



AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE EM EXTRATO DE BACTÉRIAS MARINHAS – INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

Gabriel Henrique de Souza Alves Glória¹; Lucas Hlavnicka Nogueira²; José Brango Vanegas³; Octavio Luiz Franco⁴

¹Curso de Medicina – Universidade Católica de Brasília;

²Curso de Biomedicina – Universidade Católica de Brasília;

³Laboratório de Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília;

⁴Laboratório de Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: gabrielhgpi5@gmail.com; lucas.hlavnicka@a.ucb.br; josbrang@gmail.com; ocfranco@gmail.com

RESUMO

A doença de Alzheimer envolve comprometimento da neurotransmissão colinérgica, tornando a acetilcolinesterase (AChE) um importante alvo farmacológico. Produtos naturais marinhos constituem fonte relevante para bioprospecção de moléculas bioativas. Este estudo avaliou extratos das cepas bacterianas marinhas APA04 e APA06G em ensaios de atividade da AChE. As cepas foram cultivadas em meio MOLP, submetidas a extrações com acetato de etila e butanol e avaliadas pelo método de Ellman, utilizando galantamina como controle positivo e MOLP estéril como controle. O extrato de APA04 foi posteriormente fracionado por cromatografia flash. Entre as condições avaliadas, a fração Hexano/AcOEt 7:3 de APA04 apresentou o resultado mais promissor em relação ao respectivo controle MOLP. Entretanto, a resposta também observada no meio de cultivo impede atribuir o comportamento exclusivamente à cepa bacteriana ou a um metabólito específico. Os resultados permitiram delimitar uma fração de interesse e reforçaram a importância dos controles correspondentes na interpretação dos ensaios.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Bactérias marinhas. Bioprospecção

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa progressiva e multifatorial, caracterizada pelo comprometimento gradual das funções cognitivas e pela perda de autonomia. Entre as alterações neuroquímicas relacionadas à doença destaca-se o comprometimento da neurotransmissão colinérgica. A acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, constitui um dos alvos farmacológicos utilizados no tratamento sintomático da DA. Sua inibição aumenta a disponibilidade sináptica de acetilcolina, mecanismo explorado por medicamentos como a galantamina (Forlenza, 2005).

Embora existam terapias farmacológicas disponíveis, permanece relevante a investigação de novas moléculas biologicamente ativas. Nesse contexto, produtos naturais de origem marinha representam uma importante fonte de diversidade química para a descoberta de substâncias de interesse farmacológico. Microrganismos associados ao ambiente marinho podem produzir metabólitos secundários estruturalmente diversos e com diferentes propriedades biológicas, favorecendo sua utilização em estratégias de bioprospecção (Kelecom, 2002; Hughes & Fenical, 2010).

Bactérias marinhas apresentam especial interesse por poderem ser cultivadas em condições laboratoriais, possibilitando a obtenção de extratos e o estudo sistemático dos compostos produzidos.



Entretanto, a interpretação de ensaios realizados com extratos microbianos exige controles adequados, uma vez que componentes provenientes do próprio meio de cultivo também podem ser recuperados durante os procedimentos de extração e interferir nas respostas observadas.

Diante desse contexto, foram investigados extratos das cepas bacterianas marinhas APA04 e APA06G, utilizando diferentes estratégias de extração, fracionamento e avaliação da atividade da AChE, buscando identificar amostras ou frações de interesse para investigação química e biológica.

OBJETIVO

Avaliar extratos das cepas bacterianas marinhas APA04 e APA06G em ensaios de atividade da acetilcolinesterase, utilizando diferentes estratégias de extração e fracionamento, com o objetivo de identificar amostras ou frações de interesse para investigação de possíveis componentes bioativos.

MÉTODO

As cepas bacterianas marinhas APA04 e APA06G foram cultivadas em meio MOLP. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas para separação das células e obtenção dos sobrenadantes. Inicialmente, os sobrenadantes foram submetidos à extração líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt), seguida da concentração da fase orgânica. O meio MOLP estéril foi submetido ao mesmo procedimento de extração e utilizado como controle.

A galantamina foi empregada como controle positivo e obtida a partir de comprimidos comerciais de bromidrato de galantamina. O princípio ativo foi submetido à extração ácido-base seguida de extração líquido-líquido com clorofórmio. Posteriormente, a galantamina foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C18 e sua identidade foi avaliada por espectrometria de massas em tandem com ionização por eletrospray (MS/MS-ESI).

A atividade da AChE foi investigada pelo método colorimétrico de Ellman, utilizando iodeto de acetiltiocolina como substrato e DTNB como reagente cromogênico. Os ensaios foram realizados em triplicata. Na primeira etapa, a galantamina foi avaliada entre 0,0156 e 1,0 mg.mL⁻¹, enquanto MOLP, APA04 e APA06G foram avaliados entre 0,10 e 2,0 mg.mL⁻¹.

Na continuidade do estudo, novas extrações foram realizadas utilizando butanol (BuOH). Nessa etapa, os extratos de MOLP, APA04 e APA06G foram avaliados a 6,0 mg.mL⁻¹, enquanto a galantamina foi avaliada a 1,0 mg.mL⁻¹. Posteriormente, o extrato obtido com AcOEt foi submetido ao fracionamento por cromatografia flash (CCFlash), empregando sistemas constituídos por hexano e acetato de etila. As frações Hexano/AcOEt 7:3 e Hexano/AcOEt 1:1 de APA04 e do respectivo controle MOLP foram avaliadas pelo ensaio de Ellman na concentração de 1,6 mg.mL⁻¹.

RESULTADOS

A galantamina apresentou aumento progressivo do percentual de inibição conforme o aumento da concentração. Na etapa inicial, foram registrados percentuais de 18,56%, 24,83%, 39,20%, 53,35%, 68,72%, 90,16% e 98,18% nas concentrações de 0,0156; 0,0313; 0,0625; 0,1250; 0,2500; 0,5000 e 1,0000 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Na avaliação inicial dos extratos obtidos com AcOEt, considerando a concentração de 2,0 mg.mL⁻¹, foram registrados percentuais de 52,08% para o controle MOLP, 56,48% para APA04 e 37,88% para APA06G. Embora APA04 tenha apresentado percentual superior ao controle nessa condição, a proximidade entre os valores não permitiu atribuir a resposta exclusivamente à cepa bacteriana.



Na segunda etapa, utilizando BuOH e concentração de $6,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, foram observados percentuais de 82,30% para MOLP, 71,79% para APA04 e 66,90% para APA06G. A galantamina, avaliada a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, apresentou 96,55%. Como as concentrações utilizadas nessa etapa diferiram das empregadas na primeira extração, os percentuais entre as duas etapas não foram considerados diretamente comparáveis.

Após o fracionamento por CCFlash, as frações foram avaliadas a $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$. Na condição Hexano/AcOEt 7:3, foram observados percentuais de 87,36% para APA04 e 70,19% para o controle MOLP. Na condição Hexano/AcOEt 1:1, foram registrados 76,95% para APA04 e 72,85% para MOLP. Os principais resultados encontram-se sintetizados na Tabela 1.

Tabela 1

Síntese dos principais resultados obtidos nas diferentes etapas experimentais

Amostra	Etapa 1 – AcOEt ¹	Etapa 2 – BuOH ²	CCFlash Hex/AcOEt 7:3 ³	CCFlash Hex/AcOEt 1:1 ³
Galantamina	98,18%	96,55%	—	—
MOLP	52,08%	82,30%	70,19%	72,85%
APA04	56,48%	71,79%	87,36%	76,95%
APA06G	37,88%	66,90%	—	—

Nota. ¹ Galantamina: $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$; MOLP e extratos: $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. ² Galantamina: $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$; MOLP e extratos: $6,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. ³ MOLP e frações: $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Fonte: Resultados experimentais do projeto (2026).

Entre as condições avaliadas após o fracionamento, a fração Hexano/AcOEt 7:3 de APA04 apresentou a maior diferenciação em relação ao respectivo controle MOLP, constituindo o resultado mais promissor dessa etapa. Entretanto, a presença de resposta relevante no próprio MOLP permaneceu como fator limitante para a interpretação dos resultados.

CONCLUSÃO

A avaliação progressiva dos extratos das cepas bacterianas marinhas APA04 e APA06G permitiu avançar da triagem inicial para diferentes estratégias de extração e fracionamento cromatográfico. Entre as condições estudadas após o fracionamento, a fração de APA04 obtida em Hexano/AcOEt 7:3 apresentou o resultado mais promissor em comparação ao respectivo controle MOLP.

Entretanto, a resposta observada também no meio de cultivo representa uma limitação fundamental para a interpretação dos achados. Os resultados não permitem atribuir o comportamento registrado exclusivamente à APA04, demonstrar atividade anticolinesterásica específica da cepa ou relacionar a resposta a determinado metabólito bacteriano.

O estudo permitiu, portanto, delimitar uma fração de interesse e evidenciou a importância do processamento de controles correspondentes na investigação de extratos microbianos. Os resultados obtidos constituem contribuição para a compreensão experimental dessas amostras e demonstram que a caracterização química seria necessária para determinar a origem dos componentes relacionados à resposta observada.

REFERÊNCIAS



- Forlenza, O. V. (2005). Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 32(3), 137–148. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832005000300006>
- Hughes, C. C., & Fenical, W. (2010). Antibacterials from the sea. *Chemistry – A European Journal*, 16(42), 12512–12525. <https://doi.org/10.1002/chem.201001279>
- Kalola, U. K., Patel, P., & Nguyen, H. (2024). Galantamine. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574546/>
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1), 151–170. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000100012>
- Knapskog, A.-B., Engedal, K., Selbæk, G., & Øksengård, A.-R. (2021). Alzheimers sykdom – diagnostikk og behandling. *Tidsskrift for Den norske legeförening*, 141(7). <https://doi.org/10.4045/tidsskr.20.0919>
- Li, X.-W. (2020). Chemical ecology-driven discovery of bioactive marine natural products as potential drug leads. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18(11), 837–838. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)60024-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)60024-3)
- Liang, X., Luo, D., & Luesch, H. (2019). Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. *Pharmacological Research*, 147, 104373. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104373>
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O., & Fusetani, N. (2017). Marine pharmacology in 2012–2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs*, 15(9), 273. <https://doi.org/10.3390/md15090273>
- Newman, D. J., & Hill, R. T. (2006). New drugs from marine microbes: The tide is turning. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(7), 539–544. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0115-2>
- Penesyan, A., Kjelleberg, S., & Egan, S. (2010). Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Marine Drugs*, 8(3), 438–459. <https://doi.org/10.3390/md8030438>
- Piel, J. (2009). Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 26(3), 338–362. <https://doi.org/10.1039/B703499G>
- Unson, M. D., Holland, N. D., & Faulkner, D. J. (1994). A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*, 119(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF00350100>
- Vaz, M., & Silvestre, S. (2020). Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).