crescente conhecimento por parte do utente e dificuldade em filtrar a informação

Atualmente somos extremamente influenciados pelo mundo digital estando a informação muito mais ao alcance dos utentes surgindo a internet como uma fonte de disseminação de conhecimento de diversos temas não sendo o setor de saúde exceção.

Um utente mal informado surge como um desafio para o farmacêutico, que tem de lidar com utentes que chegam à farmácia a confiar cegamente na informação lida e apresentando resistência perante o aconselhamento do profissional de saúde.

Esta fonte de informação conduz algumas vezes a situações de autodiagnóstico e automedicação bem como situações de ansiedade e preocupação desnecessária por interpretações incorretas.

O papel do farmacêutico perante isto passa por tentar transmitir a ideia de que nem toda a informação lida é fidedigna e confiável e por criar empatia com o utente para que este acredite no seu aconselhamento e esteja cada vez mais informado e atualizado.

3.4.2. Medicamentos Esgotados

O termo inglês “*drug shortage*” que significa escassez, carência ou falha na disponibilidade de um medicamento no mercado farmacêutico surge como um desafio aos farmacêuticos que são os profissionais de saúde incumbidos de informar o paciente que o medicamento não está disponível.

O farmacêutico é muitas vezes responsável pelo fornecimento de uma terapia medicamentosa mais adequada, devendo ainda avaliar se a qualidade dos tratamentos com medicação alternativa é suficiente e se esses mesmos tratamentos são eficazes e seguros para o utente, bem como entrar em contacto e consenso com o médico prescritor, o que nem sempre é fácil. No caso dos diabéticos o optar por uma medicação alternativa muitas vezes passa por reduzir a dose e diminuir o tempo entre tomas, podendo gerar uma menor adesão por parte do paciente.

Para além disso o farmacêutico prescinde mais do seu tempo na procura da melhor solução e esta quando não é devidamente ponderada e estudada pode originar imprecisões de prescrição, erros de dispensação, erros de administração e negações ao tratamento [6][7].

3.4.3. Venda em parafarmácias e grandes superfícies comerciais

Muitas foram as vezes em que me deparei com utentes que vieram somente procurar por aconselhamento farmacêutico, sobretudo na área de dermocosmética, para posteriormente adquirirem os produtos em parafarmácias ou *websites* onde os mesmos eram vendidos a preços mais acessíveis. As compras *online* por *websites* para além de oferecerem ao utente promoções e preços mais aliciantes dá ainda a oportunidade de uma compra mais cómoda em apenas um “*click*”.

A venda de MNSRM pelos meios referidos surge então como uma ameaça pois a farmácia apesar de ser um estabelecimento de prestação de cuidados de saúde não deixa de ser um estabelecimento comercial. É exigido à farmácia que adote abordagens mais inovadoras para atrair e reter clientes fornecendo serviços de saúde personalizados, oferecendo produtos exclusivos e de qualidade superior, e focando-se na educação e orientação dos pacientes sobre os produtos que vendem informando sempre o utente que muitos dos produtos que compram por estes meios não seguem regulamentação tão rígida como os produtos disponibilizados por uma farmácia.

4. Casos Práticos

4.1. Primeiro Caso Prático: Automedicação

Mulher de 35 anos deslocou-se à farmácia com uma embalagem de Gentocil[®] vazia na mão e veio pedir uma segunda embalagem.

Questionou-se primeiramente para que fim era a medicação solicitada ao que a utente respondeu que era para a sua mãe que tinha *Alzheimer* e cujo olho lacrimejava bastante e produzia bastantes secreções oculares.

A filha informou que já há algum tempo que vinha a realizar uma limpeza diária com algodão e água e posteriormente aplicava o Gentocil[®] que tinha sido inicialmente prescrito por um médico.

A primeira abordagem passou por explicar que o Gentocil[®] era um antibiótico e como tal não poderia ser dispensado sem a presença de uma receita. Seguidamente, informei também que a utilização deste tipo de medicamentos deve ser limitada e não realizada regularmente e que um medicamento na forma farmacêutica de colírio após aberto tinha a validade de somente 1 mês.

Foi então aconselhado que para uma limpeza diária do olho fossem usadas compressas e soro fisiológico e seguidamente fosse aplicado um colírio com ação hidratante e lubrificante: Hyabak[®]. Foi dito no final que caso persistissem a produção de secreções bem como o desconforto ocular como irritação e vermelhidão que deveria ser procurado aconselhamento médico.

4.2. Segundo Caso Prático: Infecção vaginal

Jovem de 25 anos veio à farmácia queixando-se de desconforto vaginal. Primeiramente questionei há quanto tempo andava a sentir este desconforto ao que a utente respondeu que lhe começou por aparecer um corrimento diferente e que na altura do período menstrual a sintomatologia (corrimento fora do normal e desconforto) foi agravada, no entanto, no período pós menstruação o desconforto foi aliviado apesar de continuar presente.

Como não era possível distinguir e avaliar se se tratava de uma infecção fúngica ou bacteriana aconselhei um MNSRM sob a forma de comprimidos que fosse eficaz em ambas as situações: Lafemidia[®], que deveria tomar durante um período de 7 a 10 dias dias após o deitar.

Simultaneamente aconselhei a aplicar também um creme vaginal designado Gynohadazin[®] 30 minutos durante 6 dias antes da toma dos comprimidos Lafemidia[®] para permitir uma correta absorção do fármaco.

Aconselhei ainda o gel de limpeza Gyn8uriage[®] para uma limpeza diária durante um período máximo de 8 dias para alívio do desconforto e ação calmante uma vez que aumenta o pH vaginal tornando-o mais alcalino e menos propício ao desenvolvimento de certos fungos como *C. albicans*.

4.3. Terceiro Caso Prático: Obstipação

Sr. de 60 anos apareceu na farmácia a queixar-se de uma sensação de barriga endurecida e inchada dizendo que não conseguia defecar há 5 dias. Iniciei o meu aconselhamento questionando se era uma situação que acontecia com alguma recorrência ao que o utente respondeu que sim e que costumava utilizar Microlax[®] nestas situações.

Expliquei ao utente que o medicamento que costumava utilizar não é indicado para uma administração regular mas sim para situações pontuais uma vez que é bastante irritante para o intestino podendo até gerar algumas cólicas e criar habituação. Em detrimento do Microlax[®] aconselhei antes uma alternativa mais natural designada Melilax[®].

Expliquei ao utente o funcionamento deste medicamento natural que para além de favorecer a evacuação exerce ainda, graças à presença de mel, uma ação lenitiva e protetora da mucosa anal. A sua ação protetora é exercida ao mimetizar a ação do muco formando uma película que vai facilitar a passagem das fezes pelo canal anal sem provocar dor. Podendo assim, ao contrário do Microlax[®], ser usado em situações de hemorroidas e fissuras anais bastante associadas a obstipação e a esforço no processo de evacuação[8].

Aconselhei então o utente a dar uma oportunidade ao medicamento neste tipo de situações de obstipação mais prolongada caracterizada pela formação do “rolhão” e sensação de barriga inchada.

Terminei este mesmo atendimento referindo que se este problema fosse acompanhado de dor abdominal, cólicas, perda de peso, sangue ou alteração da consistência das fezes deveria ir ao médico.

Por fim, realcei ainda a importância de adotar também medidas não farmacológicas e hábitos e estilos de vida saudáveis como:

1. Beber muitos líquidos e ingerir fibras
2. Prática de atividade física
3. Evitar refeições muito gordurosas e condimentadas
4. Realizar banhos de assento com água tépida
5. Não ignorar o reflexo de defecação

4.4. Quarto Caso Prático: Contraceção Oral Emergência

Jovem de 25 anos desloca-se à farmácia solicitando a pílula do dia seguinte ou contraceção oral de emergência.

Iniciei o meu aconselhamento com 4 questões fundamentais:

1. Diminuí o tom de voz e questionei a cliente se se sentia à vontade em conversar no balcão de atendimento ou se preferia deslocar-se para um gabinete da FS.

2. Há quanto tempo tinha ocorrido a relação sexual desprotegida.
3. Se tinha usado algum método contraceptivo barreira ou se tomava algum contraceptivo oral e se tratava de algum esquecimento.
4. Se era recorrente solicitar pela pílula do dia seguinte.

A utente optou por se deslocar para o gabinete, começou por dizer que não tinha usado nenhum método barreira e que não tomava nenhum anticoncepcional; que a relação tinha ocorrido há cerca de dois dias e que seria a segunda vez que solicitava por um método de contraceção oral de emergência (a primeira vez tinha ocorrido há cerca de dois anos).

Informei a utente das duas opções de fármacos entre os quais poderia optar e que atuavam de forma diferente: levornogestrel eficaz até um período de 3 dias (72 horas) sendo que a eficácia diminuía há medida que o tempo passava entre a relação sexual desprotegida e a toma e o acetato de ulipristal que oferece uma proteção até cerca de 5 dias (120 horas).

A utente por precaução decidiu levar o acetato de ulipristal de nome comercial: ellaOne®

Prossigui com algumas recomendações relativamente a este fármaco:

1. Avisei que deveria ser o mais breve possível, uma vez que, como referido anteriormente a eficácia diminuía quanto maior fosse o intervalo entre a relação desprotegida e a toma.
2. Mencionei que poderiam surgir alguns efeitos secundários como vómitos, dores pélvicas, náuseas, cefaleias. Recomendei que caso tivesse algum efeito adverso gastrointestinal como vómitos ou diarreias nas 3 a 4 horas após a toma deveria tomar uma segunda contraceção oral de emergência.
3. Informei que poderia vir a ter algumas perturbações menstruais e que a menstruação poderia sofrer um atraso até cerca de 7 dias. Após este período caso não tivesse menstruado aconselhei a realização de um teste de gravidez.
Até ao aparecimento da menstruação foi também recomendada a utilização de um método contraceptivo barreira.
4. Avisei por fim que caso estivesse a amamentar teria de suspender a amamentação por um período de 7 dias.

Terminei o atendimento realçando, que, uma contraceção oral de emergência funciona tal como o nome indica em situações de emergência e não como um método contraceptivo de rotina, que não conferia proteção para doenças sexualmente transmissíveis e que a eficácia não era de 100%.

4.5. Quinto Caso Prático: Pé de atleta

Sr. de 40 anos queixou-se de secura no pé acompanhada de comichão que piorava em alturas de maior calor e algumas fissuras e gretas entre os dedos.

Associei os sintomas descritos a pé de atleta fazendo as seguintes recomendações ao utente:

1. Pevaryl® em pomada para aplicação no pé após estar lavado e totalmente seco, aplicar de manhã e à noite durante um período de aproximadamente 4 semanas. Realizar o tratamento até ao fim mesmo que antes do período proposto apresente uma melhoria significativa dos sintomas.
2. Canesten® em pó para aplicação nos sapatos e no próprio pé durante um período de aproximadamente 4 semanas. Realizar o tratamento até ao fim mesmo que antes do período proposto apresente uma melhoria significativa dos sintomas.

Terminei o aconselhamento com algumas medidas farmacológicas como:

1. Arejar o calçado, evitar calçado oclusivo e trocar de calçado diariamente
2. Optar por meias de algodão
3. Secar bem os pés sobretudo na zona interdigital
4. Não partilhar calçado ou toalhas

5. Conclusão

Desde o primeiro dia que entramos no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas que nos é ensinado que a função do farmacêutico não se restringe à mera dispensa de medicamentos, sendo no estágio curricular que o estudante tem a oportunidade de ganhar consciência disso mesmo.

O farmacêutico é o primeiro e último profissional de saúde a quem o doente recorre. Numa primeira instância na procura por aconselhamento farmacêutico, deslocando-se posteriormente ao médico em certas situações que vão para além das competências do farmacêutico e numa última instância assegurando-se que o doente irá proceder à correta toma do medicamento quando o mesmo estiver sozinho em casa.

Assim, foi-me permitido contactar com esta mesma realidade deparando-me com uma enorme diversidade de utentes, com diferentes necessidades, aos quais tentei sempre proporcionar um atendimento personalizado e completo. Através desta experiência extremamente enriquecedora consegui adquirir diversas competências tanto profissionais, como pessoais e sociais que irei levar comigo e colocar em prática como futura profissional de saúde.

6. Bibliografia

- [1] Valormed, “Quem somos?” <https://valormed.pt/quem-somos/> (acedido a 5 de agosto, 2023).
- [2] AMI, “Reciclagem de Radiografias.” <https://ami.org.pt/missao/reciclagem-de-radiografias/> (acedido a 5 de agosto, 2023).
- [3] SNS (Serviço Nacional de Saúde), “Programa troca de seringas.” <https://www.spms.min-saude.pt/tema/programa-troca-de-seringas/> (acedido a 5 de agosto, 2023).
- [4] Infarmed, “Medicamentos manipulados.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados> (acedido a 5 de agosto, 2023).
- [5] INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso, “Portaria n.o 594/2004.” https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a (acedido a 5 de agosto, 2023).
- [6] S. Shukar et al., “Drug Shortage: Causes, Impact, and Mitigation Strategies,” *Front Pharmacol*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.693426.
- [7] M. Kruijtbosch, A. Floor-Schreudering, E. van Leeuwen, W. Göttgens-Jansen, and M. L. Bouvy, “Moral reasoning perspectives of community pharmacists in situations of drug shortages,” *Research in Social and Administrative Pharmacy*, vol. 18, no. 3, 2022, doi: 10.1016/j.sapharm.2020.11.012.
- [8] Aboca, “Ficha do produto: Melilax.” <https://www.melilax.pt/melilax-aboca/> (acedido a 5 de agosto, 2023).

Parte II

Monografia

“Contribuição da fitoterapia em infecções vaginais provocadas
por *Candida albicans*”

Lista de abreviaturas:

ABC: Adenosina trifosfato *binding cassette*

ALS3: Aglutinina do local de adesão 3

ATP: Adenosina trifosfato

CDC: *The centres of disease control and prevent*

CDR: *Candida drug resistance*

CVV: candidíase vulvovaginal

CVVR: Candidíase vulvovaginal recorrente

MBL: *Manose binding lectin*

MDR: *Multidrug resistance*

MF: Facilitadores maiores

OE: Óleo essencial

OMS: Organização Mundial de Saúde

SAP: Protease Aspártica Segregada

SNC: Sistema nervoso central

TTO: *Tea tree oil*

VIH: Vírus da imunodeficiência adquirida

Resumo

Estima-se que cerca de 75% das mulheres em idade fértil tenham pelo menos uma ocorrência de candidíase ao longo da sua vida, e cerca de 40% delas sofram uma segunda infecção.

Embora esta infecção não coloque em risco a vida das mulheres, uma infecção não resolvida afeta a qualidade de vida feminina desde a sua vida social e profissional, saúde mental e relações sexuais.

A crescente incidência da resistência antifúngica, a elevada dificuldade em tratar biofilmes resistentes e a limitação e toxicidade das terapêuticas existentes torna urgente a necessidade de encontrar novas soluções terapêuticas mais toleráveis, mais acessíveis e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes surgindo a fitoterapia como uma alternativa

A presente monografia constitui, portanto, um trabalho de revisão bibliográfica sobre as alternativas fitoterapêuticas no tratamento da candidíase vulvovaginal. No presente documento são abordados diversos tópicos desde algumas características de *Candida spp.* e da microflora vaginal, epidemiologia, sintomas e manifestações clínicas, terapêutica convencional e alternativas fitoterapêuticas à mesma ou com potencial no desenvolvimento de futuros tratamentos.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal, *Candida spp.*, *Candida albicans*, Fitoterapia, Óleos essenciais.

Abstract

It is estimated that around 75% of women of childbearing age have at least one occurrence of candidiasis in their lifetime, and around 40% of them suffer a second infection.

Although this infection is not life-threatening, an unresolved infection affects women's quality of life, from their social and professional lives to their mental health and sexual relations.

The growing incidence of antifungal resistance, the great difficulty in treating resistant biofilms and the limitation and toxicity of existing therapies mean that there is an urgent need to find new therapeutic solutions that are more tolerable, more accessible and improve patients' quality of life.

This monograph is therefore a literature review on phytotherapeutic alternatives in the treatment of vulvovaginal candidiasis. This document covers a range of topics from the characteristics of *Candida* Spp. and the vaginal microflora, epidemiology, symptoms and clinical manifestations, conventional therapy and phytotherapeutic alternatives to it or with the potential to develop future treatments.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis, *Candida* spp., *Candida albicans*, Phytotherapy, Essential Oils.

I. Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um problema de saúde pública que afeta milhões de mulheres em todo o mundo enfrentando, muitas delas, infecções recorrentes que afetam significativamente a sua qualidade de vida. *Candida spp.* é um fungo oportunista que pode ser encontrado em diversas partes do corpo humano e em condições normais é parte constituinte das nossas mucosas não sendo patogénico e sendo controlado pelo nosso sistema imunológico e microbiota destas áreas. No entanto, alguns fatores podem levar a um desequilíbrio, propiciando o desenvolvimento deste microrganismo e conseqüentemente uma infecção que quando atinge a mucosa vaginal designa-se por candidíase vulvovaginal [1] [2].

A Fitoterapia, do grego *therapeia* (tratamento) e *phyton* (vegetal), é a ciência que estuda o tratamento e prevenção de doenças através da utilização de plantas medicinais e de produtos à base de plantas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), “as plantas medicinais são aquelas que, em qualquer circunstância, ao serem introduzidas ou colocadas em contacto com um organismo humano ou animal produzem atividade farmacológica”.

O uso de plantas com fins medicinais é uma prática antiga que remonta a milhares de anos estimando-se que entre 35000 a 70000 espécies de plantas tenham sido utilizadas para fins medicinais ao longo dos tempos [3].

Atualmente em muitas regiões do mundo a utilização de plantas medicinais é parte integrante da sua medicina tradicional estimando-se que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento dependa de medicinas tradicionais à base de plantas para os seus cuidados de saúde primários [4].

A crescente incidência da resistência antifúngica, a elevada dificuldade em tratar biofilmes resistentes e a limitação e toxicidade das terapêuticas existentes torna urgente a necessidade de encontrar novas soluções terapêuticas mais toleráveis, mais acessíveis e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes surgindo a fitoterapia como uma alternativa [2].

2. *Candida spp.*: microbiologia e infeções

Estima-se que atualmente existam entre 1,5 a 5 milhões de espécies de fungos, no entanto, apenas algumas centenas destes podem provocar doenças no ser humano.

O filo *Ascomycota* contém alguns dos agentes patogénicos mais bem sucedidos incluindo fungos oportunistas como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e *Candida spp.* As espécies de *Candida spp.* são responsáveis por uma grande maioria das infeções humanas sendo a causa mais frequente de infeções oportunistas: a espécie *Candida albicans*, *Candida glabrata* (resistente a

diversos medicamentos e a nova ameaça global à saúde pública), *Candida auris*, e outras espécies emergentes, como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* [5].

As infecções causadas por *C. albicans* podem ser classificadas em dois subtipos: mucosas e sistêmicas. As superfícies mucocutâneas mais afetadas são a vaginal, a oral, a esofágica e menos frequentemente as unhas (onicomicose), ocorrem também candidíases cutâneas sendo, no entanto, situações mais invulgares (Fig.1)[5].

A candidíase oral ou corriqueiramente conhecida como “sapinhos” é a infecção mais comum pensando-se que entre 35-80% da população seja portadora da mesma. Os mais afetados são os idosos, recém-nascidos, grávidas e pacientes imunologicamente deprimidos. A sua forma de manifestação mais comum é caracterizada pela presença de manchas e placas brancas na mucosa oral, manifesta-se clinicamente como uma lesão vermelha dolorosa na língua, sendo comum a ocorrência de despilação, ardor e alterações do paladar.

A candidíase esofágica existe sobretudo em doentes imunodeprimidos, sendo em casos de VIH e de doentes transplantados uma das infecções associadas à própria doença. Os sintomas deste tipo de candidíase podem ser variados e incluir: distensão abdominal, diarreia, constipação, náuseas, vômitos e perda de peso sem motivo aparente. Em situações de maior gravidade podem desencadear-se sérias complicações como perfuração intestinal e disseminação para outros órgãos.

A forma mais comum de candidíase cutânea é a forma superficial podendo, no entanto, também existir a forma mais profunda com envolvimento da derme e tecido subcutâneo. Tem um amplo espectro de apresentações clínicas dependendo do local do corpo afetado, idade e de outros fatores predisponentes, no entanto, as formas clinicamente mais relevantes apresentam-se sob a forma de eritemas que podem ou não ser erosivos, pápulas e pústulas satélite na periferia e placas brancas de fácil remoção sendo os locais mais comuns as zonas intertriginosas.

C. albicans pode também provocar paroníquia crónica e aguda (inflamação da pele envolvente à unha) e onicomicose.

A candidíase sistémica também designada de candidémia ou candidíase disseminada ou invasiva afeta locais como a corrente sanguínea, pode envolver o sistema nervoso central (SNC), o fígado, o baço, o coração e/ou os rins. Pode também envolver o compartimento intra-abdominal com ou sem disseminação para a corrente sanguínea estando associada a uma elevada mortalidade. Apesar de *C. albicans* ser a espécie que mais prevalece como causa deste tipo de infecções outras espécies do género *Candida* também podem estar envolvidas.

A candidémia atinge sobretudo indivíduos imunologicamente debilitados como doentes oncológicos, doentes em unidades de cuidados intensivos e pacientes portadores de cateteres

por longo período de tempo. Os sintomas diferem consoante o órgão atingido sendo os sintomas iniciais bastante generalizados como febres, arrepios e mal-estar podendo ser confundidos com outras causas. De forma a evitar este tipo de infeções é essencial que sejam reforçados os cuidados em ambiente hospitalar sobretudo em unidades de cuidados intensivos, adotando as precauções necessárias no que toca a medidas de higiene uma vez que a transmissão ocorre muitas vezes pelo contacto com mãos de profissionais de saúde ou com material contaminado; uso apropriado de cateteres e controlo da antibioterapia e corticoterapia. A crescente resistência aos antifúngicos é uma preocupação crescente no tratamento destas infeções [6].

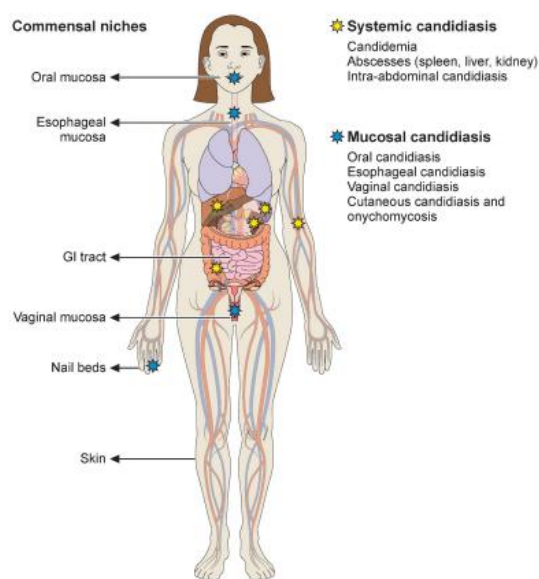


Figura I – Locais anatómicos atingidos por *Candida spp.* (Retirado de⁵)

3. Fatores de Virulência

Candida albicans é um fungo comensal que se torna patogénico quando o hospedeiro se encontra imunologicamente mais frágil sendo por isso considerada uma espécie oportunista. Os principais fatores de virulência desta espécie incluem a produção de candidilina, secreção de proteínas específicas, formação de biofilme e polimorfismo. (Fig.2).

Começando pela capacidade de apresentação de diferentes morfologias, este fungo é considerado uma espécie polimórfica pela sua capacidade de se apresentar tanto na forma de levedura como na forma de hifa verdadeira e pseudo-hifa.

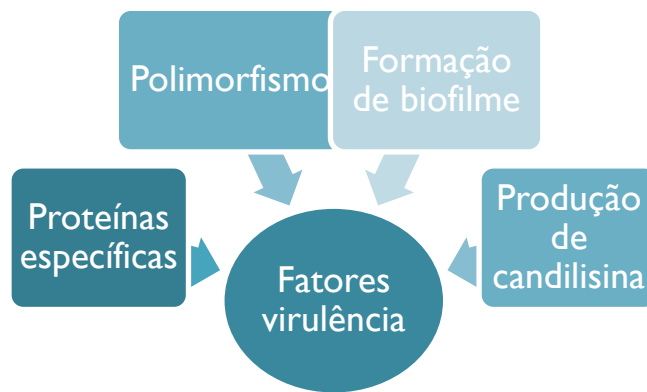


Figura 2 – Fatores de virulência de *Candida spp.*

Na sua forma de levedura reproduz-se assexuadamente por brotamento havendo a divisão de célula filha de célula mãe. Após o brotamento surgem cadeias de células de levedura mais alongadas designadas pseudohifas que em situações como temperaturas superiores a 37°C, pH alcalino, necessidades nutricionais, elevadas concentrações de dióxido de carbono se transformam em hifas. A passagem morfológica de pseudohifa para hifa é ainda reforçada por um ambiente deficiente em azoto e carbono e elevada quantidade de N-acetilglucosamina. A principal diferença notável entre a composição da forma leveduriforme para a forma hifal prende-se na constituição das suas paredes celulares: a parede celular da hifa é mais rica em quitina sendo portanto mais resistente comparativamente à parede celular da levedura. Esta parede celular exerce um papel importantíssimo para o fungo protegendo-o de condições de stress ambiental como alterações osmóticas, desidratação e mudanças de temperatura, exercendo ainda uma função protetora contra o sistema imunitário do hospedeiro[6].

Há autores que defendem que a forma comensal do fungo é a forma de levedura enquanto que a forma invasiva é a forma hifal baseando-se no facto de que a maioria das observações histológicas de células invadidas por *C. albicans* apresenta a presença de hifas e raramente a presença de leveduras, outros autores, por sua vez, defendem que ambas as formas são virulentas. Apesar disso, as duas formas morfológicas têm funções distintas durante as diferentes fases do desenvolvimento da infeção, incluindo a adesão, invasão, danos, disseminação, evasão imunitária e resposta do hospedeiro e é a capacidade de transitar entre ambas as formas que contribui para a virulência deste fungo[1].

A forma de levedura está associada à capacidade de adesão às células do hospedeiro. A adesão é um passo crítico para a colonização inicial do fungo e é facilitada por adesinas, como a ALS3 (aglutinina do local de adesão 3), que desempenham um papel fulcral nesta etapa reconhecendo ligandos como proteínas, fibrinogénios e fibronectinas e ligando-se a eles.

Também a existência de uma toxina específica da forma hifal designada candidisina é crucial para a ocorrência de infeção. Esta toxina é um peptídeo produzido por hifas que é capaz de

atacar a membrana epitelial do hospedeiro danificando-a diretamente por meio de intercalação, permeabilização e criação de poros havendo conseqüentemente um enfraquecimento do conteúdo citoplasmático.

A secreção de proteínas específicas como enzimas hidrolíticas, como as fosfolipases, lipases extra e intracelulares estão associadas à invasão do epitélio e penetração celular. Dentro das enzimas hidrolíticas sintetizadas destacam-se as proteases aspárticas segregadas (SAPs), envolvidas em processos que destroem, alteram ou danificam a integridade da membrana das células infectadas levando à sua disfunção. São identificadas especificamente em quatro espécies do gênero: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*.

Por fim, a formação do biofilme é também um mecanismo de virulência sendo o principal responsável pela elevada morbidade e mortalidade de *Candida albicans* [6] [7].

Os biofilmes são uma das formas mais comuns de crescimento microbiano sendo que aproximadamente cerca 65% de todas as infecções microbianas humanas envolvem a formação desta estrutura [8].

Trata-se de uma comunidade microbiana complexa caracterizada pelo crescimento do fungo em diferentes formas morfológicas (levedura, hifa e pseudo-hifa) sobre uma matriz rica em exopolissacáridos. O desenvolvimento do mesmo dá-se em superfícies como células epiteliais, dispositivos médicos e implantes. A formação do biofilme compreende várias fases, inicia-se com a fase de adesão de células de levedura à superfície formando a camada basal (fase inicial); diferenciação das células de levedura em hifas (fase intermédia); aumento da matriz pela acumulação de uma matriz extracelular de polissacáridos (fase de maturação) e dispersão de células de levedura não aderentes (fase final) que possibilita a criação de novos biofilmes e a disseminação no tecido do hospedeiro (Fig.3) [8].

Esta estrutura protege as células fúngicas do ambiente externo funcionando como um “escudo” e dificultando a penetração dos antifúngicos promovendo resistência ao tratamento, modificando a interação fungo-células epiteliais da mucosa e impedindo um adequado reconhecimento e ativação de mecanismos de defesa [6] [7].

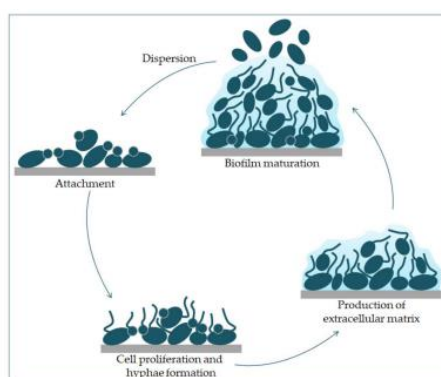


Figura 3 – Fases de formação do biofilme (Retirado de⁶)

4. Candidíase Vulvovaginal

De acordo com *The Centers of Disease Control and Prevention* (CDC), a candidíase vulvovaginal (CVV) é definida como sendo uma infecção vaginal provocada por espécies de *Candida spp.*, principalmente por *C. albicans* (responsável por cerca de 85% das infecções) ou ocasionalmente por outras espécies de leveduras (*C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) gerando sintomas como corrimento vaginal anormal, prurido, disúria, dor vaginal e dispareunia[9].

Estima-se que cerca de 75% das mulheres em idade fértil tenham pelo menos uma ocorrência de candidíase ao longo da sua vida, e cerca de 40% delas sofram uma segunda infecção, a taxa de recorrência desta infecção é alta sendo que 5 a 8% das mulheres podem desenvolver Candidíase Vulvovaginal Recorrente (CVVR) [10].

4.1. Microbiota vaginal

O hospedeiro dispõe de mecanismos de defesa eficazes que permitem a colonização por *C. albicans* num estado de comensalismo não patogénico. Este comensalismo não patogénico é garantido pelo próprio epitélio vaginal, pela *manose binding lectin* (MBL) (também conhecida como lectina de ligação à manose) e pela microbiota vaginal.

O epitélio vaginal surge como a primeira linha de defesa: funciona como barreira protetora mantendo a sua integridade pela existência de *tigh junctions* e outras proteínas transmembranares evitando também a disseminação de *C. albicans*. Para além de barreira física, o epitélio vaginal em situações infecciosas ativa também mecanismos de resposta imune inata[11].

MBL é encontrada no nosso sistema imune desempenhando um papel importante de defesa pela sua capacidade de ligação a hidratos de carbono e microrganismos como vírus, bactérias e fungos. Quando esta lectina reconhece e estabelece ligação com as células fúngicas de *C. albicans* ativa o sistema de complemento que se vai encarregar de destruir as células fúngicas e impedir o seu desenvolvimento [9] [12].

Uma microbiota vaginal saudável implica a coexistência de bactérias benéficas num relacionamento de mutualismo com o hospedeiro. Os *lactobacillus*, bacilos gram positivo, são uma das espécies comumente encontradas na mucosa vaginal desempenhando várias funções protetoras: produzem substâncias como ácido láctico, peróxido de hidrogénio e o biosurfactantes que ajudam a manter o pH ácido (evitando a transição morfológica de *C. albicans* de levedura para hifa) na mucosa vaginal, contribuem para a existência de um ambiente anti-inflamatório através da produção de citocinas e quimiocinas que ajudam a regular a resposta imune e ainda dificultam a adesão de agentes patogénicos ao epitélio vaginal [11].

A produção de ácido láctico pelos *Lactobacillus* vai inibir a formação de hifas bem como induzir a libertação de citocinas anti-inflamatórias, a produção de peróxido de hidrogénio inibe o crescimento de *C. albicans* e a produção de biosurfactantes inibe o desenvolvimento do biofilme [11].

Numa CVV o que se sucede é a alteração da população microbiana vaginal, deixando assim de existir a predominância de *lactobacillus* gerando um aumento dos valores de pH e promovendo a existência de outros microrganismos diferentes daqueles que habitam em condições saudáveis.

Além dos *lactobacillus*, outras espécies bacterianas em menor quantidade podem estar presentes na microbiota vaginal de uma mulher saudável como é o caso de *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae*, *Streptococcus aureus*, *Bifidobacteriaceae spp.*, *Mobiluncus spp.* No entanto, é a predominância dos *lactobacillus* que contribui para a manutenção de um ambiente vaginal saudável. Importante também salientar que a composição da microbiota vaginal pode ser influenciada por vários fatores, como a idade, fase do ciclo menstrual, gravidez, menopausa, uso de antibióticos e existência de certas comorbidades [9] [12].

E, embora cada mulher apresente uma comunidade de microbiota vaginal diferente, aquelas com *Lactobacillus* como membro dominante estão mais frequentemente associados a uma homeostasia vaginal [11].

4.2. Grupos de risco

Infeções provocadas pelo fungo *Candida spp.* não são comuns em mulheres antes da puberdade e tendem a aumentar durante a idade fértil, diminuindo após a menopausa. Relativamente à faixa etária mais afetada foi demonstrado em vários estudos ser a faixa entre os 25 e os 34 anos de idade.

Os momentos associados a uma taxa mais elevada de colonização deste fungo são episódios de hiperoestrogenemia, como situações de terapêutica hormonal de substituição na pós-menopausa, fase folicular do período menstrual e fase reprodutiva. O estrogénio para além de funcionar como meio nutritivo para o crescimento do fungo estimula ainda o espessamento do revestimento vaginal bem como o aumento da produção de glicogénio, o que, conseqüentemente, facilita a adesão de microrganismos. Para além dos fatores referidos, alguns estudos demonstraram também que o estrogénio pode exercer efeitos imunossupressores, diminuindo a resposta imunológica local contra *Candida spp.*

Após a menopausa, os níveis de estrogénio diminuem, por conseguinte ocorre uma diminuição da humidade e um afinamento do revestimento vaginal, isto combinado, contribui para uma diminuição da incidência de CVV nessa faixa etária.

Também a utilização de contraceptivos com elevadas concentrações de estrogénio e a gravidez constituem um fator de risco.

Infeções por este fungo surgem também muitas vezes associadas a tratamento com antibióticos de largo espectro. É um fator predisponente já que alguns antibióticos não são seletivos a fim de eliminarem só as bactérias desejadas eliminando também bactérias constituintes de uma microbiota vaginal saudável, como é o caso dos *Lactobacillus*. Quando a quantidade de *Lactobacillus* diminui estas bactérias deixam de desempenhar de forma eficiente o seu papel de manutenção do pH vaginal criando um ambiente propício ao desenvolvimento de *Candida spp.*

A competência biológica e a disponibilidade de nutrientes constituem também fatores relevantes para o desenvolvimento de uma possível infeção, como é o caso de pacientes diabéticos, sobretudo doentes diabéticos não controlados que apresentam níveis elevados de glicose no sangue e nos tecidos, incluindo na mucosa vaginal. Uma vez que este microrganismo é capaz de se alimentar de glicose, altas concentrações da mesma na mucosa vaginal favorecem o seu crescimento [13].

A imunodepressão provocada pelo uso de glucocorticoides e outros imunossuppressores, pacientes com HIV ou transplantados, uso de dispositivos contraceptivos, esponjas vaginais, diafragmas e DIU são também fatores predisponentes.

Outros fatores como alergias e dietas ricas em açúcares também afetam o microambiente vaginal podendo levar a alterações na microbiota [9].

Os motivos pelos quais uma mulher passa a ter episódios recorrentes de infeção são ainda desconhecidos, na maioria dos casos estas mulheres não apresentam nenhum dos fatores de risco acima mencionados o que leva a crer que possa estar associado a fatores de predisposição genética [13].

4.3. Sintomas e tratamento farmacológico

Os sintomas característicos desta infeção são o prurido sendo usualmente acompanhado de dor, leucorreia, irritação, disúria ou dispareunia, eritema e edema vulvovaginal podendo também ocorrer escoriações e fissuras. O corrimento caracteriza-se como sendo branco, espesso, grumoso e bastante aderente às paredes vaginais, com odor mínimo e quase inexistente e sendo usualmente caracterizado como tendo o aspeto de “requeijão”.

O tratamento convencional da CVV não complicada consiste na utilização de antifúngicos azólicos tanto orais como tópicos, alguns destes medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Os mais comumente usados são os derivados imidazólicos que atuam sobre um constituinte essencial da membrana fúngica designado ergosterol. O ergosterol é um lípido da

família dos esteróis que confere fluidez, simetria e integridade à membrana fúngica para além de contribuir para a funcionalidade de diversas enzimas entre elas a quitina sintetase envolvida no crescimento e divisão celular. Estes antifúngicos atuam por inibição de enzimas oxidativas associadas ao citocromo P450 (lanosterol 14-alfa-desmetilase) envolvidas no processo de conversão de lanosterol em ergosterol gerando uma alteração na permeabilidade membranar. Para além do referido, promovem ainda a acumulação de peróxido de hidrogénio capaz de provocar lesões na estrutura de organelos celulares do fungo (Fig.4) [14].

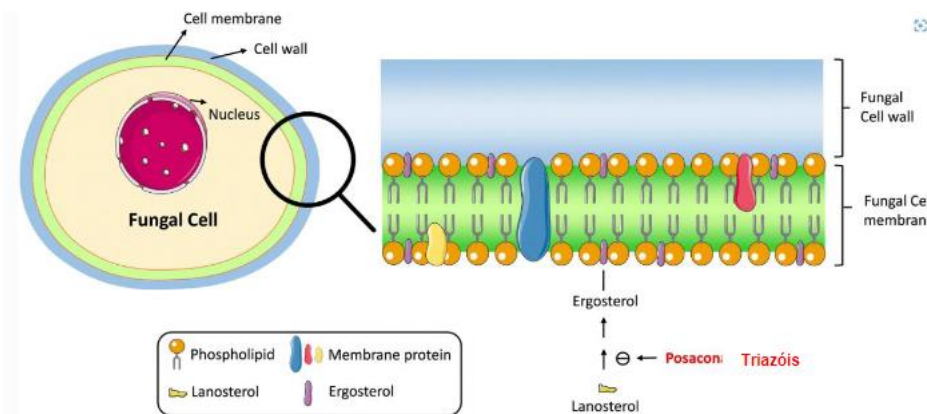


Figura 4 – Mecanismo de ação dos fármacos azólicos (Retirado de¹⁴)

Uma CVV não complicada define-se como sendo uma CVV cujos sintomas são considerados ligeiros a moderados, sendo a infeção esporádica e afetando uma mulher não gestante e sem imunossupressão. O tratamento passa pela administração por via oral de uma toma única de fluconazol 150 mg, ou por via vaginal, com antifúngicos de aplicação única ou em regimes de três dias, muitos deles MNSRM.

Relativamente aos diversos antifúngicos disponíveis no mercado não parece existir diferença de eficácia entre os vários fármacos tópicos e esquemas de tratamento, bem como entre a via oral e a via tópica. Os tratamentos tópicos apresentam menos efeitos adversos em comparação com a via oral proporcionando assim mais rápida sensação de alívio associada ao seu efeito calmante.

No caso de uma CVV complicada, definida como sendo uma infeção com sintomas graves, que afeta uma mulher imunodeprimida, diabética mal controlada ou provocada por uma estirpe não *albicans* o tratamento é mais prolongado. O tratamento oral passa pela administração de fluconazol 150 mg em duas a três doses sequenciais a cada 72 horas (3 dias), dependendo da gravidade da infeção. A terapêutica tópica deverá ser administrada pelo período mínimo de 7 dias, podendo ser necessários regimes até 14 dias.

Para grávidas a terapêutica de eleição é por via vaginal, administrados durante 7 dias, como o clotrimazol, o miconazol ou o econazol. Os antifúngicos orais não são adequados, pois podem estar associados a aumento do risco de aborto ou malformações fetais.

Para mulheres durante a amamentação não existe consenso sobre a terapêutica mais indicada. CVV recorrente (CVVR) é definida como quatro ou mais episódios de infeção sintomática no intervalo de um ano. O regime recomendado consiste na administração de 150 mg de fluconazol cada 3 dias, em 3 doses, como terapêutica de indução, seguindo-se um tratamento de manutenção com a sua administração uma vez por semana durante 6 meses. No caso de recaídas durante o tratamento poderá readministrar-se o esquema de indução e reiniciar-se o tratamento de manutenção, desta vez durante um ano.

Em situações refratárias, particularmente em que exista resistência aos antifúngicos, pode ser necessário recorrer a fármacos raramente utilizados como o violeta de genciana por aplicação diária durante um período de 10-14 dias. No entanto, caiu em desuso pela baixa eficácia e pela inconveniência de manchar a roupa permanentemente. Outra possibilidade é o ácido bórico 600 mg por via vaginal durante 14 dias apesar de provocar irritação local [15].

5. Mecanismos de resistência

O mecanismo de ação de antifúngicos azólicos, onde está inserido o fluconazol, fármaco de eleição, é por interferência na atividade da enzima lanosterol-14 α -demetilase, que é uma enzima dependente do citocromo P-450 envolvida na produção de ergosterol, um componente essencial da membrana fúngica. Ao inibir a atividade desta enzima, o fluconazol causa danos estruturais e funcionais na membrana fúngica pela acumulação de 14- α -metil esteróis que tornam a membrana menos fluida e permeável gerando consequências ao nível do transporte de nutrientes e metabolitos, regulação da pressão osmótica, atividade de enzimas e interações com o sistema imune do hospedeiro comprometendo a sua viabilidade. Por não provocar a morte celular este antifúngico é considerado fungistático e não fungicida. Assim, *Candida spp.* como resposta à ação do fluconazol defende-se com vários mecanismos de resistência entre eles mutações moleculares em genes (gene *Erg1p*) que codificam para a enzima alvo do antifúngico (*Erg1*) envolvida na síntese de ergosterol; estas mesmas mutações alteram tanto estruturalmente como funcionalmente a enzima diminuindo a sua afinidade para com o antifúngico. Outro dos mecanismos de resistência de *C. albicans* é o transporte ativo como os transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) e Facilitadores Maiores (MF) que são um sistema de bomba de efluxo mediado por ATP que se localizam na membrana citoplasmática e que contribuem para a resistência de quase todos os antifúngicos azólicos expulsando compostos indesejáveis como fármacos para o exterior da célula. Os transportadores ABC

são codificados por genes *Candida Drug Resistance* (CDR) e os transportadores MF são codificados por genes *Multidrug Resistance* (MDR). A sobreexpressão de transportadores é a causa mais frequente de resistência aos antifúngicos, no entanto a sobreexpressão de genes MDR só confere resistência especificamente ao fluconazol.

Os antifúngicos azólicos entram numa célula suscetível por um mecanismo de transporte por difusão passiva atuando sobre a enzima lanosterol desmetilase inibindo a síntese de ergosterol. Estas células sensíveis possuem baixos níveis de expressão de gene CDR e MDR, enquanto que numa célula resistente estes antifúngicos não são tão efetivos na enzima lanosterol desmetilase devido a uma sobreexpressão de genes CDR e MDR.

De importante realçar que as células resistentes podem ter mais do que um único mecanismo de resistência [16] [17] [18].

6. Plantas medicinais

Produtos à base de plantas têm sido tradicionalmente usados como agentes terapêuticos. Apesar dos notáveis progressos observados na química orgânica sintética durante o último século mais de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados derivam direta ou indiretamente de plantas, esta mesma percentagem pode atingir os 50% quando também temos em consideração os medicamentos de venda livre. Os produtos naturais à base de plantas para além das propriedades farmacológicas a eles associados ainda são uma fonte de compostos que podem ser modificados no desenvolvimento de novas moléculas.

Desde o século passado que as plantas medicinais têm vindo a ser consideradas como uma potencial terapêutica em situações infecciosas e, nas últimas décadas tem vindo a ser dada especial atenção a espécies ricas em metabolitos secundários como compostos fenólicos, terpenos, esteróides, iridóides e alcalóides [19].

Atualmente sabemos que os óleos essenciais são usados há milénios existindo evidências arqueológicas que sugerem a sua utilização desde o Neolítico (antes de 4000 a.C.) sendo ainda mencionados também em relatos antigos da Mesopotâmia e Egito [20].

São misturas complexas de vários compostos voláteis de origem terpenóide ou não-terpenóide que podem ser extraídos de diferentes partes da planta por hidrodestilação, destilação a vapor e destilação a seco ou ainda por um processo mecânico adequado (no caso dos citrinos)[19]. São caracterizados pelos seus componentes principais presentes em concentrações altas (20–70%) em comparação com outros componentes que estão presentes em quantidades vestigiais e podem ser encontrados em diversas partes da planta como folhas, caules, raízes, sementes, casca sob a sua forma livre ou associados a glicosídeos [21].

Os óleos essenciais têm demonstrado exercer atividade antimicrobiana tanto *in vivo* como *in vitro*, têm vindo a destacar-se como uma das terapêuticas mais promissoras uma vez que apresentam baixa toxicidade e uma ampla gama de propriedades incluindo atividade antifúngica [20].

A crescente incidência de estirpes resistentes aos antifúngicos disponíveis, a elevada dificuldade em combater o biofilme formado por *Candida albicans* e as opções terapêuticas limitadas tornam crucial o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e seguras [22].

Surgem então os compostos naturais à base de plantas, tanto isoladamente como em associação com medicamentos convencionais, como uma alternativa ao processo de síntese de moléculas que é altamente dependente do tempo, é economicamente mais dispendiosa e não é amiga do meio ambiente [19].

6.1. *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel

A *Melaleuca alternifolia* (Fig.5) também conhecida como árvore-do-chá, é uma planta originária da Austrália pertencente à família *Myrtaceae*. Tradicionalmente tem vindo a ser usada pelos povos indígenas há mais de 80 anos. De entre as várias propriedades terapêuticas a que tem recebido mais atenção é a sua propriedade antimicrobiana tendo a sua primeira utilização sido relatada pelos *Aborígenes Bundjalung do New South Wales*.

Por meio de destilação a vapor das folhas e partes terminais desta árvore conseguimos obter o seu óleo essencial, *tea tree oil* (TTO), conhecido por possuir diversas propriedades anti-inflamatórias, antisépticas, antimicrobianas e cicatrizantes.

Segundo a EMA o seu uso bem estabelecido é atribuído a preparações líquidas contendo entre 0,5% a 10% do seu óleo essencial para uso cutâneo e oromucoso em situações de pequenas feridas superficiais e picadas de inseto; tratamento de pequenos furúnculos e acne ligeiro; alívio de comichão e irritação associada a casos ligeiros de pé de atleta e tratamento sintomático de inflamações ligeiras na mucosa oral.

Não é recomendado o seu uso por via oral ou por inalação nem a sua aplicação nos olhos e ouvidos e quanto a possíveis interações com medicamentos nenhum episódio foi reportado [23].

O TTO é composto por hidrocarbonetos terpénicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e os respectivos álcoois associados e o constituinte maioritário do óleo desta planta é o terpinen-4-ol, responsável pelas suas propriedades antissépticas. O 1,8-cineol, o γ -terpineol e o α -terpineno são outros componentes que também se encontram presentes neste óleo.

Quando expostos à luz, calor ou humidade os terpinenos oxidam e formam uma substância designada p-cimeno. Quando a quantidade de terpinenos diminui há conseqüentemente um aumento da quantidade de p-cimeno. Assim, a concentração deste componente é considerada um indicador da degradação oxidativa do óleo e, tendo em conta, a variabilidade entre lotes existente, a sua composição deve respeitar sempre uma norma internacional onde são estabelecidos os valores máximos e mínimos da concentração destes compostos. Deve ter um componente mínimo de 35% de terpineno-4-ol e um conteúdo máximo de 8% de p-cimeno [24].

A aplicação tópica deste óleo apresenta um bom perfil de segurança e os seus efeitos adversos são considerados *minor*, ocasionais e autolimitados, no entanto, a sua natureza lipofílica permite-lhe não só penetrar nas camadas mais superficiais da pele e exercer o seu efeito antimicrobiano como também aumenta a possibilidade de absorção pela derme podendo causar irritação cutânea em concentrações mais elevadas e causar reações alérgicas em indivíduos predispostos. Tendo sido reportado pela EMA a ocorrência de algumas reações adversas como: dor aguda, prurido ligeiro, sensação de ardor, irritação, comichão, picadas, eritema, edema e reações alérgicas [23].

A ingestão de óleo de Melaleuca tem efeitos tóxicos e não está recomendada considerando-se que o óleo de Melaleuca 100% puro deve ser embalado em frascos à prova de crianças e rotulados com um aviso que aconselhe a não ingestão do óleo, para além disso deve ainda ser conservado em recipientes herméticos, protegidos da luz e do calor. O seu armazenamento bem como o seu manuseamento devem ser adequados e cuidados de forma a evitar a formação de produtos de oxidação com maior potencial de sensibilização da pele [25].

Quanto ao modo de atuação de TTO em *Candida albicans* o mesmo altera a fluidez e permeabilidade da membrana celular, provoca alterações na membrana mitocondrial, inibe a respiração celular e produção de energia e inibe a acidificação do meio induzida por glucose (acidificação esta que ocorre por um método de expulsão de prótons pela ATPase da membrana plasmática alimentada por ATP proveniente da mitocôndria). Para além do referido, TTO tem ainda a capacidade de inibir reversivelmente a formação de tubos germinativos e a conversão micelial [24].



Figura 5 - *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (Retirado de²⁶)

Um estudo foi realizado por Mertas e colaboradores em 2015 com 32 estirpes de *Candida Albicans* resistentes ao fluconazol que foram submetidas a doses subletais do óleo essencial de Melaleuca.

Recordando novamente, o mecanismo de ação do fluconazol o mesmo dá-se pela interferência na atividade da enzima lanosterol-14 α -demetilase, envolvida na produção de ergosterol causando conseqüentemente danos estruturais e funcionais na membrana fúngica, comprometendo a sua viabilidade. Mecanismos de resistência a este fármaco incluem a diminuição na produção da enzima lanosterol 14 α -demetilase, por mutações no gene ERG11 e por defeitos na Δ 5-6 desaturase, codificada pelo gene ERG3, resultando numa perda de função na via do ergosterol. Também através da expressão dos genes CDR1/2 e MDR1, que codificam para "bombas de efluxo" é aumentado o transporte ativo de antifúngicos como fluconazol para fora da célula fúngica, reduzindo assim a sua eficácia.

O óleo essencial de *Melaleuca* (TTO) no estudo foi usado com o intuito de permeabilizar as membranas das células para posteriormente aumentar a suscetibilidade das mesmas à ação do fluconazol. O TTO atua por diferentes mecanismos: ficando incorporado na membrana lipídica do fungo perturbando inevitavelmente a estrutura membranar aumentando a permeabilidade e comprometendo a função fisiológica; inibe a formação de tubos germinativos e a transição para forma micelial e inibe a respiração celular. TTO vai ainda perturbar as bombas de efluxo, tornando a célula fúngica mais suscetível ao fluconazol.

Relativamente aos resultados obtidos neste estudo, ao todo, 62,5% das espécies passaram a ser suscetíveis ao fluconazol, 25,0% apresentaram suscetibilidade intermédia e 12,5% permaneceram resistentes. A concentração mínima inibitória (CIM) do fluconazol diminuiu de uma média de 244,0 μ g/mL para uma média de 38,46 μ g/mL e as concentrações mínimas fraccionadas (CMF's) diminuíram de uma média de 254,67 μ g/mL para uma média de 66,62 μ g/mL.

Este estudo concluiu então que a combinação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* ou dos seus componentes, como o terpineno-4-ol a fármacos convencionais como o fluconazol, tem potencial para auxiliar no tratamento de infeções por *C. albicans*. No entanto, são necessários estudos adicionais *in vitro* para identificar a actividade antimicrobiana das substâncias medicinais naturais e detectar interacções sinérgicas com agentes antimicrobianos normalmente utilizados [27].

Já noutro estudo realizado por Alkhanjaf e colaboradores desenvolveu-se um gel termossensível contendo cravo da Índia e óleo de *Melaleuca alternifolia* com o intuito de combater e solucionar candidíases vaginais. Os óleos foram misturados numa proporção de 3:1 e convertidos numa nanoemulsão óleo/água. Para determinar o potencial da formulação final foram efetuadas algumas análises *in vitro* como medição da viscosidade, avaliação de estabilidade termodinâmica, mucoadesão e permeação *ex vivo*,... Foram também realizados estudos *in vivo* avaliando a cinética de eliminação do fungo num modelo animal.

A sinergia entre estes compostos permitiu a criação de um gel termossensível estável e eficaz que pode ser utilizado em candidíase recorrente e noutras infeções, uma formulação não irritante em que os ativos utilizados estivessem em concentrações mínimas e fossem encapsulados numa nanoemulsão que posteriormente se converteria num gel termossensível. Ou seja, a formulação mantém-se líquida à temperatura ambiente mas quando contacta com a temperatura corporal é convertida num gel termossensível. O tamanho das partículas, à nanoescala, permite uma boa penetração na camada de muco bem como o tratamento de infeções fúngicas mais profundas. Por outro lado, a incorporação dos ativos na fase lipídica protege também o fármaco da ação de processos catalíticos do muco e de outros fluidos. O facto de a formulação ser em gel e não em pomada faz com que a administração seja melhor tolerada e com que o ativo permaneça no local de ação durante um determinado período de tempo controlando e prolongando a libertação do fármaco.

O teste *in vivo* foi realizado em modelos de rato (n=24) que foram divididos em 4 grupos: grupo A controlo negativo; grupo B gel com óleo essencial de cravo da Índia e de melaleuca alternifolia; grupo C gel convencional com óleo de cravo da Índia e grupo D gel convencional com óleo essencial de melaleuca alternifolia, todos eles inoculados com uma solução salina de *C. albicans*. O gel foi aplicado 1 dia depois e realizaram-se recolhas do fluido vaginal admitindo-se que o rato estaria infetado quando existisse pelo menos uma unidade formadora de colónia (UFC) por mililitro de fluido (ou seja, uma contagem de $\geq 10^3$ UFC/mL) na amostra.

Nos 21 dias de estudo, a maior taxa de depuração foi observada com o grupo B, ou seja, o grupo a quem foi administrado o gel termossensível contendo óleo essencial de Cravo da Índia

e Melaleuca. O gel padrão de óleo de cravo da Índia foi o que apresentou uma menor depuração.

O gel termossensível contendo óleo essencial de cravo da Índia e TTO otimizado seria muito provavelmente menos irritante para utilização na pele ou mucosa, sendo no entanto necessária a realização de mais estudos sobre o perfil de irritação da mucosa para fundamentar esta afirmação.

O facto da formulação referida no estudo incluir ativos naturais à base de plantas confere a vantagem de não exigir uma avaliação clínica tão pormenorizada como é geralmente necessário no caso de moléculas sintéticas, os parâmetros de segurança são também menos rigorosos devido às suas origens naturais e à aplicação generalizada dos seus componentes em diferentes doenças e do apoio da literatura científica. Esta investigação pode abrir portas a estudos que avaliem outras combinações de dois ou mais ingredientes naturais para a doença em causa e para outras doenças também [28].

6.2. *Mentha arvensis* L. e *Lavandula x intermedia*

Mentha arvensis, conhecida como hortelã-japonesa ou vique, é uma planta herbácea perene pertencente à família *Lamiaceae* que pode atingir cerca de 60cm de altura (Fig.6). É uma espécie de menta nativa das regiões temperadas da Europa ocidental e central, China e Japão, naturalizada dos Estados Unidos da América.



Figura 6 – *Mentha arvensis* (Retirado de²⁹)

A parte aérea florida é utilizada para a extração, por vapor de água, do seu óleo essencial. O seu óleo essencial é sobretudo constituído por mentol (70-95%) e seus ésteres dos ácidos acético e isovalérico, mentona (10-20%) e em menores quantidades outros constituintes entre eles isomentona, mentofurano, cineol, limoneno, carvona e pulegona,... [30].

As folhas desta planta são utilizadas pelas suas propriedades termogénicas, anti-helmínticas, desodorizantes, expetorantes, carminativas, diuréticas, cardiotónicas e digestivas sendo ainda usadas para doenças hepáticas, icterícia e asma. A infusão das suas folhas é também utilizada para alguns problemas pediátricos, náuseas na gravidez e alívio de articulações inflamadas. É ainda utilizada ainda na área dermatológica pelas suas propriedades anti-pruriginosas, antissépticas e de alívio de irritações de pele.

Para além das propriedades acima referidas, estudos recentes têm vindo a dar ênfase também ao seu efeito anti-inflamatório, anti-oxidante e antimicrobiano.

Lavandula x intermedia (Fig.7) também conhecida como lavandina ou *Lavandula hybrida* é uma planta perene da família *Lamiaceae* que resulta de um cruzamento híbrido entre a lavanda portuguesa (*L. angustifolia* Mill.) e a lavanda inglesa (*L. latifolia* Medik).

A lavandina foi produzida com intuito de servir de matéria-prima para a obtenção de óleo essencial (OE) cujo rendimento é cerca de cinco vezes superior ao de *L. angustifolia*. O OE obtido das flores de *L. angustifolia* é composto principalmente por acetato de linalilo, linalol, lavandulol, 1,8-cineol, acetato de lavandulilo e cânfora, enquanto que o OE de lavandina contém linalol, acetato de linalilo, cânfora, 1,8-cineol e borneol. O OE obtido da *L. angustifolia* tem várias aplicações terapêuticas: propriedades sedativas, carminativas, antidepressivas e anti-inflamatórias, enquanto que o óleo isolado de *L. x intermedia*, devido ao seu elevado teor de cânfora é utilizado principalmente na produção de perfumes e sabão. Para além destas aplicações, ambos os óleos essenciais são utilizados na indústria alimentar como aromas naturais em produtos de pastelaria, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, pudins, etc. Para além destas propriedades, numerosos estudos relataram que ambos os óleos essenciais possuem propriedades antimicrobianas e citotóxicas [30] [31].



Figura 7 – *Lavandula x intermedia* (Retirado de³⁰)

Num estudo realizado por Iseppi e colaboradores foram selecionados dois óleos essenciais, de *L. x intermedia* e *M. arvensis*, plantas pertencentes à família *Lamiaceae* com base na sua atividade antimicrobiana contra *S. agalactiae* e *C. albicans*.

No estudo referido foram realizados diversos ensaios:

- Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) pelo método de microdiluição para ambos os óleos essenciais: o óleo essencial de *Lavandula x. intermedia* apresentou os melhores resultados com um valor de CIM de 9-18 µg/mL e *Mentha arvensis* com resultados de 18-144 µg/mL.
- Determinação da concentração inibitória fracionada (CFI) também pelo método de microdiluição em que se observou a inexistência de antagonismo entre os dois óleos essenciais e a presença de sinergismo entre os dois óleos essenciais e entre o óleo essencial e o antifúngico fluconazol.
- “Time-kill studies”, estudo realizado com base na alteração dos valores de densidade óptica da amostra a diferentes tempos.
- Atividade antibiofilme através do ensaio de coloração com violeta de cristal.
- Ação dos óleos essenciais no biofilme formado por *Candida albicans* por meio de um ensaio de fluorescência que quantificou o número de células viáveis em comparação com o número de células mortas após exposição entre as associações OE/OE e OE/antifúngico.
- Finalizou-se o estudo com um teste de determinação de eficácia anti-biofilme com o método coloração vivo/morto associado a microscopia de fluorescência em que o biofilme maduro foi exposto às associações OE/OE e OE/antifúngico que após observação no microscópio de fluorescência permitiu observar as células mortas na matriz polimérica.

Em todas as determinações o OE de *Lavandula* apresentou um melhor desempenho e atividade em comparação com o OE de *Mentha*, para além disso o OE de *Lavandula* preservou um maior número de *Lactobacillus* em todos os ensaios demonstrando possuir um impacto reduzido na microflora protetora vaginal. Foi demonstrado inequivocamente que estes óleos essenciais, com um elevado teor de linalol e acetato de linalilo para *L. x intermedia* e mentol para *M. arvensis* respectivamente, apresentavam uma boa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, nas formas planctónica e de biofilme tanto individualmente como em associação entre si e com o antifúngico fluconazol.

A atividade anti-biofilme destes OEs pode ocorrer através da modulação de certos genes envolvidos no processo de adesão inibindo a primeira fase do processo de formação do

biofilme pela inibição de ocorrência de *quorum sensing* e pela sua capacidade de degradar as proteínas da membrana e alterar a permeabilidade celular. O OE de *L. x intermedia* foi o menos ativo contra os *lactobacillus*, permitindo assim a reconhecida função protetora da flora láctica na mucosa vaginal. Uma das principais causas de recorrência pós-tratamento na vaginose é a drástica redução da população nativa de *lactobacillus*, redução esta que muitas vezes implica certas perturbações associadas à vaginose, como infertilidade e complicações pós-gravidez. Por conseguinte, este produto natural poderia ser utilizado no domínio clínico para controlo dos agentes patogénicos, respeitando a existência dos *lactobacillus*, no entanto, são necessários mais estudos, especialmente sobre a atividade e a toxicidade dos constituintes do OE, que também podem ser responsáveis por efeitos indesejáveis, como irritação, rubor, fototoxicidade e outras sensibilizações [32].

6.3. *Thymus vulgaris* L.

O tomilho pertencente taxonomicamente à família das Lamiáceas (*Lamiaceae*), género *Thymus* (etimologicamente do latim "*Thymún*" e do grego "*Thymon*") e à classe das dicotiledóneas, é constituído por cerca de 400 espécies de plantas herbáceas e subarborescentes aromáticas, perenes, provenientes da Europa Meridional (Fig.8).

Thymus vulgaris L., é um subarbusto, nativo da Europa Meridional sendo cultivado em todo o mundo e vulgarmente conhecido como arçã, arçanha, tomilho-ordinário e tomilho vulgar. É ao seu óleo essencial, extraído a partir das suas partes aéreas floridas, que estão associadas diversas propriedades terapêuticas como propriedades antitússicas, expetorantes, antissépticas, antimicrobianas, anti-helmínticas, antiespasmódicos e estimulantes. É ainda muito usado na área dermatológica na resolução de problemas como acne, dermatites, eczemas e picadas de insetos e em aromaterapia para alívio de dores de cabeça, ansiedade, tensão, dores musculares e irritação cutânea [30].

O seu uso bem estabelecido, segundo a EMA, em situações de tosse produtiva associada a constipação na forma de chá para administração oral e na forma farmacêutica líquida e oral segundo o método padrão estabelecido na Farmacopeia Europeia. Quanto a efeitos adversos reportados associados a este uso foram descritas situações de distúrbios gastrointestinais não tendo sido reportadas interações com outros medicamentos [33].



Figura 8 – *Thymus vulgaris* L. (Retirado de³⁴)

Pode-se, sobretudo, encontrar neste óleo p-cimeno, carvacrol e timol, sendo este último o principal responsável pela ação antifúngica [35].

Existem pelo menos 6 quimiotipos de *Thymus vulgaris* com diferentes composições do óleo essencial, apenas o tipo "timol", com timol como composto predominante, está em conformidade com o estabelecido pela Farmacopeia Europeia [36].

É na sua fase de floração que se é possível obter uma maior quantidade do seu óleo essencial apesar de que fatores como fase de crescimento, fatores ambientais (época da colheita, localização geográfica, condições climáticas...) contribuam para uma variabilidade qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis levando assim, à existência dos seis diferentes quimiotipos sendo por isso exigido um rigoroso controlo analítico no que toca à constituição do seu óleo essencial [37].

Foi realizado um estudo aberto, multicêntrico, não centralizado em 2018 por Murina e colaboradores para avaliar a eficácia de um gel vaginal em 209 mulheres. Destas 209 mulheres, 100 estavam diagnosticadas com vaginose bacteriana, 82 diagnosticadas com candidíase vulvovaginal não recorrente e 27 diagnosticadas com candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR). Cada participante foi instruída a utilizar um gel vaginal (EFB) constituído por diversos compostos entre eles o extracto de *Thymus vulgaris*. O regime posológico foi de 6 manhãs consecutivas sem outro tratamento concomitante.

Após 2 semanas de administração de EFB por meio de uma consulta por via telefónica foi avaliada a necessidade de uma segunda realização do tratamento por um período de mais 3 semanas com base na evolução dos sintomas que caso se mantivessem exigiriam esta nova posologia.

Após 20-30 dias de se finalizar o tratamento foram realizadas avaliações clínicas e microbiológicas incluindo avaliação dos sintomas, efeitos adversos durante o período de tratamento, exames físicos vulvovaginais e análise microscópica de secreções vaginais.

Tanto no início como no final do estudo foram avaliados quer sintomas clínicos como prurido, ardor e dispareunia como sinais objetivos (edema e eritema vulvovaginal, pH e secreção vaginal). No final do tratamento, foi ainda efetuada pelo médico uma avaliação global final (resolução de aspetos clínicos, resolução temporária com recidiva a curto prazo ou não) e uma classificação do tratamento pelo próprio doente.

Quanto aos resultados obtidos: 60% dos casos das mulheres com CVV não necessitaram de um segundo ciclo de tratamento tendo sido observada uma melhoria significativa dos sintomas em todos os grupos de diagnóstico. No final do estudo, não foram observadas anormalidades na avaliação microbiológica em cerca de 62,5% dos casos com CVV e 100,0% com CVVR quanto aos restantes casos a flora demonstrou-se parcialmente alterada. A avaliação global do tratamento efetuada pelo médico indicou resolução das características clínicas em 81,6% dos casos com CVV e 63,0% com CVVR. A avaliação do doente foi boa em 85,0% dos casos com CVV e em 70,3% dos casos com CVVR. A terapia instalada foi bem tolerada não tendo sido observadas desistências ao longo de todo o período do estudo.

Os dados demonstraram ainda que, na maioria dos casos, o produto utilizado foi capaz de tratar CVV como uma única abordagem terapêutica e que a utilização concomitante de um agente antimicótico foi necessário apenas em 8,5% dos casos.

Os potenciais efeitos secundários e o aumento progressivo da resistência fúngica estimulam a procura de novas abordagens terapêuticas tornando-se ainda mais urgente esta abordagem em situações em que estas infeções vaginais são recorrentes, já que diversos estudos epidemiológicos revelaram que quase todas as mulheres diagnosticadas com *C. albicans* resistente ao fluconazol tinham já tido uma exposição prévia considerável ao mesmo [38].

Como referido anteriormente, um dos sintomas muitas vezes associado às infeções fúngicas é também a inflamação que surge como uma resposta de defesa do nosso organismo.

Os medicamentos anti-inflamatórios têm associados diversos efeitos adversos prejudiciais como distúrbios gastrointestinais e problemas de toxicidade para os nossos órgãos. Assim, é também essencial a pesquisa e descoberta de novas moléculas à base de plantas para solucionar esta problemática, moléculas com um potencial também ele anti-inflamatório que atuem como anti-oxidantes e “anti-irritação” reduzindo a carga de radicais livres e evitando a obstrução proporcionada por uma libertação exacerbada de substâncias pró-inflamatórias.

Num estudo realizado por Boukhatem e colaboradores foram selecionadas 6 estirpes clínicas de *Candida spp.* sobre as quais foram testados os efeitos do óleo essencial de *Thymus vulgaris*. A atividade antifúngica do óleo essencial foi testada tanto na sua formulação líquida como na sua formulação em fase gasosa recorrendo aos métodos de difusão e de volatilização de discos respetivamente tendo em ambas as fases apresentado atividade contra todas as estirpes

testadas, no entanto, na fase de vapor o diâmetro do halo de inibição foi maior do que na fase líquida. A avaliação da atividade antifúngica nestas duas formas permitiu concluir que a utilização do óleo essencial na sua fase gasosa é mais vantajoso não só pela simplicidade de aplicação como pela necessidade de uma menor quantidade para se atingir a ação pretendida e sem que sejam gerados efeitos agressivos (associados ao uso de doses mais elevadas pelo caráter lipofílico do óleo).

Posteriormente, foi também determinada a CIM através do método de diluição em agar.

Ainda no decorrer do estudo, com o objetivo de avaliar o impacto dos efeitos adversos associados ao óleo essencial realizou-se o ensaio hemolítico num modelo celular *in vitro*. Recorrendo-se a glóbulos vermelhos *in vitro* foram observados os impactos do óleo essencial de *Thymus vulgaris* na membrana plasmática destas células concluindo que caso houvesse libertação de alguma quantidade de hemoglobina haveria uma potencial ocorrência de inflamação. Os resultados obtidos demonstraram que quando se recorria a elevadas concentrações de óleo essencial se observava uma alta atividade hemolítica o que não descartava a necessidade de precaução a ter na sua utilização e de uma necessidade acrescida de realização de mais estudos.

A desnaturação proteica é uma reconhecida forma de manifestação de inflamação, por conseguinte, a fim de avaliar a sua ocorrência foi realizado o teste de inibição de desnaturação da albumina sérica bovina (BSA) *in vitro*. A fração de óleo essencial rica em carvacrol apresentou uma inibição máxima dose dependente de desnaturação de BSA de 96,35% a 0,5 µL/mL enquanto que o fármaco anti-inflamatório padrão (diclofenac) revelou uma inibição de 96,89% a uma concentração de 1 mg/mL.

Para determinar o efeito tópico do óleo essencial avaliou-se o edema induzido pela aplicação de um solvente irritante designado óleo de cróton em grupos de ratinhos durante um período de 6 a 8 semanas na sua orelha esquerda que foi posteriormente comparado com a sua orelha direita à qual tinha sido só somente administrado veículo. O *diclofenac dietilamónio*, utilizado como padrão produziu uma inibição de 73,52% do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e, este efeito não foi estatisticamente significativo quando comparado com o óleo essencial que apresentou valores de inibição de 65,69% a 73%.

Finalizou-se o estudo examinando-se a morfologia do tecido da orelha do ratinho: a aplicação do óleo de cróton resultou num aumento considerável da espessura do tecido com confirmação clara de edema, hiperplasia epidérmica e infiltração de células na derme com rutura do tecido conjuntivo. Quando comparado com o tratamento convencional o edema foi drasticamente mais reduzido com o uso do óleo essencial sobretudo quando o mesmo foi usado em doses baixas, no entanto, quando se aumentou a dose registou-se uma infiltração

de células inflamatórias na derme. Este episódio pode ser explicado pelo efeito irritativo do óleo essencial quando utilizado em concentrações mais elevadas.

O efeito anti-inflamatório deste óleo essencial pode estar principalmente ligado ao seu principal constituinte químico, o carvacrol tendo, de facto, várias investigações relatado atividade anti-inflamatória para esta molécula fenólica [39].

6.4. *Satureja montana* L.

Satureja montana L., também conhecida como segurelha-silvestre ou segurelha-de-inverno pertence à família *Lamiaceae*, compreende 30 espécies, estando localizadas maioritariamente na parte oriental da zona mediterrânica (Fig.9). Em Portugal, *S. montana* é espontânea na região nordeste e nas ilhas da Madeira sendo uma espécie vivaz de 45 centímetros. São plantas aromáticas anuais ou perenes que habitam regiões áridas, soalheiras e rochosas.

Os seus óleos essenciais são conhecidos por terem várias propriedades biológicas, tais como a ação antimicrobiana, anticolinesterásica, fungicida e anti-HIV. O óleo essencial, obtido por destilação a vapor, é também utilizado na indústria alimentar como agente aromatizante, no fabrico de licores e em perfumaria [30].

Relativamente à composição do seu óleo essencial, cujo método de extração de eleição mais comumente utilizado é a hidrodestilação, este possui um forte carácter terpenico geralmente fenólico tendo uma notável variabilidade da sua composição química justificada por diferentes fases de desenvolvimento da planta, locais ecologicamente diferentes bem como características genéticas. É essencialmente constituído por timol, p-cimeno, alfa-pineno, linalol, borneol, geraniol e γ -terpineno [40].



Figura 9 – *Satureja montana* L. (Retirado de⁴¹)

No estudo realizado por Ciani e colaboradores foi relatada atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Satureja montana* em várias espécies de leveduras incluindo *C. albicans*. O principal componente do óleo em estudo foi identificado como sendo o carvacrol (50%). Através da

medição do halo de inibição por meio do método de difusão de disco avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial juntamente com a determinação da concentração mínima inibitória (CIM).

Neste estudo todas as estirpes selecionadas, incluindo as de *C. albicans*, foram inibidas por uma concentração muito baixa do óleo essencial (0,06 µL). O método de difusão de disco apesar de fácil execução e grande utilidade para detetar a atividade de agentes antimicrobianos num grande número de culturas carece de sensibilidade e é afetado por diversos parâmetros, tais como as taxas de difusão e a quantidade e fase de crescimento do inóculo. A fim de avaliar as diferenças na atividade antimicrobiana foi também avaliada a CIM em diferentes espécies de leveduras, tendo *C. albicans* apresentado valores mais baixos (0,12 µL/mL). Em conclusão, o óleo essencial de *Satureja montana* L. apresentou um amplo espectro de atividade sobre as leveduras estudadas e que as suas baixas concentrações inibitórias e elevada volatilidade podem ser utilizadas para controlar estas espécies onde entre elas se encontra *C. albicans* [42]. Em 2016, num estudo realizado por Bona e colaboradores foram isoladas 30 estirpes de *C. albicans*, todas elas resistentes a pelo menos um fármaco antifúngico convencional, de esfregaços vaginais recolhidas de 2 hospitais públicos. Foram submetidas a um teste de sensibilidade para com vários óleos essenciais pelo método de difusão de disco. No teste de sensibilidade entre os óleos essenciais mais eficazes encontrava-se o óleo essencial de segurelha de inverno.

Para determinar a concentração mínima inibitória foi realizado o método da microdiluição em caldo. O ensaio de concentração mínima inibitória forneceu informações sobre a melhor concentração para exercer uma atividade contra a estirpe microbiana: valores mais baixos correspondem a um maior potencial na produção de dispositivos médicos. As concentrações mínimas inibitórias de segurelha de inverno apresentou-se também baixa: inferior a 1% (v/v) em 31% das estirpes isoladas.

Para avaliar o impacto dos óleos essenciais na atividade metabólica do fungo recorreu-se ao teste do diacetato de fluoresceína (FDA). Esta substância é hidrofóbica, incolor e não fluorescente, tem a capacidade de se difundir livremente nas células não danificadas, sendo hidrolisado num produto amarelo-esverdeado fluorescente mais polar (fluoresceína) e em duas moléculas de acetato. Neste ensaio as células metabolicamente ativas apresentam fluorescência verde, enquanto que células metabolicamente não ativas permanecem incolores. Este ensaio fornece informações relevantes sobre os efeitos de diferentes concentrações de óleos essenciais na atividade de *C. albicans*; que juntamente com a determinação da CIM, podem ajudar a identificar a quantidade mínima de óleos essenciais que induzem a perda, num primeiro momento, da atividade celular e depois da sua viabilidade. Os valores de redução da

atividade metabólica em comparação com os controlos revelaram que cada óleo essencial atua de forma específica e diferente dos outros associado à presença de mecanismos de ação específicos. A segurelha apresentou de entre os óleos essenciais testados um dos melhores resultados apresentando uma redução de cerca de 50% da atividade metabólica apenas a 1% (v/v).

Foram realizadas análises de microscopia eletrónica para investigar os possíveis efeitos do óleo essencial a nível celular. As principais modificações celulares induzidas foram modificações na parede celular e indução da morte celular. A parede celular desta espécie apresenta frequentemente uma camada fibrilar externa que consiste em glicoproteínas que emanam para o ambiente. As imagens obtidas em microscopia eletrónica de varrimento obtidas a partir do controlo mostram um conjunto de células bem preservadas, sem ocorrência de divisão, com parede celular intacta e com camada fibrilar externa nítida. Nas células tratadas com clotrimazol (antifúngico azólico) as células apresentaram-se encolhidas e lisas e quando tratadas com o óleo essencial a uma concentração baixa as células apresentaram a sua superfície lisa enquanto que a concentrações mais elevadas ficaram encolhidas e a camada fibrilar não se encontrava nítida e visível como no controlo.

Nas imagens obtidas por microscopia de transmissão eletrónica das células tratadas com óleo de segurelha de inverno verificou-se a desorganização dos organelos celulares e um núcleo com cromatina não condensada, juntamente com a presença de vacúolos autofágicos. Quando foi aumentada a concentração deste óleo foi induzida uma total desorganização dos organelos celulares e foi também observado o encolhimento das células. No tratamento com clotrimazol foi induzido um espessamento significativo da parede causado pela expansão das camadas fibrilares e internas pelo contrário, no tratamento com óleo de segurelha de inverno observou-se uma redução significativa da espessura da parede celular, particularmente relacionada com a camada fibrilar.

A investigação sobre óleos essenciais sugere a sua possível aplicação como agentes antifúngicos com elevada eficácia terapêutica e baixa toxicidade no tratamento da candidíase vaginal. No geral, os dados demonstraram a eficácia do óleo essencial de segurelha na redução do crescimento e dos danos celulares de estirpes de *C. albicans* isoladas de esfregaços vaginais e resistentes aos três principais antifúngicos azólicos. Estudos futuros poderão centrar-se nos mecanismos de ação dos óleos essenciais e dos seus alvos celulares (envolvimento de proteínas) [43].

6.5. *Salvia officinalis*

A *Salvia officinalis*, é uma das plantas medicinais mais antigas do mundo, “*Salvia*” termo que deriva do verbo em latim “*salvare*” que significar salvar ou curar e “*officinalis*” que significa medicinal (Fig.10) [22].



Figura 10 – *Salvia officinalis* (Retirado de⁴⁴)

É um subarbusto perene, membro da família *Lamiaceae*, é o maior gênero presente nesta família sendo constituído por um total de cerca de 900 espécies sendo nativa do Médio Oriente e das zonas mediterrânicas.

As partes aéreas deste arbusto têm um longo historial de uso tanto na culinária como na medicina tradicional. Na Ásia e América Latina é empregue em situações de úlceras, gota, reumatismo, diarreia, hiperglicemia, tonturas, tremores e paralisia. Na Europa é usada em situações de dispepsia ligeira (azia e inchaço), sudação excessiva, distúrbios cognitivos associados ao envelhecimento e inflamações ao nível da pele e garganta.

Vários estudos realizados ao longo dos anos revelaram ainda outras propriedades como propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antioxidantes, hipoglicémicas e hipolipidémicas, anti-nocicetivas e antimicrobianas.

O seu óleo essencial é obtido a partir das suas partes aéreas sendo constituído essencialmente por borneol, cânfora, cineol, pineno, alfa e beta tujona,...

As suas propriedades antimicrobianas estão sobretudo associadas à presença de cânfora, tujona e 1,8-cineol, no entanto em 2007, Pinto e colaboradores afirmou que as tujonas não desempenham um papel “significativo” contra leveduras e fungos filamentosos [45].

Condições ambientais como temperatura, duração do dia e luz influenciam a composição do seu óleo essencial. Monoterpenos como 1,8-cineol, cânfora, alfa e beta-tujona apresentam uma variabilidade pronunciada durante o ciclo vegetativo desta planta que foi confirmada pelas diferentes condições geográficas, por exemplo, no caso do fitoconstituintes 1,8-cineol o mesmo diminui progressivamente durante o ciclo vegetativo que ocorre entre outubro e maio,

a cânfora atinge o seu pico máximo a meio desse mesmo ciclo e a alfa e beta tujona aumentam progressivamente a sua constituição durante o ciclo vegetativo[22].

Vários ensaios clínicos realizados não indicaram efeitos secundários graves induzidos por *Salvia officinalis*, no entanto, um consumo excessivo e prolongado (mais de 15g das suas folhas) podem provocar vômitos, vertigens, reações alérgicas, cianose e convulsões. A cânfora, tujona e as cetonas terpénicas são consideradas os constituintes mais tóxicos desta planta e induzem efeitos indesejados tanto no feto como no recém-nascido não sendo por isso recomendada a sua utilização durante a gravidez e lactação[46].

Num estudo realizado por Ahangari e colaboradores entre agosto e novembro de 2017, foi avaliado o efeito de um comprimido vaginal contendo o extrato de *Salvia officinalis*. O ensaio referido foi um ensaio aleatório controlado triplamente cego com um total de 111 pacientes que foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos cada um deles contendo 37 doentes.

O primeiro passo no presente estudo foi a determinação da presença de candidíase vulvovaginal provocada por *Candida albicans* tendo em consideração o pH vaginal, a realização de *wet test* e teste de *wiff*, cultura em agar e sintomas relatados pelos pacientes.

Aos pacientes diagnosticados com CVV foi administrado 100 mg de um comprimido contendo clotrimazol e placebo (grupo CP), 400 mg de um comprimido contendo *Salvia officinalis* e placebo (grupo SP) e um comprimido vaginal contendo somente *Salvia officinalis*, todos os grupos realizaram um tratamento de duração de 7 dias.

Quanto aos resultados obtidos não foram observadas diferenças significativas no que diz respeito a características sociodemográficas e obstétricas consideradas (como idade, habilitações literárias, ocupação profissional, número de filhos, tipo de parto, método contraceptivo utilizado, etc.).

Antes dos 7 dias de tratamento cerca de 94% dos pacientes referiram a presença de um corrimento anormal com aspeto de requeijão tendo, após o período de tratamento, sido observada uma taxa de recuperação de 75% dos casos no grupo CP, 97,2% dos casos no grupo SC e 97,1% dos casos no grupo SP.

Foram ainda estudados a diminuição de outros sintomas entre eles:

- Prurido: diminuição em 72% dos pacientes do grupo CP; 94,4% dos pacientes do grupo SC e 88,6% dos pacientes no grupo SP.
- Dispareunia: diminuição em 86,1% dos pacientes do grupo CP; 97,2% dos pacientes do grupo SC e 100% dos pacientes do grupo SP.

O tempo de recuperação completa registado no sétimo dia foi de 83,3% dos casos no grupo PC, 88,2% no grupo SC e 92% no grupo SP, mas não foi estatisticamente significativo.

Como referido anteriormente, antes e após a intervenção em estudo foi realizado um *wet test* para diagnóstico de CVV. Na fase pré-intervenção todos os participantes obtiveram um *wet test* positivo e após a intervenção o resultado positivo foi obtido só em 19,4% dos casos do grupo CP; 2,8% do grupo SC e 5,7% do grupo SP.

No que toca a efeitos adversos observados 7 pacientes registaram efeitos adversos como náuseas e vômitos, diarreia, prurido e cefaleias.

Dos 107 pacientes submetidos ao estudo cerca de 94 pacientes respeitaram os 7 dias de tratamento.

Os resultados demonstraram que o comprimido vaginal de *Salvia officinalis*, tanto isoladamente como em combinação com o clotrimazol, melhorou significativamente a VVC nas pacientes afetadas, tendo sete dias após o fim do tratamento, 29 pacientes (80,6%) no grupo CP, 35 pacientes (97,2%) no grupo SC e 33 pacientes (94,3%) no grupo SP apresentado um *wet test* negativo.

As propriedades desta planta na prevenção fúngica poderá dever-se às propriedades de dois fitoconstituintes: a cis-tujona e a cânfora sendo que o mecanismo de ação passa pela interferência na germinação, na formação do biofilme, no metabolismo celular, na integridade da parede celular, na elasticidade da membrana celular ou na indução de apoptose.

O ensaio como mencionado anteriormente foi um ensaio controlado aleatório e triplamente cego (e, como tal, não teve interferência de viés no estudo, medições e avaliação de resultados), a avaliação de resultados foi objetiva através da realização de testes laboratoriais, observação vaginal e preenchimento de um questionário por parte dos pacientes no fim do estudo tendo sido observado um grau de satisfação de cerca de 80%.

Pela eficácia demonstrada no ensaio e pelo baixo custo associado a esta planta, a *Salvia officinalis* surge como uma potencial terapêutica para a CVV. No entanto, o estudo podia ter incluído amostras de maior dimensão e ter tido um período de tratamento mais longo, como tal, para tirar conclusões mais fundamentadas é necessária a realização de mais estudos [10].

7. Conclusão

A candidíase vulvovaginal apesar de não ser uma infeção fatal é uma das principais causas que leva o sexo feminino a procurar por atendimento de ginecológico. Esta infeção é normalmente acompanhada de desconfortáveis sintomas como prurido, eritema, edema vulvar, corrimento branco com aspeto de requeijão, disúria e dispareunia sendo que aproximadamente 138 milhões de mulheres em todo o mundo sofrem até 4 episódios de candidíase vulvovaginal por ano.

Esta recorrência de infeções aliada aos sintomas mencionados geram impactos psicológicos, como depressão e ansiedade e impactos na vida social, profissional e sexual da mulher.

Apesar da fácil acessibilidade aos antifúngicos disponíveis no mercado tem sido observada uma preocupação crescente com o desenvolvimento e aumento de resistência. Esta resistência é essencialmente potenciada por situações de autodiagnóstico e automedicação com antifúngicos de venda livre que podem resultar em infeções crónicas e por situações de infeções vaginais recorrentes e uso constante da terapêutica convencional existente.

A fim de contornar esta problemática, requiere-se a descoberta e a inovação de novos fármacos antifúngicos, a fim de proporcionar uma gama diversificada de tratamentos e lutar contra as resistências que têm surgido.

Os óleos essenciais (EOs) obtidos a partir de plantas medicinais surgem assim como uma possível alternativa. São caracterizados por possuir um significativo efeito inibitório anti-*Candida* bem como menos efeitos secundários, menor toxicidade e uma melhor biodegradabilidade. A sua administração através da sua fase de vapor permite ainda uma libertação local de compostos voláteis e bioativos diretamente no epitélio vaginal evitando o contacto direto do OE com a pele e possíveis irritações ao nível da mucosa.

No futuro, seria interessante a realização de mais estudos que envolvessem a inclusão de óleos essenciais neste tipo de infeções pelos factos anteriormente mencionados e também pela maior simplicidade no desenvolvimento deste tipo de formulações que por incluírem constituintes ativos à base de plantas têm a vantagem de na fase de avaliação clínica não existir tanta exigência e pormenor comparativamente a novas moléculas sintéticas. Os parâmetros de segurança são também menos rigorosos devido às suas origens naturais e à aplicação generalizada dos seus componentes em diferentes doenças e do apoio da literatura científica.

8. Bibliografia

- [1] I. D. Jacobsen, D. Wilson, B. Wächtler, S. Brunke, J. R. Naglik, and B. Hube, "Candida albicans dimorphism as a therapeutic target," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 10, no. 1. 2012. doi: 10.1586/eri.11.152.
- [2] L. Fernandes *et al.*, "Vapor-Phase of Essential Oils as a Promising Solution to Prevent Candida Vaginal Biofilms Caused by Antifungal Resistant Strains," *Healthcare (Switzerland)*, vol. 10, no. 9, 2022, doi: 10.3390/healthcare10091649.
- [3] E. Miraldi and G. Baini, "MEDICINAL PLANTS AND HEALTH IN HUMAN HISTORY: FROM EMPIRICAL USE TO MODERN PHYTOTHERAPY," *Journal of the Siena Academy of Sciences*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.4081/jsas.2018.8529.
- [4] C. Roshni Thampi Student, R. Thampi, and J. S. Menon, "Traditional knowledge on use of medicinal plants grown in homesteads as home remedies," ~ 1 ~ *Journal of Medicinal Plants Studies*, vol. 7, no. 2, 2019.
- [5] J. P. Lopes and M. S. Lionakis, "Pathogenesis and virulence of Candida albicans," *Virulence*, vol. 13, no. 1. 2022. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950.
- [6] J. Talapko *et al.*, "Candida albicans-the virulence factors and clinical manifestations of infection," *Journal of Fungi*, vol. 7, no. 2, 2021, doi: 10.3390/jof7020079.
- [7] W. R. V. da Rocha, L. E. Nunes, M. L. R. Neves, E. C. P. de A. Ximenes, and M. C. P. de A. Albuquerque, "Gênero Candida - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência," *Research, Society and Development*, vol. 10, no. 4, p. e43910414283, apr. 2021, doi: 10.33448/rsd-v10i4.14283.
- [8] T. Atriwal *et al.*, "Mechanistic Understanding of Candida albicans Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition," *Frontiers in Microbiology*, vol. 12. 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.638609.
- [9] P. Chatzivasileiou and T. A. Vyzantiadis, "Vaginal yeast colonisation: From a potential harmless condition to clinical implications and management approaches—A literature review," *Mycoses*, vol. 62, no. 8. 2019. doi: 10.1111/myc.12920.
- [10] F. Ahangari, A. Farshbaf-Khalili, Y. Javadzadeh, M. Adibpour, and B. Sadeghzadeh Oskouei, "Comparing the effectiveness of Salvia officinalis, clotrimazole and their combination on vulvovaginal candidiasis: A randomized, controlled clinical trial," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, vol. 45, no. 4, 2019, doi: 10.1111/jog.13918.
- [11] S. N. Balakrishnan, H. Yamang, M. C. Lorenz, S. Y. Chew, and L. T. L. Than, "Role of Vaginal Mucosa, Host Immunity and Microbiota in Vulvovaginal Candidiasis," *Pathogens*, vol. 11, no. 6. 2022. doi: 10.3390/pathogens11060618.

- [12] B. Mohankumar, R. K. Shandil, S. Narayanan, and U. M. Krishnan, "Vaginosis: Advances in new therapeutic development and microbiome restoration," *Microbial Pathogenesis*, vol. 168. Academic Press, jul. 01, 2022. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105606.
- [13] M. S. Miró *et al.*, "Vulvovaginal candidiasis: An old disease with new challenges," *Rev Iberoam Micol*, vol. 34, no. 2, pp. 65–71, apr. 2017, doi: 10.1016/j.riam.2016.11.006.
- [14] S. S. de Moraes, L. S. Felix, and R. C. Badin, "Antifúngicos azólicos: utilidade clínica e interações medicamentosas," *Brazilian Journal of Development*, vol. 8, no. 10, pp. 66152–66169, oct. 2022, doi: 10.34117/bjdv8n10-089.
- [15] A. P. Mendes, "Candidíase vulvovaginal: manifestações e tratamento," nov. 16, 2020. https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/cim_e_publicacoes_candidiase_vulvovaginal_final_11673414455fb7f4bc905c1.pdf (acedido a 15 junho, 2023).
- [16] C. H. Gómez Quintero, "Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol," *Infectio*, vol. 14, 2010, doi: 10.1016/s0123-9392(10)70134-x.
- [17] K. López-Ávila, K. R. Dzul-Rosado, C. Lugo-Caballero, J. J. Arias-León, and J. E. Zavala-Castro, "Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión," *REVISTA BIOMÉDICA*, vol. 27, no. 3, 2016, doi: 10.32776/revbiomed.v27i3.541.
- [18] S. Córdoba *et al.*, "Emergence of Resistance to Fluconazole in *Candida albicans* Isolated From Vaginal Discharge," *Current Fungal Infection Reports*, vol. 12, no. 4. Current Medicine Group LLC 1, pp. 155–160, Dec. 01, 2018. doi: 10.1007/s12281-018-0329-6.
- [19] A. Palmeira-de-Oliveira, B. Silva, R. Palmeira-de-Oliveira, J. Martinez-de-Oliveira, and L. Sagueiro, "Are Plant Extracts a Potential Therapeutic Approach for Genital Infections?," *Curr Med Chem*, vol. 20, no. 23, 2013, doi: 10.2174/09298673113209990007.
- [20] T. M. Karpiński, M. Ożarowski, A. Seremak-Mrozikiewicz, and H. Wolski, "Anti-*Candida* and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils," *Frontiers in Bioscience - Landmark*, vol. 28, no. 2, 2023, doi: 10.31083/j.fbl2802028.
- [21] S. Chouhan, K. Sharma, and S. Guleria, "Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives," *Medicines*, vol. 4, no. 3, 2017, doi: 10.3390/medicines4030058.
- [22] M. S. Abu-Darwish *et al.*, "Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential," *Biomed Res Int*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/538940.
- [23] E. M. Agency, "Community herbal monograph on *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betch) Cheel, *M. linariifolia* Smith, *M. dissitiflora* F. Mueller and/or other species of *Melaleuca*, aetheroleum," jul. 09, 2013. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-community-herbal->

- monograph-melaleuca-alternifolia-maiden-betch-cheel-m-linariifolia-smith-m/other-species-melaleuca-aetheroleum-first-version_en.pdf (acedido a 15 de julho, 2023).
- [24] K. A. Hammer, C. F. Carson, T. V. Riley, and J. B. Nielsen, "A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, no. 5. 2006. doi: 10.1016/j.fct.2005.09.001.
- [25] C. on H. M. P. (HMPC), "Assessment report on *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betch) Cheel, *M. linariifolia* Smith, *M. dissitiflora* F. Mueller and/or other species of *Melaleuca*, *aetheroleum*," 2013.
- [26] Australian Tea Tree Industry Association, "All about Australian Tea Tree." https://teatree.org.au/teatree_about_growing.php (acedido a 25 de julho, 2023).
- [27] A. Mertas, A. Garbusińska, E. Szliszka, A. Jureczko, M. Kowalska, and W. Król, "The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains," *Biomed Res Int*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/590470.
- [28] A. A. M. Alkhanjaf, M. T. Athar, Z. Ullah, A. Umar, and I. A. Shaikh, "In Vitro and In Vivo Evaluation of a Nano-Tool Appended Oilmix (Clove and Tea Tree Oil) Thermosensitive Gel for Vaginal Candidiasis," *J Funct Biomater*, vol. 13, no. 4, 2022, doi: 10.3390/jfb13040203.
- [29] Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, "Mentha arvensis." https://jb.utad.pt/especie/Mentha_arvensis (acedido a 31 de agosto, 2023).
- [30] A. Proença da Cunha, O. Roque, and N. Gaspar, *Cultura e utilização das plantas medicinais e aromáticas*. 2010.
- [31] C. Jianu, G. Pop, A. T. Gruia, and F. G. Horhat, "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania," *Int J Agric Biol*, vol. 15, no. 4, 2013.
- [32] R. Iseppi *et al.*, "Phytochemical composition and in vitro antimicrobial activity of essential oils from the lamiaceae family against *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans* biofilms," *Antibiotics*, vol. 9, no. 9, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9090592.
- [33] E. M. Agency, "Community herbal monograph on *Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L., herba," nov. 12, 2013. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-thymus-vulgaris-l-thymus-zygis-l-herba_en.pdf (acedido a 15 de agosto, 2023).
- [34] Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, "Thymus vulgaris." https://jb.utad.pt/especie/Thymus_vulgaris_subesp_vulgaris (acedido a 31 de agosto, 2023).

- [35] C. F. Carson and K. A. Hammer, "Chemistry and Bioactivity of Essential Oils," in *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, 2010. doi: 10.1002/9780470976623.ch9.
- [36] A. Abdullah and E. M. A. Dauqan, "Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb," *J Appl Biol Biotechnol*, 2017, doi: 10.7324/jabb.2017.50203.
- [37] A. S. Silva et al., "The evidence of health benefits and food applications of *Thymus vulgaris* L.," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 117. 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2021.11.010.
- [38] F. Murina, F. Vicariotto, and S. Di Francesco, "Thymol, eugenol and lactobacilli in a medical device for the treatment of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis," *New Microbiologica*, vol. 41, no. 3, 2018.
- [39] M. N. Boukhatem et al., "In vitro antifungal and topical anti-inflammatory properties of essential oil from wild-growing *thymus vulgaris* (Lamiaceae) used for medicinal purposes in algeria: A new source of carvacrol," *Sci Pharm*, vol. 88, no. 3, 2020, doi: 10.3390/scipharm88030033.
- [40] J. D. C. Santos et al., "Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* byproducts essential oils," *Ind Crops Prod*, vol. 137, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.058.
- [41] Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, "*Satureja montana* L." https://jb.utad.pt/especie/Satureja_montana_subesp_montana (acedido a 31 de agosto, 2023).
- [42] M. Ciani, L. Menghini, F. Mariani, R. Pagiotti, A. Menghini, and F. Fatichenti, "Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts," *Biotechnol Lett*, vol. 22, no. 12, 2000, doi: 10.1023/A:1005649506369.
- [43] E. Bona et al., "Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents?," *J Appl Microbiol*, vol. 121, no. 6, 2016, doi: 10.1111/jam.13282.
- [44] Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, "*Salvia Officinalis*." https://jb.utad.pt/especie/Salvia_officinalis (acedido a 20 de julho, 2023).
- [45] E. Pinto, L. R. Salgueiro, C. Cavaleiro, A. Palmeira, and M. J. Gonçalves, "In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*," *Ind Crops Prod*, vol. 26, no. 2, 2007, doi: 10.1016/j.indcrop.2007.02.004.
- [46] A. Ghorbani and M. Esmailizadeh, "Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components," *J Tradit Complement Med*, vol. 7, no. 4, pp. 433–440, oct. 2017, doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014.