REPOSICIONAMENTO DO AZUL DE METILENO COMO INIBIDOR DA ACETILCOLINESTERASE: UMA ABORDAGEM IN SILICO

Leonardo Agostinho de Sales; Larissa de Gouvêa Santos Rufino; Bruno Henrique Godoi

Universidade de Taubaté (UNITAU), Departamento de Saúde e Biotecnologia, Av. Tiradentes, 500, Bom Conselho, 12030-180, Taubaté – SP, Brasil, leonardo.asales@unitau.br

Resumo

A Doença de Alzheimer é marcada pelo déficit colinérgico, o que sustenta a busca por inibidores da enzima Acetilcolinesterase (AChE) de alta viabilidade terapêutica. Este trabalho investigou, por meio de *docking* molecular *in silico*, o reposicionamento do Azul de Metileno (AM) como inibidor da AChE humana, comparando seu modo de ligação ao de dois inibidores clinicamente estabelecidos, Donepezila e Galantamina. A estrutura cristalográfica da AChE humana (PDB 4EY7) foi preparada no PyMOL, os ligantes foram otimizados no Open Babel (campo de força MMFF94) e o *docking* foi conduzido no PyRx/AutoDock Vina, direcionado à garganta catalítica; as interações não covalentes dos complexos foram analisadas pelo servidor PLIP. Os resultados mostraram que o AM se acomoda de forma compacta e planar na garganta enzimática, estabelecendo contatos hidrofóbicos e interação do tipo π-*stacking*/cátion-π com o resíduo Trp286, em região sobreposta à ocupada pelos sítios de ligação de Donepezila e Galantamina. Os achados corroboram, do ponto de vista estrutural, a viabilidade do reposicionamento do AM como inibidor da AChE.

Palavras-chave: Alzheimer. Azul de metileno. Acetilcolinesterase. Docking molecular. Reposicionamento de fármacos.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas e da Saúde – Neurociências / Farmacologia / Bioinformática.

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA), forma mais comum de demência, é uma patologia neurodegenerativa progressiva de distribuição mundial. A urgência por novas alternativas terapêuticas é evidenciada pelas projeções da Alzheimer's Disease International (2015), que estima um aumento dos atuais 55 milhões para 139 milhões de casos de demência até 2050.

A fisiopatologia da DA está intimamente associada ao déficit colinérgico no Sistema Nervoso Central, que compromete a síntese e a liberação de acetilcolina nas vias colinérgicas das áreas hipocampais e corticais relacionadas à memória e à cognição. A Acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa a acetilcolina na fenda sináptica e apresenta dois subsítios farmacologicamente relevantes ao longo de sua garganta catalítica: o sítio aniônico catalítico (CAS), que abriga a tríade Ser203–His447–Glu334 e o resíduo Trp86, e o sítio aniônico periférico (PAS), delimitado por Trp286 na entrada da cavidade. A inibição desta enzima é uma das principais estratégias farmacológicas para atenuar os sintomas cognitivos da doença, seja de forma mais localizada junto à tríade catalítica, como ocorre com a Galantamina, seja de forma dual entre o CAS e o PAS, como ocorre com a Donepezila *(ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL*, 2015).

O Azul de Metileno (AM) é um composto fenotiazínico com propriedades farmacológicas singulares: apresenta elevada capacidade de transposição da Barreira Hematoencefálica, atua na modulação da função mitocondrial e possui histórico clínico consolidado de baixa toxicidade em doses controladas (Muhammad et al., 2022). Além de inibir a agregação da proteína tau (Wischik et al., 1996), ensaios bioquímicos *in vitro* já demonstraram que o AM inibe a AChE humana, com concentração inibitória (IC50) de aproximadamente 2,74 μM, o que evidencia seu potencial multialvo (Cloete; Petzer; Petzer, 2021).

Diante do déficit colinérgico observado na DA e da necessidade de novas estratégias terapêuticas de baixo custo, este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de *docking* molecular *in silico*, o modo de ligação e a afinidade estrutural do Azul de Metileno no sítio ativo da Acetilcolinesterase humana, comparando seu perfil de interação ao dos inibidores de referência Donepezila e Galantamina, de modo a subsidiar, com base na bioinformática estrutural, o reposicionamento farmacológico desta molécula já validada na clínica.

Metodologia

O presente estudo caracteriza-se como uma investigação computacional *in silico*, fundamentada na bioinformática estrutural e em algoritmos de busca estocástica para a avaliação da afinidade molecular entre ligantes de interesse farmacológico e o sítio ativo da Acetilcolinesterase (AChE) humana.

A estrutura tridimensional da AChE humana foi obtida do Protein Data Bank (PDB ID: 4EY7), correspondente ao complexo cristalográfico da enzima com o inibidor Donepezila, resolvido a 2,35 Å (Cheung et al., 2012). A preparação da macromolécula foi conduzida no PyMOL, com remoção de moléculas de água cristalográficas, cofatores não essenciais, contra-íons e do ligante nativo, seguida da adição de átomos de hidrogênio polares e da atribuição de cargas parciais de Gasteiger.

O ligante teste (Azul de Metileno) e os ligantes controles (Donepezila e Galantamina) foram processados no software Open Babel, empregando-se o campo de força MMFF94 para a otimização geométrica e a minimização de energia, além da atribuição dos graus de liberdade rotacionais das ligações torcionais ativas, garantindo que cada molécula estivesse em seu estado conformacional de menor energia livre antes das simulações.

Os ensaios de *docking* molecular foram executados no PyRx, com o motor de busca AutoDock Vina, direcionando-se a caixa de confinamento (*grid box*) às coordenadas cristalográficas do sítio ativo e da garganta catalítica da AChE. O volume de busca englobou tanto o sítio aniônico catalítico (CAS), delimitado por resíduos como Trp86, Glu202 e a tríade catalítica (Ser203, His447 e Glu334), quanto o sítio aniônico periférico (PAS), na entrada da garganta, delimitado por resíduos como Trp286. Para cada ligante, as conformações de menor energia livre de ligação (ΔG) e de maior frequência populacional nos agrupamentos (*clusters*) foram selecionadas para a análise conformacional detalhada.

A caracterização das interações intermoleculares não covalentes dos três complexos proteínas ligantes (AChE–Donepezila, AChE–Galantamina e AChE–AM) foi processada por meio do servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP v2.4.0) (Adasme et al., 2021), que identificou e categorizou interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações π-π *stacking* e ligações cátion-π, quantificando comprimentos de ligação, distâncias interatômicas e ângulos planares. A geração das imagens e a inspeção das poses de ancoramento na superfície e na cavidade enzimática foram realizadas no PyMOL, versão 2.5 (Schrödinger, LLC, 2021), adotando-se representação em fita (*cartoon*) para o arcabouço peptídico e bastões (*sticks*) para os ligantes e os resíduos-chave circundantes, em raio de corte ≤ 4,5 Å.

Resultados

A análise dos modos de ancoragem demonstrou que os três ligantes avaliados, Donepezila, Galantamina e Azul de Metileno (AM), acomodam-se de maneira favorável ao longo da garganta catalítica da Acetilcolinesterase, ainda que com padrões de interação distintos entre si, conforme detalhado a seguir.

A conformação obtida para a Donepezila evidenciou uma orientação canônica estendida ao longo de todo o canal aromático da AChE, ancorando simultaneamente a porção indanona no sítio aniônico periférico (PAS) e a fração benzila no sítio aniônico catalítico (CAS), no fundo da garganta enzimática, conforme sintetizado na Tabela 1 e ilustrado na Figura 1.

Tabela 1 - Parâmetros das interações intermoleculares no complexo AChE–Donepezila obtidos por PLIP.

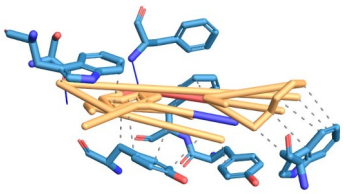
Resíduo (subsítio)	Tipo de interação	Distância (Å)	Parceiros atômicos
Trp86 (CAS)	Hidrofóbica	3,63 – 3,79	Anel indol – anel aromático
Trp286 (PAS)	Hidrofóbica	3,48 – 3,87	Anel indol – sistema

Resíduo (subsítio)	Tipo de interação	Distância (Å)	Parceiros atômicos
			aromático
Tyr337 (gargalo)	Hidrofóbica	3,55	Fenol – carbonos alifáticos
Phe338 (gargalo)	Hidrofóbica	3,56 – 3,90	Fenila – esqueleto do ligante
Tyr341 (PAS)	Hidrofóbica	3,26 – 3,82	Fenila – anel do ligante
Phe295 (gargalo)	Hidrogênio	2,82 (dD-A)	N–H (Phe295) → O=C (ligante)
Ser293 (gargalo)	Hidrogênio	3,79 (dD-A)	O (ligante) → carbonila (Ser293)

Fonte: elaborada pelos próprios autores a partir de PLIP (2026).

A estabilização polar da Donepezila destacou-se pela formação de uma ligação de hidrogênio dirigida entre o hidrogênio da amida da cadeia principal de Phe295 (dH-A = 1,81 Å; dD-A = 2,82 Å; ângulo de doador de 175,29°) e o átomo de oxigênio carbonílico da porção indanona do ligante. O perfil hidrofóbico foi sustentado por múltiplos contatos em distâncias inferiores a 3,90 Å envolvendo Trp86, Trp286 e a tríade Tyr337/Phe338/Tyr341, consolidando a inibição dual, entre CAS e PAS, típica deste padrão farmacológico.

Figura 1 - Diagrama das interações intermoleculares do complexo AChE–Donepezila gerado pelo PLIP (bastões laranja: Donepezila; bastões azuis: resíduos da AChE; linhas tracejadas: contatos hidrofóbicos).



Fonte: elaborada pelos próprios autores a partir de PLIP (2026).

A Galantamina, por sua vez, adotou um modo de ligação mais restrito, voltado ao fundo da garganta catalítica (Tabela 2, Figura 2). Diferentemente da Donepezila, sua estabilização decorreu predominantemente de ligações de hidrogênio com resíduos do CAS: o grupo hidroxila do ligante atuou como doador de hidrogênio ao resíduo Glu202 (dD-A = 2,88 Å; ângulo = 128,69°) e o oxigênio do anel do ligante atuou como aceptor da His447 da tríade catalítica (dD-A = 3,02 Å; ângulo = 149,58°), além de contatos com as carbonilas do esqueleto peptídico de Gly120 e Gly122. Contatos hidrofóbicos adicionais com Trp86, Tyr124 e Phe338 (3,68–3,99 Å) reforçaram o posicionamento do ligante próximo à tríade catalítica, compatível com o mecanismo de inibição competitiva e reversível característico deste alcaloide.

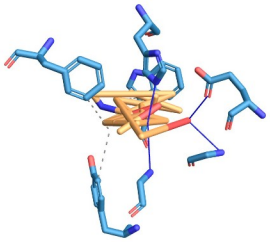
Tabela 2 - Parâmetros das interações intermoleculares no complexo AChE–Galantamina obtidos por PLIP.

Resíduo (subsítio)	Tipo de interação	Distância (Å)	Parceiros atômicos
Trp86 (CAS)	Hidrofóbica	3,68 – 3,87	Anel indol – anel do ligante
Tyr124 (PAS)	Hidrofóbica	3,93	Fenol – anel do ligante
Phe338 (gargalo)	Hidrofóbica	3,99	Fenila – anel do ligante
Gly120 (cadeia principal)	Hidrogênio	3,57 (dD-A)	N–H (Gly120) → O (ligante)
Gly122 (cadeia principal)	Hidrogênio	3,90 (dD-A)	N–H (Gly122) → O (ligante)
Glu202 (CAS)	Hidrogênio	2,88 (dD-A)	O–H (ligante) → O

Resíduo (subsítio)	Tipo de interação	Distância (Å)	Parceiros atômicos
			(Glu202)
His447 (tríade catalítica)	Hidrogênio	3,02 (dD-A)	N–H (His447) → O (ligante)

Fonte: elaborada pelos próprios autores a partir de PLIP (2026).

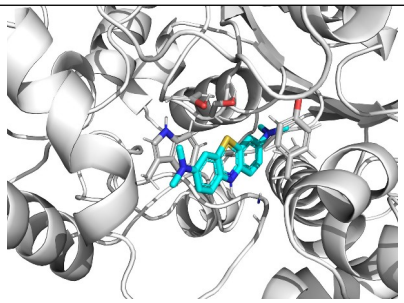
Figura 2 - Diagrama das interações intermoleculares do complexo AChE–Galantamina gerado pelo PLIP (bastões laranja: Galantamina; bastões azuis: resíduos da AChE; linhas azuis: ligações de hidrogênio; linhas tracejadas: contatos hidrofóbicos).



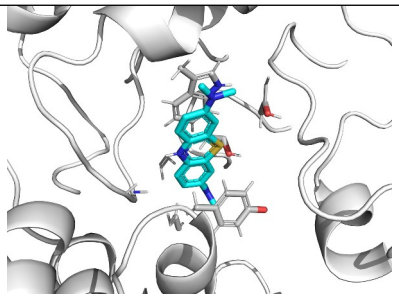
Fonte: elaborada pelos próprios autores a partir de PLIP (2026).

Em paralelo, os resultados de acoplamento do Azul de Metileno (AM) revelaram um modo de ligação compacto e planar, inserido na porção medial/periférica da garganta da AChE (Figura 3). Em virtude de sua estrutura fenotiazínica aromática e da carga formal catiônica distribuída pelos grupos amina e pelo heterociclo contendo enxofre e nitrogênio, o composto estabeleceu ancoramento predominantemente aromático e eletrostático, sem a formação de ligações de hidrogênio clássicas (Tabela 3).

Figura 3 - Acoplamento molecular do Azul de Metileno (AM) na garganta catalítica da Acetilcolinesterase. Em (A), visão geral da inserção do ligante na enzima (fita cinza); em (B), detalhe dos resíduos aromáticos adjacentes ao anel fenotiazínico (bastões ciano).



(A)



(B)

Fonte: elaborada pelos próprios autores (2026).

O núcleo fenotiazínico do AM estabeleceu contato hidrofóbico com Trp286, Phe338 e Tyr341 (3,53 –3,89 Å) e uma interação de π-*stacking* com o anel indólico de Trp286 (distância entre centroides de 3,75 Å; ângulo de 2,57°; deslocamento de 1,05 Å), sintetizada na Tabela 3 e evidenciada na Figura 4. Esse arranjo é compatível com um mecanismo de bloqueio do sítio periférico e da porção medial do canal, por complementaridade estrutural ao microambiente aromático da enzima, favorecendo interações do tipo cátion-π entre a densidade eletrônica do indol de Trp286 e o centroide positivamente polarizado do ligante.

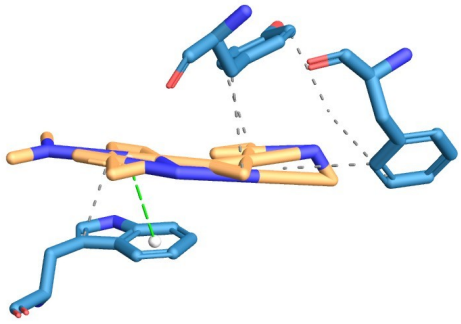
Tabela 3 - Parâmetros das interações intermoleculares no complexo AChE–Azul de Metileno obtidos por PLIP.

Resíduo (subsítio)	Tipo de interação	Distância (Å)	Parceiros atômicos
Trp286 (PAS)	Hidrofóbica	3,89	Indol – anel fenotiazínico
Phe338 (gargalo)	Hidrofóbica	3,74 – 3,82	Fenila – anel fenotiazínico

Resíduo (subsítio)	Tipo de interação	Distância (Å)	Parceiros atômicos
Tyr341 (PAS)	Hidrofóbica	3,53 – 3,85	Fenila – anel fenotiazínico
Trp286 (PAS)	π-*stacking*	3,75 (centroide)	Indol – anel fenotiazínico (ângulo 2,57°)

Fonte: elaborada pelos próprios autores a partir de PLIP (2026).

Figura 4 - Diagrama das interações intermoleculares do complexo ache–Azul de Metileno gerado pelo PLIP, evidenciando a interação de π-*stacking* (linha verde) com Trp286.



Fonte: elaborada pelos próprios autores a partir de PLIP (2026).

Discussão

Em conjunto, os resultados indicam que, embora o AM não reproduza a extensão dupla CAS–PAS observada para a Donepezila, nem o ancoramento profundo e polar da Galantamina junto à tríade catalítica, o composto ocupa uma região sobreposta ao PAS e à porção medial da garganta enzimática, compartilhando resíduos-chave (Trp286, Phe338, Tyr341) com os dois inibidores de referência. Esse padrão estrutural sustenta a hipótese de que o AM é capaz de interferir na dinâmica de ligação do substrato acetilcolina, corroborando dados bioquímicos independentes que já descreviam o AM como inibidor da AChE humana, com IC50 de aproximadamente 2,74 μM (Cloete; Petzer; Petzer, 2021).

Embora os três ligantes convirjam para a mesma garganta catalítica, os padrões de interação observados refletem estratégias farmacológicas distintas. A Donepezila explora simultaneamente o CAS e o PAS, por meio de contatos hidrofóbicos extensos e de uma ligação de hidrogênio direcional com Phe295. A Galantamina, por outro lado, ancora-se preferencialmente junto à tríade catalítica, com ligações de hidrogênio a Glu202 e His447. Já o AM privilegia interações aromáticas e eletrostáticas, hidrofóbicas e do tipo π-*stacking*/cátion-π, com resíduos compartilhados pelos dois controles, sobretudo Trp286 e Phe338, sem formar ligações de hidrogênio clássicas.

Esses achados dialogam com estudos estruturais prévios sobre os mesmos sítios de ligação. Greenblatt et al. (2004), ao resolverem estruturas cristalográficas de derivados da galantamina em AChE de *Torpedo californica*, descreveram o estreitamento aromático formado por resíduos equivalentes a Tyr337/Phe338 (numeração humana) como uma barreira estérica junto à tríade catalítica, compatível com o ancoramento profundo da Galantamina aqui observado. Já Bachurin et al. (2019), em ensaios de *docking* com conjugados fenotiazínicos relacionados ao AM, descreveram interações cátion-π especificamente com o Trp286 do PAS, o mesmo resíduo identificado como principal ponto de ancoragem do AM neste estudo. Essa convergência reforça a plausibilidade do mecanismo proposto: interações cátion-π e π-π *stacking* com resíduos aromáticos da garganta enzimática são reconhecidamente relevantes para a afinidade de ligantes catiônicos, podendo compensar a ausência de ligações de hidrogênio clássicas no complexo AChE–AM.

Conclusão

O presente estudo demonstrou, por meio de *docking* molecular e da análise de interações intermoleculares via PLIP, que o Azul de Metileno se acomoda de forma estável na garganta catalítica da Acetilcolinesterase humana, ocupando uma região parcialmente sobreposta à dos inibidores de referência Donepezila e Galantamina. Ainda que o modo de ligação do AM seja predominantemente aromático e eletrostático, e não polar como observado nos dois controles, esse resultado sustenta, sob

a perspectiva estrutural, a viabilidade de seu reposicionamento como candidato a inibidor da AChE. A confirmação desse mecanismo depende de etapas futuras, como simulações de dinâmica molecular, cálculos de energia livre de ligação e ensaios *in vitro*.

Referências

ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530-W534, 2021.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. *Numbers of people with dementia worldwide: an update to the estimates in the World Alzheimer Report 2015*. Londres: ADI, 2015. Disponível em: https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide/. Acesso em: 25 mar. 2026.

BACHURIN, S. O. et al. Conjugates of methylene blue with γ-carboline derivatives as new multifunctional agents for the treatment of neurodegenerative diseases. **Scientific Reports**, v. 9, art. 4873, 2019.

CHEUNG, J. et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282-10286, 2012.

CLOETE, S. J.; PETZER, A.; PETZER, J. P. Interactions of dye compounds that are structurally related to methylene blue with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 97, n. 4, p. 854-864, 2021.

GREENBLATT, H. M. et al. The complex of a bivalent derivative of galanthamine with Torpedo acetylcholinesterase displays drastic deformation of the active-site gorge: implications for structure-based drug design. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 47, p. 15405-15411, 2004.

MUHAMMAD, J. S. et al. Methylene Blue: A Multitarget Agent for Alzheimer's Disease Strategy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3313, 2022. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8949236/. Acesso em: 25 mar. 2026.

SCHRÖDINGER, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System*, version 2.5. Nova York: Schrödinger, 2021.

WISCHIK, C. M. et al. Selective inhibition of Alzheimer's disease-like tau aggregation by phenothiazines. ***Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)***, v. 93, n. 20, p. 11213-11218, 1996. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2014378/. Acesso em: 25 mar. 2026.