

# Atividade Antibacteriana de Extratos de *Chlorella sorokiniana* Obtidos por Extração com Diferentes Solventes Orgânicos

## Antibacterial Activity of *Chlorella sorokiniana* Extracts Obtained by Organic Solvents Extraction

Iasmin Teixeira Simões da Silva<sup>\*a</sup>; Caio César Richter Nogueira<sup>b</sup>; Josemeyre Bonifácio da Silva Marques<sup>c</sup>; Luiz Rodrigo Ito Morioka<sup>a</sup>; Hélio Hiroshi Suguimoto<sup>ad</sup>

<sup>a</sup>Centro Universitário Anhanguera de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Inovação em Saúde. SP, Brasil.

<sup>b</sup>Centro Universitário Anhanguera Niterói. RJ, Brasil.

<sup>c</sup>Anhanguera Unopar. PR, Brasil.

<sup>d</sup>Universidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação em Agronegócio Sustentável. MS, Brasil.

\*E-mail: [iasmin\\_simoes@yahoo.com.br](mailto:iasmin_simoes@yahoo.com.br)

### Resumo

O estudo teve como objetivo avaliar qualitativamente o efeito inibitório de extratos de *Chlorella sorokiniana* obtidos pela extração com diferentes solventes orgânicos com polaridades crescentes em bactérias patogênicas. A microalga *C. sorokiniana* cepa IPR 7104 foi liofilizada e submetida às extrações com os respectivos solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol para posterior ensaio inibitório. Para o teste de inibição, as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Serratia marcescens* foram cultivadas em meio Müeller-Hinton e a partir disso, foi preparado um inóculo bacteriano, diluído na proporção 1/100. 195 µL de inóculo bacteriano foi acondicionado em tubo de ensaio com 5 µL dos diferentes extratos de *C. sorokiniana*. O conteúdo dos tubos foi esgotado em placas e avaliado. Os resultados do ensaio antibacteriano com os extratos da microalga *C. sorokiniana* obtidos pela extração com diferentes solventes indicaram que somente o extrato hexânico na concentração de 500 µg/mL apresentou inibição para a bactéria *Serratia marcescens*. A concentração inibitória mínima do extrato hexânico de *C. sorokiniana* é de 400 µg/mL. O ensaio temporal aponta que a partir da oitava hora o extrato hexânico tem atividade de inibição. **Palavras-chave:** Inibição. Hexano. Microalgas. Bactérias Patogênicas.

### Abstract

The study aimed to qualitatively evaluate the inhibitory effect of *Chlorella sorokiniana* extracts obtained by extraction with different organic solvents of increasing polarity on pathogenic bacteria. The microalga *C. sorokiniana* strain IPR 7104 was lyophilized and subjected to extractions with the following solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol for subsequent inhibitory assay. For the inhibition test, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Serratia marcescens* were cultured in Müeller-Hinton medium, and from this, a bacterial inoculum was prepared, diluted at a 1/100 ratio. 195 µL of bacterial inoculum was placed in a test tube with 5 µL of the different *C. sorokiniana* extracts. The tube contents were plated and evaluated. The results of the antibacterial assay with *C. sorokiniana* extracts obtained by extraction with different solvents indicated that only the hexane extract at a concentration of 500 µg/mL showed inhibition for the bacterium *Serratia marcescens*. The minimum inhibitory concentration of the hexane extract of *C. sorokiniana* is 400 µg/mL. The time-course assay indicates that from the eighth hour, the hexane extract exhibits inhibitory activity.

**Keywords:** Inhibition. Hexane. Microalgae. Pathogenic Bacteria.

## 1 Introdução

As microalgas são excelentes fontes de compostos bioativos associados a presença de metabólitos primários e secundários como carboidratos, proteínas, lipídios, aminoácidos (arginina e triptofano), vitaminas (Chiaiese et al., 2018), polifenóis, ficobilinas entre outros (Balasubramaniam et al., 2021). Estes compostos bioativos apresentam excelentes ações biológicas, incluindo antioxidante, antimicrobiano, antiviral, antitumoral, antiinflamatório e efeitos antialérgicos. Por apresentarem composição nutricional valiosa e serem consideradas seguras para ingestão humana (Barkia; Saari, 2019), as espécies de microalgas *Chlorella* e *Spirulina* têm sido as mais utilizadas em diversas áreas nutraceuticas, farmacêuticas e cosméticas (Chandrasekaran et al., 2014).

As Enterobacteriaceae abrigam um grupo grande e heterogêneo de bacilos Gram-negativos que possuem como

habitat o trato intestinal de animais e seres humanos. Essa família abrange gêneros como *Serratia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, entre outros (Riedel et al., 2022). Microrganismos como *Escherichia coli* participam da microbiota normal e acidentalmente podem provocar doenças. Já as salmonelas, são frequentemente patogênicas aos seres humanos (Riedel et al., 2022), enquanto que as *Serratia* são patógenos comuns e oportunistas, colonizadoras de pacientes hospitalizados.

Para a extração de compostos bioativos é necessário promover a lise da parede celular permitindo assim, a liberação destes componentes. A extração pode ser realizada por métodos físicos, mecânicos (moagem, homogeneização, micro-ondas, campo elétrico ultrassônico e pulsado), químicos (solvente, ácido e álcalis) e biológicos (enzimas). A extração usando solventes orgânicos é uma opção simples, fácil e acessível contudo, é importante levar em consideração

a polaridade do solvente no processo de extração, visto que os solventes são capazes de recuperar aqueles compostos cuja polaridade é semelhante à sua (Balasubramanian et al., 2011).

Mashhadinejad, Zamani e Sarmad (2016) utilizaram diferentes solventes extratores para aumentar o potencial antimicrobiano da microalga *Chlorella vulgaris* contra duas bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), duas bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e uma cepa fúngica (*Candida albicans*) e concluíram que o clorofórmio usado como extrato solvente apresentou maior potencial antimicrobiano.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar qualitativamente o efeito inibitório de extratos de *Chlorella sorokiniana* obtidos a partir da extração com diferentes solventes orgânicos de polaridades crescentes nas bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, e *Serratia marcescens*.

## 2 Material e Métodos

A microalga *C. sorokiniana* cepa IPR 7104 foi obtida da coleção de microalgas do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR), Londrina, Paraná, e foi cultivada em embalagens plásticas transparentes de 5L, contendo 10% (v/v) de inóculo inicial na proporção de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, 10% (v/v) de solução de micronutrientes (17 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 18% Ca, 7% Mg, 0,1% B, 0,05% Cu, 0,3% Mn, 10% Si, 0,55% Zn) e 1g L<sup>-1</sup> de uréia e 80% (v/v) de água de torneira. As embalagens foram mantidas a 28°C com fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro no Laboratório de Cultivo de Microalgas da Universidade Anhanguera Pitágoras Unopar, Campus Piza, Londrina, Paraná. Após sete dias de cultivo, a cultura foi centrifugada (centrífuga Novatecnica, NT820) a 3.500rpm por 20min e formaram-se duas frações: o sedimento ou pellet (biomassa) e o sobrenadante. A biomassa foi, então, coletada e liofilizada (Liofilizador L101, Marca Liobras).

### 2.1 Extração da *C. sorokiniana*

A microalga *C. Sorokiniana* liofilizada foi encaminhada para o laboratório multidisciplinar do Centro Universitário Anhanguera de Niterói e pesada em balança analítica. A massa da microalga (10,9472g) foi acondicionada em erlenmeyer de 200mL, onde foram adicionados 100mL do solvente orgânico n-Hexano PA (Merck®), e o recipiente foi então vedado. Depois de 7 dias de extração sólido-líquido sem aplicação de agitação ou temperatura, o líquido da extração foi filtrado usando papel filtro qualitativo (Qualy®) com porosidade média de 14-19µm, e o solvente removido por meio de um evaporador rotativo a vácuo (Fisatom®). O extrato, livre de solvente, foi transferido para um frasco de vidro e armazenado sob refrigeração. A amostra foi novamente acondicionada no erlenmeyer com um novo volume de n-hexano. O procedimento de extração foi repetido 4 vezes e o extrato resultante foi combinado com as extrações realizadas anteriormente. Depois

da quarta extração, a massa algal, livre do solvente hexano, foi transferida para o erlenmeyer contendo 100mL do solvente orgânico diclorometano PA (Merck®). A extração com diclorometano se repetiu 4 vezes e, em seguida, substituída, em ordem crescente de polaridade, pelos solventes orgânicos Acetato de etila e Metanol PA (Merck®). Ao final, os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido e armazenados sob refrigeração (concentração de 500µg/mL).

### 2.2 Bactérias patogênicas

Para os ensaios de atividade antibacteriana, três cepas de bactérias foram utilizadas: *Serratia marcescens* (CCCD-S005), *Escherichia coli* (CCCD-E003), e *Salmonella enterica* (CCCD-S001). As cepas foram adquiridas comercialmente como culturas liofilizadas e cultivadas em meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI) em uma estufa microbiológica (Nova Instruments®) à temperatura de 36 °C ± 1 °C por 12h. Depois do período de incubação, 10µL da solução bacteriana foi semeado em placas de Petri contendo meio ágar Müeller-Hinton, com o auxílio de alça em gota. As placas foram incubadas novamente em estufa microbiológica à 36 °C ± 1 °C por 24 h.

### 2.3 Inóculo bacteriano

A partir das bactérias cultivadas em meio Müeller-Hinton, conforme citado anteriormente, o inóculo bacteriano foi preparado. Colônias bacterianas foram coletadas utilizando uma alça em gota e adicionadas a um tubo contendo 5mL da solução de NaCl a 0,9%, até obter a turvação que corresponde a 0,5 na escala McFarland. Ostrosky et al. (2008) afirma que na escala de McFarland, o padrão de leitura 0,5 apresenta densidade de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. As culturas foram centrifugadas a 3.500rpm por 10min, o sobrenadante removido, e o caldo Müeller-Hinton foi adicionado no tubo de ensaio até atingir o volume inicial. Em seguida, visando reduzir a densidade de células bacterianas, realizou-se uma diluição do inóculo utilizando meio Müeller-Hinton (1/100), para alcançar uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (Gaspar et al., 2017)

### 2.4 Triagem da avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *C. sorokiniana*

Para a triagem da atividade antibacteriana, 195µL do inóculo bacteriano foi acondicionado em tubo de ensaio, com 5µL dos diferentes extratos (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) da microalga *C. sorokiniana* diluídos em dimetilsulfóxido (500µg/mL). 200µL do inóculo bacteriano foram colocados em um tubo vazio como controle negativo. Para o controle do diluente, 195µL do inóculo bacteriano foram adicionados com 5µL de DMSO em um tubo. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica a 36 °C ± 1 °C por 24h.

Depois do período de incubação, 10µL do conteúdo dos tubos foram esgotados, com auxílio de alça em gota, em placas

de Petri contendo meio ágar Müeller Hinton e encaminhados para estufa bacteriológica a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após, foi avaliado de maneira visual, a presença ou não do crescimento bacteriano (Jafari et al., 2018). Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 2.5 Concentração Inibitória Mínima

O mesmo protocolo do ensaio antibacteriano foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). 195µL de inóculo bacteriano de *Serratia marcescens* (CCCD5005) na concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e 5µL de extrato hexânico, de *Chlorella sorokiniana* diluído em dimetilsulfóxido em quatro concentrações diferentes de 800, 400, 200 e 100µL/mL foram empregados em tubos de ensaio. Esses tubos permaneceram em estufa bacteriológica sendo incubados a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h e, após, os seus conteúdos foram esgotados em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton. As placas retornaram para a estufa, sendo incubadas à  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h e então, avaliado a concentração inibitória mínima. 5µL de dimetilsulfóxido foi utilizado como controle do diluente e 5µL de solução salina como controle negativo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 2.6 Ensaio de tempo da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do extrato hexânico de *C. sorokiniana* em diferentes intervalos de tempo de incubação contra a enterobacter *Serratia marcescens* foi avaliada utilizando tubos de ensaio contendo 195 µL de inóculo bacteriano de *S. marcescens* na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e 5 µL de extrato de *Chlorella sorokiniana* na concentração de 400µg/mL conforme protocolo já mencionado no item 2.5, em intervalos de tempo de 2h, 4h, 8h, 12h e 24h, para avaliar o tempo em que o extrato apresentou inibição.

## 3 Resultados e Discussão

O rendimento obtido com o solvente hexano foi de 2,055%, para o diclorometano de 5,060%, para o acetato de etila de 1,251% e para o metanol de 15,273% (Quadro 1).

**Quadro 1** - Peso da massa (g) dos extratos obtidos e rendimento (%) das extrações

Solvente	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,225	2,055
Diclorometano	0,554	5,060
Acetato de etila	0,137	1,251
Metanol	1,672	15,273

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados do teste de inibição com os diferentes extratos orgânicos obtidos da microalga *C. sorokiniana* indicaram que somente o extrato preparado com o solvente hexano na concentração de 500µg/mL apresentou inibição para a bactéria *Serratia marcescens* (Quadro 2).

**Quadro 2** - Teste de inibição utilizando os diferentes extratos orgânicos obtidos a partir da microalga *C. Sorokiniana*

Solventes	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Hexano	+++	---	---
Diclorometano	---	---	---
Acetato de etila	---	---	---
Metanol	---	---	---

\*sinal +++ indica inibição; sinal--- indica ausência de inibição.

Fonte: dados da pesquisa.

Li et al. (2016) apontaram que os extratos de etanol 95% e acetato de etila das microalgas *Chlorella sp.* (C14) e (SY01), no método de difusão em ágar, demonstraram atividade antibacteriana notória contra *S. aureus* e alta bioeficácia contra *E. coli*. Os extratos de *Chlorella sorokiniana* (C74) apresentaram grandes efeitos antibacterianos tanto em *S. aureus* quanto em *E. coli*.

Shaima et al. (2022) também obtiveram atividade inibitória utilizando extratos metanólicos das microalgas *Chlorella sorokiniana* (UKM2) e *Chlorella sp.* UKM8 por meio do método de difusão em disco e poço, contra 18 cepas de bactérias diferentes. No método de difusão em disco, o extrato de *Chlorella sp.* apresentou boa atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e duas cepas clínicas de *Bacillus subtilis*. *Chlorella sorokiniana* demonstrou a menor atividade inibindo apenas *E. coli*. Já no método em poço, o extrato metanólico de *Chlorella sorokiniana* não apresentou inibição, porém *Chlorella sp.* foi ativa contra um isolado de *P. aeruginosa*.

Nas concentrações de 800µg/mL e 400µg/mL ocorreram inibição da bactéria *Serratia marcescens* utilizando o extrato hexânico de *Chlorella sorokiniana* sendo que a concentração de 400µg/mL foi a concentração inibitória mínima estabelecida. No restante das concentrações (200µg/mL e 100µg/mL) não houve atividade de inibição.

**Quadro 3** - Concentração Inibitória Mínima do extrato hexânico de *Chlorella sorokiniana* na inibição da enterobacter *Serratia marcescens*

Solvente	800µg/mL	400µg/mL	200µg/mL	100µg/mL
Hexano	+++	+++	---	---

\*sinal +++ indicando inibição; sinal — indicando ausência de inibição.

Fonte: dados da pesquisa.

Nos testes de concentração inibitória mínima, Shaima et al. (2022) estabeleceram a concentração inibitória mínima de 6,25mg/mL pelo método de difusão em disco para o extrato metanólico de *Chlorella sp.* contra a bactéria *Serratia marcescens*.

O ensaio de tempo realizado entre os intervalos de 2h, 4h, 8h, 12h e 24h demonstrou que a partir da oitava hora o extrato hexânico de *Chlorella sorokiniana* inibia a *Serratia marcescens*, assim como nos intervalos de 12h e 24h (Quadro 4).

**Quadro 4** - Curva temporal de inibição do extrato hexânico de *Chlorella sorokiniana* contra *Serratia marcescens* nos intervalos de 2h, 4h, 8h, 12h e 24h

Tempo (h)	2	4	8	12	24
Inibição	---	---	+++	+++	+++

\*sinal +++ indicando inibição; sinal -- indicando ausência de inibição.

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4 Conclusão

Na concentração de 500 µg/mL, o extrato hexânico de *Chlorella sorokiniana* apresenta atividade inibitória contra a enterobacter *Serratia marcescens*. A concentração inibitória mínima do extrato de hexânico de *C. sorokiniana* é de 400 µg/mL. A partir da oitava hora o extrato hexânico tem atividade inibitória.

#### Referências

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system: design, optimization, and quality characterization. *Bioresource Technol.*, v.102, n.3, p.3396-3403, 2011.

BALASUBRAMANIAM, V. et al. Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae. *Molecules*, v.26, n.4, p.943, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26040943>

BARKIA, I.; SAARI, N. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Mar. Drugs*, v.17, n.5, p.304. doi: [10.3390/md17050304](https://doi.org/10.3390/md17050304)

CHANDRASEKARAN, M. et al. Antibacterial properties of

various extracts of *Sargassum wightii* against multidrug resistant bacterial strains. *Phykos*, v.44, n.2, p.17-28, 2014.

CHIAIESE, P. et al. Renewable sources of plant biostimulation: microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Frontiers Plant Sci.*, v.9, 430391, 2018.

GASPAR, E. et al. Comparação de métodos para a avaliação in vitro de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Bol. Pesq. Desenvol.*, 2017.

GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.*, v.33, n.2, p.243-260, 2015.

JAFARI, S. et al. Antibacterial potential of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* extracts against *Streptococcus mutans*. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, v.13, n.2, 2018.

LI, A. et al. Prescreening, identification and harvesting of microalgae with antibacterial activity. *Biologia*, v.71, n.10, p.1111-1118, 2016.

MASHHADINEJAD, A.; ZAMANI, H.; SARMA, J. Effect of growth conditions and extraction solvents on enhancement of antimicrobial activity of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Pharm. Biom. Res.*, v.2, n.4, p.65-73, 2016.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.18, p.301-307, 2008.

RIEDEL, S. et al. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg*. Porto Alegre: Artmed, 2022.

SHAIMA, A. F. et al. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella sp.* (UKM8) and *Scenedesmus sp.* (UKM9). *Saudi J. Biol. Sci.*, v.29, n.2, p.1043-1052, 2022.