

**Vaginose bacteriana – avaliação da atividade antimicrobiana seletiva de gel de *Schinus terebinthifolia* raddi**

**Bacterial vaginosis – evaluation of the selective antimicrobial activity of *Schinus terebinthifolia* raddi gel**

**Vaginosis bacteriana: evaluación de la actividad antimicrobiana selectiva del gel de *Schinus terebinthifolia* raddi**

DOI:10.34119/bjhrv7n2-202

Originals received: 01/23/2024

Acceptance for publication: 03/15/2024

**Carlos Alberto Sá Marques**

Mestre em Ginecologia e Obstetrícia

Instituição: Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Endereço: Rua Do Príncipe, 526, Boa Vista - Recife – PE, CEP: 50050-900

E-mail: carlos.marques@unicap.br

**Paloma de Barros Henrique**

Especialista em Pneumologia e Clínica Médica

Instituição: Hospital Universitário Osvaldo Cruz, Grupo Hebron Farmacêutica

Endereço: Rua Arnóbio Marques, s/n, 310, Santo Amaro, Recife - PE, CEP: 50100-130

E-mail: palomabarros@gmail.com

**Haliny da Silva Magalhães**

Especialista MBA em Gestão de Pessoas

Instituição: Grupo Hebron Farmacêutica

Endereço: Barão de Souza Leão, 452, Boa Viagem, Recife - PE, CEP: 51030-300

E-mail: haliny@hebron.com.br

**Tahira Souza Melo**

Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências do Desenvolvimento Humano

Instituição: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie

Endereço: Rua da Consolação, 896, Consolação São Paulo – SP, CEP: 01302-000

E-mail: tahira.melo@mackenzie.br

**Amouni Mohmoud Mourad**

Doutora em Ciências da Saúde

Instituição: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie e Conselho Regional de Farmácia

Endereço: R. da Consolação, 930, Higienópolis, São Paulo - SP, CEP: 01302-000

E-mail: amouni@digitalpages.com.br

**Jan Carlo Morais Oliveira Bertassoni Delorenzi**

Doutor em Ciências - Ciências Biológicas, Biofísica

Instituição: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie

Endereço: Rua da Consolação, 896, Consolação, São Paulo - SP, CEP: 01930-907

E-mail: jan.bertassoni@mackenzie.br

**RESUMO**

O microbioma vaginal sofre contínua flutuação durante o ciclo menstrual e após a menopausa. Albert Döderlein foi o primeiro a descrever sobre bactérias produtoras de ácido láctico na cavidade vaginal. Tais bactérias são capazes de inibir o crescimento de microrganismos anaeróbios e patogênicos. Quando há a redução desses lactobacilos, há proliferação de bactérias oportunistas como as do gênero *Gardnerella*. A vaginose bacteriana (VB) é uma patologia não sexualmente transmissível, caracterizada pelo aumento do número de bactérias anaeróbias e do pH vaginal, ocasionando um corrimento vaginal acinzentado e de odor fétido. A prevalência estimada é alta, no entanto a cura efetiva e duradoura é ainda incerta. Essa falha em tratar adequadamente tem motivado a busca de alternativas terapêuticas, que consigam tratar e prevenir as possíveis recidivas da patologia<sup>1</sup>. No Brasil, a espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-da-praia) é bem conhecida, e um ensaio clínico mostrou sua atuação de forma eficaz no tratamento da VB, bem como a recomposição da microbiota vaginal. O presente estudo tem por objetivo determinar a capacidade do gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi em inibir o crescimento dos microrganismos *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 e *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018. Foram usados *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 e *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018. As culturas de trabalho foram produzidas com incubação a 36±1°C por 24 horas. Foram efetuados pequenos poços nas placas com meio de cultura, onde a amostra teste foi inoculada. As placas foram incubadas por 48 horas a temperatura de 30°C. Não foi observado halo de inibição contra *L. gasseri*, enquanto que foi observado halo de inibição contra *G. vaginalis*. Tais dados, demonstram que o gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi tem ação anaerobicida contra um dos principais microrganismos causadores da VB e, ao mesmo tempo, não apresenta nenhuma alteração na formação das colônias de *L. gasseri*, um dos lactobacilos da microbiota vaginal.

**Palavras-chave:** microbiota vaginal, *Lactobacillus gasseri*, vaginose bacteriana, *Gardnerella vaginalis*, *Schinus terebinthifolia* Raddi.

**ABSTRACT**

Vaginal microbiome undergoes continuous fluctuations during the menstrual cycle and after menopause. Albert Döderlein was the first to describe lactic acid-producing bacteria in the vaginal cavity. Such bacteria are capable of inhibiting the growth of anaerobic and pathogenic microorganisms. When these lactobacilli are reduced, opportunistic bacteria such as those of the *Gardnerella* genus proliferate. Bacterial vaginosis (BV) is a non-sexually transmitted pathology, characterized by an increase in the number of anaerobic bacteria and vaginal pH, causing a grayish vaginal discharge with a foul odor. The estimated prevalence is high, however the effective and lasting cure is still uncertain. This failure to treat adequately has motivated the search for therapeutic alternatives that can treat and prevent possible recurrences of the pathology<sup>1</sup>. In Brazil, the species *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-da-praia) was widely investigated, and a clinical trial showed that it acts effectively in the treatment of BV, as well as vaginal microbiota restoration. The present study aims to determine the ability of *Schinus terebinthifolia* Raddi gel to inhibit the growth of the microorganisms *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 and *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018. *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 and

*Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 were used and incubated at  $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. Small wells were made in the plates with culture medium, where the test samples were inoculated. The plates were incubated for 48 hours at  $30^{\circ}\text{C}$ . No inhibition halo was observed against *L. gasseri*, while an inhibition halo was observed against *G. vaginalis*. These data demonstrate that the *Schinus terebinthifolia* Raddi gel has anaerobicidal action against one of the main microorganisms that cause BV and, at the same time, does not present any change in the colonies formation of *L. gasseri*, one of the most important lactobacilli in vaginal microbiota.

**Keywords:** vaginal microbiota, *Lactobacillus gasseri*, bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, *Schinus terebinthifolia* Raddi.

## RESUMEN

El microbioma vaginal sufre fluctuaciones continuas durante el ciclo menstrual y después de la menopausia. Albert Döderlein fue el primero en describir las bacterias productoras de ácido láctico en la cavidad vaginal. Tales bacterias son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos anaerobios y patógenos. Cuando estos lactobacilos se reducen, proliferan bacterias oportunistas como las del género *Gardnerella*. La vaginosis bacteriana (VB) es una patología de transmisión no sexual, caracterizada por un aumento en el número de bacterias anaerobias y el pH vaginal, causando una secreción vaginal grisácea con olor fétido. La prevalencia estimada es alta, sin embargo, la cura efectiva y duradera sigue siendo incierta. Esta falta de tratamiento adecuado ha motivado la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan tratar y prevenir posibles recurrencias de la patología<sup>1</sup>. En Brasil, se investigó ampliamente la especie *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira-da-praia), y un ensayo clínico demostró que actúa eficazmente en el tratamiento de la vaginosis bacteriana, así como en la restauración de la microbiota vaginal. El presente estudio tiene como objetivo determinar la capacidad del gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi para inhibir el crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 y *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018. *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 y *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 se utilizaron e incubaron a  $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se hicieron pequeños pozos en las placas con medio de cultivo, donde se inocularon las muestras de prueba. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . No se observó halo de inhibición contra *L. gasseri*, mientras que se observó halo de inhibición contra *G. vaginalis*. Estos datos demuestran que el gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi tiene acción anaerobicida contra uno de los principales microorganismos causantes de la vaginosis bacteriana y, al mismo tiempo, no presenta ningún cambio en la formación de colonias de *L. gasseri*, uno de los lactobacilos más importantes en la microbiota vaginal.

**Palabras clave:** microbiota vaginal, *Lactobacillus gasseri*, vaginosis bacteriana, *Gardnerella vaginalis*, *Schinus terebinthifolia* Raddi.

## 1 INTRODUÇÃO

O microbioma é o conjunto formado pelo ambiente, microorganismos e seus genomas. O microbioma vaginal é um microssistema que sofre contínua flutuação durante o ciclo menstrual e no período após a menopausa. A mucosa vaginal é composta de um epitélio escamoso estratificado, não queratinizado, coberto pelo conteúdo vaginal que umedece o meio vaginal.

Essa mucosa adquire oxigênio, glicose e outros nutrientes da própria camada tecidual submucosa, por difusão, devido ao limitado suprimento da circulação sanguínea nesse epitélio.

Albert Döderlein (1860–1941) (Leipzig, Alemanha) foi o primeiro cientista a descrever a importância de existir bactérias produtoras de ácido láctico na cavidade vaginal. Além disso, tais bactérias são capazes de inibir o crescimento de microrganismos anaeróbios e patogênicos<sup>1</sup>. Atualmente, há cerca de 250 microrganismos identificados como pertencentes à microbiota vaginal, cuja saúde está relacionada à predominância de *Lactobacillus*<sup>1</sup>. Quando há a redução desses lactobacilos, há proliferação de outras bactérias oportunistas como as dos gêneros *Gardnerella*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Peptostreptococcus*. As alterações na predominância bacteriana na cavidade vaginal estão relacionadas com a vaginose bacteriana (VB).

A VB é uma patologia caracterizada pela quebra do equilíbrio da microbiota vaginal normal, diminuição acentuada do número de *Lactobacillus* sp, aumento do número de bactérias anaeróbias e do pH vaginal, ocasionando um corrimento vaginal de cor acinzentada e de odor fétido. Das pacientes que procuram atendimento com queixa de corrimento vaginal, entre 30% e 40% são portadoras de vaginose bacteriana, constituindo-se a mais frequente dentre as patologias que provocam corrimento vaginal<sup>1</sup>.

A VB não é uma doença sexualmente transmissível; representa uma alteração da microbiota vaginal caracterizada pelo crescimento excessivo da população de microrganismos anaeróbios facultativos, como a *Gardnerella vaginalis*, levando a um aumento na produção de aminas voláteis e incremento do pH vaginal para valores acima de 4,5, acompanhada de importante depleção da população de *Lactobacillus*, produtores de ácido láctico, bacteriocinas e outras moléculas antimicrobianas, o que representa importante queda nos mecanismos de defesa contra patógenos no meio vaginal<sup>2</sup>.

Nos EUA, a prevalência estimada de VB é 29% a 49% na população feminina sexualmente ativa<sup>3,4</sup>. Apesar dessa elevada prevalência, a cura efetiva e duradoura é ainda incerta. No Brasil, em um estudo conduzido na cidade de São Paulo, observou-se uma prevalência de 29% na população investigada<sup>5</sup>. Os únicos agentes terapêuticos indicados pelos guidelines, metronidazol e clindamicina, mostram-se incapazes de impedir os elevados índices de recorrência, alcançando de 50% a 80% das mulheres tratadas de VB, devido à persistência da patologia ou à falha na recomposição da população de *Lactobacillus* no microbioma vaginal<sup>6,7</sup>. Apesar da elevada prevalência de VB, a sua cura efetiva e duradoura é enigmática. Os únicos agentes terapêuticos indicados pelos guidelines, metronidazol e clindamicina embora apresentem eficácia elevada, mostram-se incapazes de impedir os elevados

índices de recorrência, alcançando taxas de 50% a 80% das mulheres tratadas e re-avaliadas em 06 e 12 meses, devido à persistência da patologia ou falha na recomposição da população de lactobacilos no microbioma vaginal. Essa falha em tratar adequadamente a VB é um significativo problema de saúde pública, ocasionando impacto negativo na qualidade de vida das pacientes e elevando o risco de partos prematuros, infecções sexualmente transmissíveis, incluindo o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e doença inflamatória pélvica, bem como as complicações infecciosas pós-operatórias<sup>8</sup>.

A falha dos antibióticos como agentes que possam garantir uma cura da VB de longa duração tem sido a motivação para a busca de alternativas terapêuticas, que não são antibióticos, que consigam tratar e prevenir as possíveis recidivas da patologia<sup>1</sup>.

Assim, no intuito de restaurar a microbiota vaginal, vários estudos foram realizados, como: transplante de microbioma vaginal<sup>9</sup>, modulação do pH com ácido láctico e vitamina C<sup>10</sup>, agentes anti-biofilmes<sup>11,12</sup>, probióticos<sup>16,17</sup>, dietas ricas em vitaminas A, C, D e E<sup>13</sup>, uso permanente do preservativo masculino, contraceptivos hormonais<sup>14,15</sup> e interrupção do tabagismo<sup>16</sup>. Ainda assim, nenhuma dessas estratégias mostrou resultados convincentes para o tratamento e a prevenção das recorrências da VB.

Outros estudos interessados em identificar agentes terapêuticos capazes de penetrar nos biofilmes, incluindo octenidina, DNAses, retrocycline e antimicrobianos como: o subtilosin, ploy-L-lysine e lauramide arginine ethylester, foram publicados. O octenidine e o ácido bórico foram os únicos utilizados em estudo com humanos, sendo que com este último foi observada uma alta taxa de recorrência<sup>17</sup>.

Diante dessas constatações, verifica-se a necessidade de novas medidas terapêuticas, efetivas e isentas de eventos adversos ou que estes estejam minimizados para o tratamento da VB. Os fitoterápicos têm sido citados em vários ensaios clínicos, demonstrando elevados índices de cura e de tolerabilidade. Os efeitos do creme vaginal de *Zataria multiflora*, a ducha vaginal de timol e eugenol (constituíntes do óleo do trevo), o extrato aquoso de *Triticum vulgare* e comprimidos vaginais de alho foram extensamente avaliados, porém nenhum estudo avaliou a ação dessas substâncias sobre os biofilmes na VB. A atuação exitosa desses agentes contra os biofilmes da VB foi feita por inferência, a partir dos resultados obtidos em estudos realizados com outros biofilmes vaginais correlatos<sup>20</sup>. Embora tenham sido pesquisados, não existem no mercado farmacêutico produtos comerciais produzidos a partir desses agentes de origem vegetal.

No Brasil, a espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-da-praia) foi investigada e suas propriedades descritas nos compêndios de plantas medicinais como cicatrizante,

adstringente, anti-inflamatória, antialérgica, antidiarreica, antiulcerosa e em várias doenças de vias respiratórias e urinárias.

A experiência etnofarmacológica aponta que o decocto da casca do caule de *Schinus terebinthifolia* preparado na forma de chá de uso interno ou para banhos de assento, é eficaz no tratamento e prevenção dos distúrbios inflamatórios do aparelho genital feminino<sup>18</sup>. Tal experiência popular e a realização de ensaio clínico realizado demonstrando que o uso *Schinus terebinthifolia*, além de atuar de forma eficaz no tratamento da VB, permite a rápida recomposição da microbiota vaginal<sup>19,20</sup>, favoreceu o desenvolvimento e produção industrial de gel vaginal oriundo de extratos da casca do caule da planta.

A eficácia do referido gel, além de evidenciada por estudos clínicos randomizados, já foi amplamente demonstrada pela experiência de vida real nos 20 anos em que o produto tem sido prescrito no Brasil e em outros países. Ainda assim, o efeito direto dos extratos de *Schinus terebinthifolia* nas bactérias relacionadas com a VB ainda carece ser demonstrado.

O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade do extrato do gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi em inibir o crescimento dos microrganismos *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 e *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados para a avaliação da atividade antimicrobiana do gel de *Schinus terebinthifolia* segue os Guidelines, CLSI M2-A11<sup>21</sup>.

### 2.1 BACTÉRIAS

*Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 - Anteriormente classificada como *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Møcquot, isolada de amostras de fezes. As utilizadas nos experimentos foram adquiridas pela empresa DOSAGE da representante da ATCC no Brasil, PensaBio (São Paulo, SP, Brasil).

*Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 - Anteriormente classificada como *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes, isolada de secreção vaginal. As amostras utilizadas nos experimentos foram adquiridas pela empresa DOSAGE da representante da ATCC no Brasil, PensaBio (São Paulo, SP, Brasil).

### 2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

As culturas de trabalho dos microrganismos foram produzidas a partir de uma cultura estoque, através de um repique em ágar TSA com incubação a  $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Para a

utilização dos microrganismos no estudo, foram preparadas suspensões testes de cada microrganismo, conforme abaixo:

A partir do crescimento obtido nas culturas de trabalho, foram retiradas colônias dos microrganismos, com auxílio de uma alça de inoculação estéril. As colônias retiradas foram sendo dissolvidas na parede de um frasco estéril, contendo aproximadamente 5g de pérolas de vidro e 10mL de caldo TSB, até que o caldo ficasse completamente turvo. O frasco foi agitado manualmente por 3 minutos. A suspensão obtida foi transferida para outro frasco, contendo caldo TSB e realizou-se a homogeneização. A turvação da suspensão final obtida foi comparada com a escala de McFarland (0,5 a 3), para a obtenção de uma concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL.

### 2.3 PREPARO DAS PLACAS PARA O ENSAIO

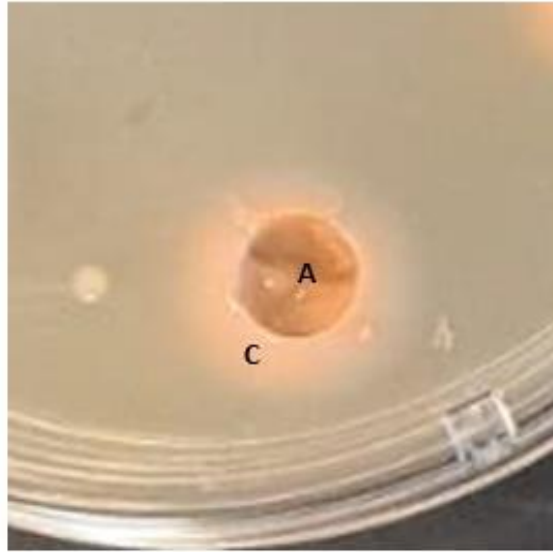
Foi adicionado 25mL do meio de cultura, ágar TSA, em placa de Petri e adicionada suspensão de cada um dos microrganismos testados na concentração de  $10^6$  UFC/mL. O meio foi disperso vagarosamente no centro da placa até sua completa solidificação. Com auxílio de furador esterilizado foram efetuados pequenos poços nas placas com meio de cultura, onde a amostra teste foi inoculada.

### 2.4 PRODUTO INVESTIGACIONAL

As amostras do gel de *Schinus terebinthifolia*, vendido comercialmente com o nome de Kronel, fabricado pela INFAN – Indústria Química Farmacêutica Nacional S/A (empresa do grupo HEBRON) foram cedidas pelo fabricante.

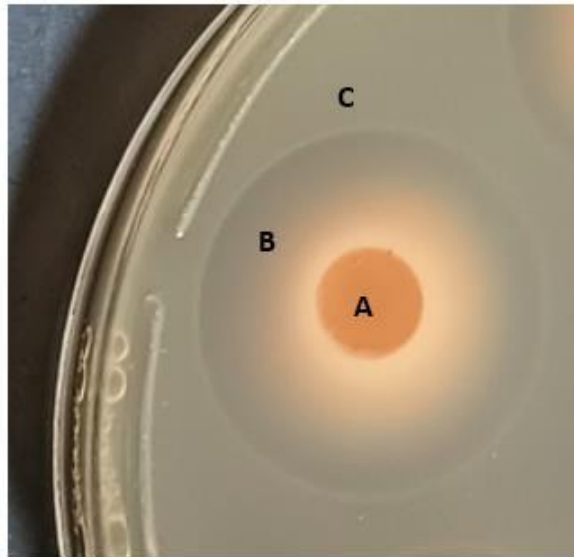
Com auxílio de uma seringa estéril foi aplicado 100 $\mu$ L do gel, preenchendo cuidadosamente os poços do meio de cultura das placas de Petri. O mesmo procedimento foi realizado para as duas bactérias. As placas foram incubadas por 48 horas a temperatura de 30°C.

Figura 1 - Avaliação da inibição do crescimento bacteriano de *Lactobacillus gasseri* 19992 por gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi. É possível observar que não houve inibição do crescimento bacteriano.



Fonte: Autoral.

Figura 2 - Avaliação da inibição do crescimento bacteriano de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 por gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi. É possível evidente halo de inibição do crescimento bacteriano.



Fonte: Autoral.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, não foi observado halo de inibição, demonstrando que o extrato do gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi não possui ação bactericida contra *L. gasseri* (Bacilo de Doderlhëin), enquanto na Figura 2, é possível observar halo de inibição, evidenciando o efeito bactericida do extrato do gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi contra *G. vaginalis*. Tais dados, demonstram que o gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi tem ação anaerobicida contra um dos principais microrganismos causadores da VB e, ao mesmo tempo, não apresenta nenhuma alteração na formação das colônias de *L. gasseri*, um dos lactobacilos da microbiota vaginal.



Ademais, é possível destacar que os dados experimentais reforçam o que já consta da etnofarmacologia e também dos anos de uso do produto produzido a partir do gel de *Schinus terebinthifolia* Raddi na ginecologia e clínica médica.

Os resultados obtidos corroboram com outro estudo, em que extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolia* foram capazes de produzir halo de inibição nas culturas de *Staphylococcus aureus*<sup>22</sup>. Também, em um estudo clínico randomizado em que se observou uma taxa de cura de 84% no tratamento com o gel de *Schinus terebinthifolia* em relação ao tratamento com o placebo<sup>27</sup>. Além disso, evidenciaram uma melhora na proliferação de Bacilos de Doderlëin e redução significativa de *Gardnerella*, no grupo tratado em relação ao grupo placebo.

O ideal para o tratamento da VB é um agente terapêutico que além de atuar como anaerobicida, tenha um efeito protetor sobre a população de *Lactobacillus* no ambiente vaginal, como demonstrado laboratorialmente pela avaliação do halo de inibição em teste colocando o gel vaginal de *Schinus terebinthifolia* Raddi em contato com a *Gardnerella vaginalis* e com os *Lactobacillus*, em placa de Petri e já amplamente verificado na clínica.

Novos estudos podem ser realizados com outras espécies de bactérias anaeróbias causadoras de VB e com outras espécies de *Lactobacillus* para demonstrar a ampla ação bactericida do gel de *Schinus terebinthifolia*.

### CONFLITO DE INTERESSES

CASM, PBH, JCD declaram que são consultores da Coordenação de Pesquisa Clínica do Grupo Hebron Farmacêutica. HSM é vinculada à Gerência de Assuntos Regulatórios do Grupo Hebron Farmacêutica. TSM e AMM declaram não possuírem quaisquer conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Mendlin, Werner. "Normal and abnormal vaginal microbiota." *J Lab Med*, vol. 40, no. 4, 2016, pp. 239 - 246.
2. Duarte SMS, Faria FV, Lima RMS, Sampaio JS, Maia TMB, et al. Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da vaginose bacteriana. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 5, n. 10, p. 21467-21475 oct. 2019 ISSN 2525-876121467
3. Abbe C, Mitchell CM (2023). Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment and prevention. *Front. Reprod. Health* 2023 1100029
4. Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. *BJOG*. (2017) 124(1):61–9. doi: 10.1111/1471-0528.14209
5. Tanaka VDA, Fagundes LJ, Catapan A, Gotlieb SLD, Jr VB, Arnone M, et al. Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo, SP\*. *An Bras Dermatol*. 2007;82(1):41-6.
6. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS One*. (2013) 8(11):e80074. doi: 10.1371/journal.pone.0080074
7. Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson D, Morgan DJ, Ison C, Pearson J. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *Br Med J*. (1994) 308(6924):295. doi: 10.1136/bmj.308.6924.295
8. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. (2008) 22(12):1493–501. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283021a37
9. Castro J, Alves P, Sousa C, Cereija T, França Â, Jefferson KK, et al. Using an invitro biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or nonbacterial vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. *Sci Rep*. (2015) 5:1–10. doi: 10.1038/srep11640
10. Muzny CA, Schwebke JR. Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. *Clin Infect Dis*. (2015) 61 (4):601–6. doi: 10.1093/cid/civ353
11. Amabebe E, Anumba DOC. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front Med*. (2018) 5:181. doi: 10.3389/fmed.2018.00181
12. Abdelmaksoud AA, Koparde VN, Sheth NU, Serrano MG, Glascock AL, Fettweis JM, et al. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology*. (2016) 162 (3):466–75. doi: 10.1099/mic.0.000238
13. Tohill BC, Heilig CM, Klein RS, Rompalo A, Cu-Uvin S, Piwoz EG, et al. Nutritional biomarkers associated with gynecological conditions among US women with or at risk of HIV infection. *Am J Clin Nutr*. (2007) 85(5):1327–34. doi: 10.1093/ajcn/85.5.1327

14. Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* (2008) 47(11):1426–35. doi: 10.1086/592974
15. Vodstrcil LA, Hocking JS, Law M, Walker S, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. Hormonal contraception is associated with a reduced risk of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* (2013) 8(9):73055. doi: 10.1371/journal.pone.0073055
16. Koumans EH, Stemberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis.* (2007) 34(11):864-9. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565
17. Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N. Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions. *Frontiers in Microbiology*, 2016 (Jan).
18. Santos LC, Amorim MMR. Uso da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para tratamento de infecções vaginais. *Femina*; 30(6): 339-342, 2002 (Jul)
19. CLSI M2-A11, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – 11th Edition, Vol. 32, Nº 1, 2012
20. Pacheco EBA, Martins DS, Rocha MP. Atividade antibacteriana in vitro de extratos etanólicos e aquosos de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-vermelha) e *Cymbopogon nardus* (citronela) frente a *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v. 5, n. 6, p.24872-24888, nov./dec., 2022
21. Amorim MMR, Santos LC. Tratamento da vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2003, vol.25, n.2.
22. Mendlin, Werner. “Normal and abnormal vaginal microbiota.” *J Lab Med*, vol. 40, no. 4, 2016, pp. 239 - 246.
23. Duarte SMS, Faria FV, Lima RMS, Sampaio JS, Maia TMB, et al. Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da vaginose bacteriana. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 5, n. 10, p. 21467-21475 oct. 2019 ISSN 2525-8761/21467
24. Abbe C, Mitchell CM (2023). Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment and prevention. *Front. Reprod. Health* 2023 1100029
25. Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. *BJOG.* (2017) 124(1):61–9. doi: 10.1111/1471-0528.14209
26. Tanaka VDA, Fagundes LJ, Catapan A, Gotlieb SLD, Jr VB, Arnone M, et al. Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo, SP\*. *An Bras Dermatol.* 2007;82(1):41-6.

27. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS One*. (2013) 8(11):e80074. doi: 10.1371/journal.pone.0080074
28. Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson D, Morgan DJ, Ison C, Pearson J. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *Br Med J*. (1994) 308(6924):295. doi: 10.1136/bmj.308.6924.295
29. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. (2008) 22(12):1493–501. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283021a37
30. Castro J, Alves P, Sousa C, Cereija T, França Â, Jefferson KK, et al. Using an invitro biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or nonbacterial vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. *Sci Rep*. (2015) 5:1–10. doi: 10.1038/srep11640
31. Muzny CA, Schwebke JR. Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. *Clin Infect Dis*. (2015) 61 (4):601–6. doi: 10.1093/cid/civ353
32. Amabebe E, Anumba DOC. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front Med*. (2018) 5:181. doi: 10.3389/fmed.2018.00181
33. Abdelmaksoud AA, Koparde VN, Sheth NU, Serrano MG, Glascock AL, Fettweis JM, et al. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology*. (2016) 162 (3):466–75. doi: 10.1099/mic.0.000238
34. Tohill BC, Heilig CM, Klein RS, Rompalo A, Cu-Uvin S, Piwoz EG, et al. Nutritional biomarkers associated with gynecological conditions among US women with or at risk of HIV infection. *Am J Clin Nutr*. (2007) 85(5):1327–34. doi: 10.1093/ajcn/85.5.1327
35. Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. (2008) 47(11):1426–35. doi: 10.1086/592974
36. Vodstrcil LA, Hocking JS, Law M, Walker S, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. Hormonal contraception is associated with a reduced risk of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. (2013) 8(9):73055. doi: 10.1371/journal.pone.0073055
37. Koumans EH, Stemberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis*. (2007) 34(11):864–9. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565
38. Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N. Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions. *Frontiers in Microbiology*, 2016 (Jan).

39. Santos LC, Amorim MMR. Uso da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para tratamento de infecções vaginais. *Femina*; 30(6): 339-342, 2002 (Jul)
40. CLSI M2-A11, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – 11th Edition, Vol. 32, N° 1, 2012
41. Pacheco EBA, Martins DS, Rocha MP. Atividade antibacteriana in vitro de extratos etanólicos e aquosos de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-vermelha) e *Cymbopogon nardus* (citronela) frente a *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v. 5, n. 6, p.24872-24888, nov./dec., 2022
42. Amorim MMR, Santos LC. Tratamento da vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2003, vol.25, n.2.