



**Fátima Sofia Alves
Baptista**

**Atividade antibacteriana de extratos de plantas
contra bactérias isoladas de pacientes com cancro
colorretal**

**Antibacterial activity of plant extracts against
bacteria isolated from patients with colorectal cancer**



Universidade de Aveiro
2020

**Fátima Sofia Alves
Baptista**

**Atividade antibacteriana de extratos de plantas contra
bactérias isoladas de pacientes com cancro
colorretal**

**Antibacterial activity of plant extracts against bacteria
isolated from patients with colorectal cancer**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Catarina R. Marques, Investigadora do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmã, por serem os principais pilares da minha vida.

o júri

presidente

Professor Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto o Alves
Professor Auxiliar c/ Agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Virgília Sofia Silva
Investigadora do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

orientadora

Doutora Catarina Pires Ribeiro Ramos Marques
Investigadora do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus pais pelo carinho, amor e paciência que tiveram comigo durante estes anos académicos, assim como as suas palavras de motivação ao longo deste projeto de vida. Obrigada por apostarem na minha formação e por me mostrarem, o quão importante é viver cada momento.

À minha irmã pelos desabafos confidenciais, por me ajudar a encontrar a minha inspiração e pela sua calma transmitida com transparência.

À minha orientadora Catarina Marques por me dar a oportunidade de crescer, tanto a nível pessoal, como académico, por me fazer procurar sempre o rigor no trabalho, assim como a organização do mesmo.

Ao Professor Doutor Artur Silva e à Doutora Mónica Válega pela colaboração na realização e análise cromatográfica dos extratos de plantas.

Ao Departamento de Biologia e ao CESAM pela disponibilidade e fornecimento de equipamentos, para que este trabalho fosse possível.

Às meninas que partilharam o laboratório comigo durante este período Diana, Mafalda, Ana e Mariana, pela osmose de conhecimento e pelas risadas e piadas que demos e fizemos sobre as coisas mais parvas.

Às minhas amigas Júlia e Filipa, que juntas me deram conselhos, palavras amigas, abraços, alegrias, discussões e principalmente obrigada pela cumplicidade da nossa amizade.

Aos meus amigos de secundário, pelas receitas enviadas, nas redes sociais durante a quarentena, que me fizeram esquecer os problemas, com overdoses de açúcar.

Aos filmes da Disney e listas de música do Spotify por serem altamente inspiradores e motivos de foco.

Muito obrigada a todos, por estarem presentes, sempre que eu precisei.

“You can dream, create, design and build the most wonderful place in the world, but it requires people to make the dream a reality.” By Walt Disney

palavras-chave

cancro colorretal, bactérias cultiváveis, extratos brutos de plantas, atividade antibacteriana, ensaios de difusão em agar, ensaios de microdiluição, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

resumo

O cancro colorretal (CCR) é o segundo cancro com maior taxa de mortalidade no mundo. Os tratamentos comumente aplicados baseiam-se em cirurgia, quimio- e radioterapia. Contudo, estes não garantem um prognóstico satisfatório da doença, havendo a necessidade de novas soluções terapêuticas adjuvantes. Nos últimos anos têm surgido evidências da influência e/ou papel da microbiota intestinal na carcinogénese de CCR. Portanto, a prevenção e tratamento do CCR pode beneficiar de uma abordagem terapêutica que promova a regularização de uma microbiota em disbiose tipicamente associado a CCR, nomeadamente pelo controlo da proliferação de bactérias pró-carcinogénicas. Contudo, a resistência bacteriana aos antibióticos tem aumentado significativamente, limitando a eficácia dos antibacterianos disponíveis. Por isso, torna-se urgente a descoberta de novos compostos, nomeadamente a partir de extratos naturais de plantas, cuja atividade antibacteriana está longe de ser exaustivamente conhecida. O objetivo deste estudo foi assim analisar a bioatividade de extratos brutos de diferentes espécies de plantas, através de diferentes ensaios, contra bactérias isoladas de amostras de tecido tumoral (TT) e de mucosa não afetada (TN), excisadas do cólon de pacientes diagnosticados com CCR e submetidos a cirurgia clínica (amostras no âmbito do projeto aprovado pelo Comité de Ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.). A atividade de extratos etanólicos de 20 plantas diferentes foi analisada através de ensaios de difusão de disco, tendo sido identificados 8 extratos com atividade antimicrobiana contra bactérias da mucosa intestinal de pacientes com CCR. Os extratos em etanol de *Cinnamomum* sp., *Equisetum* sp. e de *Hibiscus* sp. inibiram o crescimento de um número superior de bactérias de TT (6,16-8,00 mm) e TN (9,44-10,38 mm), induzindo os maiores halos de inibição. O extrato bruto de *Hibiscus* sp. foi assim selecionado para a um estudo mais aprofundado, tendo sido analisados extratos preparados em etanol e metanol. A atividade antimicrobiana destes foi analisada através de ensaios de microdiluição, obtendo-se concentrações mínimas inibitórias do crescimento de bactérias de TT e TN, respetivamente, de $\leq 0,07$ - $1,00$ mg mL⁻¹ etanol e $0,11$ - $0,93$ mg mL⁻¹ metanol; e concentrações mínimas bactericidas entre $0,34$ - $>5,04$ mg mL⁻¹ etanol e $0,41$ - $>4,8$ mg mL⁻¹ metanol. As concentrações que causam 50% de inibição das bactérias estão entre $0,1658$ - $0,7987$ etanol e $0,1722$ - $0,5454$ metanol. A composição química dos extratos determinada por HPLC revelou a presença de compostos com atividade antimicrobiana, sendo o extrato de *Hibiscus* sp. em etanol mais promissor para estudos futuros de potenciais aplicações terapêuticas, em que a modelação/controlo de bactérias pro-carcinogénicas sejam uma mais-valia no combate ao CCR.

keywords

colorectal cancer, cultivable bacteria, crude plant extracts, antibacterial activity, agar diffusion assays, microdilution assays, high-performance liquid chromatography (HPLC).

abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second deadliest cancer in the world. The therapeutics commonly applied to treat CRC are based on surgery and chemotherapy. However, they do not guarantee a satisfactory prognosis, thereby highlighting the need for novel adjuvant therapeutic solutions. Recently, evidence has emerged on the influence and/or the role of the intestinal microbiota in the carcinogenesis of CRC. Therefore, the prevention and treatment of CRC may benefit from therapeutic approaches capable of manipulating the dysbiotic microbiota typically associated with CRC, namely by controlling the proliferation of pro-carcinogenic bacteria. However, bacterial resistance to antibiotics has increased significantly, hence limiting the effectiveness of available antibiotics. Therefore, it is urgent to discover new compounds, for instance from natural plant extracts, which antibacterial activity is far from being extensively known. The aim of this study was thus to analyse the bioactivity of crude extracts from different species of plants, through the performance of different assays, against cultivable bacteria isolated from samples of tumor tissue (TT) and from unaffected mucosa (TN), excised from the colon of patients diagnosed with CRC and submitted to clinical surgery (samples voluntarily provided under a project approved by the Ethics Committee of the Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.). The activity of ethanolic extracts from 20 different plant was analyzed using agar disk diffusion assays, being identified 8 extracts with antimicrobial activity against bacteria from the intestinal mucosa of CRC patients. The extracts of *Cinnamomum* sp., *Equisetum* sp. and *Hibiscus* sp. had inhibited the growth of a greater number of TT (6.16-8.00 mm) and TN bacteria (9.44-10.38 mm), and had also induced the greatest inhibition halos. The crude extract of *Hibiscus* sp. was thus selected to carry out a more in-depth study, being analyzed extracts prepared in ethanol and methanol. The antimicrobial activity of these extracts was evaluated through microdilution assays, the latter allowing to determine the minimum inhibitory concentrations for TT and TN bacteria, respectively, of ≤ 0.07 - 1.00 mg mL⁻¹ in ethanol and 0.11 - 0.93 mg mL⁻¹ in methanol; whereas the minimum bactericidal concentrations ranged between 0.34 - 5.04 mg mL⁻¹ in ethanol and 0.41 - 4.8 mg mL⁻¹ in methanol. The concentrations that cause 50% inhibition of the bacteria are between 0.1658 - 0.7987 ethanol and 0.1722 - 0.5454 methanol. The chemical composition of the extracts determined by HPLC revealed the presence of compounds with antimicrobial activity, being the ethanolic extract of *Hibiscus* sp. promising for future studies towards potential therapeutic applications in which the modelling/control of pro-carcinogenic bacteria is an asset in fighting CCR.

Índice

Lista de tabelas	10
Lista de figuras	11
Abreviaturas	13
Capítulo 1	14
1. Introdução	15
1.1. Cancro colorretal	15
1.2. Microbiota intestinal associado a cancro colorretal humano	16
1.3. Métodos terapêuticos aplicados no combate ao CCR	20
1.4. Antibióticos derivados de plantas com potencial anti-CCR	23
Objetivos	26
Capítulo 2	27
2. Material e Métodos	28
2.1. Cultura e conservação de bactérias	28
2.2. Extração de ADN e identificação das espécies de bactérias	28
2.3. Obtenção de extratos brutos de plantas	30
2.4. Análise da bioatividade dos extratos	31
2.4.1. Testes de difusão de disco em agar	31
2.4.2. Testes de difusão de poços em agar	31
2.4.3. Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços	32
2.5. Análise estatística	33
2.5.1. Teste <i>t</i> (student), comparação entre de dois grupos	33
2.5.2. ANOVA de uma via e CE50	34
2.6. Caracterização química dos extratos brutos de <i>Hibiscus</i> sp.	34
Capítulo 3	36
3. Resultados e Discussão	37
3.1. Identificação das bactérias da mucosa de pacientes com CCR	37
3.2. Análise do efeito de extratos brutos de diferentes plantas	39
3.2.1. Testes de difusão de disco em agar	39
3.3. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de <i>Hibiscus</i> sp.	46
3.3.1. Testes de difusão de poços em agar	46
3.3.2. Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços	49

3.4. Análise cromatográfica de extratos brutos de <i>Hibiscus</i> sp.	57
Capítulo 4	64
4. Considerações finais	65
Referências	68
Anexo I – Poster	84

Lista de tabelas

Tabela 1: Identificação de bactérias associadas a amostras de mucosa intestinal afetada (TT; coloridas a beje) e não afetada pelo tumor (TN) em pacientes com CCR	38
Tabela 2: Famílias e partes das plantas a partir das quais foram preparados os extratos brutos em etanol. Suscetibilidade de bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) e tumoral (TT; $n = 9$) aos extratos de plantas analisados.	40
Tabela 3: sumário do resultado da ANOVA de uma via aplicada para determinar diferenças estatísticas entre as concentrações de extratos de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) contra cada bactéria, no ensaio de microdiluição em placa. <i>GL</i> – Graus de Liberdade; <i>SQ</i> – Soma dos Quadrados; <i>QM</i> – Média dos Quadrados; <i>P</i> - valor de α	53
Tabela 4: Estimativas de toxicidade dos extratos de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) contra bactérias isoladas a partir da mucosa intestinal de pacientes com CCR, de acordo com o ensaio de microdiluição em placa. Concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB), concentração que provoca um efeito de 50% (CE50) juntamente com o erro padrão determinado e o valor de R^2 do ajuste ao modelo de regressão não linear aplicado para a estimativa de CE50. <i>nd</i> - significa não determinado.	55
Tabela 5: Tempos de retenção, fragmentos identificados por espectrometria de massa-ionização <i>electrospray</i> (ESI-MS), compostos associados e sua bioatividade de acordo com a bibliografia disponível, no extrato de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol. <i>nd</i> - significa não determinado.	58
Tabela 6: Tempos de retenção, fragmentos identificados por espectrometria de massa-ionização <i>electrospray</i> (ESI-MS), compostos associados e sua bioatividade de acordo com a bibliografia disponível, no extrato de <i>Hibiscus</i> sp. em metanol. <i>nd</i> - significa não determinado.	62

Lista de figuras

Figura 1: Crescimento de uma bactérias isolada da mucosa intestinal de um paciente com CCR.	30
Figura 2: Representação do processo de preparação de extratos de plantas. A – Mistura de extrato de planta com etanol (EtOH) após centrifugação e filtração. B – Evaporação do etanol (EtOH) e obtenção do extrato bruto de planta. C – Adição de DMSO ao extrato bruto de planta.....	30
Figura 3: Microplaca do ensaio de microdiluição para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos de <i>Hibiscus</i> sp. contra bactérias isoladas de mucosa intestinal de pacientes com CCR.	33
Figura 4: Placas de ensaio de difusão de disco em agar, em que é possível observar os halos de inibição obtidos para duas bactérias, contra diferentes extratos etanólicos de plantas.....	41
Figura 5: plantas com potencial antimicrobiano contra bactérias isoladas da mucosa intestinal de pacientes com CCR.....	42
Figura 6: Resultados dos ensaios de difusão de disco para 8 extratos brutos etanólicos de plantas selecionados: porcentagem de bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) e tumoral (TT; $n = 9$) suscetíveis aos extratos de plantas em etanol (EtOH).	42
Figura 7: Atividade antibacteriana dos extratde plantas em etanol (EtOH). A. Mapa de calor (<i>heatmap</i>) representando os halos de inibição bacteriana para as 15 bactérias expostas aos diferentes extratos em testes de difusão de disco. O diâmetro médio dos halos (mm) está representado por uma gradação de cores. B. Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) induzidos pelos diferentes extratos em bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) vs. tumoral (TT; $n = 9$), sendo também representada a concentração dos extratos das plantas em EtOH ([Extrato]; círculos verdes). As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão....	43
Figura 8: Placas de ensaio de difusão de poços em agar. Halos de inibição obtidos para duas bactérias contra os extratos brutos etanólico (Et) e metanólico (Me) de <i>Hibiscus</i> sp.	47

Figura 9: Atividade antibacteriana dos extratos brutos em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) de <i>Hibiscus</i> sp. contra bactérias da mucosa de pacientes com CCR, em ensaios de difusão de poços em agar. As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão; * indicam diferenças significativas entre o extrato em EtOH e MeOH, $P < 0,05$. Na tabela é apresentado o resultado do teste de <i>t</i> aplicado ao valor dos halos de inibição induzidos pelos extratos em EtOH vs. MeOH.	48
Figura 10: Atividade antibacteriana dos extratos brutos de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) contra bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) e tumoral (TT; $n = 9$) de pacientes com CCR, em ensaios de difusão de poços em agar. As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão.	48
Figura 11: Variação do crescimento bacteriano sob diferentes concentrações de extrato de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH). As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão. (*) indica as concentrações que induziram um crescimento bacteriano significativamente diferente do controlo, de acordo com o teste de Dunnett ($P < 0,05$).	50
Figura 12: Inoculação em placa de agar das suspensões de 5 poços (da placa de 96 poços do ensaio de microdiluição) correspondentes às 5 réplicas das concentrações mais elevadas de extrato de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) testadas.	55
Figura 13: Cronograma do extrato de <i>Hibiscus</i> sp. em etanol, onde estão representados todos os tempos de retenção, de cada metabolito encontrado neste extrato.	57
Figura 14: Cronograma do extrato de <i>Hibiscus</i> sp. em metanol, onde estão representados todos os tempos de retenção, de cada metabolito encontrado neste extrato.	60

Abreviaturas

ADN (Ácido desoxirribonucleico)

BHI (*Brain Heart Infusion*)

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA (*Bovine serum albumin* - Albumina do soro bovino)

CBM (Concentração Bactericida Mínima)

CCR (Cancro Colorretal)

CMI (Concentração Mínima Inibitória)

DMSO (Dimetilsulfóxido)

DO (Densidade ótica)

DT (*Dream Taq*)

EtOH (Etanol)

MeOH (Metanol)

MH (*Mueller Hinton*)

NCBI (National Center of Biotechnology Information)

PCR (*Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase)

rARN (Ácido ribonucleico ribossomal)

TAE (*Tris-Acetate-EDTA*)

TN (Tecido de mucosa periférica não afetada)

TSA (*Tryptic Soy Agar*)

TT (Tecido de mucosa afetada pelo tumor)

UFC (Unidades Formadoras de Colónias)

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Cancro colorretal

O cancro é uma das doenças mais letais no mundo. Em 2020, a Ásia foi o continente com a maior taxa de incidência de novos casos (49,3%) e de mortalidade (58,3%), seguido da Europa que apresentou taxas de 22,8% e 19,6%, respetivamente (GLOBOCAN, 2020). Mundialmente, o cancro colorretal (CCR) foi o segundo tipo de cancro que provou taxas de mortalidade mais elevadas (9,4%), seguido do cancro do pulmão (18%), em 2020 (GLOBOCAN, 2020). O número de mortes por CCR tem aumentado, principalmente na Ásia, no sul do continente europeu e na América Latina, assim como o número de novos casos tem vindo a aumentar em países em desenvolvimento devido a mudanças drásticas na alimentação (Wong et al., 2020). Estas tendências têm ocorrido, independentemente do género (homens ou mulheres) ou classe etária. Um estudo realizado em 2017 previu que em 2030, o CCR irá aumentar 60%, em todo o mundo, com mais de 2,2 milhões de novos casos (Arnold et al., 2017). Em Portugal, contudo, o CCR foi o que apresentou o maior número de novos casos (17,4%) e o segundo mais letal, com uma taxa de mortalidade de 14,3% (GLOBOCAN, 2020). Em 2040 está previsto que o número de novos casos de CCR em Portugal atinja 22,1% (cerca de 2285 novos casos) e que a mortalidade aumente 32,0% (mais 1369 mortes em 20 anos) (GLOBOCAN, 2020), estes dados estatísticos foram estimados para todas as idades e em ambos os géneros.

O CCR resulta da ocorrência cumulativa de alterações genéticas e epigenéticas ao nível da mucosa do cólon, promovendo assim o desenvolvimento de patologias no cólon e reto, como adenomas e adenocarcinomas (Jung et al., 2020). Assim, no processo de patogénese do CCR a co-ação de vários fatores extrínsecos (*i.e.*, situação geográfica, exposição a fontes de contaminação) e/ou intrínsecos (*i.e.*, idade, sexo, predisposição genética, historial de doenças) aumentam consideravelmente o risco do aparecimento de CCR (McFarlane et al., 2019; Yang et al., 2019).

Nos países ocidentais tem-se verificado uma maior incidência de CCR, nomeadamente devido a uma alimentação à base de carnes vermelhas, hidratos

de carbono processados e gordura animal, havendo um reduzido consumo de fibras, o que promove situações de disbiose da microbiota colorretal (Yang et al., 2019). Por outro lado, o consumo abusivo de antibióticos e outros medicamentos fomenta estes estados de disbiose (Sethi et al., 2019), podendo gradualmente aumentar o risco de ocorrência de doenças crónicas, tais como obesidade, doenças inflamatórias intestinais e, num estágio mais avançado, de CCR. Inclusivamente, os antibióticos e probióticos para o tratamento de cancro, podem alterar a microbiota intestinal (Sethi et al., 2019).

A microbiota intestinal é composta por uma variedade de vírus, fungos e principalmente por um vasto número de espécies bacterianas, responsáveis pela metabolização de alimentos, síntese de vitaminas, resposta imunológica, manutenção da função de barreira do epitélio da mucosa e reposição das células epiteliais do cólon (Bullman et al., 2018; Reider et al., 2020; Requena et al., 2020), vitais ao normal funcionamento do organismo humano, estabelecendo assim uma relação de simbiose, benéfica ao indivíduo. Posto isto, uma alteração na estrutura e diversidade funcional da microbiota intestinal humana pode conduzir a um estado de disbiose e desencadear desequilíbrios na homeostasia dos sistemas conduzindo, mormente, a um défice na resposta do sistema imunitário, distúrbios e diferentes doenças (inflamatórias) do cólon que, em última instância promovem o aparecimento de cancro. Vários trabalhos de investigação têm sido desenvolvidos nas últimas duas décadas, no sentido de compreender e elucidar a aparente associação entre a microbiota intestinal e a carcinogénese de CCR. Dejea et al. (2014) estabeleceram, pela primeira vez, uma relação entre a organização de biofilmes microbianos na mucosa colorretal e a patogénese do tumor. Por conseguinte, a microbiota em associação com o cólon e reto deve ser tida em consideração, nomeadamente na definição de (novas) estratégias terapêuticas do CCR.

1.2. Microbiota intestinal associado a cancro colorretal humano

A microbiota intestinal tem vindo assim a ser associado ao desenvolvimento e progressão de CCR, devido à proliferação de bactérias pro-cancerígenas e redução de bactérias benéficas, e também pela formação de biofilmes com ação

nociva na mucosa intestinal (Dejea et al., 2014; Liu et al., 2020; Reider et al., 2020; Sheng et al., 2020; Zackular et al., 2014).

As bactérias predominantes na microbiota intestinal saudável pertencem aos filos Bacteroidetes, Firmicutes Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia (Qin et al., 2010; Wieczorska et al., 2020), dadas as suas funções metabólicas e imunológicas benéficas (Reider et al., 2020; Wieczorska et al., 2020). No entanto, tem igualmente sido relatado um aumento de bactérias dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Fusobacteria através da análise metagenómica da microbiota intestinal em indivíduos com CCR, sendo consideradas bactérias indutoras ('drivers') do desenvolvimento de CCR. (Yang et al., 2019; Reider et al., 2020).

Alguns estudos evidenciam que o desenvolvimento de CCR está particularmente associado a certas espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium septicum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis* e *Bacteroides fragilis* (Haghi et al., 2019; McFarlane et al., 2019; Saffarian et al., 2019). Estas bactérias possuem a maquinaria genética necessária para a síntese de toxinas que danificam o ADN (Haghi et al., 2019).

Nos tecidos do tumor, além de *F. nucleatum* e *B. fragilis*, Saffarian et al., (2019) identificaram também *Parvimonas micra*, tendo reunido evidências de que diferentes bactérias habitam partes diferentes do cólon, ou seja, a microbiota na mucosa do cólon ascendente é diferente da microbiota na mucosa do cólon descendente, em tumores colónicos (Saffarian et al., 2019; Sheng et al., 2020). Um estudo que analisou fezes de pacientes com CCR, demonstrou que a diversidade de microrganismos em pacientes com CCR é inferior, quando comparada com indivíduos saudáveis, havendo uma diminuição de bactérias da classe Clostridia e um aumento dos géneros anaeróbios *Porphyromonas* e *Fusobacterium*, sendo este último o mais predominante, tanto nos tecidos tumorais, como nas fezes de pacientes com CCR (Liu et al., 2020). Também a família de bactérias Enterobacteriaceae e do género *Streptococcus* aparecem em grandes quantidades na microbiota intestinal de pacientes com CCR (Sheng et al., 2020).

Em amostras de biópsias efetuadas à mucosa do cólon é comum o aparecimento de bactérias como *F. nucleatum* (Sethi et al., 2019). Esta bactéria localiza-se preferencialmente em adenomas e carcinomas colorretais humanos,

promovendo a proliferação do tumor colorretal, para além de afetar a resposta imunológica (Haruki et al., 2020; Mima et al., 2017). O género *Fusobacterium* pode estar presente em 43% de cancros colorretais (Bullman et al., 2018). A distribuição de *F. nucleatum* no tumor é heterogénea, invadindo, contudo, regiões próximas do lúmen e ulceradas, sendo menos regular a sua presença em estruturas glandulares centrais e na periferia do tumor (Bullman et al., 2018). Apesar de se ter estabelecido uma relação entre a sua abundância na microbiota e o estágio de desenvolvimento de neoplasias e CCR (Flanagan et al., 2014), os mecanismos que sustentam a sua ação carcinogénica no CCR ainda não são totalmente conhecidos (Yang et al., 2019). No entanto, já se verificou que estas bactérias são capazes de aderir a células cancerígenas colorretais e migrar para zonas metastisadas (Bullman et al., 2018). A formação de biofilme e proliferação de *F. nucleatum* ocorrem normalmente no primeiro estágio de desenvolvimento do CCR. Além disso, esta bactéria pode ser resistente à quimioterapia que normalmente é usada no tratamento de cancro (Haruki et al., 2020). A presença de *Selenomonas*, *Bacteroides* e *Prevotella* em estágios primários e metastáticos de CCR está associada à abundância de *Fusobacterium* no adenocarcinoma primário do cólon (Bullman et al., 2018).

S. bovis embora esteja normalmente presente na microbiota intestinal, estes microrganismos podem provocar adenomas no cólon e neoplasia colorretal (Taddese et al., 2020).

Streptococcus gallolyticus também está presente em neoplasias colorretais e faz parte, em abundância elevada, da microbiota intestinal de indivíduos com CCR (Sheikh et al., 2020). Infecções por *H. pylori* potenciam a probabilidade de um indivíduo desenvolver CCR (Butt et al., 2019; Blase et al., 2016; Choi et al., 2020). Contudo, o mecanismo de ação pro-carcinogénica desta bactéria em CCR é pouco claro (Corredoira et al., 2015; Butt et al., 2019). *B. fragilis* é vulgarmente identificada na microbiota da mucosa intestinal, embora em quantidade muito reduzida, porém o subtipo enterotoxigénico desta bactéria anaeróbia liberta uma toxina promotora de carcinogénese de tumores colorretais (Boleij et al., 2015; Sethi et al., 2019; Haghi et al., 2019). Essa toxina é a fragilisina e pode provocar danos, a longo prazo, nas células epiteliais do cólon, conduzindo à formação de pólipos no cólon, à sua inflamação e posterior aparecimento de CCR (Purcell et al., 2017; Haghi et al.,

2019; Yang et al., 2019; Valguarnera e Wardenburg, 2020). Por outro lado, outros estudos defendem que *B. fragilis* protege contra o desenvolvimento de tumores no cólon em modelos animais de CCR, dado que produz um polissacarídeo (polissacarídeo A) que inibe a inflamação cólon pela indução da síntese de IL-10 (interleucina-10) pelas células T via recetor TLR2 (Lee et al., 2018). Por outro lado, há evidências de que *B. fragilis* tem resistência a antibióticos (Valguarnera e Wardenburg, 2020), podendo contribuir para uma menor eficácia das terapias anti-CCR normalmente aplicadas.

E. coli é uma das bactérias mais comuns da microbiota intestinal humana. Contudo, alguns estudos afirmam que existe uma relação entre a sua adesão à mucosa do intestino e o CCR (Bonnet et al., 2014). Algumas das suas estirpes patogénicas estão associadas a CCR, visto a sua capacidade de produzir colibactina, uma genotoxina que aumenta significativamente a probabilidade de um indivíduo desenvolver CCR (Song et al., 2020; Thakur et al., 2019).

Apesar da microbiota humana ser habitada maioritariamente por bactérias anaérobias, também é possível encontrar bactérias aeróbias associadas a CCR como *E. faecalis* e *Klebsiella pneumoniae* (já isoladas de amostras de fezes humanas) e *S. gallolyticus* (Dahmus et al., 2018; Fei et al., 2019; Wieczorska et al., 2020). Além disso, alguns géneros como *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Enterobacter* estão associados à produção de agentes carcinogénicos como o acetaldéido (Molska e Regula, 2019).

Acima foi descrito que alguns *taxa* e, em particular, espécies bacterianas, presentes na microbiota intestinal, potenciam o aparecimento de CCR, assim como a proliferação de células cancerígenas. Deste modo, é de elevada relevância que o desenvolvimento de estratégias terapêuticas tenham em consideração a influência da microbiota intestinal e alterações estruturais e funcionais, na sua eficácia. Assim, de modo a prevenir, controlar e/ou reduzir a probabilidade de desenvolvimento e progressão de CCR, num indivíduo, deve ser estudado o impacto de compostos bioativos com potencial ação terapêutica, em bactérias associadas a CCR.

1.3. Métodos terapêuticos aplicados no combate ao CCR

Dentre as abordagens terapêuticas de CCR, a remoção do tumor através de cirurgia é o tratamento curativo primordial. A quimioterapia e radioterapia combinadas ou não, bem como terapias dirigidas ou imunoterapia, são também aplicadas como terapias neoadjuvantes (pré-cirúrgicas) ou adjuvantes (pós-cirúrgicas) à cirurgia, sendo os regimes terapêuticos definidos consoante o sucesso na remoção total das lesões e/ou estágio de desenvolvimento do CCR (Benarba e Pandiella, 2018; Cáceres et al., 2019; Xie et al., 2020). A quimioterapia adjuvante normalmente é usada após a cirurgia a indivíduos com CCR que evidenciam uma tendência para a recidiva do cancro (Bhudia et al., 2020). As terapias neoadjuvantes (tratamentos que podem ser administrados antes da cirurgia, que atuam sobre um tumor presente no organismo do indivíduo, com a finalidade de diminuir o seu tamanho, por exemplo) à quimioterapia ajudam a diminuir metástases hepáticas em CCR, contribuindo para a eficácia da cirurgia curativa e para o prognóstico da doença (Bhudia et al., 2020).

Os medicamentos regularmente utilizados em quimioterapia são o irinotecano e a oxaliplatina devido às suas propriedades anticancerígenas. Porém, foi demonstrado que algumas bactérias associadas a CCR contribuem para a resistência à oxaliplatina em linhas celulares de CCR (Geller et al., 2017; Imai et al., 2020). Além disso, a oxaliplatina pode provocar neuropatia periférica (Ventzel et al., 2016) e o irinotecano diarreias, no trato gastrointestinal, com uma toxicidade superior ou igual a 30% (Schmoll et al., 2012). Após a cirurgia, o CCR é normalmente tratado com 5-fluorouracil (5-FU) ou oxaplatina. No entanto, apesar da quimioterapia ser um dos tratamentos mais usados em CCR, aumentando o tempo de vida dos pacientes, esta pode resultar em efeitos secundários bastante agressivos para o organismo humano, como dores de cabeça, problemas no sono, neutropenia, fadiga, baixa resposta imunológica, toxicidade sistêmica, falta de concentração e memorização e dor (Röhrl et al., 2019; Xie et al., 2020). Adicionalmente, a quimioterapia pode ser pouco específica para o tumor em causa, limitando o nível de eficácia do tratamento. Além disso, a diversidade, distribuição e metabolismo da microbiota intestinal pode alterar por exposição aos medicamentos e assim condicionar a resposta à quimioterapia (Xie et al., 2020).

Uma outra abordagem terapêutica que tem sido aplicada consiste no uso de antibióticos juntamente com agentes citotóxicos (quimioterapêuticos). Os antibióticos permitem uma diminuição de bactérias promotoras de CCR no tumor que, associados ao fármaco gemcitabina potenciam o tratamento de pacientes com cancro, numa fase mais tardia, aumentando também a eficácia da oxaliplatina (Imai et al., 2020). Os antibióticos são fundamentais na quimioterapia antimicrobiana e têm a função de eliminar e/ou reduzir o crescimento de microrganismos patogénicos em pacientes com CCR (Dafale et al., 2016). Contudo, um dos grandes problemas deste tratamento é o facto de certas bactérias promotoras de CCR serem altamente resistentes aos antibióticos (Dafale et al., 2016). Não obstante, no cancro, como as células cancerígenas proliferam rapidamente e de maneira irregular, a dose de antibiótico administrada para eliminar o microrganismo alvo por vezes não é suficiente (Gerstein et al., 2016; Jinu et al., 2017). Outro problema é o facto dos antibióticos induzirem disbiose intestinal associada a CCR, sendo que a sua administração prolongada pode provocar adenomas (Armstrong et al., 2020; Boursi et al., 2015).

O metronidazol é um antibiótico usado para a inibição de *Fusobacterium*, tanto no tecido tumoral, como na proliferação das células do tumor, não tendo influência no crescimento de carcinomas colorretais (Bullman et al., 2018). No entanto, o metronidazol atua sobre bactérias anaeróbias que co-ocorrem com *Fusobacterium*, prejudicando bactérias benéficas à microbiota intestinal saudável (Bullman et al., 2018). A eritromicina é outro antibiótico que inibe *F. nucleatum*, tendo sido demonstrado que diminuiu o volume do tumor em ratinhos administrados com o antibiótico comparativamente a ratinhos não medicados (Bullman et al., 2018). *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, espécies bacterianas que constituem a microbiota intestinal (saudável e tumoral), são resistentes a fluoroquinolonas, carbapenem e meticilina, vancomicina e cefotaxima, respetivamente (Hossan et al., 2018).

Os antibióticos têm sido assim estudados devido às suas propriedades e capacidade de potenciar o efeito anticancerígeno de agentes citotóxicos, contudo, devido ao crescente aumento da resistência de bactérias aos seus efeitos, a ineficácia na sua aplicação no combate a CCR limita a utilização desta estratégia

terapêutica. Assim, existe uma grande necessidade de encontrar tratamentos alternativos e menos agressivos para pacientes com CCR (Imai et al., 2020; Xie et al., 2020).

A manipulação/modelação da microbiota intestinal humana através da alimentação tem sido também uma alternativa de tratamento adjuvante do CCR. O controlo de bactérias indutoras de CCR pode ser promovido através da alimentação, numa fase inicial e preventiva do cancro, uma vez que dietas ricas em prebióticos (substrato benéfico usado por microrganismos) (Gibson et al., 2017) auxiliam na regularização da estrutura e composição da microbiota intestinal humana (Reider et al., 2020). Os probióticos (microrganismos vivos benéficos à saúde, quando administrados em doses apropriadas) (Hill et al., 2014) podem ainda ser usados para repor a microbiota que sofreu disbiose devido à quimioterapia. Os prebióticos potenciam a atividade e o crescimento dos probióticos, são capazes de reduzir o aparecimento de tumores, induzir a apoptose celular em CCR e promover a proliferação de *Bifidobacterium*, uma bactéria benéfica (Fong et al., 2020). O butirato é um ácido gordo de cadeia curta, produto da fermentação de prebióticos por probióticos, que pode ser usado no tratamento de CCR, uma vez que tem uma ação anti-inflamatória, induz apoptose, reduz efeitos de stress oxidativo e fortalece a função da barreira epitelial que protegem a mucosa do cólon (Fong et al., 2020). Contudo, as variações genéticas entre diferentes indivíduos são um fator determinante na eficácia deste tipo de tratamento, visto que existem vários fenótipos tumorais (Fong et al., 2020). Este tipo de tratamento requer mais estudos que tenham em conta diferentes fatores extrínsecos condicionantes, como o género e a variação nas dietas alimentares consoante a situação geográfica (Kyro et al., 2019; Reider et al., 2020).

Outras abordagens terapêuticas mais recentes e ainda pouco exploradas/aplicadas, consistem na modulação da microbiota intestinal pela transplantação de microbiota fecal, de modo a repor a microbiota saudável do intestino, algo que pode ainda reduzir o surgimento/desenvolvimento de tumores. Porém, existe a problemática da compatibilidade da microbiota entre indivíduos, assim como o défice da resposta imunológica aos microrganismos patogénicos que possam integrar a microbiota do indivíduo, durante o transplante (Fong et al., 2020).

Por conseguinte, nas últimas décadas tem surgido novamente a necessidade das farmacêuticas e dos investigadores descobrirem novas moléculas químicas bioativas a partir de fontes naturais, como por exemplo bactérias, fungos e plantas, oriundos de diferentes nichos ecológicos (Manganyi e Ateba, 2020; Nweze et al., 2020). Apesar de todos os avanços, os tratamentos existentes acarretam efeitos secundários que podem prejudicar o indivíduo (Röhrl et al., 2019) e, embora aumentem o prognóstico da doença e a probabilidade de sobrevivência, apresentam limitações quanto à sua eficácia, nomeadamente devido à interferência da microbiota intestinal no processo de desenvolvimento do CCR, assim como na resposta do tumor/organismo ao tratamento administrado.

1.4. Antibióticos derivados de plantas com potencial anti-CCR

A utilização de plantas naturais no tratamento de doenças remonta há milénios de anos e são cada vez mais recorrentemente aplicadas em métodos alternativos às terapias tradicionais (Wong et al., 2019). A síntese de compostos bioativos é assim um atrativo primordial na bioprospeção de plantas para aplicações clínicas terapêuticas diversas (Martínez-Aledo et al., 2020). As plantas (medicinais) apresentam propriedades anticancerígenas, antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-tumorais (Hossan et al., 2018; Zhou et al., 2019), anti-angiogénicas (Valsalam et al., 2019), entre outras, pelo que os seus compostos podem exercer uma ação adjuvante à quimioterapia, potenciando o tratamento de CCR, assim como a sua prevenção (Subramaniam et al., 2019). Na Ásia existem plantas que conseguem sintetizar uma vasta diversidade de moléculas, cujo peso molecular é baixo e onde as suas estruturas químicas são diferentes das dos antibióticos comumente conhecidos, tornando-se uma grande mais valia para a descoberta e produção de novos compostos naturais bioativos (Hossan et al., 2018).

Os compostos bioativos produzidos por plantas, com propriedades anticancerígenas e antibacterianas, são os polifenóis, flavonóides, diterpenóides, alcalóides, terpenóides, polissacarídeos e ácidos gordos insaturados (Huang et al., 2019; Manganyi e Ateba, 2020; Martínez-Aledo et al., 2020). Estes compostos conseguem potenciar a apoptose celular e inibir o crescimento das células

cancerígenas em CCR (Martínez-Aledo et al., 2020). Os polifenóis, por exemplo, podem ser encontrados em vários alimentos como os cereais, legumes, frutas (uvas e cerejas), cerveja, chá, vinho tinto, chocolate e café, sendo grandes agentes anti-inflamatórios e com atividade anti-cancerígena e anti-tumoral (Mileo et al., 2019). Foi registado que o crescimento de *Streptococcus* é inibido por polifenóis presentes no vinho tinto, assim como o crescimento de *F. nucleatum* é inibido pelas sementes de uvas, usadas na produção de vinho tinto (Sánchez et al., 2019). Os grãos contêm, assim, polifenóis e antioxidantes que reduzem a inflamação local no cólon e protegem o organismo contra o CCR. O sorgo, por exemplo, evita a formação de metástases, protegendo contra alterações disbióticas da microbiota intestinal. Yang et al. (2019) constatou que uma alimentação rica em grãos (*i.e.*, arroz não-glutinoso e aglutinoso, e sorgo) diminui o aparecimento de CCR em ratinhos, aumentando a abundância de *Prevotella* no intestino.

Existem múltiplas espécies de plantas com atividade anticancerígena e antibacteriana. *Musa barbisiana* é composta por flavonóides, carotenóides, polifenóis. Apresenta um grande poder antioxidante que interfere diretamente com a progressão do cancro e desenvolvimento de metástases (Valsalam et al., 2019). O extrato de hexano obtido a partir de *Mentha arvensis* inibe *S. aureus* resistente a metilcilina sob uma concentração mínima inibitória (CMI) de 24,3 mg mL⁻¹, demonstrando uma ação bacteriostática para esta bactéria e para *E. coli*, assim como uma ação bactericida contra *Acinetobacter baumannii* (Hossan et al., 2018). O extrato de hexano de casca de *Cinnamomum cassia* é bactericida para *A. baumannii*, *E. faecalis* e *S. aureus* resistente a metilcilina. O cinamaldeído é o composto bioativo principal do óleo da casca de *C. cassia* e é capaz de reduzir a resistência da bactéria *S. aureus* resistente à metilcilina, à vancomicina. Assim, *C. cassia* apresenta atividade antibacteriana (Hossan et al., 2018). *Curcuma longa*, oriunda da Índia, produz um composto bioativo, a curcumina, que tem propriedades anticancerígenas e pode ser usado como tratamento adjuvante à quimioterapia de CCR. No entanto, a sua administração por via oral é pouco viável, uma vez que é mal absorvido pelo organismo, devido à sua baixa solubilidade em água (Wong et al., 2019). A curcumina também é capaz de induzir a apoptose no cancro da mama e impossibilita o crescimento de metástases hepáticas a partir de células

cancerígenas do cólon (Subramaniam et al., 2019). Num estudo feito em plantas da China, compostos bioativos como a quercetina (flavonóide) podem também ser usados no tratamento de combate ao CCR, uma vez que são capazes de estimular a apoptose (Lin et al., 2020).

O presente estudo centrou-se na utilização de extratos brutos de plantas, visto serem ferramentas relevantes que possam vir a ser mais tarde integradas em tratamentos preventivos e/ou adjuvantes, caso se verifique a sua ação benéfica, pois os compostos químicos de plantas têm um efeito preventivo na maioria dos cancros (Jinu et al., 2017).

Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi testar a atividade antibacteriana de extratos brutos de diferentes espécies de plantas, em bactérias isoladas de amostras de tecido de mucosa afetada pelo tumor (TT) e de tecido de mucosa periférica não afetada (TN), obtidas de pacientes com CCR submetidos a cirurgia clínica. Para este fim foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- identificar extratos de diferentes plantas que evidenciem atividade contra bactérias de mucosa tumoral através do ensaio de difusão de disco em agar;
- analisar a bioatividade do extrato da planta que evidencia atividade antibacteriana relevante, através do ensaio de difusão de poços em agar;
- avaliar a eficiência de dois solventes orgânicos (etanol e metanol) na extração de compostos bioativos da planta selecionada;
- determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos preparado em etanol e metanol, através do ensaio de microdiluição em placa de 96 poços;
- Analisar a composição química de cada extrato bruto recorrendo à técnica de HPLC.

Estrutura da dissertação

O trabalho assim desenvolvido será apresentado nesta dissertação ao longo dos capítulos que a compõem:

- Capítulo 1 - Introdução
- Capítulo 2 - Material e Métodos
- Capítulo 3 - Resultados e Discussão
- Capítulo 4 - Considerações finais.

Deste trabalho de Mestrado resultou ainda a produção de um *Poster* que foi apresentado no congresso FEMS 2020 realizado *online*, entre 28-31 de outubro de 2020, sendo o título: *Antibacterial activity of plant extracts against bacteria isolated from patients with colorectal cancer* (Anexo - I).

Capítulo 2

Material e métodos

2. Material e Métodos

2.1. Cultura e conservação de bactérias

As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas anteriormente no âmbito de um projeto realizado em colaboração com o Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. (CHBV), devidamente aprovado pelo Conselho de Ética do mesmo Centro Hospitalar. As bactérias foram obtidas a partir de amostras de mucosa do cólon de cinco voluntários diagnosticados com cancro colorretal (CCR), tendo sido excisadas durante a cirurgia a que os pacientes foram sujeitos. Assim, foram isoladas bactérias de tecido de mucosa afetada pelo tumor (TT) e de tecido de mucosa periférica não afetada (TN). Dos cinco pacientes foi possível isolar um total de 15 bactérias em diferentes meios de cultura aeróbios (*e.g.*, TSA - *Tryptic Soy Agar* -, BHI - *Brain Heart Infusion agar*), das quais 6 provieram de TN e 9 de TT. As estirpes bacterianas foram conservadas em glicerol e mantidas a -80°C.

2.2. Extração de ADN e identificação das espécies de bactérias

As 15 bactérias usadas neste estudo foram cultivadas em agar BHI a partir dos gliceróis conservados e incubadas a 37°C, durante aproximadamente 24h (figura 1). Após este período, cerca de 3 colónias bacterianas foram ressuspensas em 30 µL de água destilada estéril, sendo posteriormente efetuada a lise da membrana bacteriana através de choque térmico a 100°C durante 6 minutos. Ao fim deste tempo, as bactérias foram colocadas a -20°C por 10 minutos. As suspensões obtidas foram conservadas a 4°C. Este choque térmico, a que as bactérias foram sujeitas, provocou a lise celular e libertação do ADN genómico, para posterior aplicação de diferentes técnicas de biologia molecular, *e.g.*, amplificação de do gene 16S ARN ribossomal (rARN) por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). A sequenciação deste gene tem sido amplamente utilizada para a identificação de espécies bacterianas graças às zonas com informação genética conservada num fragmento de aproximadamente 1600 pb, sendo por isso considerado um excelente marcador filogenético (Kim et al., 2011).

Assim, a partir do ADN extraído procedeu-se à amplificação do gene 16S rARN através de PCR, tendo sido utilizada uma reação de 25 µL composta por: 0.04 mg mL⁻¹ de albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* - BSA), 0,3 µM de *primer* direto (27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e reverso (1522R: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'), 1 µL do ADN genómico extraído (50 pb – 20 kb), 12,5 µL de *Dream Taq Master Mix* e 9,5 µL de água destilada estéril. A corrida de PCR foi efetuada no termociclador C1000 (Bio-Rad) e consistiu nas seguintes fases: desnaturação inicial da cadeia de ADN por 9 minutos a 94°C; 28 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), hibridização (ligação dos *primers* à cadeia de ADN, a 57°C, durante 30 segundos) e extensão da cadeia de ADN (72°C durante 1 minuto e 30 segundos); e extensão final da cadeia de ADN sintetizada a 72°C durante 10 minutos (Lorenz, 2012).

A confirmação dos fragmentos de ADN amplificados foi realizada através de uma corrida eletroforética. O gel de eletroforese feito com agarose, a uma concentração de 1% em tampão tris-acetate-EDTA (TAE). Por fim adicionou-se 1,8 µL de corante Green Safe. O gel solidificado foi carregado com uma alíquota do produto de PCR misturado com 2 µL do tampão de carga, um marcador de ADN de 1 Kb e com um controlo negativo, em que não foi adicionado ADN. As amostras carregadas no gel foram corridas numa tina de eletroforese, por 30 minutos, a 100 V. O gel foi observado e digitalizado num ChemiDoc Universal Hood II, Bio-Rad, sendo confirmada a presença de uma banda de 1,6 kb, correspondente ao fragmento do gene 16S rARN amplificado, nos poços carregados com os produtos de PCR. Os produtos de PCR foram purificados através do kit NZYGelpure, Nzytech, e sequenciados através de sequenciação de Sanger, na empresa GATC BioTech na Alemanha.

A sequência de nucleótidos obtida foi comparada com as sequências depositadas na base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o *software* BLASTn[®] (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Através desta ferramenta informática é possível identificar o filótipo da espécie bacteriana em estudo, assim como percentagem de similaridade relativamente às sequências nucleotídicas depositadas.



Figura 1: Crescimento de uma bactéria isolada da mucosa intestinal de um paciente com CCR.

2.3. Obtenção de extratos brutos de plantas

As plantas usadas neste estudo pertencem às seguintes famílias: Lauraceae, Equisetaceae, Monimiaceae, Humiriaceae, Solanaceae, Brassicaceae, Malvaceae, Bignoniaceae, Apiaceae, Fabaceae, Chlorellaceae, Laminariaceae, Asteraceae, Amaryllidaceae, Zingiberaceae, Meliaceae, Bromeliaceae e Rubiaceae. A massa seca de caules, folhas, flores, frutos, sementes ou bulbos das vinte plantas foi triturada até se obter um pó. Os extratos foram depois preparados por imersão do material vegetal triturado em etanol (EtOH) ou metanol (MeOH) (10% m/v). A mistura foi agitada a 180-200 rpm (rotações por minuto), a 25°C, durante 24h. Esta mistura foi posteriormente centrifugada e filtrada. O filtrado obtido foi evaporado num evaporador rotativo, num banho a 40°C. A massa de extrato bruto da planta foi pesada e ressuspensa em dimetilsulfóxido (DMSO) (figura 2). Os extratos brutos foram armazenados a 4°C.



Figura 2: Representação do processo de preparação de extratos de plantas. A – Mistura de extrato de planta com etanol (EtOH) após centrifugação e filtração. B – Evaporação do etanol (EtOH) e obtenção do extrato bruto de planta. C – Adição de DMSO ao extrato bruto de planta.

2.4. Análise da bioatividade dos extratos

2.4.1. Testes de difusão de disco em agar

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos em EtOH de 20 plantas diferentes foi testada através de testes de difusão de disco em agar, contra um total de 15 bactérias isoladas previamente de TN e TT. Para esse fim, as bactérias foram inoculadas em Mueller Hinton (MH) broth e incubadas a 37°C e 180 rpm durante 16-18h. De seguida, a densidade ótica (DO) da cultura bacteriana foi medida a um comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), num espectrofotómetro. Sobre uma placa de agar MH foi inoculada uma camada do mesmo meio contendo a bactéria em estudo, a uma densidade de DO₆₀₀ = 0,02. Para cada bactéria e extrato em análise foram preparadas 3 réplicas (*i.e.*, 3 placas).

Os discos foram impregnados com 10 µL de extrato bruto ou DMSO (controlo para verificar se o solvente interfere no crescimento bacteriano) e deixados a secar, à temperatura ambiente, por cerca de 2h. Após este tempo, os discos foram colocados sobre os tapetes bacterianos. As placas foram incubadas a 37°C, por 24h, sendo de seguida medido o diâmetro dos halos de inibição do crescimento das bactérias. O extrato que apresentou atividade antibacteriana significativa, sobretudo contra bactérias de TT, foi testado mediante a aplicação de outro tipo de ensaios.

2.4.2. Testes de difusão de poços em agar

Os testes de difusão de poços em agar, apenas foram aplicados ao extrato em EtOH de *Hibiscus* sp., uma vez que este conseguiu inibir o crescimento, de uma maior percentagem de bactérias de TT. Neste caso, 20 µL de extrato bruto foi adicionado diretamente em poços (com 5-6 mm de diâmetro) feitos no agar contendo um tapete bacteriano. O processo de preparação dos tapetes bacterianos foi efetuado como descrito para os testes de difusão de disco em agar. As placas, após o extrato bruto difundir no agar, foram incubadas a 37°C, por 24h. Findo este período de incubação, o diâmetro dos halos de inibição formados à volta dos discos foi medido em 3 réplicas diferentes.

2.4.3. Ensaios de microdiluição em placa de 96 poços

Neste ensaio pretendia-se determinar a concentração mínima de extrato bruto de *Hibiscus* sp. capaz de inibir o crescimento (*i.e.*, Concentração Mínima Inibitória; CMI) de bactérias extraídas de TN e TT. A determinação da CMI foi efetuada através do método de microdiluição segundo o qual as bactérias foram expostas, em microplacas de 96 poços, a uma gama de concentrações do extrato bruto diluído em MH broth, em resultado da aplicação de um fator de diluição final de 1,2-1,5 entre concentrações. Este fator foi definido mediante os resultados de ensaios prévios em que se testou uma gama de concentrações mais alargada, *i.e.*, com um fator de diluição de 2 entre concentrações. O efeito dos extratos na viabilidade celular microbiana foi analisado pela adição do corante resazurina (10 µL por poço) que, pelo metabolismo respiratório das bactérias ativas, é oxidado e convertido num composto fluorescente, a resorufina, mensurável num espectrofluorímetro a um comprimento de onda de excitação de 530 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm.

Nos ensaios foram considerados diferentes tratamentos: (i) controlo negativo composto pelo meio de cultura MH broth; (ii) controlo de solvente em que foi testado o efeito da concentração máxima de DMSO adicionada aos extratos; (iii) diferentes concentrações de extrato bruto de *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH. Para cada tratamento foi considerado um total de 5 réplicas inoculadas com a suspensão bacteriana e três réplicas em que não foi adicionada bactéria. As réplicas em que não foi adicionado o inóculo bacteriano funcionaram como um controlo de esterilidade, assim como permitiram corrigir os níveis de autofluorescência do extrato – denominados brancos. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de um inóculo em crescimento exponencial (37°C, 180 rpm, 16h de incubação), cuja densidade celular foi ajustada, por diluição em MH broth, de modo a ter uma densidade inicial de 5×10^5 UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colónia por mililitro). As microplacas foram incubadas a 180-200 rpm, a 37°C, por 16-18h. A leitura da fluorescência foi feita num espectrofluorímetro com um leitor de microplacas, a 530/590 nm de comprimento de onda de excitação e emissão, respetivamente (Synergy H1, Biotek) (figura 3). A fluorescência relativa, para cada concentração de extrato foi obtida, pela subtração dos valores de fluorescência das

réplicas com adição do inóculo bacteriano, à média da fluorescência das réplicas dos brancos.

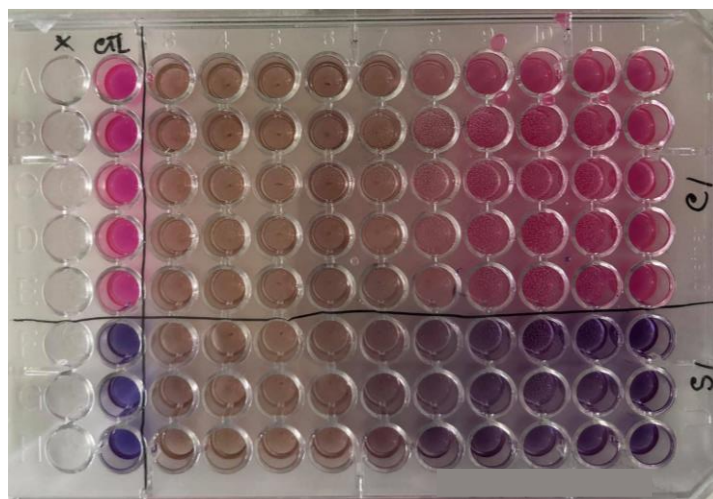


Figura 3: Microplaca do ensaio de microdiluição para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Hibiscus* sp. contra bactérias isoladas de mucosa intestinal de pacientes com CCR.

A Concentração Mínima Bactericida (CMB) é a concentração mínima de extrato em que não se verifica viabilidade das células bacterianas e que, por isso, tem um efeito bactericida. Esta concentração foi determinada pela incubação, em placas de MH agar, de 5 μ L da suspensão dos poços (num total de 5 réplicas/poços) das concentrações mais elevadas testadas. As placas foram seladas e incubadas a 37°C e 200 rpm, por 3-24h, dependendo do crescimento da bactéria.

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi aplicada aos resultados gerados nos ensaios de difusão de poços em agar (diâmetro de halos de inibição) e nos ensaios de microdiluição (dados de fluorescência relativa), através do programa SigmaPlot versão 12.5.

2.5.1. Teste *t* (student), comparação entre de dois grupos

Os valores dos testes de difusão de poços foram submetidos a um teste de *t* de Student para determinar a existência de diferenças significativas ($P < 0.05$) entre o diâmetro dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos para extrato

bruto etanólico *versus* metanólico de *Hibiscus* sp. Definiu-se como hipótese H0 que os diâmetros dos halos de inibição obtidos no extrato em EtOH não são significativamente diferentes dos halos de inibição obtidos por exposição ao extrato em MeOH.

2.5.2. ANOVA de uma via e CE50

De modo a analisar diferenças significativas ($P < 0,05$) nos valores de fluorescência relativa entre as várias concentrações dos extratos etanólico e metanólico de *Hibiscus* sp. testadas nos ensaios de microdiluição, foi aplicada uma análise de variâncias de uma via (ANOVA). De seguida aplicou-se o teste de Dunnett de comparação múltipla para identificar quais as concentrações de extrato eram significativamente diferentes do controlo negativo. A CMI corresponde à concentração de extrato mais baixa que inibiu significativamente o crescimento bacteriano comparativamente com o controlo negativo.

Através de uma regressão não linear logística determinou-se os valores de concentração de extrato que provocou 50% de efeito (CE50) que, neste caso é a inibição do crescimento e viabilidade celular bacteriana. A qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo logístico é avaliada pelo valor de erro padrão e do R^2 .

2.6. Caracterização química dos extratos brutos de *Hibiscus* sp.

As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Ms spcrometer model: LTQ XL Linear Ion Trap 2D, no modelo HPLC: Ultimate 3000RSLC, da Thermo Scientific. Orthogonal electrospray ion source (ESI).

A separação dos compostos foi realizada em programa de eluição em gradiente com uma taxa de fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, a 30°C , em coluna *Hypersil Gold C18* (100x2,1mm; $1,9 \mu\text{m}$) fornecida pela *Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA)*. O volume de injeção no sistema UHPLC foi de 6 microlitros e a fase móvel consistiu em ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B). O seguinte gradiente linear foi aplicado: 0-14,7 min (5-40% B), 14,7-16,6 min (40-100% B), 16,6-18,8 min (100% B) 18,8-24 min (100-5%), seguido pelo reequilíbrio da coluna

por 10 min antes da próxima corrida. A detecção *online* foi realizada no detetor de matriz de díodo, a 280 nm e foram registados espectros de UV num intervalo de 190-700 nm.

O HPLC foi acoplado a um espectrómetro de massa *LTQ XL Linear Ion Trap 2D* (*ThermoFisher SCIENTIFIC, San Jose, CA, EUA*), equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray* ortogonal operando em modo negativo. O revestimento de nitrogênio e o gás auxiliar foram 50 e 10 (unidades arbitrárias), respetivamente. A voltagem de pulverização foi de 5 kV e a temperatura capilar de 275 °C. As voltagens da lente capilar e de ajuste foram definidas para -28 V e -115 V, respetivamente. A aquisição de dados foi realizada no sistema de dados *Xcalibur®* (*ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA*).

Capítulo 3

Resultados e discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação das bactérias da mucosa de pacientes com CCR

O ADN de 15 bactérias isoladas de tecido normal (TN; 6 bactérias) e tumoral (TT; 9 bactérias) da mucosa de cólon de 5 pacientes, foi extraído e o gene 16S rARN foi amplificado e sequenciado. A identificação do filo, classe, ordem e filótipo das estirpes bacterianas estudadas, bem como a percentagem de similaridade, estão representadas na tabela 1.

A ferramenta BLAST foi utilizada para determinar que as estirpes bacterianas pertencem a 10 filótipos diferentes. As bactérias SB8 e SB14 pertencem ao mesmo filo (Firmicutes), classe (Bacilli) e ordem (Lactobacillales), sendo os filótipos atribuídos caracterizados como Gram-positivos, ao contrário das restantes bactérias que são Gram-negativas. As bactérias SB1–SB5, SB7, SB9–SB13 e SB15–SB16 pertencem todas ao mesmo filo (Proteobacteria), classe (Grammaproteobacteria) e ordem (Enterobacterales), exceto SB1, cuja ordem é Alteromonadales e SB7, cuja a ordem é Pseudomonadales.

As estirpes bacterianas SB3, SB9, SB11 e SB15 pertencem ao mesmo filótipo, com similaridades entre 93,53 - 99,30%, enquanto as estirpes SB2 e SB5 foram identificadas como *Morganella morganii*, com um nível de similaridade entre 90,69 e 97,93% e *Shigella sonnei* foi o filótipo determinado para SB13 e SB16, com uma % de similaridade entre 98,37 e 98,71%. Quanto maior a % de similaridade retribuída pelo BLAST, maior é a probabilidade da espécie bacteriana em análise corresponder ao filótipo identificado. Contudo, para valores de similaridade <97% há uma forte probabilidade de corresponder a uma nova espécie ou a outro género (Peters et al., 2016), muito embora seja necessário primeiramente amplificar e sequenciar outros genes, de modo a confirmar o resultado de identificação obtido através da sequenciação do gene 16S rRNA.

Segundo a tabela 1 é possível verificar que todas as bactérias do tipo TN pertencem à mesma classe. De acordo com a literatura regista-se que alguns dos filótipos atribuídos às estirpes bacterianas analisadas, tais como *Shewanella algae*,

Tabela 1: Identificação de bactérias associadas a amostras de mucosa intestinal afetada (TT; coloridas a bege) e não afetada pelo tumor (TN) em pacientes com CCR

Tecido	Estirpe	Filo	Classe	Ordem	Filótipo	Gram	Similaridade (%)	Notas	Referência
TN	SB1	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	<i>Shewanella algae</i>	-	98,13	Género <i>Shewanella</i> presente em tumores	(Zhang et al., 2020)
TT	SB2	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Morganella morganii</i>	-	97,93	nd	nd
TN	SB3	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Escherichia coli</i>	-	96,89	Certas estirpes estão associadas a CCR. Mais abundante no estágio II	(Iyadorai, 2020)
TN	SB4	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Escherichia fergusonii</i>	-	99,84	Género <i>Escherichia</i> associado a CCR. Produção de toxinas cancerígenas.	(Molska e Regula, 2019)
TT	SB5	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Morganella morganii</i>	-	90,69	nd	nd
TT	SB7	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	97,93	Está presente em cancro do cólon	(Koliarakis et al., 2020)
TT	SB8	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	+	99,13	Género <i>Streptococcus</i> presente no desenvolvimento de CCR. Produção de toxinas cancerígenas.	(Sheng et al., 2020; Molska e Regula, 2019)
TT	SB9	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Escherichia coli</i>	-	99,3	Certas estirpes estão associadas a CCR. Mais abundante no estágio II	(Iyadorai, 2020)
TN	SB10	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	98,02	Presentes na microbiota intestinal de pacientes com CCR	(Varas et al., 2020)
TT	SB11	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Escherichia coli</i>	-	93,53	Certas estirpes estão associadas a CCR. Mais abundante no estágio II	(Iyadorai, 2020)
TN	SB12	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Proteus mirabilis</i>	-	97,79	nd	nd
TT	SB13	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Shigella sonnei</i>	-	98,37	nd	nd
TT	SB14	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	<i>Streptococcus australis</i>	+	94,79	Género <i>Streptococcus</i> presente no desenvolvimento de CCR. Produção de toxinas cancerígenas.	(Sheng et al., 2020; Molska e Regula, 2019)
TT	SB15	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Escherichia coli</i>	-	98,79	Certas estirpes estão associadas a CCR. Mais abundante no estágio II	(Iyadorai, 2020)
TN	SB16	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Shigella sonnei</i>	-	98,71	nd	nd

E. coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* e alguns géneros como *Shewanella* e *Streptococcus* já foram identificadas na microbiota intestinal humana associada a tumores e CCR (Iyadorai et al., 2020; Koliarakis et al., 2020; Molska e Reguła, 2019; Sheng et al., 2020; Varas et al., 2020; Zhang et al., 2020). O aumento das estirpes virulentas de *P. aeruginosa* (SB7) e *E. coli* (bactérias de TT SB9, SB11 e SB15), em estágios avançados de CCR, indica o seu potencial envolvimento na progressão do cancro (Iyadorai et al., 2020; Koliarakis et al., 2020). Assim, a modulação e/ou controlo de uma microbiota que promova a patogénese de CCR e limite a resposta do organismo e regressão do tumor sujeito a terapias anti-cancerígenas será uma mais valia para o prognóstico da doença.

3.2. Análise do efeito de extratos brutos de diferentes plantas

Os extratos brutos foram preparados por imersão, em EtOH, da biomassa (folhas, caules, sementes, bolbos flores ou frutos) de vinte plantas diferentes, tendo sido obtidas concentrações *stock* finais entre 19,90 e 3929,65 mg mL⁻¹, após ressuspensão da massa de extrato em DMSO (tabela 2).

3.2.1. Testes de difusão de disco em agar

Os testes de difusão de disco em agar são normalmente usados em laboratórios clínicos para testar a suscetibilidade de bactérias a diferentes substâncias antimicrobianas. Estes testes permitem verificar o potencial dos antibióticos para inibir o crescimento de bactérias, de maneira a obter indicação quanto à estratégia terapêutica mais adequada tendo em conta a suscetibilidade bacteriana (Gefen et al., 2017). Além disso, por serem testes económicos, simples de realizar e rápidos no fornecimento de resultados, são recorrentemente aplicados para avaliar, em simultâneo, o efeito antibacteriano de várias substâncias em diferentes microrganismos (Balouiri et al., 2016).

Numa primeira abordagem aplicaram-se, assim, testes de difusão de disco em agar (figura 4) para avaliar o efeito de extratos brutos em EtOH de vinte plantas em bactérias isoladas de TN e TT.

Tabela 2: Famílias e partes das plantas a partir das quais foram preparados os extratos brutos em etanol. Suscetibilidade de bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) e tumoral (TT; $n = 9$) aos extratos de plantas analisados.

				Bactérias de mucosa intestinal de pacientes com CCR														
				TN ($n = 6$)						TT ($n = 9$)								
Família	Parte da planta	Extrato bruto #	[Extrato] (mg mL ⁻¹)	SB1	SB3	SB4	SB10	SB12	SB16	SB2	SB5	SB7	SB8	SB9	SB11	SB13	SB14	SB15
Lauraceae	caule	Ex1	461,35	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Equisetaceae	folhas e caules	Ex2	3644,70	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Monimiaceae	folhas	Ex3	427,40	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Humiriaceae	caule	Ex4	786,12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solanaceae	fruto	Ex5	3929,65	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Brassicaceae	mistura	Ex6	224,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Solanaceae	caule	Ex7	163,40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Malvaceae	flor	Ex8	305,90	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lauraceae	folhas	Ex9	316,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bignoniaceae	caule	Ex10	73,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apiaceae	folhas	Ex11	134,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Fabaceae	sementes	Ex12	159,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Chlorellaceae	biomassa total	Ex13	101,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laminariaceae	folhas	Ex14	71,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asteraceae	folhas	Ex15	493,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amaryllidaceae	bolbo	Ex16	19,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zingiberaceae	caule	Ex17	133,70	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meliaceae	caule	Ex18	160,45	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bromeliaceae	folhas	Ex19	46,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rubiaceae	folhas	Ex20	231,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		# extratos bioativos/bac		7	0	1	1	3	0	2	1	1	2	2	1	2	9	0

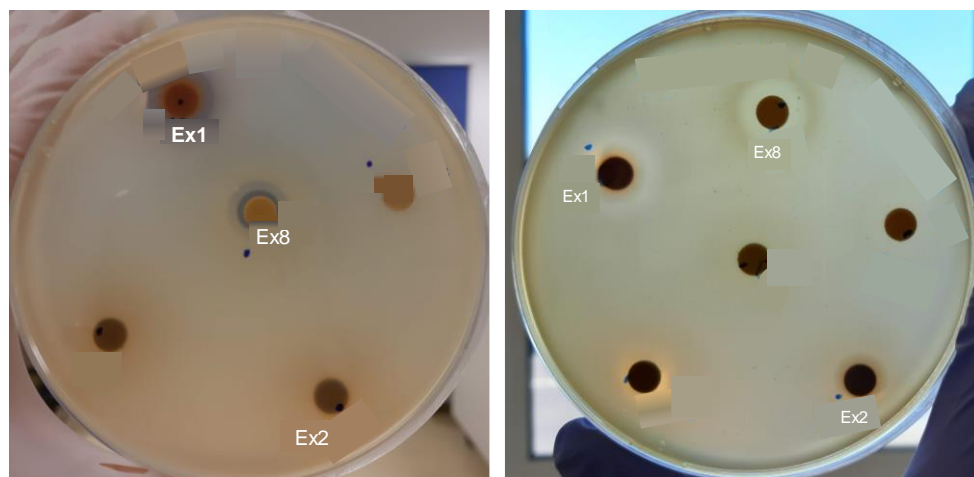


Figura 4: Placas de ensaio de difusão de disco em agar, em que é possível observar os halos de inibição obtidos para duas bactérias, contra diferentes extratos etanólicos de plantas.

Os discos impregnados com o solvente DMSO utilizado para ressuspender a massa de extrato não inibiu o crescimento das bactérias analisadas. Dos extratos brutos etanólicos de plantas testados, 8 evidenciaram um efeito bioativo particularmente relevante, contra o crescimento das bactérias isoladas da mucosa intestinal de pacientes com CCR (tabela 2). Segundo a tabela 2, os extratos Ex10, Ex13, Ex14, Ex15, Ex16, Ex19 e Ex20 foram excluídos, porque não inibiram o crescimento de nenhuma bactéria, assim como os extratos Ex9, Ex11, Ex12, Ex17 e Ex18, que apenas inibiram o crescimento de uma bactéria. Deste modo, os extratos selecionados para a análise subsequente foram o Ex1 (*Cinnamomum* sp.), Ex2 (*Equisetum* sp.), Ex3 (*Peumus* sp.), Ex4 (*Endopleura* sp.), Ex5 (*Capsicum* sp.), Ex6 (*Wasabi* sp.), Ex7 (*Withania* sp.) e Ex8 (*Hibiscus* sp.) (figura 5). Os extratos Ex4 e Ex6 que inibiram uma bactéria TN e uma bactéria TT, respetivamente, foram igualmente incluídos – o Ex4 por ser usado tanto na prevenção como no tratamento de cancro e por não ser tóxico em células humanas de adenocarcinomas colorretais (Peixoto et al., 2019); o Ex6 foi considerado devido à sua atividade antibacteriana e anticancerígena demonstrada em estudos com ratinhos, onde se verificou que o seu principal composto ativo pode prevenir a carcinogénese do cólon (Yano et al., 2019), para além de ter evidenciado atividade anti-bactéria de TT (SB14).



Figura 5: plantas com potencial antimicrobiano contra bactérias isoladas da mucosa intestinal de pacientes com CCR

Dos 8 extratos, o de *Hibiscus* sp. (Ex8) foi o que inibiu o crescimento de um maior número de bactérias, demonstrando um efeito antibacteriano mais acentuado sobre bactérias provenientes de TT (88,9%) comparativamente com as de TN (50%) (figura 6). Segue-se o extrato Ex1 (*Cinnamomum* sp.), que inibiu 33,3 e 44,4% de bactérias de TN e TT, respectivamente, e os extratos Ex2 (*Equisetum* sp.), Ex5 (*Capsicum* sp.) e Ex7 (*Withania* sp.), que apenas inibiram o crescimento de 16,7% de bactérias TN e 11,1% de bactérias TT (figura 6). Contudo, o extrato Ex3 (*Peumus* sp.) teve um efeito antibacteriano superior contra bactérias de TN (33,3%), do que contra as de TT (11,1%), e os extratos Ex4 (*Endopleura* sp.) e Ex6 (*Wasabi* sp.), apenas inibiram o crescimento bacteriano de uma bactéria de TN e uma de TT, respectivamente (figura 6).

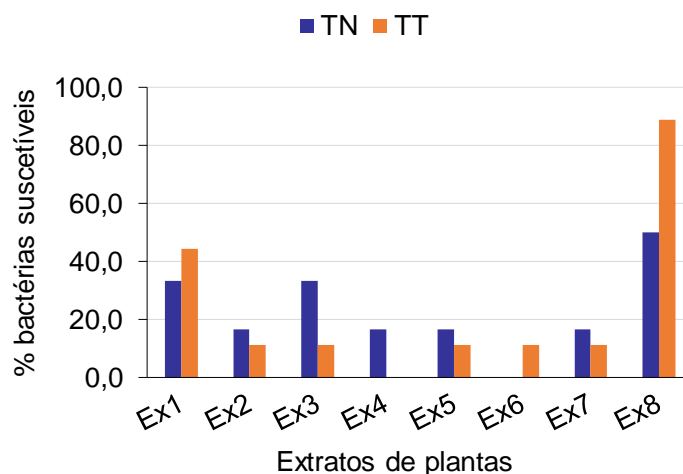


Figura 6: Resultados dos ensaios de difusão de disco para 8 extratos brutos etanólicos de plantas selecionados: porcentagem de bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) e tumoral (TT; $n = 9$) suscetíveis aos extratos de plantas em etanol (EtOH).

De um modo geral, as bactérias mais suscetíveis à bioatividade dos extratos foram *S. algae* (SB1) e *Streptococcus australis* (SB14), ambas inibidas por 8 e 9 extratos (num total de vinte plantas), respectivamente (tabelas 1 e 2). No entanto

dos 8 extratos selecionados, SB1 e SB14 foram ambas inibidas por apenas 6 extratos (figura 7A). Na figura 7B está representado o diâmetro dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos, para os 8 extratos de plantas em EtOH. A capacidade antibacteriana dos extratos contra bactérias de TN pode ser organizada na seguinte ordem decrescente Ex2> Ex1≅Ex8>Ex3>Ex4>Ex5>Ex7, mediante os halos de inibição de crescimento induzidos (figura 7B). Para bactérias de TT, a atividade antibacteriana dos extratos assume a seguinte organização decrescente Ex5>Ex6>Ex3≅Ex2>Ex8>Ex7>Ex1 (figura 7B). Assim, os extratos de *Capsicum* sp. (Ex5) e *Wasabi* sp. (Ex6) induziram os maiores halos de inibição em bactérias de TT, seguidos do Ex2, Ex3 e Ex8, os quais tem um nível de atividade semelhante (figura 7B).

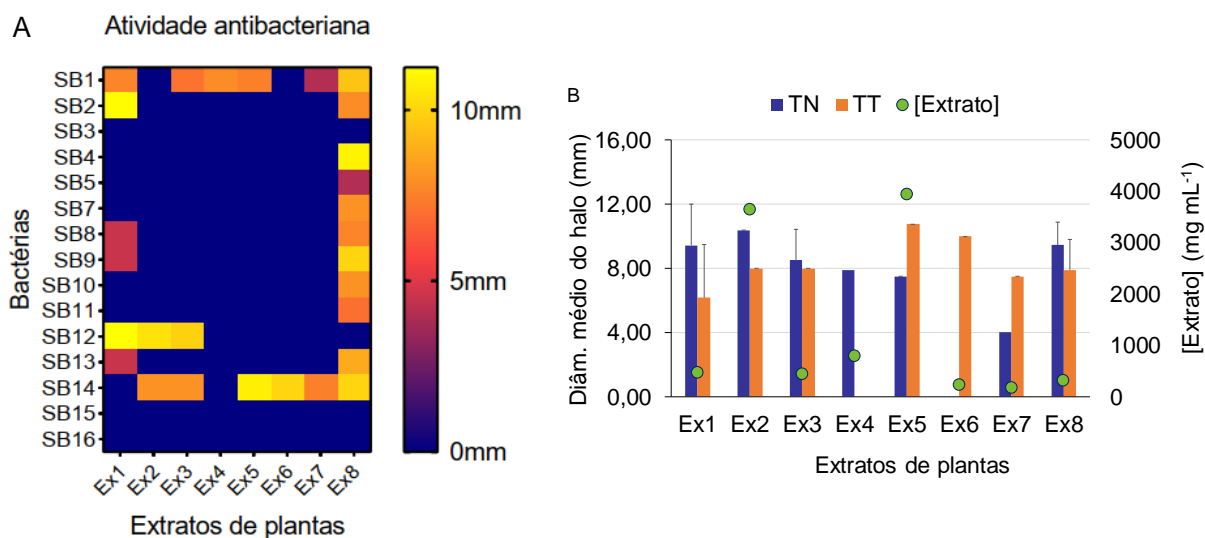


Figura 7: Atividade antibacteriana dos extratos de plantas em etanol (EtOH). **A.** Mapa de calor (*heatmap*) representando os halos de inibição bacteriana para as 15 bactérias expostas aos diferentes extratos em testes de difusão de disco. O diâmetro médio dos halos (mm) está representado por uma graduação de cores. **B.** Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) induzidos pelos diferentes extratos em bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) vs. tumoral (TT; $n = 9$), sendo também representada a concentração dos extratos das plantas em EtOH ([Extrato]; círculos verdes). As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão.

De acordo com o reportado na literatura, os extratos de plantas pertencentes a estes gêneros têm demonstrado ter atividade antibacteriana, anticancerígena, entre outras, reforçando os resultados obtidos no presente estudo.

Num estudo feito em nano partículas de *Hibiscus sabdariffa* verificou-se que o seu extrato etanólico foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* e *E. coli*, cuja média dos diâmetros dos halos foram 12,7 mm e 12 mm,

respetivamente (Maeah et al., 2020). Estes dados comprovam os resultados obtidos neste estudo, uma vez que extratos etanólicos de *Hibiscus* sp. inibiram o crescimento de bactérias TT como SB7 (*P. aeruginosa*), SB9 e SB11 (*E. coli*), e de bactérias TN pertencentes ao género *Escherichia* sp. (SB4).

Hibiscus cannabinus é uma espécie muito usada na medicina natural da Ásia e de África, onde as suas folhas têm características antioxidantes e atividade anticancerígena, devido ao excesso de fenilpropanóides. Além disso, os seus extratos de sementes contêm compostos bioativos, como compostos fenólicos, que incluem uma série de ácidos. Esta espécie possui atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas (e.g., *E. coli* e *P. aeruginosa*) e Gram-positivas (e.g. *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) (Adnan et al., 2020). Também no presente estudo foi verificada a suscetibilidade de estirpes Gram-positivas – como *Streptococcus pasteurianus* (SB8) e *S. australis* (SB14) – e Gram-negativas – como *E. coli* (SB9, SB11) e *P. aeruginosa* (SB7) ao extrato de *Hibiscus* sp. em EtOH

Em experiências com modelos de ratinhos, *Cinnamomum zeylanicum*, originária da Índia (Husain et al., 2018), demonstrou ter propriedades preventivas no combate ao cancro, pois o cinamaldeído presente na planta é um composto que previne o desenvolvimento de carcinogénese colorretal (Taha e Eldahshan, 2017; Husain et al., 2018). O óleo das folhas de *Cinnamomum glanduliferum* possui uma grande atividade antibacteriana contra *E. coli*, uma vez que apresenta halos de inibição de aproximadamente 25,3 mm e em *P. aeruginosa*, sendo os seus halos de inibição de 18,3 mm (Taha e Eldahshan, 2017). Embora no presente estudo, os halos de inibição induzidos pelo extrato *Cinnamomum* sp. (Ex1) sejam menores, também se observou que inibiu a bactéria de TT SB9 (*E. coli*), mas não inibiu a SB7 (*P. aeruginosa*).

O chá e extrato de *Equisetum arvense* tem propriedades anticancerígena, antioxidante e antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas (Pallag et al., 2018), o que é comprovado neste estudo, uma vez que *Equisetum* sp. inibiu o crescimento bacteriano de *S. australis* (SB14 de TT) (tabela 2 , figura 7A). Também na Arábia Saudita esta planta é usada para tratar a gastroenterite e doenças renais, embora os seus extratos em EtOH evidenciem também atividade

anticancerígena, devido à citotoxicidade e indução da apoptose verificada na linha celular A549 do carcinoma do pulmão (Mohammed et al., 2017).

O extrato de *Peumus boldus* demonstrou ter atividade antibacteriana contra *E. coli*, para além de evidenciar atividade anticancerígena anti-cancro da bexiga e da próstata (Ferrante et al., 2020). Também as propriedades antioxidantes de *P. boldus* atuam na prevenção do cancro e outras doenças (Teixeira et al., 2016). Contudo, neste estudo não se verificou atividade antibacteriana do extrato de *Peumus* sp. (Ex3) contra estirpes de *E. coli* isoladas das amostras de mucosa de pacientes com CCR; apenas se observou atividade contra *S. algae* (SB1) e *Proteus mirabilis* (SB12) de TN, e contra *S. australis* (SB14) de TT.

Como expectável, uma maior concentração de massa de extrato não induziu uma inibição superior no crescimento bacteriano (figura 7B), estando este efeito associado à bioatividade dos ingredientes ativos que constituem o extrato bruto. Normalmente, considera-se que um extrato apresenta toxicidade se induzir um efeito a uma concentração inferior a 1 g L^{-1} (*i.e.*, 1 mg mL^{-1}) (Miranda et al., 2015). Assim, os extratos Ex2, Ex3, Ex5, Ex7 e Ex8 são os que aparentemente têm um potencial antibacteriano mais relevante. Contudo, esta atividade nem sempre representou uma seletividade ótima, *i.e.*, capacidade para inibir apenas bactérias de TT que podem contribuir para a progressão do CCR (figura 7A-B). Ainda assim, de todos os extratos em EtOH testados, o de *Hibiscus* sp. demonstrou ser o mais promissor por inibir uma maior percentagem de diferentes estirpes bacterianas de TT, comparativamente com o perfil de resposta observado em bactérias de TN. Além disso, a sua atividade antibacteriana contra as bactérias de TN SB1, SB4 e SB10 pode não ser significativa. SB1 e SB4 foram isoladas a partir de tecidos excisados de um paciente num estado muito avançado da doença, em que houve dificuldade na amostragem de tecido não afetado pelo tumor (*i.e.*, TN). Por conseguinte, as bactérias associadas ao local do tumor (*i.e.*, TT) poderiam já ter colonizado os tecidos periféricos, de modo que SB1 e SB4 podem efetivamente estar associadas à microbiota tumoral desse paciente. A bactéria SB10 de TN, por seu lado, foi identificada como *K. pneumoniae*, que é uma bactéria vulgarmente associada a infeções em ambiente hospitalar, pelo que pode não fazer parte da microbiota original da amostra de mucosa considerada.

Com base no raciocínio exposto e na relevância dos dados reunidos, o extrato de *Hibiscus* sp. evidenciou uma atividade de largo espectro relevante (*i.e.*, atividade contra uma percentagem elevada de estirpes bacterianas de TT, induzindo halos de inibição consideráveis). Assim, esta planta foi selecionada para conduzir um estudo mais aprofundado, tendo sido para esse efeito aplicados diferentes ensaios experimentais (testes de difusão de poços em agar e teste de microdiluição em placa de 96 poços) que fornecem informação adicional e complementar quanto à sua atividade antibacteriana (Balouiri et al., 2016; Hossan et al., 2018; Magaldi et al., 2004).

3.3. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Hibiscus* sp.

De modo a avaliar o efeito do tipo de solvente na extração de compostos bioativos do material vegetal de *Hibiscus* sp. foram preparados extratos por imersão em EtOH e MeOH, tendo neste caso sido usada uma proporção de 1:12,5 de material vegetal:solvente. Após evaporação do solvente, o extrato bruto apresentou-se com uma consistência de óleo, o qual foi diretamente inoculado nos poços dos ensaios de difusão de poços em agar (*cf.* ponto 3.3.1.), ou diluído em meio de cultura, MH broth, nos ensaios de microdiluição em placa de 96 poços (*cf.* ponto 3.3.2.). Algumas bactérias foram excluídas dos ensaios subsequentes por apresentarem crescimento limitante em placa (SB3, SB4 e SB14) ou por não apresentarem suscetibilidade considerável aos extratos (SB15 e SB16).

3.3.1. Testes de difusão de poços em agar

Enquanto os testes de difusão de disco necessitam de um disco estéril impregnado com a substância ou solução em avaliação, que depois é colocado sobre placas de agar, os testes de difusão de poços em agar não necessitam desses discos, uma vez que são feitos vários buracos no agar e é nesses poços que são adicionados os extratos (Gopal et al., 2018). Assim, os testes de difusão de poços em agar são ainda mais económicos (Magaldi et al., 2004).

Ao todo foram realizados testes de difusão de poços em agar, para 10 bactérias, 3 TN (SB1, SB10, SB12) e 7 TT (SB2, SB5, SB7, SB8, SB9, SB11, SB13) (figura 8).

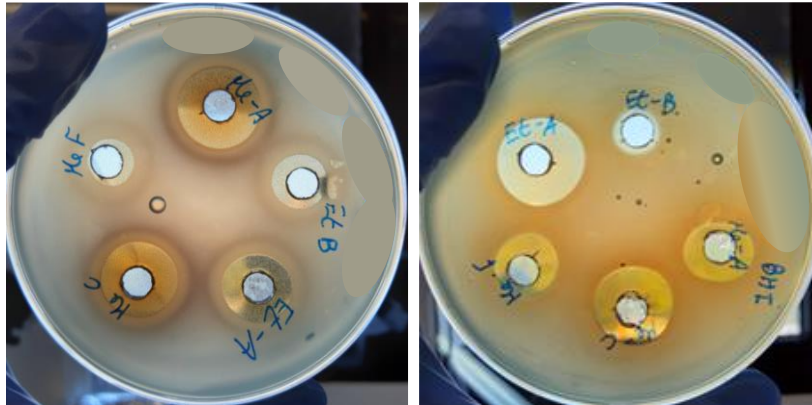


Figura 8: Placas de ensaio de difusão de poços em agar. Halos de inibição obtidos para duas bactérias contra os extratos brutos etanólico (Et) e metanólico (Me) de *Hibiscus* sp.

Na figura 9 está representada a média dos valores dos diâmetros dos halos formados, para as 10 bactérias expostas aos extratos de *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH, assim como o resumo da análise estatística pela aplicação do teste de *t*. No controlo de solvente (DMSO) não se observou a formação de halos de inibição do crescimento de qualquer uma das bactérias em estudo. Para todas as bactérias determinou-se um halo médio de inibição superior a 10 mm, para ambos os extratos em EtOH e MeOH. Porém, em bactérias de TN, a média do diâmetro dos halos foi ligeiramente superior à determinada em bactérias de TT, ainda que não significativa (figura 10).

À exceção das bactérias SB12 (TN) e SB13 (TT), o extrato em EtOH induziu halos de inibição significativamente superiores aos provocados pelo extrato em MeOH. Assim, de acordo com este ensaio, o extrato de *Hibiscus* sp. em EtOH é de um modo geral mais tóxico para as bactérias em estudo, tanto provenientes de TN como de TT (figuras 9 e 10). Estes resultados reforçam a atividade antibacteriana de *Hibiscus* sp. contra bactérias isoladas de mucosa de pacientes diagnosticados com CCR (figura 9B) e são congruentes com as observações de outros autores. Segundo Adnan et al. (2020), o extrato etanólico de *H. cannabinus* tem um forte atividade antibacteriana contra *E. coli*. Contudo, o extrato em acetato de etilo provou induzir uma atividade antibacteriana mais significativa (halos de inibição de crescimento de aproximadamente de 15,2 mm) contra *E. coli*, do que o em EtOH (Adnan et al., 2020). Os resultados obtidos na figura 9A mostram que os halos de inibição de SB9 e SB11, ambas *E. coli*, para MeOH são menores, relativamente

aos induzidos pelo extrato em EtOH. No entanto, há estudos que afirmam que extratos metanólicos de *H. sabdariffa* também inibem o crescimento de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, assim como *E. coli* (Da-Costa-Rocha et al., 2014), estando os dois últimos dentre as estirpes bacterianas (SB7, SB9, SB11) testadas no presente estudo.

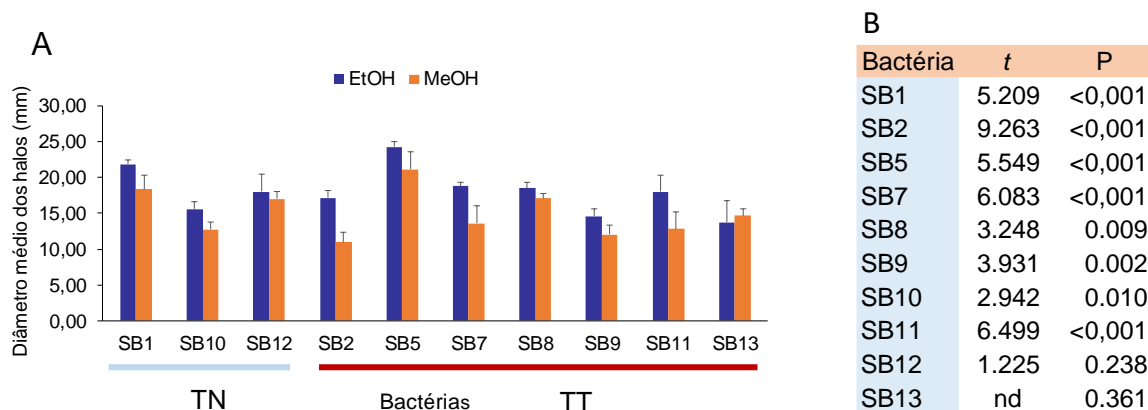


Figura 9: Atividade antibacteriana dos extratos brutos em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) de *Hibiscus* sp. contra bactérias da mucosa de pacientes com CCR, em ensaios de difusão de poços em agar. As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão; * indicam diferenças significativas entre o extrato em EtOH e MeOH, $P < 0,05$. Na tabela é apresentado o resultado do teste de *t* aplicado ao valor dos halos de inibição induzidos pelos extratos em EtOH vs. MeOH.

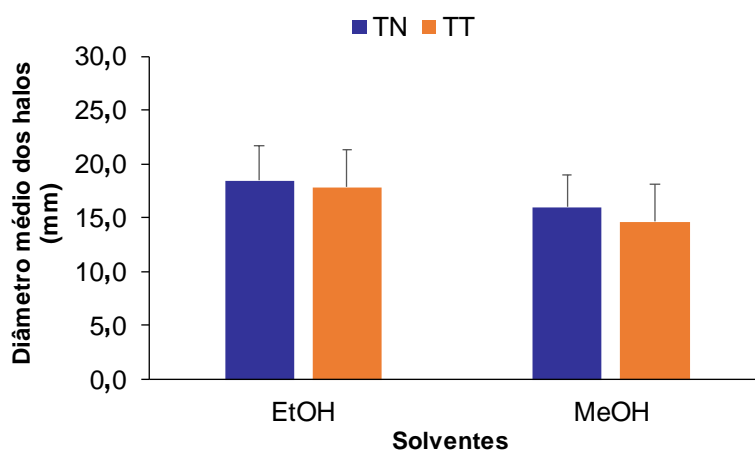


Figura 10: Atividade antibacteriana dos extratos brutos de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) contra bactérias de tecido normal (TN; $n = 6$) e tumoral (TT; $n = 9$) de pacientes com CCR, em ensaios de difusão de poços em agar. As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão.

Os ensaios de difusão de poços em agar forneceram uma resposta mais sensível das bactérias expostas aos extratos do que os ensaios de difusão de disco em agar. Este perfil sugere que os compostos nos extratos introduzidos nos poços

difundiram mais facilmente através do agar (Gopal et al. 2018), tornando-se assim mais biodisponíveis e inibindo mais acentuadamente o crescimento bacteriano. Assim, este ensaio relevou ser mais adequado para avaliar o efeito antibacteriano de extratos de *Hibiscus* sp. numa fase inicial de estudo. Contudo, ambos os tipos de ensaio permitem apenas verificar o potencial dos extratos para inibir o crescimento das bactérias, não dando indicação quanto à concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB), uma vez ser impossível saber com precisão qual a quantidade de composto(s) que difundiu(ram) no agar (Balouiri et al., 2016). Por conseguinte, e de modo a determinar a CMI e CMB, os extratos de *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH foram testados em cada uma das bactérias (testadas no ensaio de difusão de poços em agar) recorrendo a ensaios de microdiluição em placa de 96 poços.

3.3.2. Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços

Os gráficos da figura 11A-R representam as médias de fluorescência relativa obtidas para as diversas concentrações de extratos brutos de *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH, testadas contra as diferentes bactérias provenientes da mucosa intestinal de pacientes com CCR. A bactéria SB8 foi eliminada, uma vez que não cresceu o suficiente para a realização destes ensaios. A bactéria SB1 também apresentou um crescimento deficiente no ensaio, pelo que os valores de fluorescência foram muito reduzidos (figuras 11A-B), ficando a interpretação desses resultados comprometida.

De uma maneira geral, e de acordo com os resultados da ANOVA de uma via (tabela 3) registou-se uma diminuição significativa do crescimento bacteriano (*i.e.*, diminuição dos valores de fluorescência relativa) com o aumento progressivo das concentrações de extrato de *Hibiscus* sp., tanto em EtOH como em MeOH. Contudo, para as bactérias SB12 exposta ao extrato em EtOH (figura 11O), assim como para SB2 (figura 11D), SB10 (figura 11L) e SB12 (figura 11P) expostas ao extrato em MeOH, observou-se, relativamente ao controlo respetivo, uma estimulação significativa do crescimento sob concentrações inferiores e uma inibição significativa sob concentrações mais elevadas.

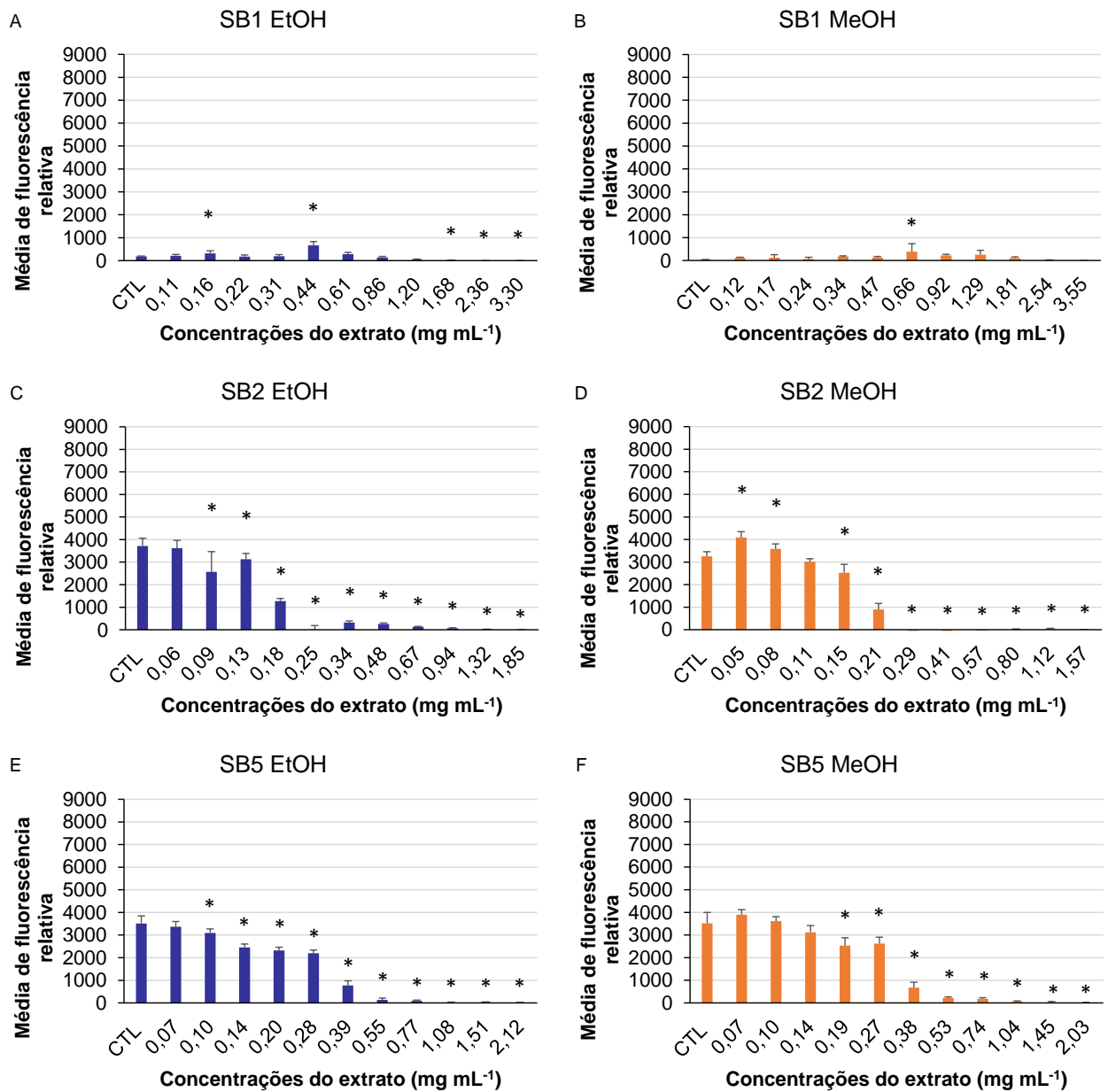


Figura 11: Variação do crescimento bacteriano sob diferentes concentrações de extrato de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH). As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão. (*) indica as concentrações que induziram um crescimento bacteriano significativamente diferente do controlo, de acordo com o teste de Dunnett ($P < 0,05$).

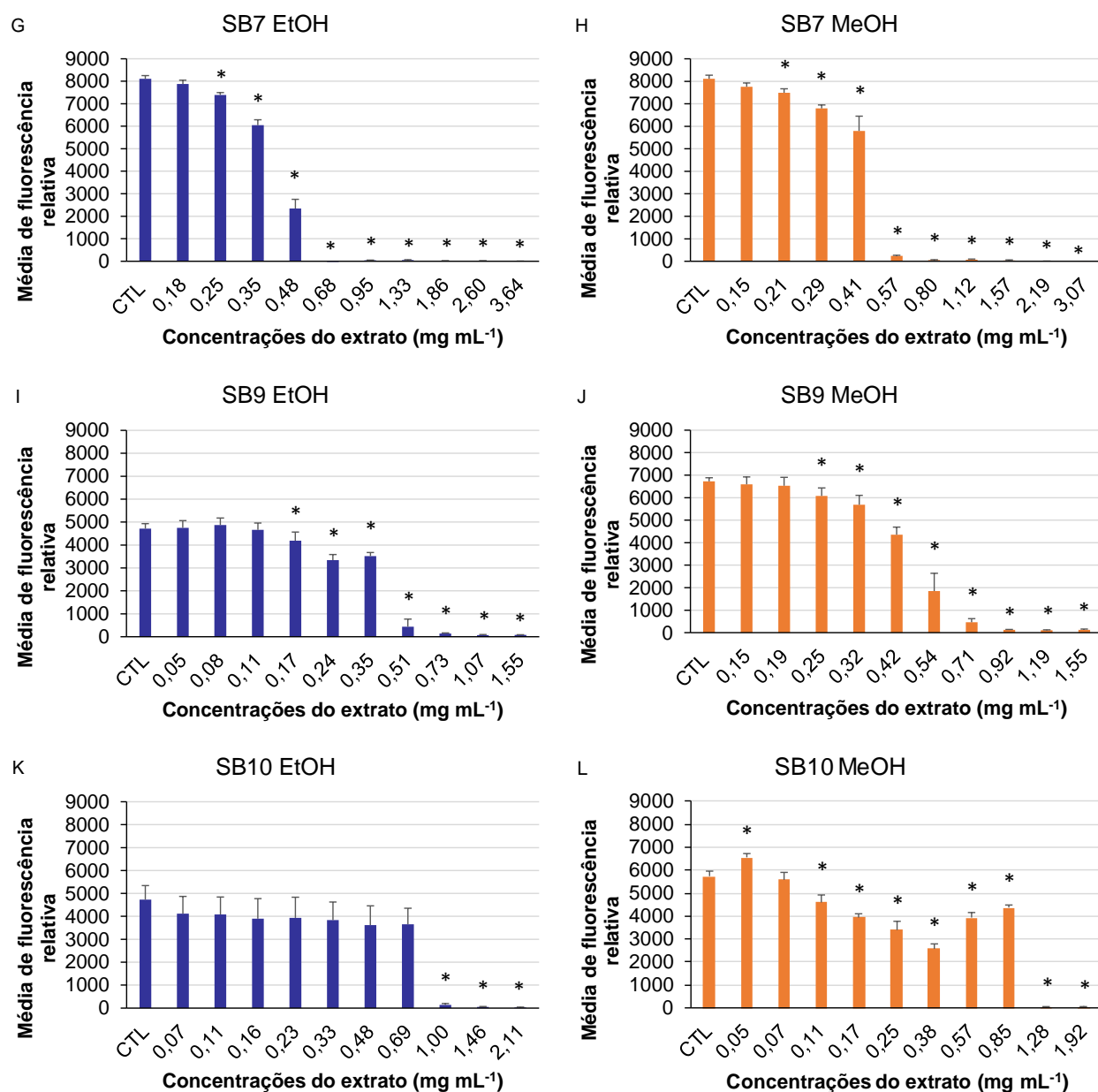


Figura 11 (Cont.): Variação do crescimento bacteriano sob diferentes concentrações de extrato de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH). As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão. (*) indica as concentrações que induziram um crescimento bacteriano significativamente diferente do controlo, de acordo com o teste de Dunnett ($P < 0,05$).

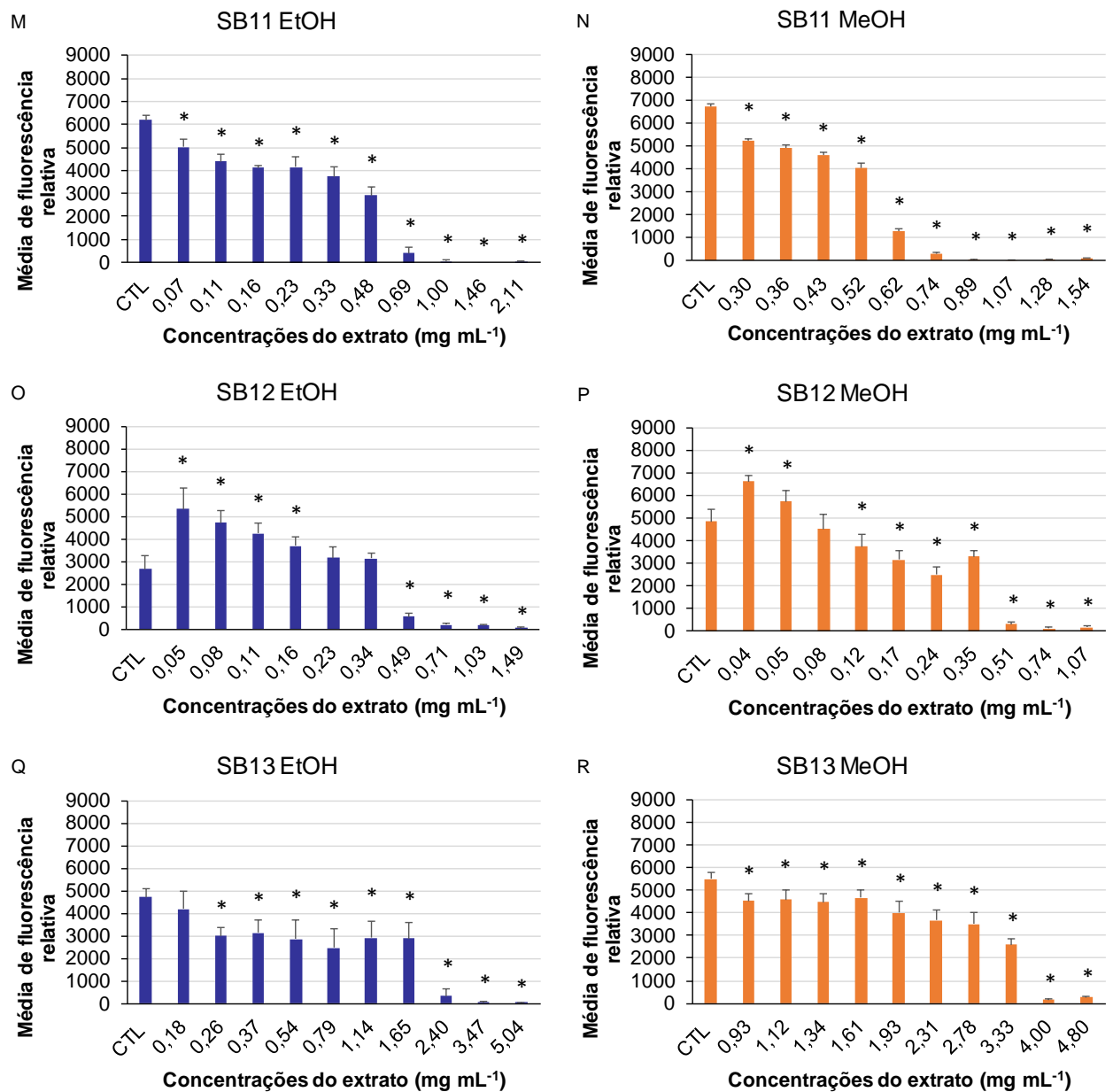


Figura 11 (Cont.): Variação do crescimento bacteriano sob diferentes concentrações de extrato de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH). As barras de erro sobre as colunas correspondem ao desvio padrão. (*) indica as concentrações que induziram um crescimento bacteriano significativamente diferente do controle, de acordo com o teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Tabela 3: sumário do resultado da ANOVA de uma via aplicada para determinar diferenças estatísticas entre as concentrações de extratos de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) contra cada bactéria, no ensaio de microdiluição em placa. *GL* – Graus de Liberdade; *SQ* – Soma dos Quadrados; *QM* – Média dos Quadrados; *P* - valor de α .

Bactéria	Solvente	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
SB1	EtOH	Between Groups	11	1890610.35	171873.67	32.715	<0,001
		Residual	48	252175.20	5253.65		
		Total	59	2142785.55	-		
	MeOH	Between Groups	11	691536.18	62866.93	4.085	<0,001
		Residual	48	738724.80	15390.10		
		Total	59	1430260.98	-		
SB2	EtOH	Between Groups	11	129870974.82	11806452.26	121.761	<0,001
		Residual	48	4654276.40	96964.09		
		Total	59	134525251.22	-		
	MeOH	Between Groups	11	165213210.87	15019382.81	468.629	<0,001
		Residual	48	1538383.20	32049.65		
		Total	59	166751594.07	-		
SB5	EtOH	Between Groups	11	115259974.56	10478179.51	401.738	<0,001
		Residual	48	1251942.40	26082.13		
		Total	59	116511916.96	-		
	MeOH	Between Groups	11	146219078.85	13292643.53	236.255	<0,001
		Residual	48	2700664.80	56263.85		
		Total	59	148919743.65	-		
SB7	EtOH	Between Groups	10	661142561.35	66114256.14	2582.963	<0,001
		Residual	44	1126236.40	25596.28		
		Total	54	662268797.75	-		
	MeOH	Between Groups	10	708300909.18	70830090.92	1436.998	<0,001
		Residual	44	2168773.60	49290.31		
		Total	54	710469682.78	-		
SB9	EtOH	Between Groups	10	227759458.82	22775945.88	377.59	<0,001
		Residual	44	2654043.60	60319.17		
		Total	54	230413502.42	-		
	MeOH	Between Groups	10	437929964.46	43792996.45	363.85	<0,001
		Residual	44	5295838.00	120359.96		
		Total	54	443225802.46	-		
SB10	EtOH	Between Groups	10	171614103.96	17161410.40	38.532	<0,001
		Residual	44	19596782.00	445381.41		
		Total	54	191210885.96	-		
	MeOH	Between Groups	10	227510357.00	22751035.70	466.915	<0,001
		Residual	44	2143955.60	48726.26		
		Total	54	229654312.60	-		
SB11	EtOH	Between Groups	10	261873908.30	26187390.83	327.374	<0,001
		Residual	44	3519658.80	79992.25		
		Total	54	265393567.10	-		
	MeOH	Between Groups	10	343182755.97	34318275.60	3498.691	<0,001
		Residual	44	431591.20	9808.89		
		Total	54	343614347.17	-		
SB12	EtOH	Between Groups	10	192909297.43	19290929.74	95.313	<0,001
		Residual	44	8905372.80	202394.84		
		Total	54	201814670.23	-		
	MeOH	Between Groups	10	253300913.51	25330091.35	165.523	<0,001
		Residual	44	6733346.80	153030.61		
		Total	54	260034260.31	-		
SB13	EtOH	Between Groups	10	111172613.74	11117261.37	33.577	<0,001
		Residual	36	11919439.88	331095.55		
		Total	46	123092053.63	-		
	MeOH	Between Groups	10	156845198.35	15684519.84	121.018	<0,001
		Residual	44	5702609.20	129604.76		
		Total	54	162547807.55	-		

Este tipo de resposta bifásica é denominado de hormesis e já tem sido descrito para outros microorganismos (e.g., fungos) expostos a extratos de plantas (Lira-de León et al., 2014) e outros compostos (Garzon e Flores, 2013).

Na tabela 4 estão representados os valores de CMI que variam entre $\leq 0,07 - 0,26 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato em EtOH para bactérias de TT (SB2, SB5, SB7, SB9, SB11, SB13) e entre $0,49 - 1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ para bactérias de TN (SB10 e SB12). Para o extrato em MeOH, os valores de CMI variam entre $0,15 - \leq 0,93 \text{ mg mL}^{-1}$ para as bactérias de TT e $0,11 - 0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ para as bactérias de TN. Assim, o extrato de *Hibiscus* sp. em EtOH tem, de um modo geral, um potencial antibacteriano superior (i.e., valores de CMI inferiores) contra as bactérias de TT, relativamente às bactérias de TN. Por outro lado, o extrato em MeOH induziu um efeito negativo nas bactérias de TN para CMI's menores, comparativamente com as determinadas para as bactérias de TT, sendo por isso mais tóxico para as primeiras.

A concentração mínima bactericida (CMB) foi obtida pela inoculação em placas de agar da suspensão nos 5 poços correspondentes às concentrações mais elevadas em que os respetivos valores médios de fluorescência relativa eram reduzidos. Este procedimento foi efetuado, uma vez que a quantidade de extrato nas concentrações mais elevadas testadas, interferiu com o corante (resazurina) adicionado a cada poço para deteção de variações de crescimento bacteriano no ensaio de microdiluição. Assim, de modo a confirmar a ação bactericida das concentrações mais elevadas dos extratos, foi inoculada uma alíquota da suspensão dos 5 poços respetivos numa placa de MH agar (figura 12), permitindo assim averiguar a viabilidade celular das bactérias expostas a essas concentrações. Após o período de incubação, a concentração mais baixa de extrato em que não se observa crescimento bacteriano é considerada a CMB (figura 12, tabela 4).

Os valores de CMB para o extrato de *Hibiscus* sp. em EtOH variaram entre $0,34 - >5,04 \text{ mg mL}^{-1}$ para as bactérias de TT e entre $0,71 - 2,11 \text{ mg mL}^{-1}$ para as bactérias de TN. No extrato em MeOH, a CMB oscilou entre $0,41 - >4,80 \text{ mg mL}^{-1}$ para as bactérias de TT e entre $0,74 - 1,92$ para as bactérias de TN. Quanto aos

Tabela 4: Estimativas de toxicidade dos extratos de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) contra bactérias isoladas a partir da mucosa intestinal de pacientes com CCR, de acordo com o ensaio de microdiluição em placa. Concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB), concentração que provoca um efeito de 50% (CE50) juntamente com o erro padrão determinado e o valor de R² do ajuste ao modelo de regressão não linear aplicado para a estimativa de CE50. *nd* - significa não determinado.

Bactéria	Solvente	CMI (mg mL ⁻¹)	CMB (mg mL ⁻¹)	CE50		
				Valor (mg mL ⁻¹)	Erro padrão	R ²
SB1	EtOH	nd	nd	nd	nd	nd
	MeOH	nd	nd	nd	nd	nd
SB2	EtOH	0,09	0,34	0,1658	0,0051	0,9317
	MeOH	0,15	0,41	0,1722	0,0044	0,9702
SB5	EtOH	0,10	1,51	0,2855	0,0136	0,9621
	MeOH	0,19	2,03	0,2906	0,0121	0,9548
SB7	EtOH	0,25	0,68	0,4174	0,0035	0,9964
	MeOH	0,21	0,57	0,4462	0,0066	0,9907
SB9	EtOH	0,17	>1,55	0,3989	0,0123	0,9536
	MeOH	0,25	>1,55	0,4622	0,0074	0,986
SB10	EtOH	1,00	>2,11	0,7987	0,0758	0,8784
	MeOH	0,11	>1,92	nd	nd	nd
SB11	EtOH	≤0,07	2,11	0,4509	0,0596	0,9289
	MeOH	≤0,30	>1,54	0,5454	0,0099	0,9681
SB12	EtOH	0,49	0,71	0,3861	0,0242	0,8386
	MeOH	0,12	0,74	0,2601	0,0532	0,8577
SB13	EtOH	0,26	>5,04	nd	nd	nd
	MeOH	≤0,93	>4,80	nd	nd	nd

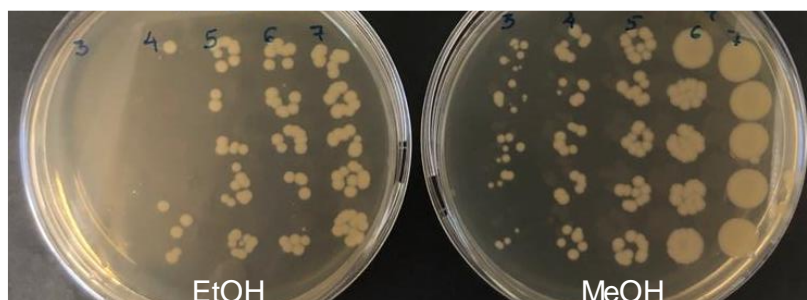


Figura 12: Inoculação em placa de agar das suspensões de 5 poços (da placa de 96 poços do ensaio de microdiluição) correspondentes às 5 réplicas das concentrações mais elevadas de extrato de *Hibiscus* sp. em etanol (EtOH) e metanol (MeOH) testadas.

valores de CMB, não é clara a existência de um perfil entre os solventes testados ou entre bactérias de TN vs. TT. Contudo, regista-se uma variação na suscetibilidade das diferentes estirpes bacterianas, sendo SB5 (*M. morgani*), SB9 e SB11 (*E. coli*) e SB13 (*S. sonnei*) de TT, assim como SB10 (*K. pneumoniae*) de

TN as estirpes menos suscetíveis aos extratos testados. Por outro lado, verificou-se que estirpes pertencentes ao mesmo filótipo, evidenciaram sensibilidades diferentes. Por exemplo, SB2 e SB5 foram ambas associadas ao filótipo *M. morganii*, porém, os valores de CMI e CMB são inferiores para SB2, revelando que é mais suscetível aos extratos de *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH do que SB5. Para esta bactéria, a % de similaridade foi, no entanto, de apenas ~91%, pelo que é possível que não sejam a mesma espécie, sendo necessário proceder à identificação com base na sequenciação de outros genes além do 16S rARN.

Os valores de CMI e CMB estão estreitamente condicionados pela gama de concentrações nominais testada. Nos primeiros ensaios de microdiluição realizados analisou-se uma gama de concentrações com um fator de diluição mais elevado (fator de 2) entre elas. Mediante os resultados obtidos, a gama de concentrações foi reajustada para cada bactéria, pelo que a análise do nível de toxicidade dos extratos com base na CMI e CMB é limitada. Por isso, estimou-se o valor de CE50, o qual resulta do ajuste dos dados experimentais (fluorescência relativa) obtidos para cada concentração de extrato em cada bactéria, a um modelo de regressão não linear (tabela 4). Este valor de toxicidade não está, assim, diretamente dependente das concentrações nominais testadas, fornecendo uma indicação mais fidedigna das concentrações dos extratos que inibem o crescimento bacteriano em 50%.

Nas bactérias SB10 exposta ao extrato em MeOH (figura 11L) e SB13 exposta a ambos os extratos (figuras 11Q e 11R), não foi possível derivar o valor de CE50 (tabela 4). Isto deve-se ao facto de haver oscilações na relação concentração-resposta que impedem uma estimativa precisa da CE50. Para o extrato em EtOH, os valores de CE50 variam entre 0,1658 - 0,4509 mg mL⁻¹ em bactérias de TT (SB2, SB5, SB7, SB9, SB11) e entre 0,3861 - 0,7987 mg mL⁻¹ em bactérias de TN (SB10 e SB12). Para o extrato em MeOH, as CE50 nas bactérias de TT (SB2, SB5, SB7, SB9, SB11) foram entre 0,1722 – 0,5454 mg mL⁻¹ e na SB12 de TN foi 0,2601 mg mL⁻¹. De um modo geral, os valores de CE50 para o extrato em EtOH são inferiores relativamente aos valores estimados para o extrato em MeOH. Esta tendência reforça o resultado dos ensaios de difusão de poços em agar (figura 7), já que o

extrato em EtOH evidenciou novamente uma atividade antibacteriana superior, particularmente contra as bactérias de TT.

Assim, o EtOH é aparentemente o solvente mais indicado para a extração de uma maior diversidade e/ou quantidade de compostos bioativos de *Hibiscus* sp. contra bactérias associadas a CCR. Com vista a confirmar esta observação, foi determinada a composição química dos extratos preparados em EtOH e MeOH.

3.4. Análise cromatográfica de extratos brutos de *Hibiscus* sp.

A composição química dos extratos de *Hibiscus* sp. foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguida de espectrometria de massa (MS), permitindo assim analisar e identificar alguns dos compostos presentes nos extratos em EtOH (figura 13, tabela 5) e MeOH (figura 14, tabela 6). No caso do extrato em EtOH foram identificados 16 compostos, enquanto que no extrato em MeOH foram identificados 9 compostos.

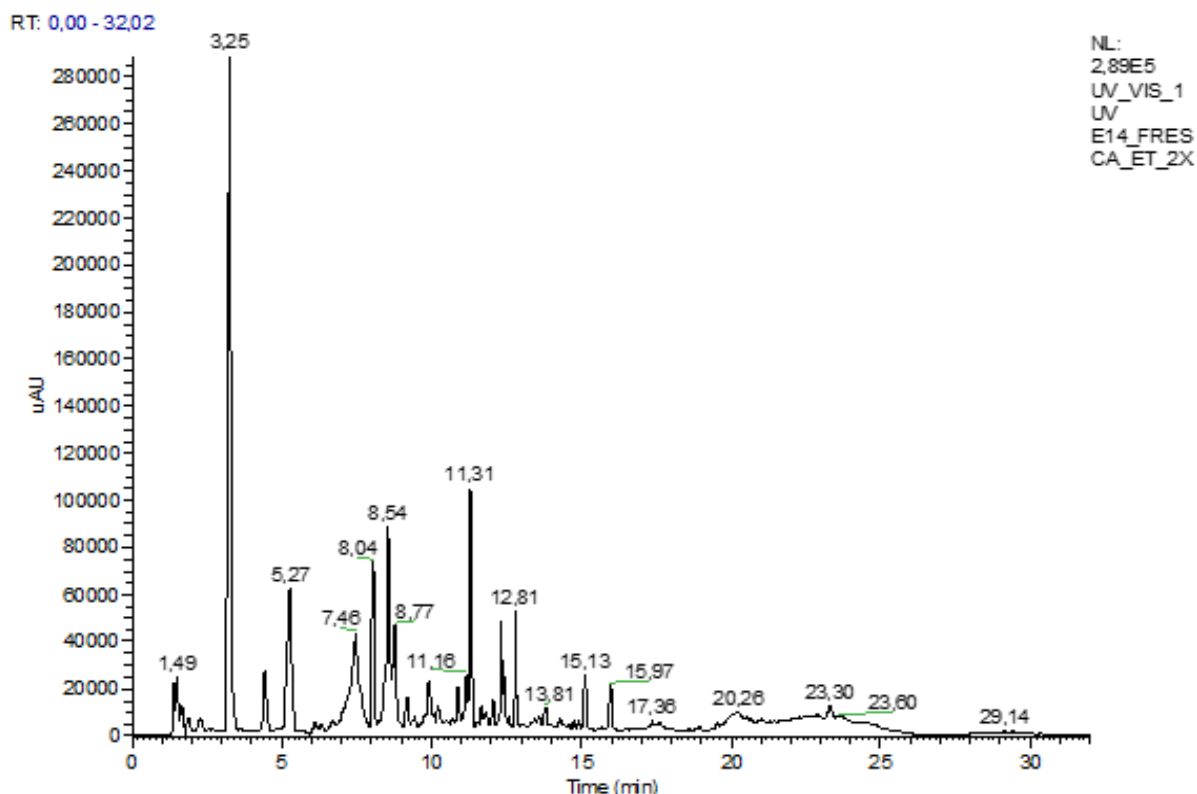


Figura 13: Cronograma do extrato de *Hibiscus* sp. em etanol, onde estão representados todos os tempos de retenção, de cada metabolito encontrado neste extrato.

Tabela 5: Tempos de retenção, fragmentos identificados por espectrometria de massa-ionização *electrospray* (ESI-MS), compostos associados e sua bioatividade de acordo com a bibliografia disponível, no extrato de *Hibiscus* sp. em etanol. *nd* - significa não determinado.

EXTRATO DE <i>Hibiscus</i> sp. em ETANOL							
RT (min)	$\lambda_{máx}$	ESI-MS (<i>m/z</i>)	ESI-MS ⁿ fragmentos	Composto	Referência	Bioatividade	Referência
3,25	284	217; 435	[217] 155 [435] 217	nd	nd	nd	nd
4,44	277	235; 249	[235] 189 [189] 127 [249] 203	Ácido hibisco (Ácido Hidroxicítrico)	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Anti-diabética	(Da-Costa-Rocha et al., 2014)
5,27	324	353; 707; 1060	[353] 191; 179 [707]	Ácido 5-O-cafeoilquínico	(Schütz et al., 2005)	Antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-histamínica	(Miyamae et al., 2011; Bajko et al., 2016)
7,46	281; 523	595; 263; 526,7	[263] 217 [526,7] 509 [595] 355; 300	Diglicosídeo de quercitina	(Schütz et al., 2005)	Antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória	(David et al., 2016)
8,04	325	353; 398,7; 707	[353] 191; 173 [398,7] 218 [707] 533	Ácido 4-O-cafeoilquínico	(Schütz et al., 2005)	Antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-histamínica	(Miyamae et al., 2011; Bajko et al., 2016)
8,54	293; 325; 517	353; 398,7; 707	nd	nd	nd	nd	nd
8,77	281; 518	335	[335]—291?	nd	nd	nd	nd
9,18	276; 523	189; 425	[425] 379 [189] 127	Ácido hibisco	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Anti-diabética	(Da-Costa-Rocha et al., 2014)
9,91	276; 528	263; 526,5	[526] 508; 354 [263] 217	nd	nd	nd	nd
10,22	317	263; 611; 353	[263] 217 [611]	Cy-3,5-O-diglucósido	nd	nd	nd
			[353] 191	Ácido Clorogénico	(Rodríguez-Medina et al., 2009; Segura-Carretero et al., 2008)	Anti-inflamatória	(Olivas-Aguirre et al., 2016)
10,89	328	335; 479	[335] 161; 135 [479] 317	Ácido 5-O-cafeoilquínico Glucósido de 3-O-petunidina	(García-Marino et al., 2010; Ramirez-Lopez et al., 2014; Rodríguez-Medina et al., 2009)	antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-histamínica	(Miyamae et al., 2011; Bajko et al., 2016)
11,16	256; 354; 524	595; 853; 257; 631	[595] 299,9 [853] [257] 167 [631]	Diglicosídeo de quercitina	(Schütz et al., 2005)	Antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória	(David et al., 2016)

Tabela 5 (Cont.): Tempos de retenção, fragmentos identificados por espectrometria de massa-ionização *electrospray* (ESI-MS), compostos associados e sua bioatividade de acordo com a bibliografia disponível, no extrato de *Hibiscus* sp. em etanol. *nd* - significa não determinado.

EXTRATO DE <i>Hibiscus</i> sp. em ETANOL							
RT (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$	ESI-MS (<i>m/z</i>)	ESI-MS ⁿ fragmentos	Composto	Referência	Bioatividade	Referência
11,30	240; 325	381; 595	[381] 161	Complexo de ácido 5-O-cafeoilquinico (CA) and ácido fórmico (FA) (335 (CA) + 46 (FA) = 381)	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	nd	nd
11,66	256; 352	609	[609] 301	Rutinosídeo de 3-O-quercitina	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, anti-alérgica, antiviral, vasoactiva	(Patel e Patel 2019)
12,06	256; 353	463; 499	[463] 301 [499]	Glucosídeo de 3-O-Quercitina	(Ramirez-Lopez et al., 2014; Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória	(David et al., 2016)
12,33	239; 326	381; 763	[763] 717? [381] 161; 135	Complexo de ácido 5-O-cafeoilquinico (CA) and ácido fórmico (FA) (335 (CA) + 46 (FA) = 381)	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	nd	nd
12,42	298	381; 363	[381] 135; 161	Complexo de ácido 5-O-cafeoilquinico (CA) and ácido fórmico (FA) (335 (CA) + 46 (FA) = 381)	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	nd	nd
12,80	242; 327	381; 763	[763]-542? [381] 179; 191; 135 nd	Complexo de ácido clorogénico (ChA) e ácido fórmico (FA) 353 (CA) + 46 (FA) = 399 399 - 18 (H ₂ O) = 381	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	nd	nd
13,81	252; 368	317	[317] 165	nd	nd	nd	nd
15,13	240; 291; 317	358; 312	[358] 312 [312] 297; 178; 135	N- Feruloiltiramida	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antioxidante	(Da-Costa-Rocha et al., 2014)
15,97	255; 368	301	[301] 179;151	Delfinidina	(Ezzat et al., 2016)	Antioxidante	(Osman et al., 2016)
17,36	287	561; 509; 597	[509] 399 [561] 363 [597] 579	nd	nd	nd	nd
23,30	270; 409	819,6	[819,6]	nd	nd	nd	nd

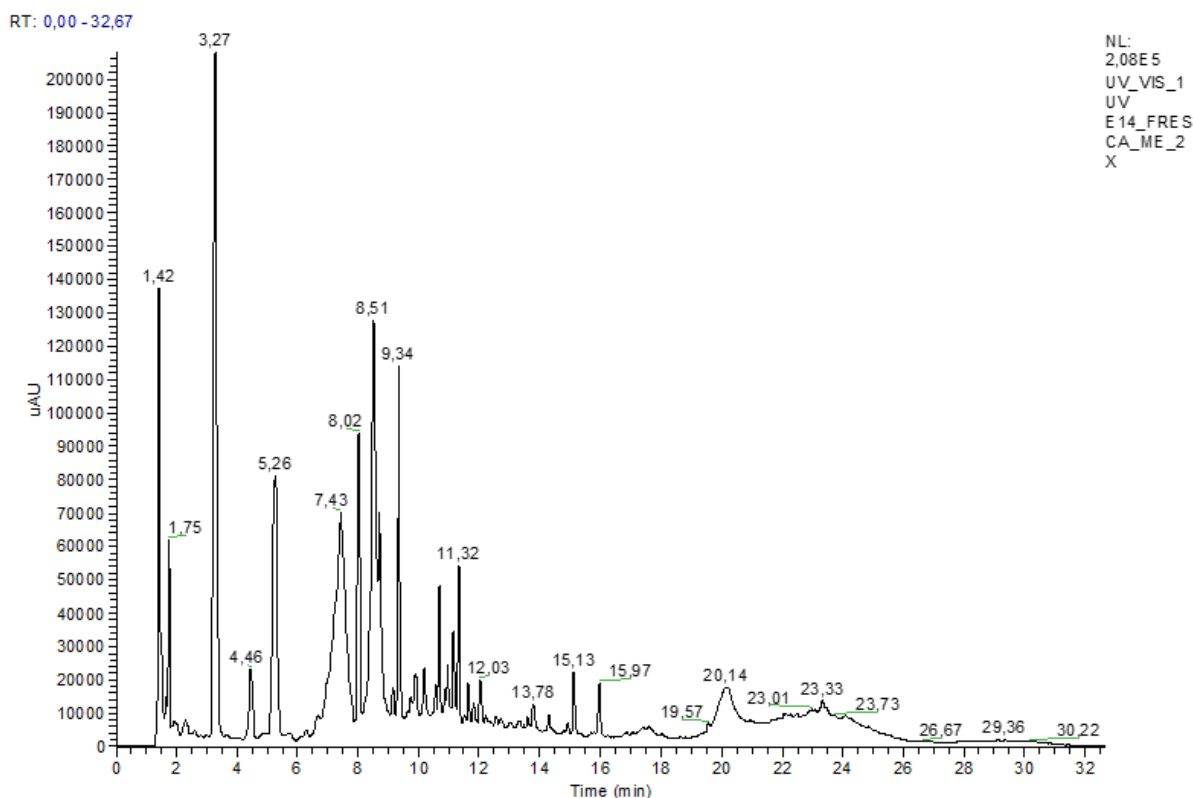


Figura 14: Cronograma do extrato de *Hibiscus* sp. em metanol, onde estão representados todos os tempos de retenção, de cada metabolito encontrado neste extrato.

De acordo com a literatura, os compostos apresentam diferentes tipos de atividade, desde anti-diabética, anti-inflamatória, anti-alérgica, anti-histamínica anticancerígena, antioxidante, antiviral a antibacteriana (tabelas 5 e 6). Dentre os compostos com atividade antibacteriana foram identificados por HPLC em ambos os extratos os seguintes: ácido de hibisco, ácido 5-O-cafeoilquínico, diglicosídeo de quercitina, ácido clorogénico, rutinosídeo de 3-O-quercitina, glucosídeo de 3-O-quercitina, delphinidina. Os compostos com atividade antimicrobiana/antibacteriana unicamente identificados no extrato de EtOH foram o ácido 4-O-cafeoilquínico e o glucósido de 3-O-petunidina; enquanto que no de MeOH foi o 3-arabinogalactosídeo de miricetina (David et al., 2016; Bajko et al., 2016; Miyamae et al., 2011; Osman et al., 2016; Patel e Patel, 2019). Assim, os compostos presentes no extrato em EtOH podem ser os responsáveis pela sua ação antibacteriana mais acentuada comparativamente com a do extrato em MeOH, ou a mistura dos compostos ativos no primeiro extrato exercem uma ação combinada sinérgica, inibindo mais eficazmente o crescimento de bactérias de TT.

Segundo Bajko et al. (2016), o ácido 5-O-cafeoilquínico inibiu o crescimento de *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* a uma CMI₈₀ de 10 mg mL⁻¹. Este resultado está de acordo com as respostas obtidas neste estudo, uma vez que *Hibiscus* sp. inibiu o crescimento de bactérias de *E. coli* como SB9 e SB11, de *P. aeruginosa* como SB7 e *K. pneumoniae* como SB10 (tabelas 1 e 2, figura 7A). Também a quercitina, presente nos compostos diglicosídeo de quercitina, rutinosídeo de 3-O-quercitina e glucosídeo de 3-O-quercitina, tem efeito antibacteriano contra quase todas as estirpes de bactérias (David et al., 2016).

Dentro dos compostos com atividade anticancerígena ou anti-tumoral destacam-se o ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido clorogénico, rutinosídeo de 3-O-quercitina, delfinidina, ácido 4-O-cafeoilquínico, glucósido de 3-O-petunidina e 3-arabinogalactosídeo de miricetina (Bajko et al., 2016; Miyamae et al., 2011; Osman et al., 2016; Patel e Patel, 2019; Semwal et al., 2016), podendo os extratos de *Hibiscus* sp. apresentar efeitos combinados com potencial adjuvante na prevenção e combate à proliferação de CCR e da microbiota pro-cancerígena associada.

Tabela 6: Tempos de retenção, fragmentos identificados por espectrometria de massa-ionização *electrospray* (ESI-MS), compostos associados e sua bioatividade de acordo com a bibliografia disponível, no extrato de *Hibiscus* sp. em metanol. *nd* - significa não determinado.

EXTRATO DE <i>Hibiscus</i> sp. em METANOL							
RT (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$	ESI-MS (<i>m/z</i>)	ESI-MS ⁿ fragmentos	Composto	Referência	Bioatividade	Referência
1,42	283	189/379	[189] 127 [379] 189	Ácido hibisco nd	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Anti-diabética	(Da-Costa-Rocha et al., 2014)
1,75	285	221/442,8	[221] 189 [442,8]	nd	nd	nd	nd
2,3	275	203; 221	[221] 189	nd	nd	nd	nd
3,27	283	235/470,5	[235] 203 470 (-)	nd	nd	nd	nd
4,46	277	287/221	[221] 189 [287] 167; 243	nd	nd	nd	nd
5,26	324	353/707/1060,5	353 (191; 179) [707] [1060]	Ácido 5-O-cafeoilquínico nd	(Schütz et al., 2005)	Antimicrobiana	(Bajko et al., 2016)
7,43	279; 523	595	355; 300	Diglicosídeo de quercitina	(Schütz et al., 2005)	Antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória	(David et al., 2016)
8,02	325	353/707/1060	353 (263;191) 707 (533?) 1060(-)	nd nd nd	nd nd nd	nd nd nd	nd nd nd
8,51	325	353/399/579/707/933	353 (191) 399(237) 579 (339;284) 707 (533)	Ácido Clorogénico nd nd	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-hitamínica	(Miyamae et al., 2011)
8,7	280; 517	335/579	335 169;183) 579 (339;284)	nd	nd	nd	nd
9,15	222; 277; 524	799	595;767	3-rutinosídeo de cianidina	(Segura-Carretero et al., 2008)	Antioxidante	(Feng et al., 2007)
9,34	324	367/735	367 (161;193) 735 (-)	nd	nd	nd	nd

Tabela 6 (Cont.): Tempos de retenção, fragmentos identificados por espectrometria de massa-ionização *electrospray* (ESI-MS), compostos associados e sua bioatividade de acordo com a bibliografia disponível, no extrato de *Hibiscus* sp. em metanol. *nd* - significa não determinado.

EXTRATO DE <i>Hibiscus</i> sp. em METANOL							
RT (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$	ESI-MS (<i>m/z</i>)	ESI-MS ⁿ fragmentos	Composto	Referência	Bioatividade	Referência
10,18	230; 267; 317	611; 647	[611] 316; 317 [647]	3-arabinogalactosídeo de miricetina	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antioxidante, anticancerígena, antidiabética and anti-inflamatória	(Semwall et al., 2016)
10,68	238; 326	367	161;135	nd	nd	nd	nd
10,96	225; 283	349	nd	nd	nd	nd	nd
11,14	256; 353; 524	595; 631; 658	[595] 300 [631] 429 [658] nd	Diglicosídeo de quercitina nd	(Schütz et al., 2005)	Antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória	(David et al., 2016)
11,32	240; 326	367; 735	367 (179; 191; 135) [609] 301	nd	nd	nd	nd
11,64	254; 352	609; 645	[645] 601	Rutinosídeo de 3-O-quercitina	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, anti-alérgica, antiviral, vasoactiva	(Patel & Patel 2019)
12,03	256; 352	463	463 (301)	Glucosídeo de 3-O-Quercitina	(Rodríguez-Medina et al., 2009)	Antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória	(David et al., 2016)
13,78	245; 368	317	[317] 179; 151	nd	nd	nd	nd
14,3	312	741	595	nd	nd	nd	nd
15,13	240; 291; 317	358; 312	[358] 312	nd	nd	nd	nd
15,97	255; 368	301	179; 151	Delfinidina	(Ezzat et al., 2016)	Antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-histamínica	(Osman et al., 2016)
20,14	239; 280	235/ 815,7	[235] 191; 203 816 (-)	nd	nd	nd	nd

Capítulo 4

Considerações finais

4. Considerações finais

A sequenciação do gene 16S rARN permitiu a identificação de 104 filótipos diferentes. As bactérias associadas a amostras de TT de pacientes com CCR são as seguintes: *M. morganii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. sonnei*, *S. australis* e *S. pasteurianus*. No entanto, as espécies *E. coli*, *S. sonnei* e *S. pasteurianus* também foram identificadas em amostras TN de pacientes com CCR. A maioria das espécies identificadas fazem parte da família Enterobacteriaceae, a qual tem sido relacionada com o aumento da probabilidade do indivíduo desenvolver cancro (Arthur et al., 2014). No caso de *E. coli*, esta bactéria é comum na microbiota intestinal e tem-lhes sido atribuído algum papel benéfico, por isso é que também foram identificadas em bactérias TN (Bonnet et al., 2014; Fong et al., 2020). Contudo, algumas das suas estirpes ou outras espécies pertencentes ao mesmo género são pró-cancerígenas, estando também associadas à carcinogénese do cancro colorretal. Apesar de *E. coli* (Gram-negativa) estar abundantemente presente na microbiota humana, alguns estudos afirmam que certos grupos filogenéticos podem ser patogénicos, conduzindo a uma situação de disbiose e acabando por provocar diferentes doenças inflamatórias como a doença de Crohn, que pode progredir para o desenvolvimento de cancro colorretal (Bonnet et al., 2014). A abundância de *E. coli* patogénica no intestino tem sido associada a um deterioramento da parede da mucosa intestinal, facilitando assim a adesão de outras bactérias aos tecidos mucosos tumorais. A colibactina é uma toxina produzida por algumas dessas estirpes, que promove a carcinogénese e desenvolvimento do cancro, para além de ser genotóxica (Cougoux et al., 2014; Eklöf et al., 2017). *Streptococcus* também está associada ao cancro colorretal (Bonnet et al., 2014). O género *Shigella* tem sido relatado, como estando fortemente relacionado com *E. coli* e a sua associação pode ter um efeito patogénico (Tang et al., 2020). O género *Streptococcus* está intrinsecamente ligado a cancro colorretal, principalmente *S. gallolyticus* que nas paredes dos tecidos tumorais do cólon está presente, em quantidades elevadas, em relação a tecidos não afetados. Esta espécie é mais frequente na primeira fase do adenoma, por

outro lado este estudo não afirma que *S. pasteurianus* está diretamente ligada ao CCR (Aymeric et al., 2017).

A resistência das bactérias aos antibióticos continua a ser um problema atual e de saúde pública, que dificulta o tratamento em algumas doenças, como o cancro colorretal e a recuperação dos indivíduos. Por este motivo, a busca por alternativas aos antibióticos tem vindo a aumentar exponencialmente, sendo as plantas com fins medicinais uma fonte de compostos bioativos com valor significativo para aplicações clínicas. Deste modo, este estudo focou-se na análise da atividade antimicrobiana de diferentes extratos brutos de plantas.

Dentre os extratos brutos etanólicos de plantas que inibiram bactérias isoladas da mucosa do cólon de pacientes diagnosticados com CCR destaca-se os de *Cinnamomum* sp., *Equisetum* sp., *Peumus* sp., *Endopleura* sp., *Capsicum* sp., *Wasabi* sp., *Withania* sp. e *Hibiscus* sp, sendo que *Wasabi* sp. apenas inibiu uma bactéria de TT. Contudo *Hibiscus* sp. foi a espécie selecionada para dar continuidade a um estudo mais aprofundado sobre a sua atividade antibacteriana, uma vez que além de inibir uma elevada percentagem de bactérias de TT, induziu os maiores halos de inibição, comparado com os restantes extratos de plantas. A atividade antibacteriana do extrato de *Hibiscus* sp. em EtOH foi congruente em ensaios de difusão de disco e de poços em agar. Nos ensaios de microdiluição foi analisada a bioatividade dos extratos brutos de *Hibiscus* sp. em EtOH versus MeOH, no sentido de verificar qual dos solventes permitia extrair uma maior quantidade e/ou diversidade de compostos ativos. O extrato em EtOH demonstrou ter atividade antibacteriana superior comparativamente com o extrato em MeOH, tendo de um modo geral induzido valores de CE50 inferiores comparativamente aos obtidos para o extrato em MeOH. Os valores de CMI e CMB, uma vez estando condicionados pela gama de concentrações testada de cada extrato, dificultam a comparação da resposta entre bactérias aos extratos, até porque existe uma variação considerável na suscetibilidade de cada bactéria analisada.

Os cromatogramas de extrato *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH mostraram a presença de alguns compostos para os quais já foram reportadas diferentes atividades, nomeadamente, antibacteriana, antitumoral e anticancerígena. Contudo é necessário perceber que composto(s) induz(em) os efeitos verificados nos

diferentes tipos de ensaio de suscetibilidade antimicrobiana aplicados. Assim é necessário a realização de testes adicionais com diferentes frações dos extratos de *Hibiscus* sp. em EtOH e MeOH, para compreender qual/ais dos compostos bioativos é que são responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano de bactérias presentes na microbiota de pacientes com CCR. Por outro lado, a avaliação da citotoxicidade dos extratos contra linhas celulares de CCR será uma mais valia em estudos futuros, no sentido de ter uma indicação quanto ao seu efeito em células humanas tumorais e potencial aplicação em estratégias terapêuticas adjuvantes.

Referências

- Adnan, M., Oh, K. K., Azad, M. O. K., Shin, M. H., Wang, M. H. e Cho, D. H. (2020). Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and seed as a potential source of the bioactive compounds: Effects of various extraction solvents on biological properties. *MDPI*, 10(223), 1–16. <https://doi.org/10.3390/life10100223>
- Armstrong, D., Dregan, A., Ashworth, M., White, P., McGee, C. e Lusignan, S. (2020). The association between colorectal cancer and prior antibiotic prescriptions: case control study. *British Journal of Cancer*, 122, 912–917. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0701-5>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. e Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66, 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>
- Arthur, J. C., Gharaibeh, R. Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J. M., McCafferty, J., Fodor, A. A. e Jobin, C. (2014). Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nature Communications*, 5(4724), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5724>
- Aymeric, L., Donnadieu, F., Mulet, C., Du Merle, L., Nigro, G., Saffarian, A., Bérard, M., Poyart, C., Robine, S., Regnault, B., Trieu-Cuot, P., Sansonetti, P. J. e Dramsi, S. (2017). Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), E283–E291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715112115>
- Bajko, E., Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejczyk, L. e Lewandowski, W. (2016). 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024>
- Balouiri, M., Sadiki, M. e Ibensouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Benarba, B. e Pandiella, A. (2018). Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107, 408–

423. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.006>
- Bhudia, J., Glynne-Jones, R., Smith, T. e Hall, M. (2020). Neoadjuvant Chemotherapy without Radiation in Colorectal Cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 33(5), 287–297. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713746>
- Blase, J. L., Campbell, P. T., Gapstur, S. M., Pawlita, M., Michel, A., Waterboer, T. e Teras, L. R. (2016). Prediagnostic *Helicobacter pylori* Antibodies and Colorectal Cancer Risk in an Elderly, Caucasian Population. *Helicobacter*, 21, 488–492. <https://doi.org/10.1111/hel.12305>
- Boleij, A., Hechenbleikner, E. M., Goodwin, A. C., Badani, R., Stein, E. M., Lazarev, M. G., Ellis, B., Carroll, K. C., Albesiano, E., Wick, E. C., Platz, E. A., Pardoll, D. M. e Sears, C. L. (2015). The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2), 208–215. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu787>
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Dechelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D. e Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 859–867. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1343>
- Boursi, B., Haynes, K., Mamtani, R. e Yang, Y.-X. (2015). Impact of antibiotic exposure on the risk of colorectal cancer. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 24, 534–542. <https://doi.org/10.1002/pds.3765>
- Bullman, S., Peadarallu, C. S., Sicinska, E., Clancy, T. E., Zhang, X., Cai, D., Neuberg, D., Huang, K., Guevara, F., Nelson, T., Chipashvili, O., Hagan, T., Walker, M., Ramachandran, A., Diosdado, B., Serna, G., Mulet, N., Landolfi, S., Cajal, S. R., Fasani, R., Aguirre, A. J., Ng, K., Élez, E., Ogino, S., Tabernero, J., Fuchs, C. S., Hahn, W. C., Nuciforo, P. e Meyerson, M. (2018). Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science*, 358(6369), 1443–1448. <https://doi.org/10.1126/science.aal5240>
- Butt, J., Varga, M. G., Blot, W. J., Teras, L., Visvanathan, K., Le Marchand, L., Haiman, C., Chen, Y., Bao, Y., Sesso, H. D. Wassertheil-Smoller, S., Ho, G.Y.F., Tinker, L. E., Peek, R. M., Potter, J. D., Cover, T. L., Hendrix, L. H., Huang, L. C., Hyslop, T., Um, C., Grodstein, F., Song, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Berndt, S., Hildesheim, A., Waterboer, T., Pawlita, M. e Epplein, M. (2019).

- Serologic Response to *Helicobacter pylori* Proteins Associated With Risk of Colorectal Cancer Among Diverse Populations in the United States. *Gastroenterology*, 156(1), 175–186. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.09.054>
- Cáceres, B., Ramirez, A., Carrillo, E., Jimenez, G., Griñán-Lisón, C., López-Ruiz, E., Jiménez-Martínez, Y., Marchal, J. A. e Boulaiz, H. (2019). Deciphering the mechanism of action involved in enhanced suicide gene colon cancer cell killer effect mediated by gef and apoptin. *MDPI*, 11(264), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers11020264>
- Choi, D. S., Seo, S. I., Shin, W. G. e Park, C. H. (2020). Risk for Colorectal Neoplasia in Patients With *Helicobacter pylori* Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000127>
- Corredoira, J., García-País, M. J., Coira, A., Rabuñal, R., García-Garrote, F., Pita, J., Rodríguez-Macías, A., Blanco, M., Lopez-Roses, L., López-Álvarez, M. J. e Alonso-García, M. P. (2015). Differences between endocarditis caused by *Streptococcus bovis* and *Enterococcus* spp. and their association with colorectal cancer. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34, 1657–1665. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2402-1>
- Cougoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., Pezet, D., Wodrich, H., Darfeuille-Michaud, A. e Bonnet, R. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *BMJ - Gut*, 63(12), 1–14. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305257>
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. e Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>
- Dafale, N. A., Semwal, U. P., Rajput, R. K. e Singh, G. N. (2016). Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotic resistance. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.05.006>

- Dahmus, J. D., Kotler, D. L., Kastenber, D. M. e Kistler, C. A. (2018). The gut microbiome and colorectal cancer: A review of bacterial pathogenesis. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(4), 769–777. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.04.07>
- David, A. V. A., Arulmoli, R. e Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- Dejea, C. M., Wick, E. C., Hechenbleikner, E. M., White, J. R., Mark Welch, J. L., Rossettid, B. J., Peterson, S. N., Snesrud, E. C., Borisy, G. G., Lazarev, M., Stein, E., Vadivelu, J., Roslani, A. C., Malik, A. A., Wanyiri, J. W., Goh, K. L., Thevambiga, I., Fu, K., Wan, F., Llosa, N., Housseau, F., Romans, K., Wu, X., McAllister, F. M., Wu, S., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Pardoll, D. M. e Sears, C. L. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), 18321–18326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406199111>
- Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P., Alexeyev, O., Rutegård, J., Wikberg, M. L. e Palmqvist, R. (2017). Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer*, 141, 2528–2536. <https://doi.org/10.1002/ijc.31011>
- Ezzat, S. M., Salama, M. M., Seif el-Din, S. H., Saleh, S., El-Lakkany, N. M., Hammam, O. A., Salem, Maha B. e Botros, S. S. (2016). Metabolic profile and hepatoprotective activity of the anthocyanin-rich extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 3172–3181. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1214739>
- Fei, Z., Lijuan, Y., Xi, Y., Wei, W., Jing, Z., Miao, D. e Shuwen, H. (2019). Gut microbiome associated with chemotherapy-induced diarrhea from the CapeOX regimen as adjuvant chemotherapy in resected stage III colorectal cancer. *Gut Pathogens*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0299-4>
- Feng, R., Ni, H. M., Wang, S. Y., Tourkova, I. L., Shurin, M. R., Harada, H. e Yin, X. M. (2007). Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13468–13476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610616200>

- Ferrante, C., Chiavaroli, A., Angelini, P., Venanzoni, R., Flores, G. A., Brunetti, L., Petrucci, M., Politi, M., Menghini, L., Leone, S., Recinella, L., Zengin, G., Ak, G., Di Mascio, M., Bacchin, F. e Orlando, G. (2020). Phenolic Content and Antimicrobial and Anti-Inflammatory Effects of *Solidago virga-aurea*, *Phyllanthus niruri*, *Epilobium angustifolium*, *Peumus boldus*, and *Ononis spinosa* Extracts. *MDPI*, 9(783), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110783>
- Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M., Soucek, P., Kunicka, T., Liska, V., Bruha, J., Neary, P., Dezeeuw, N., Tommasino, M., Jenab, M., Prehn, J. H.M. e Hughes, D. J. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(8), 1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2081-3>
- Fong, W., Li, Q. e Yu, J. (2020). Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*, 39, 4925–4943. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1341-1>
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C. e Escribano-Bailón, M. T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.055>
- Garzon, C. D. e Flores, F. J. (2013). Hormesis: Biphasic Dose-Responses to Fungicides in Plant Pathogens and Their Potential Threat to Agriculture. In *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World* (pp. 311–328). <https://doi.org/10.5772/55359>
- Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J. e Balaban, N. Q. (2017). TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. *Scientific Reports*, 7(41284), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep41284>
- Geller, L. T., Barzily-rokni, M., Danino, T., Jonas, O. H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z. A., Shee, K., Thaiss, C. A., Reuben, A., Livny, J., Avraham, R., Frederick, D. T., Ligorio, M., Chatman, K., Johnston, S. E., Mosher, C. M., Brandis, A., Fuks, G., Gurbatri, C., Gopalakrishnan, V., Kim, M.,

- Hurd, M. W., Katz, M., Fleming, J., Maitra, A., Smith, D. A., Skalak, M., Bu, J., Michaud, M., Trauger, S. A., Barshack, I., Golan, T., Sandbank, J., Flaherty, K. T., Mandinova, A., Garrett, W. S., Thayer, S. P., Ferrone, C. R., Huttenhower, C., Bhatia, S. N., Gevers, D., Wargo, J. A., Golub, T. R. e Straussman, R. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science - AAAS*, 357(6356), 1156–1160. <https://doi.org/10.1126 / science.aah5043>
- Gerstein, A. C., Rosenberg, A., Hecht, I. e Berman, J. (2016). *diskImageR*: quantification of resistance and tolerance to antimicrobial drugs using disk diffusion assays. *Microbiology*, 162, 1059–1068. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000295>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K. e Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Globocan (Global Cancer Observatory). (2020). Online retrieved January 8th, 2021, from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Gopal, J., Chun, S., Anthonydhasan, V., Jung, S., Mwang'ombe, B. N., Muthu, M. e Sivanesan, I. (2018). Assays Evaluating Antimicrobial Activity of Nanoparticles: A Myth Buster. *Journal of Cluster Science*, 29, 207–213. <https://doi.org/10.1007/s10876-018-1334-1>
- Haghi, F., Goli, E., Mirzaei, B. e Zeighami, H. (2019). The association between fecal enterotoxigenic *B. fragilis* with colorectal cancer. *BMC Cancer*, 19, 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6115-1>
- Haruki, K., Kosumi, K., Hamada, T., Twombly, T. S., Väyrynen, J. P., Kim, S. A., Masugi, Y., Qian, Z. R., Mima, K., Baba, Y., Silva, A., Borowsky, J., Arima, K., Fujiyoshi, K., Lau, M. C., Li, P., Guo, C., Chen, Y., Song, M., Nowak, J. A., Nishihara, R., Yanaga, K., Zhang, X., Wu, K., Bullman, S., Garrett, W. S., Huttenhower, C., Meyerhardt, J. A., Giannakis, M., Chan, A. T., Fuchs, C. S. e Ogino, S. (2020). Association of autophagy status with amount of

- Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer. *Journal of Pathology*, 250, 397–408. <https://doi.org/10.1002/path.5381>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. e Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hossan, M. S., Jindal, H., Maisha, S., Raju, C. S., Sekaran, S. D., Nissapatorn, V., Kaharudin, F., Yi, L. S., Khoo, T. J., Rahmatullah, M. e Wiart, C. (2018). Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 201–208. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1446030>
- Huang, X. mei, Yang, Z.-J., Xie, Q., Zhang, Z.-K., Zhang, H. e Ma, J. (2019). Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 117, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109142>
- Husain, I., Ahmad, R., Chandra, A., Raza, S. T., Shukla, Y. e Mahdi, F. (2018). Phytochemical characterization and biological activity evaluation of ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.001>
- Imai, H., Saijo, K., Komine, K., Yoshida, Y., Sasaki, K., Suzuki, A., Ouchi, K., Takahashi, M., Takahashi, S., Shirota, H., Takahashi, M. e Ishioka, C. (2020). Antibiotics Improve the Treatment Efficacy of Oxaliplatin-Based but Not Irinotecan-Based Therapy in Advanced Colorectal Cancer Patients. *Journal of Oncology*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/1701326>
- Iyadorai, T., Mariappan, V., Vellasamy, K. M., Wanyiri, J. W., Roslani, A. C., Lee, G. K., Sears, C. e Vadivelu, J. (2020). Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *PLoS ONE*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228217>
- Jinu, U., Gomathi, M., Saiqa, I., Geetha, N., Benelli, G. e Venkatachalam, P. (2017). Green engineered biomolecule-capped silver and copper nanohybrids using

- Prosopis cineraria leaf extract: Enhanced antibacterial activity against microbial pathogens of public health relevance and cytotoxicity on human breast cancer cells (MCF-7). *Microbial Pathogenesis*, 105, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.019>
- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F. e Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Gastroenterol Hepatol*, 17(2), 111–130. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0230-y>
- Kim, M., Morrison, M. e Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.020>
- Koliarakis, I., Athanasakis, E., Sgantzios, M., Mariolis-Sapsakos, T., Xynos, E., Chrysos, E., Souglakos, J. e Tsiaoussis, J. (2020). Intestinal microbiota in colorectal cancer surgery. *MDPI*, 12(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers12103011>
- Kyro, C., Frederiksen, K., Holm, M., Norskov, N. P., Knudsen, K. E. B., Overvad, K., Tjønneland, A. e Olsen, A. (2019). Prediagnosis plasma concentrations of enterolactone and survival after colorectal cancer: The Danish Diet, Cancer and Health cohort. *British Journal of Nutrition*, 122(5), 552–563. <https://doi.org/10.1017/S0007114518002143>
- Lee, Y. K., Mehrabian, P., Boyajian, S., Wu, W.-L., Selicha, J., Vonderfecht, S. e Mazmanian, S. K. (2018). The Protective Role of *Bacteroides fragilis* in a Murine Model of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *MSphere*, 3(6), 1–11. <https://doi.org/10.1128/msphere.00587-18>
- Lin, T., Liang, C., Peng, W., Qiu, Y. e Peng, L. (2020). Mechanisms of core Chinese herbs against colorectal cancer: A study based on data mining and network pharmacology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/8325076>
- Lira-de León, K. I., Ramírez-Mares, M. V., Sánchez-López, V., Ramírez-Lepe, M., Salas-Coronado, R., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R. e Hernández-Carlos, B. (2014). Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on

- two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. *Frontiers in Microbiology*, 5(383), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00383>
- Liu, W., Zhang, R., Shu, R., Yu, J., Li, H., Long, H., Jin, S., Li, S., Hu, Q., Yao, F., Zhou, C., Huang, Q., Hu, X., Chen, M., Hu, W., Wang, Q., Fang, S. e Wu, Q. (2020). Study of the Relationship between Microbiome and Colorectal Cancer Susceptibility Using 16SrRNA Sequencing. *BioMed Research International*, 2020, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2020/7828392>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 65, 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Maeah, R. K., Hasoon, B. A. A.-H., Abd-Alwahab, A. I., AL-azawi, K. F. F. e Hameedi, W. B. A. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Hibiscus sabdariffa* and their biological application. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4(2), 3377–3383. Retrieved from <http://www.ejobios.org/download/biosynthesis-of-silver-nanoparticles-using-hibiscus-sabdariffa-and-their-biological-application-7943.pdf>
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung De Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. e Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>
- Manganyi, M. C. e Ateba, C. N. (2020). Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications. *MDPI*, 8(1934), 1–25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121934>
- Martínez-Aledo, N., Navas-Carrillo, D. e Orenes-Piñero, E. (2020). Medicinal plants: active compounds, properties and antiproliferative effects in colorectal cancer. *Phytochemistry Reviews*, 19(1), 123–137. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09660-1>
- McFarlane, M., Millard, A., Hall, H., Savage, R., Constantinidou, C., Arasaradnam, R. e Nwokolo, C. (2019). Urinary volatile organic compounds and faecal microbiome profiles in colorectal cancer. *Colorectal Disease*, 21, 1259–1269. <https://doi.org/10.1111/codi.14739>

- Mileo, A. M., Nisticò, P. e Miccadei, S. (2019). Polyphenols: Immunomodulatory and therapeutic implication in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, 10(729), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00729>
- Mima, K., Nishihara, R., Qian, Z. R., Cao, Y., Sukawa, Y., Nowak, J. A., Yang, J., Dou, R., Masugi, Y., Song, M., Kostic, A. D., Giannakis, M., Bullman, S., Milner, D. A., Baba, H., Giovannucci, E. L., Garraway, L. A., Freeman, G. J., Dranoff, G., Garrett, W. S., Huttenhower, C., Meyerson, M., Meyerhardt, J.A., Chan, A. T., Fuchs, C. S. e Ogino, S. (2017). *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*, 65(12), 1973–1980. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310101>
- Miranda, J. A. L., Rocha, J. A. ., Araújo, K. M. ., Quelemes, P. V., Mayo, S. J. e Andrade, I. M. (2015). Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) MIRANDA,. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 1142–1149. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_169
- Miyamae, Y., Kurisu, M., Han, J., Isoda, H. e Shigemori, H. (2011). Structure-activity relationship of caffeoylquinic acids on the accelerating activity on ATP production. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(4), 502–507. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.502>
- Mohammed, H. I. Al, Paray, B. A. e Rather, I. A. (2017). Anticancer activity of EA1 extracted from *Equisetum arvense*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(5), 1947–1950. PMID: 29105626.
- Molska, M. e Reguła, J. (2019). Potential mechanisms of probiotics action in the prevention and treatment of colorectal cancer. *MDPI*, 11(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu11102453>
- Nweze, J. A., Mbaaji, F. N., Huang, G., Li, Y., Yang, L., Zhang, Y., Huang, S., Pan, L. e Yang, D. (2020). Antibiotics development and the potentials of marine-derived compounds to stem the tide of multidrug-resistant pathogenic bacteria, fungi, and protozoa. *MDPI*, 18(3), 1–26. <https://doi.org/10.3390/md18030145>
- Olivas-Aguirre, F. J., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N. D. R., Cárdenas-Robles, A. I., Mendoza-Díaz, S. O., Álvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., De La Rosa, L. A., Ramos-Jiménez, A. E Wall-Medrano, A. (2016). Cyanidin-3-O-

- glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. *MDPI*, 21(9), 1–30. <https://doi.org/10.3390/molecules21091264>
- Osman, A. G., Chittiboyina, A. G. e Khan, I. A. (2016). Cytoprotective Role of Dietary Phytochemicals Against Cancer Development via Induction of Phase II and Antioxidant Enzymes. *Advances in Molecular Toxicology* (1st ed., Vol. 10, pp. 99-137). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804700-2.00003-9>
- Pallag, A., Filip, G. A., Olteanu, D., Clichici, S., Baldea, I., Jurca, T., Micle, O., Vicas, L., Marian, E., Sorițău, O., Cenariu, M. e Mureșan, M. (2018). *Equisetum arvense* L. extract induces antibacterial activity and modulates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in endothelial vascular cells exposed to hyperosmotic stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/3060525>
- Patel, K. e Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (2nd ed.). Elsevier Inc. (pp. 457-479). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813820-5.00026-x>
- Peixoto, H., Roxo, M., Silva, E., Valente, K., Braun, M., Wang, X. e Wink, M. (2019). Bark extract of the amazonian tree *Endopleura uchi* (humiriaceae) extends lifespan and enhances stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *MDPI*, 24(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24050915>
- Peters, B. A., Dominianni, C., Shapiro, J. A., Church, T. R., Wu, J., Miller, G., Yuen, E., Freiman, H., Lustbader, I., Salik, J., Friedlander, C., Hayes, R. B. e Ahn, J. (2016). The gut microbiota in conventional and serrated precursors of colorectal cancer. *Microbiome*, 4(69), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0218-6>
- Purcell, R. V., Pearson, J., Aitchison, A., Dixon, L., Frizelle, F. A. e Keenan, J. I. (2017). Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLOS ONE*, 12(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171602>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan,

- M., Batto, J-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D. e Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Ramirez-Lopez, L. M., McGlynn, W., Goad, C. L. e Mireles DeWitt, C. A. (2014). Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 149, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.078>
- Reider, S. J., Moosmang, S., Tragust, J., Trgovec-Greif, L., Tragust, S., Perschy, L., Przysiecki, N., Sturm, S., Tilg, H., Stuppner, H., Rattei, T. e Moschen, A., R (2020). Prebiotic Effects of Partially Hydrolyzed Guar Gum on the Composition and Function of the Human Microbiota — Results from the PAGODA Trial. *MDPI*, 12(1257), 1–15.
- Requena, T. e Velasco, M. (2020). The human microbiome in sickness and in health. *Revista Clínica Española*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2019.07.004>
- Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Molina, V. M., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A. e Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of Separation Science*, 32(20), 3441–3448. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900298>
- Röhrl, K., Guren, M. G., Småstuen, M. C. e Rustøen, T. (2019). Symptoms during chemotherapy in colorectal cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, 27, 3007–3017. <https://doi.org/10.1007/s00520-018-4598-y>
- Saffarian, A., Mulet, C., Regnault, B., Amiot, A., Tran-Van-Nhieu, J., Ravel, J., Sobhani, I., Sansonetti, P. J. e Pédrón, T. (2019). Crypt- and mucosa-associated core microbiotas in humans and their alteration in colon cancer

- patients. *MBio*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01315-19>
- Sánchez, M. C., Ribeiro-Vidal, H., Esteban-Fernández, A., Bartolomé, B., Figuero, E., Moreno-Arribas, M. V., Sanz, M. e Herrera, D. (2019). Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(145), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2533-5>
- Schmoll, H. J., Van cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nordlinger, B., Van de Velde, C. J., Balmana, J., Regula, J., Nagtegaal, I. D., Beets-Tan, R. G., Arnold, D., Ciardiello, F., Hoff, P., Kerr, D., Köhne, C. H., Labianca, R., Price, T., Scheithauer, W., Sobrero, A., Tabernero, J., Aderka, D., Barroso, S., Bodoky, G., Douillard, J. Y., El ghazaly, H., Gallardo, J., Garin, A., Glynn-Jones, R., Jordan, K., Meshcheryakov, A., Papamichail, D., Pfeiffer, P., Souglakos, I., Turhal, S. e Cervantes, A. (2012). Esmo consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*, 23(10), 2479–2516. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds236>
- Schütz, K., Kammerer, D. R., Carle, R. e Schieber, A. (2005). Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(2), 179–186. <https://doi.org/10.1002/rcm.1767>
- Segura-Carretero, A., Puertas-Mejía, M. A., Cortacero-Ramírez, S., Beltrán, R., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Dinelli, G. e Fernández-Gutiérrez, A. (2008). Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis*, 29(13), 2852–2861. <https://doi.org/10.1002/elps.200700819>
- Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S. e Viljoen, A. (2016). Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *MPDI*, 8(90), 1–31. <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
- Sethi, V., Vitiello, G. A., Saxena, D., Miller, G. e Dudeja, V. (2019). The Role of the Microbiome in Immunologic Development and its Implication For Pancreatic

- Cancer Immunotherapy. *Gastroenterology*, 156(7), 2097–2115.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.045>
- Sheikh, A. F., Masjedi Zadeh, A. R., Saki, M., Khani, P., Hashemi, S. J., Shahin Zadeh, S., e Dastoorpoor, M. (2020). Detection of *Streptococcus gallolyticus* in colorectal cancer and inflammatory bowel disease patients compared to control group in southwest of Iran. *Molecular Biology Reports*, 47, 8361–8365.
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05807-7>
- Sheng, Q.-S., He, K.-X., Li, J.-J., Zhong, Z.-F., Wang, F.-X., Pan, L.-L. e Lin, J.-J. (2020). Comparison of gut microbiome in human colorectal cancer in paired tumor and adjacent normal tissues. *OncoTargets and Therapy*, 13, 635–646.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S218004>
- Song, M., Chan, A. T. e Sun, J. (2020). Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 158(2), 322–340.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.048>
- Subramaniam, S., Selvaduray, K. R. e Radhakrishnan, A. K. (2019). Bioactive compounds: Natural defense against cancer? *MDPI*, 9(758), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/biom9120758>
- Taddese, R., Garza, D. R., Ruitter, L. N., Jonge, M. I., Belzer, C., Aalvink, S., Nagtegaal, I. D., Dutilh, B. E. e Boleij, A. (2020). Growth rate alterations of human colorectal cancer cells by 157 gut bacteria. *Gut Microbes*, 12(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1799733>
- Taha, A. M., e Eldahshan, O. A. (2017). Chemical Characteristics, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of Egyptian *Cinnamomum glanduliferum* Bark. *Chemistry and Biodiversity*, 14, 1–9.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201600443>
- Tang, L., Zhou, Y.-J., Zhu, S., Liang, G.-D., Zhuang, H., Zhao, M.-F., Chang, X.-Y., Li, H.-N., Liu, Z., Guo, Z.-R., Liu, W.-Q., He, X., Wang, C.-X., Zhao, D.-D., Li, J.-J., Mu, X.-Q., Yao, B.-Q., Li, X., Li, Y.-G., Duo, L.-B., Wang, L., Johnston, R. N., Zhou, J., Zhao, J.-B, Liu, G.-R. e Liu, S.-L. (2020). *E. coli* diversity: Low in colorectal cancer. *BMC Medical Genomics*, 13(59), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s12920-020-0704-3>
- Teixeira, C. C. C., Cabral, T. P. D. F., Barreto De Sousa, J. P., Teixeira, S. D. P.,

- Bastos, J. K. e Pedro De Freitas, L. A. (2016). Study of quality assurance for *Peumus boldus* M products by botanic profiling, extraction optimization, HPLC quantification and antioxidant assay. *Pharmacognosy Journal*, 8(3), 264–272. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.3.16>
- Thakur, B. K., Malaisé, Y. e Martin, A. (2019). Unveiling the Mutational Mechanism of the Bacterial Genotoxin Colibactin in Colorectal Cancer. *Molecular Cell*, 74, 227–229. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.007>
- Valguarnera, E. e Wardenburg, J. B. (2020). Good Gone Bad: One Toxin Away From Disease for *Bacteroides fragilis*. *Journal of Molecular Biology*, 432, 765–785. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.003>
- Valsalam, S., Agastian, P., Esmail, G. A., Ghilan, A.-K. M., Al-Dhabi, N. A. e Arasu, M. V. (2019). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Musa acuminata* colla flower and its pharmaceutical activity against bacteria and anticancer efficacy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 201, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111670>
- Varas, M. A., Muñoz-Montecinos, C., Kallens, V., Simon, V., Allende, M. L., Marcoleta, A. E. e Lagos, R. (2020). Exploiting Zebrafish Xenografts for Testing the *in vivo* Antitumorigenic Activity of Microcin E492 Against Human Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in Microbiology*, 11(405), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00405>
- Ventzel, L., Jensen, A. B., Jensen, A. R., Jensen, T. S. e Finnerup, N. B. (2016). Chemotherapy-induced pain and neuropathy: A prospective study in patients treated with adjuvant oxaliplatin or docetaxel. *Pain*, 157(3), 560–568. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000404>
- Wieczorska, K., Stolarek, M. e Stec, R. (2020). The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer: Where Are We? Where Are We Going? *Clinical Colorectal Cancer*, 19(1), 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.07.006>
- Wong, K. E., Ngai, S. C., Chan, K. G., Lee, L. H., Goh, B. H. e Chuah, L. H. (2019). Curcumin nanoformulations for colorectal cancer: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 10(152), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00152>
- Wong, M. C. S., Huang, J., Lok, V., Wang, J., Fung, F., Ding, H. e Zheng, Z.-J. (2020). Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer

- Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 1-73.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.02.026>
- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X. e Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(22), 1–30. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Yang, J., McDowell, A., Kim, E. K., Seo, H., Lee, W. H., Moon, C. M., Kym, S. M., Lee, D. H., Park, Y. S., Jee, Y.-K. e Kim, Y.-K. (2019). Development of a colorectal cancer diagnostic model and dietary risk assessment through gut microbiome analysis. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(117), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0313-4>
- Yano, S., Wu, S., Sakao, K. e Hou, D.-X. (2019). Involvement of ERK1/2-mediated ELK1/CHOP/DR5 pathway in 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate-induced apoptosis of colorectal cancer cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 83(5), 960–969.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1574206>
- Zackular, J. P., Rogers, M. A. M., Ruffin, M. T. e Schloss, P. D. (2014). The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer. *Cancer Prevention Research*, 7(11), 1112–1121. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0129>
- Zhang, Q., Zhao, H., Wu, D., Cao, D. e Ma, W. (2020). A comprehensive analysis of the microbiota composition and gene expression in colorectal cancer. *BMC - Microbiology*, 20(308), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01938-w>
- Zhou, J., Zhao, R., Ye, T., Yang, S., Li, Y., Yang, F., Wang, G., Xie, Y. e Li, Q. (2019). Antitumor activity in colorectal cancer induced by hinokiflavone. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 34, 1571–1580.
<https://doi.org/10.1111/jgh.14581>

Antibacterial activity of plant extracts against bacteria isolated from patients with colorectal cancer

Sofia Baptista¹, Mónica Válega², Artur M. S. Silva², Amadeu M.V.M. Soares¹, Catarina R. Marques¹

¹ CESAM - Centre of Marine and Environmental Studies, Department of Biology, University of Aveiro, Santiago University Campus, 3810-193 Aveiro, Portugal

² Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) - REQUIMTE, Department of Chemistry, University of Aveiro, Santiago University Campus, 3810-193 Aveiro, Portugal

mail to: crmarques@ua.pt

Introduction

- Colorectal cancer (CRC) is the 3rd most deadly cancer in the world.
- Available therapeutic options may not effectively fight cancer progression.
- Gut microbiota have been associated with CRC (e.g., pro-carcinogenic bacteria), making them a potential target for modulating host response to treatments.
- However, the potential development of bacterial resistance to antibiotics is claiming for novel and more nature-based bioactive compounds, namely from plants.

Aim Test the antibacterial activity of ethanolic crude extracts from different plant species on bacteria isolated from tumoral (TT) and matched non-affected (NT) mucosa tissue samples resected from CRC patients undergoing clinical surgery.

Methods

A - Patients

Six CRC patients voluntarily provided mucosa samples for bacteria isolation (approved by the Ethics Committee of Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E., Aveiro, Portugal).

B - Bacterial samples

Bacteria extracted from NT and TT mucosa were cultured aerobically, isolated and stored. 16 bacteria (Fig. 1) were tested against plant extracts.



Fig. 1: Isolated bacteria.

C - Preparation of extracts

Seven plant species (roots, stems and/or leaves) (Fig. 2A) were grounded and extracted by immersion in ethanol or following Soxhlet extraction in ethanol (Fig. 2B).

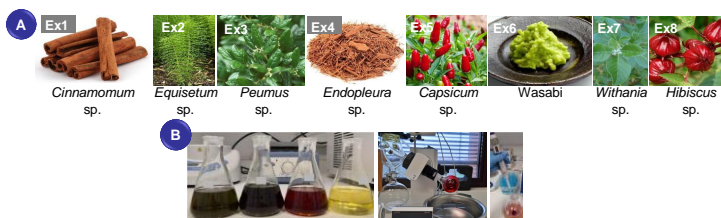


Fig. 2: A - Plants used for preparing ethanolic extracts. B - Preparation of plants extracts.

D - Disk diffusion assays

The antibacterial activity of crude extracts (dissolved in DMSO) was evaluated through disk diffusion assays (Fig. 3).

Results

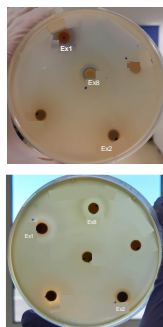


Fig. 3: Disk diffusion assay plates. Inhibition halos obtained for two bacteria against different plant extracts.

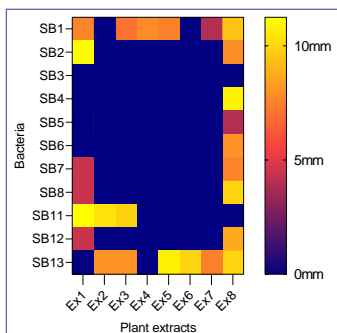


Fig. 4: Heat map representing the bioactivity of different plant extracts against aerobic bacteria isolated from mucosa tissues of CRC patients. Scale: diameter of inhibition halos.

- Plant extracts presented activity against bacteria isolated from the mucosa of 3 patients only.
- Ex1 and Ex8 extracts induced the largest halos and they inhibited the growth of a greater number of bacteria (Fig. 4).

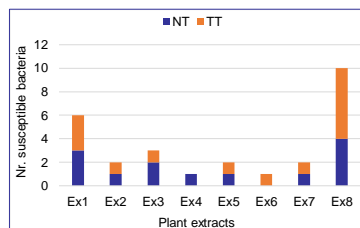


Fig. 5: Number of bacteria isolated from NT and TT mucosa of CRC patients, which growth was inhibited by the plants extracts.

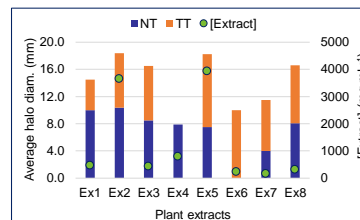


Fig. 6: Average diameter of the inhibition halos measured for bacteria isolated from NT and TT mucosa of CRC patients, when exposed to specific concentrations of the plant extracts.

- Most extracts had inhibited the growth of a similar number of bacteria, irrespectively of the tissue type from which they were sourced (Fig. 5).
- However, Ex8 affected the growth of a higher number of bacteria, followed by Ex1 (Fig. 5).
- Ex6 was the extract that had solely inhibited a bacterium from TT (Fig. 5).
- Ex5, Ex6, Ex7 and Ex8 provoked higher growth inhibition of bacteria coming from TT (Fig. 6).
- [Extracts] varied between 163 – 3930 mg mL⁻¹ (Fig. 6). Further studies are being currently performed for determining their minimum inhibitory concentrations against the bacteria from NT and TT.

Conclusions

- Most plant extracts inhibited the growth of bacteria from NT and TT, particularly *Cinnamomum* sp. and *Hibiscus* sp.
- However, *Capsicum* sp., *Wasabi*, *Withania* sp. and *Hibiscus* sp. extracts provided promising results towards the growth control of bacteria from TT, thereby highlighting their potential for future studies regarding CRC adjuvant treatments through the modulation of CRC-associated microbiota by natural products.