



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS



Valéria Noia Ribeiro

***Docking* molecular de compostos bioativos contra as bactérias do complexo
vermelho para periodontite**

Itabaiana – SE

2026

Valéria Noia Ribeiro

***Docking* molecular de compostos bioativos contra as bactérias do complexo
vermelho para periodontite**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Naturais da Universidade Federal de
Sergipe, como requisito necessário para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Naturais.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Droppa
Almeida.

Itabaiana – SE

2026

Dados Internacional de Catalogação na Publicação (CIP)

R484d

Ribeiro, Valéria Noia

Docking molecular de compostos bioativos contra as bactérias do complexo vermelho para periodontite/ Valéria Noia Ribeiro. – Itabaiana, SE, 2026.
106f.:il.

Inclui bibliografia

Orientadora: Prof.^a Dr^a Daniela Droppa Almeida

Dissertação(mestrado profissional em Ciências Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, 2026.

1. Protein Data Bank 2. Docking molecular 3. Doença Periodontal
4. Compostos bioativos 5. Periodontite 6. Ação Multi-alvo I. Título

CDU:616.31(813.7Itabaiana)

Maria Vandineide Teles Silva, Bibliotecária CRB- 5/1244

FOLHA DE APROVAÇÃO

***Docking* molecular de compostos bioativos contra as bactérias do complexo vermelho para periodontite**

Valéria Noia Ribeiro

APROVADA pela banca examinadora composta por:

Profa. Dra. Daniela Droppa Almeida

Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais
Universidade Federal de Sergipe

Profa. Dra. Cristianne Santana Santos

Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Moacir dos Santos Andrade

Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais
Universidade Federal de Sergipe

Itabaiana – SE

2026

Dedico este trabalho ao meu filho, Luigi, e ao meu marido,
Lavoisier, por caminharem de mãos dadas comigo em
todos os momentos de sua construção e por me apoiarem
incondicionalmente na realização deste sonho.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir trilhar esse novo caminho em minha vida profissional, iluminando o percurso e me concedendo força e persistência.

À Espiritualidade do Templo de Luz Filhos de Oxalá que me guia e protege. Muito obrigada pelo ensinamentos, sobretudo nos momentos mais desafiadores em que pensei em desistir, dando-me forças e me orientando com coragem, paciência e fé.

Ao meu amado filho, que a cada amanhecer, faz-me renovar a razão de viver e de continuar a busca pelos meus sonhos. Ao meu marido, pelo apoio, amor, paciência e por acreditar em minha capacidade. Gratidão imensa. Amo vocês!

Aos meus queridos pais, Wilde (*in memorian*) e Valquiria, por me escolherem como filha e por todo amor, referência e esforços dedicados de suas existências a seus filhos e filhas. Vocês são muito especiais. Amor eterno!

A vocês, queridos e amados irmão(a)s, sobrinho(a)s, cunhado(a)s, co-cunhado, sogros, pelo amor e torcida, na efetivação desse propósito. Amo todos vocês!

À família de coração e de fé que Deus me presenteou, em especial, a Jeane, Ravanna e Larissa por todo o nosso itinerário de muita luta, amor, companheirismo, fé e muito mais. Sem vocês, o caminho seria mais árduo. Amo vocês!

Aos amigos de jornada, especialmente a Edu, Iére, Felipe, Bruno, D. Alzira, Taty Luz e Dai que me fizeram entender que Deus envia seus anjos à Terra, principalmente, nos momentos mais difíceis e que nunca estamos sozinhos. Contem sempre comigo. Levarei cada um de vocês, em meu coração!

A todos os professores do mestrado, Dra. Valéria Priscila, Dr. Moacir Andrade, Dr. José Ronaldo dos Santos e Dra. Daniela Droppa, por compartilharem de seus valiosos conhecimentos para a execução dessa dissertação, em especial à Professora Dra. Cristiane Santana por exercer com maturidade e sabedoria o papel a mesma designado e ser uma referência de profissional e ser humano.

Ao PPGCN, pela oportunidade em realizar essa pesquisa tão importante para mim como dentista e, para as pessoas que sofrem com a periodontite.

Àqueles a quem diariamente dedico o meu tempo profissional e me fizeram voltar à Universidade para estudar e buscar por soluções que amenizassem as suas dores e sofrimentos: MEUS PACIENTES. Muito obrigada!!!

“- Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra!”

Ernest Hemingway

RESUMO

O cálculo dental resulta da calcificação da placa bacteriana e, em sua forma mais agressiva, está associado a bactérias do complexo vermelho, como *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*. Entretanto, as opções terapêuticas ainda são limitadas, especialmente no que se refere ao uso de compostos bioativos como alternativas terapêuticas. Nesse sentido, este trabalho possui como objetivo investigar as principais proteínas de virulência das bactérias do complexo vermelho, utilizando-as para identificar potenciais inibidores naturais capazes de interferir nos mecanismos de patogenicidade associados à doença periodontal, através de abordagens *in silico*. Para isso, realizamos uma revisão de literatura inicialmente para encontrar as principais proteínas virulentas, e em seguida, foi adotada uma estratégia computacional de *docking multitarget* contra os alvos estruturais, utilizando a biblioteca de ligantes de produtos naturais (COCONUT). As proteínas virulentas encontradas na literatura foram a Kgp para a bactéria *P. gingivalis*, a Cistalisina para a *T. denticola* e Carilisina de *T. forsythia*. Para o *docking* foram utilizados 57.476 compostos, com remoção de 844 duplicatas e 32.607 similares por *fingerprints* Morgan (Tanimoto $<0,7$; *leader clustering*), chegando a 23.771 ligantes, após a conversão em (.pdbqt). Os resultados do *docking* mostraram que a 5,0 Å, a ocupação do sítio foi alta em Cistalisina (84,17%) e Carilisina (97,98%), mas muito baixa em Kgp (8,43%), o que pode refletir diferenças geométricas e físico-químicas na cavidade amostrada. Na seleção *multitarget* foram encontrados 296 compostos que atenderam ao consenso estrito (3/3 no sítio) e foram ranqueados por energia média (E_{mean}); o *Top 80* estrito ficou em $\sim -10,65$ a $-9,34$ kcal/mol. A triagem por *docking* molecular com compostos do banco de dados COCONUT identificou a substância N-benzyl-3-[(3S)-2,5-dioxo-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]-N-methylpropanamide como o candidato *multitarget* mais promissor, atendendo simultaneamente aos critérios de ocupação do sítio catalítico, consistência estrutural e energia de ligação ($\leq -7,0$ kcal/mol) nos três alvos.

Palavras-chave: Protein Data Bank; *Docking* molecular; Doença Periodontal; Compostos bioativos; Ação Multi-alvo.

ABSTRACT

Dental calculus results from the calcification of dental plaque and, in its most aggressive form, is associated with red complex bacteria such as *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *T. forsythia*. However, therapeutic options remain limited, particularly with regard to the use of bioactive compounds as alternative treatments. In this context, the present study aims to investigate the main virulence proteins of red complex bacteria and to use them to identify potential natural inhibitors capable of interfering with pathogenicity mechanisms associated with periodontal disease through *in silico* approaches. To this end, we initially conducted a literature review to identify the major virulence proteins, followed by the adoption of a multitarget computational docking strategy against structural targets using a natural products ligand library (COCONUT). The virulence proteins identified in the literature were Kgp for *P. gingivalis*, cystalisin for *T. denticola*, and karilysin for *T. forsythia*. For docking, 57,476 compounds were used, with the removal of 844 duplicates and 32,607 similar compounds based on Morgan fingerprints (Tanimoto < 0.7; leader clustering), resulting in 23,771 ligands after conversion to (.pdbqt). Docking results at a 5.0 Å cutoff showed high site occupancy for cystalisin (84.17%) and karilysin (97.98%), but very low occupancy for Kgp (8.43%), which may reflect geometric and physicochemical differences in the sampled cavities. In the multitarget selection, 296 compounds met the strict consensus criteria (3/3 site occupancy) and were ranked by mean binding energy (E_{mean}); the strict *Top 80* ranged from approximately −10.65 to −9.34 kcal/mol. Molecular docking screening using compounds from the COCONUT database identified N-benzyl-3-[(3S)-2,5-dioxo-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]-N-methylpropanamide as the most promising multitarget candidate, simultaneously meeting the criteria for catalytic site occupancy, structural consistency, and binding energy (≤ -7.0 kcal/mol) across all three targets.

Keywords: Protein Data Bank; Molecular docking; Periodontal disease; Bioactive compounds; Multitarget action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Arcada dentária humana com (a) periodonto saudável e (b) evidenciando uma periodontite instalada, com perda de inserção, presença de bolsas periodontais, retração gengival e sangramento gengival. 19
- Figura 2. *P. gingivalis* com suas fímbrias (F) numerosas e VME (V) livres e conectadas à superfície..... 27
- Figura 3. *Treponema denticola* ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae) com seus flagelos periplasmáticos 28
- Figura 4. *Tannerella forsythia* ATCC 43037 com a camada S-glicosilada (S), membrana externa (OM), membrana citoplasmática (CM) e vesículas de membrana externa (VME), originando-se (triângulo branco). 33
- Figura 5. Visão simplificada das principais rotas de biossíntese dos três grupos de metabólitos secundários e suas conexões com o metabolismo primário do carbono (C). 37
- Figura 6. Compostos que apresentam propriedades bioativas aplicadas no tratamento da periodontite..... 39
- Figura 7. Metabólitos que apresentam propriedades bioativas aplicadas no tratamento da periodontite..... 45
- Figura 8. Distribuições globais das afinidades previstas (*AutoDock Vina*) por alvo. Resumo estatístico das energias do melhor modo de *docking* (*best_energy*, kcal/mol) para os três receptores: Gingipaina K, Cistalisina e Carilisina; $n = 23.771$ ligantes por alvo). A linha horizontal representa o intervalo do mínimo até o primeiro quartil (Q1); a caixa representa o intervalo interquartil (IQR = Q1–Q3); e o traço interno indica a mediana. Valores mais negativos correspondem a escores de *docking* mais favoráveis segundo a função de pontuação do Vina. 63
- Figura 9. Ocupação do sítio catalítico pelas melhores poses de *docking* (*cutoff* = 5,0 Å). Gráfico de barras mostrando, para cada alvo (1C7O, 4IN9 e 6I9A), a porcentagem de ligantes cuja melhor pose (*best_energy*) foi classificada como dentro do sítio (*in_site* = *True*) ou fora do sítio (*in_site* = *False*), com base na menor distância (*min_distance*) entre átomos do ligante e resíduos de referência do sítio (*min_distance* ≤ 5,0 Å). $n = 23.771$ ligantes por alvo. 64
- Figura 10. Complexo do ligante líder no sítio catalítico da Kgp de *P. gingivalis*. À direita, a proteína é mostrada em superfície semitransparente (cinza) e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) posicionado na cavidade catalítica; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua localização no contexto global da estrutura. À esquerda, um *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos de contato com o ligante (ASP³⁸⁸, TYR³⁸⁹, TRP³⁹¹, TRP⁵¹³, ASN⁵¹⁰ e TYR⁵¹²), ilustrando o padrão de ancoragem do composto na cavidade ativa. Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são representados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio. 72
- Figura 11. Complexo do ligante líder no sítio catalítico da Carilisina de *T. forsythia* (4IN9). À direita, a proteína é mostrada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) acomodado na cavidade catalítica; o círculo vermelho delimita a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos envolvidos na estabilização da pose

(TYR¹⁰⁶, VAL¹⁵² e PRO¹⁷⁵). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são representados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio..... 73

Figura 12. Complexo do ligante líder no sítio catalítico da Cistalisina de *T. denticola* (1C7O). À direita, a proteína é apresentada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) posicionado na cavidade catalítica; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos que estabilizam a pose e delimitam o bolso de ligação (VAL³⁸, LEU¹⁷, TYR⁶⁴, TYR¹²³, TYR¹²⁴, VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, ILE²⁰⁵, MET²⁷¹ e PHE²⁷³). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são representados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio. 74

Figura 13. Perfis de Radar de biodisponibilidade (SwissADME) dos 10 *hits* finais (*Top 10 multitarget*), mostrando a adequação simultânea às faixas consideradas favoráveis para biodisponibilidade oral. Em cada radar, os seis eixos representam LIPO (lipofilicidade), SIZE (tamanho), POLAR (polaridade), INSOLU (insolubilidade), INSATU (insaturação) e FLEX (flexibilidade). A área rosa indica a zona de propriedades desejável; o polígono vermelho corresponde às propriedades previstas para cada composto. Painéis: a) mol_18_267; b) mol_12_803; c) mol_16_59; d) mol_22_155; e) mol_1_481; f) mol_5_367; g) mol_0_343; h) mol_0_899; i) mol_5_159; j) mol_14_957. 76

Figura 14. Diagramas *BOILED-Egg* dos 10 *hits* finais (*Top 10 multitarget*). Os gráficos apresentam a relação entre WLOGP (eixo y) e TPSA (eixo x) para cada composto (painéis a–j: a = mol_18_267, b = mol_12_803, c = mol_16_59, d = mol_22_155, e = mol_1_481, f = mol_5_367, g = mol_0_343, h = mol_0_899, i = mol_5_159, j = mol_14_957). A região amarela (BBB) indica a faixa de propriedades associada à permeabilidade pela barreira hematoencefálica, enquanto a região branca (HIA) indica a faixa associada à alta absorção intestinal humana. Os marcadores indicam o *status* previsto de substrato da P-glicoproteína: PGP+ (azul) e PGP– (vermelho). 78

Figura 15. Visualização do complexo 6I9A–mol_22_155 na gingipaína K (*P. gingivalis*). À direita, a proteína é apresentada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) acomodado na cavidade; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua posição no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* evidencia os resíduos do microambiente de ligação (ALA³⁸⁷, ASP³⁸⁸, LYS⁴²², ALA⁴²³, TYR⁴²⁵, ASP⁴⁵² e PRO⁴⁵³) e as principais interações intermoleculares observadas. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são indicados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio..... 80

Figura 16. Visualização do ligante mol_22_155 no sítio catalítico do alvo 4IN9 (Carilisina de *T. forsythia*). À esquerda, a proteína é mostrada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) acomodado na cavidade; o círculo vermelho delimita a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À direita, o *zoom* destaca os principais resíduos do microambiente imediato do bolso de ligação (TYR¹⁰⁶, TYR¹²⁰, ALA¹²⁴ e VAL¹⁵²) e as interações intermoleculares observadas. Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, contatos hidrofóbicos por linhas tracejadas cinza e interações π -stacking por linhas

tracejadas laranja. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio..... 81

Figura 17. Visualização do ligante mol_22_155 no sítio de ligação do alvo 1C7O (Cistalisina de *T. denticola*). À direita, a proteína é mostrada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) posicionado na cavidade; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos que delimitam e estabilizam a pose (VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, TYR⁶⁴, ALA^{96A}, ALA^{96B}, PHE²⁷³, MET²⁷¹ e ASP²⁶⁶). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa; contatos hidrofóbicos por linhas tracejadas cinza; e interações π -stacking por linhas tracejadas laranja. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de virulência da <i>Porphyromonas gingivalis</i> Shah e Collins 1988 (Porphyromonadaceae) e seus mecanismos de ação.	25
Tabela 2. Fatores de virulência da <i>Treponema denticola</i> ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae) e seus mecanismos de ação.	30
Tabela 3. Fatores de virulência da <i>Tannerella forsythia</i> Sakamoto 2002 (Tannerellaceae) e seus mecanismos de ação.	34
Tabela 4. Compostos com propriedades bioativas que podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento periodontal.	42
Tabela 5. Coordenadas finais do centro da <i>grid box</i> e os tamanhos em cada dimensão (Å) para as proteínas virulentas das bactérias do complexo vermelho.	53
Tabela 6. Resíduos de referência representando o núcleo catalítico para o <i>docking</i> molecular.	55
Tabela 7. Ocupação do sítio catalítico pelas melhores poses de <i>docking</i> por alvo (cutoff = 5,0 Å). Número absoluto e porcentagem de ligantes classificados como <i>in_site</i> ou <i>out_site</i> em cada receptor, considerando a melhor pose por ligante (menor <i>best_energy</i>) e o critério geométrico $min_distance \leq 5,0 \text{ Å}$. $n = 23.771$ ligantes por alvo.	65
Tabela 8. <i>Top 10</i> ligantes por alvo (<i>ranking</i> individual) e afinidade prevista pelo AutoDock Vina (<i>best_energy</i> , kcal/mol).	66
Tabela 9. <i>Top 10</i> candidatos <i>multitarget</i> (3/3 <i>in_site</i>) com melhor consenso energético entre Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina.	68
Tabela 10. Identificação química dos <i>Top 10 hits multitarget</i> (3/3). <i>Ligand_id</i> do pipeline e anotação correspondente no COCONUT (InChIKey, nome, identificador CNP e SMILES).	69
Tabela 12. Propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético preditos (<i>in silico</i>) dos compostos selecionados, incluindo lipofilicidade (XLOGP3), peso molecular (MW), polaridade superficial total (TPSA), solubilidade aquosa estimada (ESOL), fração de carbonos sp^3 (Csp ³) e flexibilidade molecular (número de ligações rotáveis), avaliados com base em critérios de <i>drug-likeness</i> e potencial de biodisponibilidade oral.	77
Tabela 11. <i>Top 80</i> candidatos <i>multitarget</i> (3/3 <i>in_site</i>) com melhor consenso energético entre Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT – AutoDockTools

AKT – Proteína quinase B

BspA – *Bacteroides surface protein A*

CAPE – Éster fenetílico do ácido cafeico

cLogP – LogP de Crippen

COX-2 – Ciclooxygenase-2

COCONUT – *COLleCtion of Open Natural prodUcTs*

CR3 – Receptor do complemento 3

ECFP – *Extended-Connectivity Fingerprint*

EGCG – Epigallocatequina-3-galato

ETKDGv3 – *Experimental-Torsion Knowledge Distance Geometry – version 3*

ERK - *Extracellular signal-Regulated Kinase*

ETKDG – *Experimental-Torsion Knowledge Distance Geometry*

FhbB – *H-binding protein B*

FimA – Fímbrias principais

HagA – Hemaglutinina A

HagB – Hemglutinina B

H₂S – Gás sulfídrico

InChIKey – Chave do Identificador Químico Internacional

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

Kgp – Gingipaína K

KLIKK – Sequência terminal de aminoácidos –Lys-Leu-Ile-Lys-Lys

JAK/STAT – *Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription*

LPS – Lipopolissacarídeo

LrrA – Proteína rica em repetições de leucina

LOS – Lipooligossacarídeo

MAPK – Quinase ativada por mitógenos

MASP – Protease de serina associada à lectina ligadora de manose

MBL – Lectina Ligadora de Manose

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

Mfa1 – *Major Fimbrial Antigen 1*

MM/GBSA – *Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area*

MMP – Metaloproteinase da matriz

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

Msp – *Major Surface Protein*

MW – Massa molecular

NAD(P)H – forma reduzida das coenzimas NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)
+ NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NAM – Ácido N-acetilmurâmico

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

Nrf2/ARE – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Antioxidant Response Element*

OppA – *Oligopeptide-binding protein A*

PAINS – *Pan-Assay INterference compoundS*

PAMPs – Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PAR-2 – Receptor de Protease

PDB – *Protein Data Bank*

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PLP – *Pyridoxal 5'-Phosphate*

PPRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões

PrtH – Protease H

Rgp – Gingipaína R

RMSD – Desvio Quadrático Médio

TLR – Receptores *Toll-Like*

TfsA – *Tannerella forsythia surface protein A*

TfsB – *Tannerella forsythia surface protein B*

TPSA – Área de superfície polar topológica

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

T9SS – Proteínas do tipo 9

VME – Vesícula de Membrana Externa

WHO - *World Health Organization*

Wnt – Família de proteínas sinalizadoras

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 PERIODONTITE.....	19
3.2 BACTÉRIAS DO COMPLEXO VERMELHO E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA	21
3.2.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> Shah e Collins 1988 (Porphyromonadaceae). 23	
3.2.2 <i>Treponema denticola</i> ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae)	27
3.2.3 <i>Tannerella forsythia</i> Sakamoto 2002 (Tannerellaceae)	31
3.2.4 Interações bacterianas	35
3.3 TRATAMENTO PERIODONTAL	35
3.4 COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM VEGETAL APLICADOS AO TRATAMENTO PERIODONTAL	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 ALVOS PROTEICOS E A PREPARAÇÃO DOS RECEPTORES	47
4.2. CONSTRUÇÃO E FILTRAGEM DA BIBLIOTECA DE LIGANTES.....	48
4.2.1. Origem dos Compostos e Limpeza Estrutural	48
4.2.2. Filtros de Alertas Estruturais (PAINS, BRENK, NIH)	48
4.2.3. Filtros Físico-Químicos (<i>Drug-Likeness</i> Estrito)	49
4.2.4. Remoção de Duplicatas e Redução de Redundância Estrutural	50
4.3. GERAÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS E PREPARAÇÃO DOS ARQUIVOS (.pdb/.pdbqt).....	51
4.3.1. Geração de Conformações 3D (.pdb)	51
4.3.2. Conversão para (.pdbqt) COM MEEKO.....	51
4.4. DEFINIÇÃO DAS CAIXAS DE DOCKING.....	52
4.5. PROTOCOLO DE DOCKING MOLECULAR	53
4.6. DEFINIÇÃO DOS SÍTIOS CATALÍTICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS POSES DE DOCKING	54
4.7. PÓS-PROCESSAMENTO, RANKING E INTERSEÇÃO MULTITARGET	56
4.8. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE HITS FINAIS.....	57
4.9. AMBIENTE COMPUTACIONAL	58
4.10. PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-LIGANTE COM PLIP E VISUALIZAÇÃO ESTRUTURAL NO PYMOL	60
4.11. PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PROPRIEDADES ADME E AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE ORAL (SWISSADME).....	61
5. RESULTADOS	62

5.1. COMPOSIÇÃO FINAL DA BIBLIOTECA MOLECULAR	62
5.2. DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DAS AFINIDADES POR ALVO	62
5.3. OCUPAÇÃO DO SÍTIO: <i>IN_SITE</i> VS <i>OUT_SITE</i> (<i>CUTOFF</i> = 5,0 Å)	64
5.4. <i>TOP HITS</i> POR ALVO (<i>RANKING</i> INDIVIDUAL)	65
5.5. CONSISTÊNCIA <i>MULTITARGET</i> E SELEÇÃO FINAL POR CONSENSO... 66	
5.6. <i>HIT MULTITARGET</i> PRINCIPAL: ANÁLISE COMPARATIVA NOS TRÊS ALVOS	67
5.7. PREVISÃO ADME DOS COMPOSTOS <i>TOP 10</i>	74
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO	100

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 45% da população mundial é afetada por patologias bucais e, entre as ocorrências, a doença periodontal está em segundo lugar, sendo superada apenas pela cárie dentária (WHO, 2022). No Brasil, de acordo com o resultado do Projeto SB-Brasil 2023, aproximadamente metade da população brasileira apresentou algum grau de comprometimento periodontal, sendo o cálculo dental a condição com maior frequência de registros, 54,13% em adultos de 35 a 44 anos de idade (Brasil, 2025).

O cálculo dental, ou tártaro, como também é conhecido, origina-se das relações interdependentes dos microrganismos presentes no biofilme bacteriano (Oliveira *et al.*, 2023). Dentre as bactérias patogênicas, as do complexo vermelho exercem um papel fundamental na periodontite, as quais compreendem a *Porphyromonas gingivalis* Shah e Collins 1988 (Porphyromonadaceae), *Treponema denticola* ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae) e *Tannerella forsythia* Sakamoto 2002 (Tannerellaceae) (Subbiah *et al.*, 2022; Lazarus *et al.*, 2025).

Nos casos mais avançados, o biofilme bacteriano do cálculo dental subgengival, pode levar a danos irreversíveis do periodonto, com a inflamação gengival generalizada, reabsorções ósseas, mobilidade dental e até perdas de unidades dentárias (Newman e Carranza, 2020). Sendo assim, a periodontite configura-se como uma doença inflamatória crônica, de etiologia multifatorial, com ênfase na resposta imune do hospedeiro e na disbiose microbiana (Kwon *et al.*, 2021).

As doenças periodontais podem comprometer consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes com implicações físicas, emocionais e sociais (Reynolds; Duane, 2018; Wulandari *et al.*, 2022; Hashim *et al.*, 2024), bem como pode estar associada ao agravamento de condições sistêmicas de saúde, como doenças cardiovasculares e diabetes, sendo um problema de saúde pública, e, dessa forma, tornando-se, relevante, investir esforços em sua prevenção e tratamento (Nazir *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2025).

Atualmente, a periodontite é tratada por meio da intervenção clínica do profissional de odontologia, com a remoção do tártaro, através do debridamento periodontal, que é considerado o padrão ouro, composto pela raspagem e alisamento radicular de todos os dentes (Abdulkareem *et al.*, 2021). Este tratamento pode estar associado ou não a outras terapias adjuvantes, dentre os quais destacamos os

antimicrobianos locais ou sistêmicos, agentes físicos, químicos ou moduladores do hospedeiro, além do controle dos fatores de risco e cirurgias periodontais (Figuerro *et al.*, 2023).

No entanto, esses procedimentos podem revelar algumas limitações, como as retrações gengivais decorrentes de raspagens e alisamento extensos e frequentes, hipersensibilidade radicular pós-cirúrgicas (Kaufmann *et al.*, 2020); alteração do paladar e pigmentação dos dentes, pelo uso contínuo da clorexidina (Sun *et al.*, 2024); gerando efeitos colaterais desfavoráveis e resistência microbiana que alguns pacientes podem desenvolver com a utilização dos antibióticos (Tawfig, 2023).

Sob essa perspectiva, compostos bioativos, a exemplo dos polifenóis, alcaloides e terpenos vêm, gradativamente, sendo utilizados como promissoras terapias adjuvantes no tratamento da periodontite, apresentando possíveis atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e efeitos colaterais reduzidos, porém, necessitando de pesquisas que forneçam mais dados sobre a sua eficácia, segurança e estabeleçam normas tanto para a sua regulação, quanto para os processos de produção (Chatzopoulos *et al.*, 2022; Hashim *et al.*, 2024).

Nesse sentido, os bancos de dados públicos, como o COCONUT (*COlleCtion of Open Natural prodUcTs*), reúnem informações sobre compostos bioativos com características farmacológicas que podem ser utilizados em testes *in silico* para a descoberta de potenciais agentes terapêuticos (Sorokina; Steinbeck, 2020). Atualmente, *screening* virtuais têm contribuindo para a redução no tempo de pesquisa, custo de bancada (Pinzi; Rastelli, 2019) e na diminuição do uso de animais experimentais (Lakhan, 2025).

O *docking* molecular é uma dessas abordagens computacionais que vem sendo utilizada na busca por novas formas de tratamento para periodontite, prevendo virtualmente as interações moleculares entre as proteínas-alvos de bactérias presentes no biofilme do cálculo dental e ligantes de compostos naturais (Subbiah *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2024; Kamaraj, 2025; Saini *et al.*, 2025), mas, individualmente para cada bactéria, necessitando de trabalhos que identifiquem substâncias que atuem de forma específica e simultânea em bactérias patogênicas importantes, como as do complexo vermelho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as principais proteínas de virulência das bactérias do complexo vermelho, utilizando-as para identificar potenciais inibidores naturais capazes de interferir nos mecanismos de patogenicidade associados à periodontite, através de abordagens *in silico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão na literatura visando identificar as principais proteínas de virulência descritas para as bactérias do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*);
- Analisar o papel funcional dessas proteínas de virulência nos mecanismos de patogenicidade e progressão da doença periodontal;
- Investigar, por meio de abordagens *in silico*, o potencial de interação de produtos naturais com fatores de virulência selecionados do complexo vermelho;
- Identificar compostos naturais com afinidade prevista para os sítios catalíticos das proteínas-alvo, com potencial inibitório sobre fatores de virulência bacteriana;
- Selecionar candidatos *multitarget* promissores, capazes de interagir com mais de uma proteína de virulência do complexo vermelho, visando estratégias terapêuticas alternativas.
- Caracterizar o perfil farmacocinético e a viabilidade de biodisponibilidade oral dos compostos candidatos, com foco em propriedades ADME.

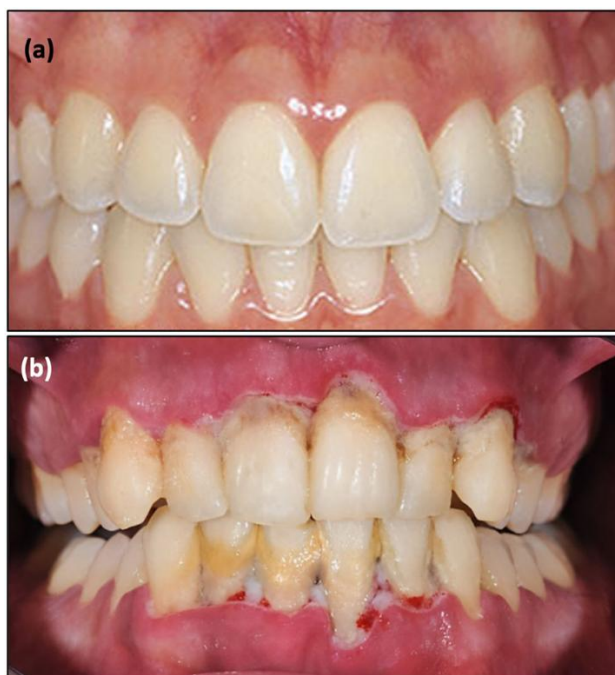
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PERIODONTITE

A periodontite é uma doença inflamatória crônica e multifatorial decorrente de um biofilme bacteriano disbiótico, presente no cálculo dental (Papapanou *et al.*, 2018) e da evasão da resposta imune do hospedeiro (Hajishengallis, 2015), promovendo progressivamente a degradação dos tecidos de suporte dos dentes: o osso alveolar, o ligamento periodontal e o cimento radicular (Papapanou *et al.*, 2018).

Em ambiente clínico, é possível observar que diferente dos pacientes saudáveis (Figura 1a), as pessoas que possuem a periodontite (Figura 1b) apresentam inflamações gengivais que podem levar à perda de inserção clínica, mobilidade dentária, sangramentos gengivais, retrações, formação de bolsas periodontais e, radiograficamente, reabsorção óssea alveolar (Papapanou *et al.*, 2018).

Figura 1. Arcada dentária humana com (a) periodonto saudável e (b) evidenciando uma periodontite instalada, com perda de inserção, presença de bolsas periodontais, retração gengival e sangramento gengival.



Fonte: Rossi Odontologia (2025); Amor Saúde Medicina e Odontologia Exames (2025)

A periodontite apresenta alta prevalência mundial, com cerca de 1,07 bilhão de pessoas afetadas no ano de 2021, concentrando-se em grupos socialmente desfavorecidos, com discreta prevalência entre os homens com idades de 50 e 64 anos (WHO, 2022; Nascimento *et al.*, 2024). Essa patologia traz em suas formas mais severas, perdas de

unidades dentárias, prejuízos na função mastigatória, estética, autoestima e qualidade de vida do ser humano, tornando-se um grave problema de saúde pública, demandando investimentos para o seu tratamento (Papapanou *et al.*, 2018; Wulandari *et al.*, 2022).

No Brasil, em termos populacionais, as doenças periodontais aumentam de acordo com a idade, com a forma mais grave atingindo frequentemente os adultos. No último levantamento epidemiológico realizado, o SB-Brasil 2023, o cálculo dental foi a condição mais comum, tendo os participantes de 35 a 44 anos apresentado a maior prevalência, 54,13%; com 69,66% de perda de inserção periodontal entre 0 a 3mm (Brasil, 2025).

O cálculo dental, ou tártaro, como é comumente denominado, é originado por uma reação de defesa dos microrganismos que residem na boca contra a imunidade do hospedeiro, inicialmente formando a placa dentária. Essa, quando mineralizada, em virtude da presença de cálcio e fósforo oriundos principalmente da saliva, forma essa condição, ocasionando as manifestações clínicas das doenças periodontais (Newman *et al.*, 2023). Assim, observa-se que, muito embora outros determinantes devam ser considerados, o biofilme atua como o agente etiológico primário nessas patologias (Abdulkareem *et al.*, 2021).

Além do tártaro, outros aspectos também devem ser considerados como influenciadores dessas patologias. De acordo com o nível de evidência, existem os fatores predisponentes, associados à idade, hábitos alimentares, nível socioeconômico, atividade física e consumo de álcool; indicadores de risco que incluem doenças cardiovasculares, osteoporose, obesidade, transtornos psicológicos, estresse, distúrbios do sono, deficiência nutricional; e, os fatores de risco, como o tabagismo e diabetes mellitus (Sabine *et al.*, 2025).

Vale também ressaltar que existe uma relação robusta entre a periodontite e algumas doenças sistêmicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, auto-imunes (Rajasekaran *et al.*, 2024), o diabetes mellitus, depressão, doença renal crônica, alguns tipos de câncer (mama, próstata, pulmão, cabeça e pescoço), infecção gástrica por *Helicobacter pylori*, asma, artrite reumatoide, síndrome dos ovários policísticos e doenças inflamatórias intestinais, impactando fortemente a saúde geral de um indivíduo (Botelho *et al.*, 2022).

Comprometimento sistêmico por bactérias periodontopatogênicas pode ser observado após terapias, como raspagem, alisamento radicular e cirurgias periodontais,

aonde a *P. gingivalis* e outros microrganismos, por meio de seus fatores de virulência, podem desencadear a bacteremia, com a ocorrência de endocardite subaguda, potencializando os efeitos do infarto isquêmico, doença cardíaca coronariana e aterosclerose (Aleksijević *et al.*, 2022).

De acordo com a literatura, a periodontite pode produzir efeitos físicos, orais, sistêmicos, psicológicos, sociais e econômicos, tornando-se essencial, compreender a sua microbiologia e patogênese, a fim de investir em pesquisas que priorizem intervenções eficazes (Hashim *et al.*, 2024), somada a requisição de um protocolo de tratamento integrado, com diagnóstico precoce, intervenção profissional adequada e uso de adjuvantes apropriados (Yekani *et al.*, 2025).

3.2 BACTÉRIAS DO COMPLEXO VERMELHO E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA

Do ponto de vista microbiológico, o cálculo dental apresenta uma composição complexa com bactérias aeróbias e anaeróbias (Innocenti *et al.*, 2023), tendo como microrganismos patogênicos relevantes a *T. denticola*, *P. gingivalis* e a *T. forsythia* que se agregam formando o “*complexo vermelho*” ocasionando as condições mais severas da doença periodontal (Yashnova *et al.*, 2025).

A denominação complexo vermelho surgiu em 1998, quando Dr. Sigmund Socransky e colaboradores, definiram as comunidades de espécies bacterianas presentes na placa subgengival, ordenando-os em 05 complexos: roxo e amarelo, encontrados em biofilme saudável; verde, composto por bactérias presentes na formação inicial do biofilme; laranja, formada por espécies anaeróbias gram-negativas, que se fixam por co-adesão e dão início à doença periodontal; e o vermelho, formado pelas bactérias *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* associadas a progressão da patologia e de alta virulência.

Muito embora, outros microrganismos tenham sido identificados como patógenos periodontais, como a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Fernandes *et al.*, 2024), *Retibacterium fastidiosum* (Soueidan *et al.*, 2024) e a *Filifactor alocis* (Faisal; Ali, 2025); estudos recentes, corroboram a importância das bactérias do complexo vermelho na periodontite quanto a sua patogenicidade e virulência (Kametani *et al.*, 2024; Dai *et al.*, 2025; Lazarus *et al.*, 2025; Yashnova *et al.*, 2025).

Os fatores virulentos desenvolvidos por esses patógenos-chave são responsáveis pela colonização, invasão tecidual, modulação do sistema imune e destruição dos tecidos periodontais (Hajishengallis; Lamont, 2012). Os metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias e a proteólise extracelular resultantes dessa virulência, possibilitam uma sinergia entre as bactérias do complexo vermelho, especialmente na progressão e fases mais severas, no qual estão em níveis mais altos e mais frequentes, demonstrando o seu papel significativo nessa patologia (Mohanty *et al.*, 2019).

A presença de determinadas estruturas dos patógenos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, lipoproteínas e flagelina nos tecidos periodontais são identificados como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) pelos receptores *toll-like* (TLR) (Dashper *et al.*, 2011), culminando em uma sucessão de eventos que incluem a ativação do sistema imunológico e da resposta inflamatória (Dunkelberger; Song, 2010).

O sistema complemento exerce um papel primordial na defesa do organismo humano, ativando uma cascata de proteínas ao identificar agentes infecciosos, promovendo a sua opsonização e eliminação. Esse sistema pode atuar por três eixos distintos: a clássica, a da lectina e a alternativa. Quando a via clássica é ativada por complexos antígeno-anticorpo, há o estímulo da produção de mediadores e citocinas pró-inflamatórias, resultando na resposta inflamatória clássica (Dunkelberger; Song, 2010).

Todas as vias do complemento resultam na produção de convertases, responsáveis pela formação de importantes efetores do sistema complemento, as anafilatoxinas (C4a/C3a/C5a), moléculas pró-inflamatórias em potencial, derivadas da clivagem de C4, C3 e C5; o complexo de ataque à membrana (C5b-9), responsável por destruir corpos estranhos; e, opsoninas (C3b) que realizam a fagocitose dos alvos e intensifica a ativação do complemento pela via alternativa (Dunkelberger; Song, 2010).

Acontece que patógenos bem-adaptados apresentam mecanismos evolutivos de impedir ou anular os efeitos desse sistema imunológico, explorando componentes do hospedeiro a seu favor e promovendo o quadro infeccioso (Dunkelberger; Song, 2010). A seguir, pode-se verificar como bactérias do complexo vermelho manipulam os seus alvos, causando a periodontite.

3.2.1 *Porphyromonas gingivalis* Shah e Collins 1988 (Porphyromonadaceae)

Dentre os microrganismos associados à periodontite, *P. gingivalis* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica e não móvel, destacando-se como um agente etiopatogênico chave no desenvolvimento dessa doença (Aleksijević *et al.*, 2022). Esse patógeno está associado à desregulação das vias inflamatórias, do sistema complemento, do ciclo celular e da apoptose periodontal (Chopra *et al.*, 2020).

A *P. gingivalis* é a mais estudada entre os agentes bacterianos envolvidos na periodontite e tem estratégias de sobrevivência especializadas, resistindo a condições desfavoráveis na bolsa periodontal e ao estresse oxidativo, somando-se à habilidade em captar recursos metabólicos, seja pela aquisição de heme/ferro pela via hemoglobina (Messina *et al.*, 2025), como pela decomposição de insumos proteicos essenciais ao seu metabolismo (Karin *et al.*, 2015).

Um outro diferencial que essa bactéria possui e que a torna essencial no processo infeccioso dessa patologia, é o arsenal de fatores de virulência e patogenicidade que a mesma apresenta, como as gingipaínas, fímbrias, vesículas de membrana externa (VME), LPS, hemolisina, hemaglutinina e cápsula (Tabela 1) (Chopra *et al.*, 2020; Aleksijević *et al.*, 2022).

As gingipaínas são enzimas consideradas fatores de virulência cruciais de *P. gingivalis*, sendo responsáveis por cerca de 85% de sua atividade proteolítica extracelular com notável resistência aos inibidores do hospedeiro (Potempa *et al.*, 1997; Diego *et al.*, 2014). As mesmas participam de todas as etapas do processo infeccioso, incluindo adesão, colonização e invasão do periodonto, obtenção de nutrientes e modulação da resposta imunológica (Guo *et al.*, 2010).

Essas proteinases de cisteína clivam substratos proteicos e peptídicos após resíduos de arginina, que são as gingipaínas R (RgpA e RgpB), e após resíduos de lisina que são as gingipaína K (Kgp) (Travis *et al.*, 1997). Os complexos RgpA e Kgp são não covalentes e possuem um domínio de adesão/hemaglutinina e um domínio catalítico; por outro lado, RgpB contém apenas um domínio catalítico e é estruturalmente análoga à subunidade catalítica de RgpA (Imamura, 2003).

Diversas funções têm sido atribuídas às gingipaínas, incluindo a síntese e ativação das fímbrias principais (FimA) (Karin *et al.*, 2015); indução de edema e sangramento por meio da deterioração de fibrinogênio e estímulo das vias da calicreína/cinina; promoção

da via do complemento (Travis *et al.*, 1997); alteração da composição e da organização do biofilme (Messina *et al.*, 2025); e, a destruição tecidual do periodonto, favorecendo a invasão e disseminação dos patógenos periodontais, o que culmina em inflamação crônica e dano tecidual (Messina *et al.*, 2025; Andrian *et al.*, 2004).

Tabela 1. Fatores de virulência da *Porphyromonas gingivalis* Shah e Collins 1988 (Porphyromonadaceae) e seus mecanismos de ação.

FATORES DE VIRULÊNCIA	MECANISMO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
Gingipáinas	Alteração da composição e da organização do biofilme	Messina <i>et al.</i> , 2025
	Síntese e ativação das fímbrias principais (FimA)	Karin <i>et al.</i> , 2015
	Relacionadas a aquisição de heme	Smalley; Olczak, 2017
	Indução de edema e sangramento por meio da deterioração de fibrinogênio e estímulo das vias da calicreína/cinina	Travis <i>et al.</i> , 1997
	Modulação da resposta imune	Guo <i>et al.</i> , 2010
	Ativação da via do complemento (Travis <i>et al.</i> , 1997)	Travis <i>et al.</i> , 1997
	Promoção de inflamação crônica e dano tecidual	Andrian <i>et al.</i> , 2004
	Por não serem reconhecidas pelos PPRs, ativam diretamente o eixo PAR-2 (receptor de protease), havendo a produção de citocina IL-33	Tada <i>et al.</i> , 2016
	Redução do desempenho cognitivo e comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica	Li <i>et al.</i> , 2024
	Formação do biofilme e adesão bacteriana às células hospedeiras	Hasegawa.; Nagano; 2021
Fímbrias	Amplificação da reabsorção óssea	Suzuki <i>et al.</i> 2022
Lipopolissacarídeo (LPS)	Interação com o receptor do complemento 3 (CR3) em monócitos ou macrófagos, subvertendo o sistema imune e reduzindo a produção de citocina IL-12p70	Hajishengallis <i>et al.</i> , 2007
	A heterogeneidade de lipídios A em seu LPS modula o TRL4 de forma diferente, provocando uma subversão às células imunes; além de regular a expressão de IL-6 e IL-8	Herath <i>et al.</i> , 2013
Hemolisina	Auxílio na aquisição de heme	Smalley; Olczak, 2017
Hemaglutinina	Contribuição na aquisição de heme	Smalley; Olczak, 2017
Cápsula	Promoção de resistência fagocitária, dificultando a ação do sistema complemento e dos neutrófilos polimorfonucleares	Mohanty <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Elaborada pela própria autora.

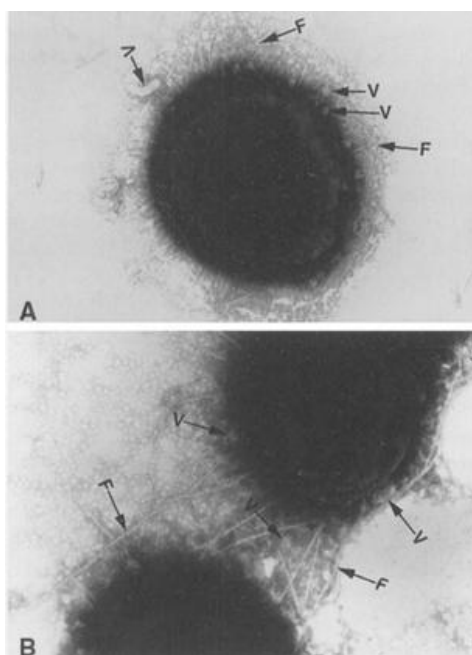
As gingipaínas ainda modulam as respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro de forma complexa e mais eficiente do que os demais periodontopatógenos, regulando-as de acordo com a sua necessidade: estimulando-as, quando em concentrações reduzidas; e, em altos níveis, degradando os receptores e mediadores dessas mesmas vias (Guo *et al.*, 2010).

Devido às suas funções amplas e indispensáveis, essas proteinases tornam-se potenciais alvos terapêuticos específicos (Diego *et al.*, 2014). Recentemente, elas foram associadas à maior gravidade da doença periodontal em indivíduos com diabetes (Al-Janabi *et al.*, 2025) e também propostas como possíveis responsáveis pela redução do desempenho cognitivo e pelo comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica (Li *et al.*, 2024).

As fímbrias de *P. gingivalis* constituem outros fatores virulentos e são classificadas em dois tipos: FimA e Mfa1. Elas promovem a adesão bacteriana ao hospedeiro, favorecendo a agregação tanto entre células da própria espécie quanto com outras espécies patogênicas, contribuindo para a organização e maturação do biofilme subgingival (Hasegawa; Nagano, 2021). Suzuki *et al.* (2022) também demonstraram que o reconhecimento das fímbrias Mfa1 por receptores *toll-like* em osteoclastos auxilia na osteoclastogênese, favorecendo a reabsorção óssea.

A liberação de VME no periodonto por bactérias Gram-negativas orais funciona como um significativo fator de virulência na periodontite, pois essas vesículas transportam diretamente para o hospedeiro diversas substâncias patogênicas, como proteases, toxinas, enzimas, ácidos nucleicos e lipopolissacarídeos (Lazarus *et al.*, 2025). As VME exercem múltiplas funções, incluindo o transporte de agentes virulentos, a formação e maturação do biofilme, a adesão e invasão celular, a promoção da inflamação com consequente dano tecidual, a evasão do sistema imune, além de cooperarem para a resistência antimicrobiana e ambiental (Wang *et al.*, 2025). Na Figura 2, pode-se observar as numerosas fímbrias e VME da *P. gingivalis* livres e conectadas à superfície externa.

Figura 2. *P. gingivalis* com suas fímbrias (F) numerosas e VME (V) livres e conectadas à superfície.



Fonte: Holt *et al.*, 1999

3.2.2 *Treponema denticola* ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae)

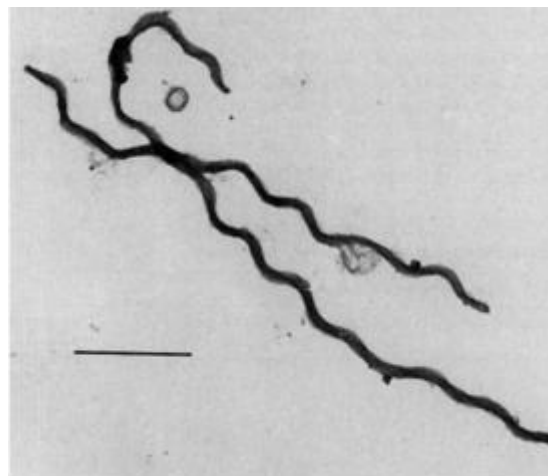
A *T. denticola* é uma espiroqueta Gram-negativa, anaeróbica (Chan *et al.*, 1993), associada ao agravamento da reabsorção óssea alveolar e a única do complexo vermelho que é móvel. Essa bactéria participa da progressão da periodontite por meio de diversos fatores de virulência, incluindo quimiotaxia e motilidade (mediadas por flagelos periplasmáticos), a *Major surface protein* (Msp), dentilisina, cistalisina, lipoproteínas, VME e lipooligossacarídeos (Dashper *et al.*, 2011), conforme podem ser visualizados, com seus respectivos mecanismos de ação na Tabela 2.

A quimiotaxia e a motilidade constituem importantes mecanismos utilizados por esse microrganismo para promover a colonização do hospedeiro. O movimento ocorre por meio da rotação dos flagelos, que se localizam no espaço periplasmático, e pela forma helicoidal do corpo bacteriano, cujo deslocamento lembra o funcionamento de uma hélice. A motilidade de *T. denticola* é um diferencial em relação às demais bactérias do complexo vermelho, permitindo a esse patógeno percorrer com facilidade ambientes altamente viscosos e adaptados às temperaturas fisiológicas, como os do tecido conjuntivo. (Ruby & Charon, 1998; Li *et al.*, 2000).

Graças a esse complexo mótil, *T. denticola* é capaz de invadir tecidos periodontais com integridade comprometida e migrar para bolsas periodontais profundas, orientando-se por quimiotaxia (Lux *et al.*, 2001). Dessa forma, consegue proliferar, sobreviver, obter nutrientes e expandir sua colonização, promovendo coagregação e sinergia no biofilme (Ng *et al.*, 2019). Na figura 3, pode ser visualizada a *T. denticola* com seus flagelos periplasmáticos.

A *Major surface protein* (Msp), é uma glicoproteína responsável pela adesão, modulação imunológica no hospedeiro e por sua capacidade de formar poros, o que a torna citotóxica (Zhao *et al.*, 2025). A associação de *T. denticola* com *P. gingivalis* ocorre por meio desse fator de virulência (Rosen *et al.*, 2008). Já a dentilisina, interage com o fibrinogênio, auxiliando na colonização e interferindo na formação de coágulos (Bamford *et al.*, 2007), além de promover a desregulação das citocinas inflamatórias, reduzindo as interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e o fator de necrose tumoral α , garantindo a persistência da infecção (Miyamoto *et al.*, 2006).

Figura 3. *Treponema denticola* ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae) com seus flagelos periplasmáticos



Fonte: Chan *et al.*, 1993

A cistalisina, um dos principais fatores de virulência de *T. denticola* (Krupka *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2010), é uma proteína dependente de *Pyridoxal 5'-Phosphate* (PLP) que utiliza *L*-cisteína como substrato, rompendo a ligação entre o enxofre gama (S γ) e o carbono beta (C β), produzindo amônia, piruvato e gás sulfídrico (H $_2$ S), o que a torna altamente citotóxica (Krupka *et al.*, 2000). O piruvato e o H $_2$ S, abundantes em bolsas periodontais profundas, estão relacionados à nutrição bacteriana e ao avanço da doença (Chu *et al.*, 2002).

Esse fator de virulência também é responsável pelas atividades hemolíticas e hemooxidantes da bactéria (Chu *et al.*, 1994), promovendo a degradação das hemácias, oxidando hemoglobinas e induzindo hemólise. A ruptura das hemácias permite que *T. denticola* obtenha nutrientes, como aminoácidos e, sobretudo, heme livre proveniente da hemoglobina, tornando essa espécie uma peça importante no consórcio microbiano das bolsas periodontais profundas (Chu *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1999).

As lipoproteínas estão presentes em todos os patógenos e quando detectadas, ativam as células de defesa do hospedeiro, pelo receptor TLR2 e por meio desse, provocam a apoptose de células monocíticas THP-1, contribuindo para a sua persistência nos tecidos subjacentes (Aliprantis *et al.*, 1999), bem como, induzem abundantemente a síntese de citocinas IL-12 pelos macrófagos, potencializando a inflamação (Brightbill *et al.*, 1999).

Outras funções também podem ser reportadas às lipoproteínas, como a *Oligopeptide-binding protein A* (OppA), que tem predileção por ligações às proteínas solúveis, como plasminogênio e fibronectina, cooperando na captação de nutrientes peptídicos (Fenno *et al.*, 2000) e a *Factor H-binding protein B* (FhbB), que é exclusiva da *T. denticola* e interage com o sistema complemento, resultando em evasão da resposta imune hospedeira (Mcdowell *et al.*, 2009).

Os LPS bacterianos contêm um lipídio A (ou endotoxina), um polissacarídeo distal (ou antígeno O) e um oligossacarídeo central não repetitivo. São importantes indutores das defesas do hospedeiro (Raetz; Whitfield, 2002) e impulsionam a reabsorção óssea alveolar pelo estímulo da osteoclastogênese e da expressão de metaloproteinase da matriz (MMP) (Choi *et al.*, 2003).

Os lipooligossacarídeos (LOS), também denominados de glicolipídios, são constituídos de um lipídio à base de glicerol, fosfatos e açúcares no núcleo (Schultz *et al.*, 1998). Essas estruturas induzem a produção de determinados mediadores inflamatórios (Tanabe *et al.*, 2008) e promovem lesões dos tecidos vasculares, resultando em sangramentos (Dauphinee; Karsan, 2006).

Tabela 2. Fatores de virulência da *Treponema denticola* ex Brumpt 1925 (Spirochaetaceae) e seus mecanismos de ação.

FATORES DE VIRULÊNCIA	MECANISMO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
Motilidade e quimiotaxia	Colonização, aquisição de nutrientes, coagregação e sinergia bacteriana	Ng <i>et al.</i> , 2019
Msp	Adesão, modulação imunológica e formação de poros	Zhao <i>et al.</i> , 2025
	Coagregação com <i>P. gingivalis</i>	Rosen <i>et al.</i> , 2008
	Colonização e modulação hemostática	Bamford <i>et al.</i> , 2007
Dentilisina	Persistência da infecção pela desregulação das citocinas inflamatórias	Miyamoto <i>et al.</i> , 2006
	Exacerbação da resposta inflamatória e reabsorção óssea alveolar, através da ativação da via TLR2/6 e consequente estímulo na produção de citocinas IL-36 γ	Hinson <i>et al.</i> , 2022
	Altamente citotóxica pela produção de H ₂ S	Krupka <i>et al.</i> , 2000
Cistalisina	Nutrição e crescimento bacteriano	Chu <i>et al.</i> , 2002
	Atividades hemolíticas e hemooxidantes da bactéria	Chu <i>et al.</i> , 1994
Lipoproteínas	Ativação do receptor TLR2 e promoção da apoptose de células monocíticas THP-1	Aliprantis <i>et al.</i> , 1999
	Potencialização da inflamação, através da indução da síntese de citocinas IL-12 pelos macrófagos	Brightbill <i>et al.</i> , 1999
	Ativação da osteoclastogênese e a da expressão de metaloproteinase da matriz (MMP)	Choi <i>et al.</i> , 2003
LPO	Lesão dos tecidos vasculares pela indução de um complexo de receptores TLR4, CD14 e MD2	Dauphinee; Karsan, 2006
	Indução da produção de mediadores inflamatórios – interleucina-6, interleucina-8, óxido nítrico e prostaglandina E2	Tanabe <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Elaborada pela própria autora

3.2.3 *Tannerella forsythia* Sakamoto 2002 (Tannerellaceae)

A *T. forsythia* é uma bactéria oral Gram-negativa, anaeróbica, não móvel (Sakamoto *et al.*, 2002) e considerada um colonizador tardio do biofilme bacteriano. Seus fatores de virulência incluem as proteínas *Bacteroides surface protein A* (BspA), proteases H (PrtH) e da família KLIKK; sialidases; sistemas de secreção de proteínas do tipo 9 (T9SS) e de O-glicosilação de proteínas; glicoproteínas de superfície, como a *Tannerella forsythia surface protein A* (TfsA) e *Tannerella forsythia surface protein B* (TfsB) da camada S; lipopolissacarídeo do tipo rugoso; e VME (Schäffer & Andrukhov, 2024), conforme podem ser visualizados na Tabela 3, com seus respectivos mecanismos de ação.

As proteases KLIKK correspondem a um grupo de proteínas que compartilham o mesmo domínio C-terminal, apresentando a seguinte sequência terminal de aminoácidos –*Lys-Leu-Ile-Lys-Lys*. Esse grupo inclui três serinoproteases: a mirolase, miropsina-1 e miropsina-2, e três metaloproteases: carilisina, mirolisina e forsilisina. Essas enzimas degradam colágeno e elastina, favorecendo para a destruição dos tecidos periodontais (Ksiazek *et al.*, 2015).

A carilisina é uma metaloproteinase semelhante às MMP humanas e constitui um fator de virulência essencial, por inibir mecanismos imunológicos antimicrobianos do hospedeiro: suprime a atividade do sistema complemento pelo impedimento do reconhecimento e a ligação ao patógeno; bloqueia as vias clássica e de lectina por meio da degradação de ficolina-2, ficolina-3, lectina ligadora de manose e C₄; e, inativa a via terminal, ao suprimir a proteína C₅, bloqueando o recrutamento de neutrófilos (Jusko *et al.*, 2012).

Essa metaloprotease consegue ativar a inflamação ao degradar especificamente elastina, fibrinogênio e fibronectina (Karim *et al.*, 2010), além de sustentá-la por meio do bloqueio do peptídeo antimicrobiano LL-37, deixando o LPS livre (Koziel *et al.*, 2010). A carilisina também é capaz de clivar parcialmente o fator de necrose tumoral α (TNF- α) solúvel, produzido por macrófagos, gerando uma forma ativa da citocina, que induz degradação do tecido periodontal, exacerbando a resposta inflamatória e auxiliando na persistência desse microrganismo no ambiente (Bryzek *et al.*, 2014).

Por pertencer ao filo *Bacteroidetes*, *T. forsythia*, assim como *P. gingivalis*, possui um sistema de secreção de proteínas do tipo 9 (T9SS), responsável por transportar fatores

de virulência para fora da célula que contenham um domínio estrutural de direcionamento C-terminal. No caso de *P. gingivalis*, esse sistema libera gingipaínas para o meio; já em *T. forsythia*, os produtos secretados permanecem na superfície celular, como as proteínas TfsA e TfsB, que compõem a camada superficial (S-layer), e a proteína BspA; influenciando na regulação das respostas inflamatórias (Braun *et al.*, 2022).

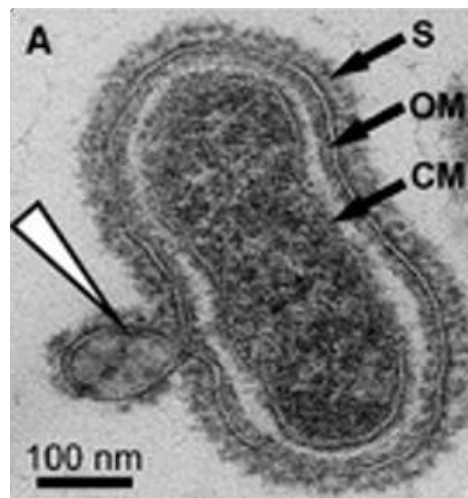
T. forsythia possui ainda uma característica singular: é auxotrófica para o açúcar ácido N-acetilmurâmico (NAM), que precisa ser obtido exogenamente, a partir de detritos de peptidoglicano de outras bactérias, decorrentes de morte celular (Mayer *et al.*, 2020), ou por suas próprias enzimas, como as sialidases. O NAM é essencial para a sobrevivência dessa espécie, atuando tanto como fonte nutricional quanto como componente indispensável para a montagem da camada de peptidoglicano de sua parede celular (Honma *et al.*, 2016).

A O-glicosilação é um sistema utilizado por *T. forsythia*, no qual glicanos como os ácidos nonulosônicos, análogos ao ácido siálico, são adicionados às proteínas, fazendo parte da colonização bacteriana (Bloch *et al.*, 2019). Adicionalmente, confere estabilidade às glicoproteínas, amplificando a virulência desses patógenos (Veith *et al.*, 2021). Quando, esses glicanos estão associados às proteínas TfsA e TfsB, formam a camada S glicosilada, desempenhando funções importantes, como a adesão aos tecidos periodontais (Sakakibara *et al.*, 2007). Na figura 4, é possível detectar por microscopia eletrônica a *T. forsythia* com a presença da camada S-glisosilada e a formação da VME.

Outra função atribuída ao ácido siálico captado pelas sialidases em *T. forsythia* é o mimetismo molecular, no qual esse açúcar é incorporado às estruturas de superfície do LPS e LOS. Isso dificulta sua detecção pelas células de reconhecimento do hospedeiro que também possuem resíduos desse ácido em sua superfície e, consequentemente, subverte a resposta imunológica (Jennings *et al.*, 2022).

O LPS desse patógeno é do tipo rugoso e é responsável por estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6 e TNF- α em macrófagos (Posch *et al.*, 2013). Um fator de virulência que também se destaca é a VME por promover a liberação de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos, como TNF- α e IL-8, incluindo a quimiocina *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) em fibroblastos do ligamento periodontal (Friedrich *et al.*, 2015).

Figura 4. *Tannerella forsythia* ATCC 43037 com a camada S-glicosilada (S), membrana externa (OM), membrana citoplasmática (CM) e vesículas de membrana externa (VME), originando-se (triângulo branco).



Fonte: Friedrich *et al.*, 2015

Tabela 3. Fatores de virulência da *Tannerella forsythia* Sakamoto 2002 (Tannerellaceae) e seus mecanismos de ação.

FATORES DE VIRULÊNCIA	MECANISMO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
Carilisina (KLIKK)	Ativação da inflamação com degradação específica de elastina, fibrinogênio e fibronectina	Karim <i>et al.</i> , 2010
	Modulação da inflamação por meio da inibição do peptídeo antimicrobiano LL-37	Koziel <i>et al.</i> , 2010
	Supressão da atividade do sistema complemento	Jusko <i>et al.</i> , 2012
	Degradação parcial do fator de necrose tumoral α (TNF- α) solúvel, com consequente destruição do tecido periodontal, exacerbação da resposta inflamatória e persistência do patógeno no ambiente	Bryzek <i>et al.</i> , 2014
Mirolase (KLIKK)	Promove a ruptura de fibrinogênio, comprometendo a coagulação na bolsa periodontal	Ksiazek <i>et al.</i> , 2015
BspA	Ativa os receptores TRL2 combinado com o TLR1, modulando a resposta imune do hospedeiro	Onishi <i>et al.</i> , 2008
PrtH	Perda de inserção clínica do tecido periodontal	Pei; Grishin, 2009
Sistema de secreção tipo 9 (T9SS)	Regulação das respostas inflamatórias	Braun <i>et al.</i> , 2022
Camada S glicosilada (TsfA e TsfB)	Supressão da resposta inflamatória pelos neutrófilos Th17, garantindo a persistência da bactéria, e levando à indução das respostas TLR2-Th2, intensificando a reabsorção óssea alveolar	Settem <i>et al.</i> , 2013
	Adesão aos tecidos periodontais	Sakakibara <i>et al.</i> , 2007
VME	Indução de mediadores pró-inflamatórios – fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-8 em macrófagos e de IL-6, IL-8 e MCP-1 em fibroblastos	Friedrich <i>et al.</i> , 2015
LPS rugoso	Estímulo da produção de IL-1, IL-6 e TNF- α	Posch <i>et al.</i> , 2013

Fonte: Elaborada pela própria autora

3.2.4 Interações bacterianas

Tão importantes quanto a própria virulência dessas bactérias periodontopatogênicas são as suas interações estabelecidas para a manutenção e o agravamento da periodontite (Dashper *et al.*, 2011). É possível observar que *P. gingivalis* e *T. denticola* atuam sinergicamente na coagregação e na formação do biofilme, respectivamente, por meio da gingipaína RgpB e das fímbrias principais (Yamada *et al.*, 2005). Paralelamente, a dentilisina de *T. denticola*, em conjunto com a gingipaína de *P. gingivalis*, danificam cooperativamente a vascularidade tecidual, degradando fibrinogênio e resultando em sangramento (Bamford *et al.*, 2007).

Outra interação significativa, diz respeito à proteína rica em repetições de leucina (LrrA) de *T. denticola*, responsável pela adesão aos tecidos e pela associação interbacteriana com *T. forsythia* (Ikegami *et al.*, 2004). Já *P. gingivalis* estimula a adesão e a invasão celular de *T. forsythia* por meio de suas VME (Inagaki *et al.*, 2006), enquanto *T. forsythia*, em condições de restrição nutricional, favorece o desenvolvimento de *P. gingivalis* ao fornecer componentes que são assimilados pelas gingipaínas (Yoneda *et al.*, 2005).

A identificação dessa associação entre as bactérias do complexo vermelho propõe que terapias direcionadas a uma delas, pode acarretar o desequilíbrio da colonização bacteriana desse agrupamento (Socransky *et al.*, 1998). Portanto, os agravos ocasionados por esses microrganismos, decorrentes de seus fatores de virulência, às suas coagregações, interações e cooperação metabólica, devem ser prevenidos e tratados adequadamente por profissionais da odontologia (Yekani *et al.*, 2025).

3.3 TRATAMENTO PERIODONTAL

O tratamento da periodontite tem como foco principal um controle eficaz das bactérias patogênicas, com a remoção do biofilme, a fim de eliminar os riscos de inflamação ou infecção (Suvan *et al.*, 2020). Abordagens diversas são necessárias, compreendendo o controle dos fatores de risco, adoção de hábitos comportamentais saudáveis e cuidados de manutenção periodontal. A remoção mecânica do cálculo dental pelo profissional de saúde é a abordagem de escolha fundamental e pode ser feita pela raspagem supra-gengival, pela instrumentação sub-gengival e cirurgias periodontais, associadas ou não a terapias adjuvantes (Sanz *et al.*, 2020).

Com os avanços tecnológicos, o debridamento periodontal passou a ser realizado com pontas ultrassônicas dotadas de efeito vibratório nas pontas, resfriadas por microfluxo de água, facilitando a remoção de cálculos dentais (Arabaci *et al.*, 2007). Observa-se, também, uma adesão crescente no uso de dispositivos de polimento a jato na terapia periodontal de suporte, proporcionando segurança e rapidez no procedimento e, especialmente, conforto ao ser humano acometido por essa doença (Martins *et al.*, 2023).

No entanto, ressaltam-se alguns efeitos não desejáveis que podem ser ocasionados algumas vezes durante e após a realização desses procedimentos mecânicos que são dor e sensibilidade dentária (Smiley *et al.*, 2015), retração gengival, comprometendo a saúde e conseqüentemente a estética dos dentes e gengiva do paciente (Kaufmann *et al.*, 2020), e um aumento significativo da hipersensibilidade radicular trazendo prejuízos na qualidade de vida (Goh *et al.*, 2016).

Para evitar a formação ou reincidência do tártaro, é essencial que o indivíduo mantenha uma higiene oral adequada, com escovação regular, escovas interdentais, fio dental, dentifrícios e enxaguantes bucais. O dentista deve atuar ativamente na promoção da saúde bucal, orientando, motivando e capacitando o paciente (Sanz *et al.*, 2020). Ainda assim, observa-se com frequência a deposição de novos cálculos dentários, mesmo com tais cuidados, tendo como uma das causas a baixa adesão ao tratamento periodontal de suporte (Echeverría *et al.*, 2019).

A clorexidina é uma das substâncias mais empregadas como adjuvante em estágios mais avançados da periodontite, para o controle eficaz das bolsas periodontais, apresentando propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana local, porém, podendo causar alteração do paladar, pigmentação dos dentes e risco de resistência bacteriana pelo seu uso contínuo (Sun *et al.*, 2024).

Além desses recursos terapêuticos, destaca-se o uso de antibióticos sistêmicos, em protocolos periodontais complementares, especialmente a combinação da amoxicilina ao metrodinazol (Abdulkareem *et al.*, 2021), levantando uma discussão atual e de saúde pública sobre o aparecimento potencial de resistências bacterianas a esses medicamentos, provocando o interesse na busca por novas alternativas terapêuticas (Ushanthika *et al.*, 2021).

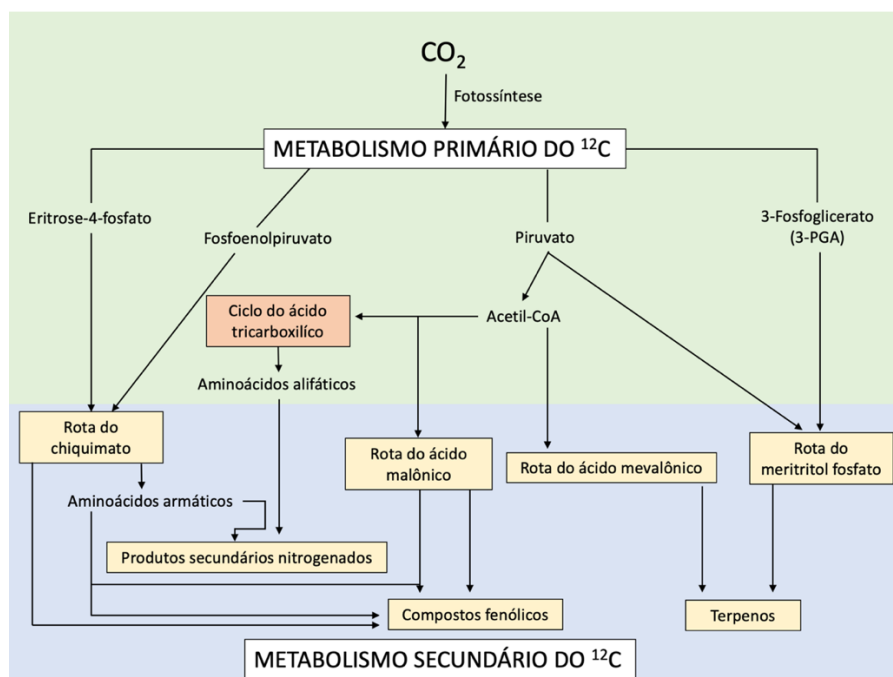
Na tentativa de encontrar novas estratégias de ação que sejam menos invasivas, várias ferramentas vêm surgindo ao longo do tempo para reforçar essas abordagens,

dentre eles, destacamos o laser, os agentes moduladores como as estatinas, os probióticos, a terapia fotodinâmica e com bacteriófagos, mas que carecem de mais estudos científicos a fim de que sejam recomendadas de forma segura (Sanz *et al.*, 2020; Abdulkareem *et al.*, 2021). Nessa perspectiva, os compostos bioativos devido aos seus mecanismos de ação têm despertado o interesse dos pesquisadores e despontando como alternativas promissoras para o tratamento da periodontite (Hashim *et al.*, 2025).

3.4 COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM VEGETAL APLICADOS AO TRATAMENTO PERIODONTAL

Os compostos bioativos de origem vegetal são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e se distribuem em diferentes classes químicas, que se distinguem principalmente por suas fórmulas e estruturas moleculares (Santos, 2020). De forma geral, esses metabólitos são organizados em três grandes classes: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados secundários (Figura 5) (Santos, 2020). A bioatividade desses compostos está relacionada a ação antiinflamatória e antioxidante, tornando-se eficazes no tratamento de doenças periodontais (Sorrenti *et al.*, 2023).

Figura 5. Visão simplificada das principais rotas de biossíntese dos três grupos de metabólitos secundários e suas conexões com o metabolismo primário do carbono (C).



Fonte: Santos, 2020.

O mecanismo de ação dos compostos bioativos pode estar relacionado à interação com a membrana celular dos microrganismos, aumentando sua fluidez e, conseqüentemente, sua permeabilidade. Esse processo pode levar ao extravasamento do conteúdo intracelular e, em última instância, à morte da célula (Nourbakhsh *et al.*, 2022). Além disso, essas substâncias podem inibir enzimas essenciais ao metabolismo e à virulência microbiana (Williams *et al.*, 2020), bem como interferir na comunicação intercelular dependente da densidade celular, bloqueando a expressão gênica associada à formação de biofilmes e à produção de fatores de virulência (Hashim *et al.*, 2025).

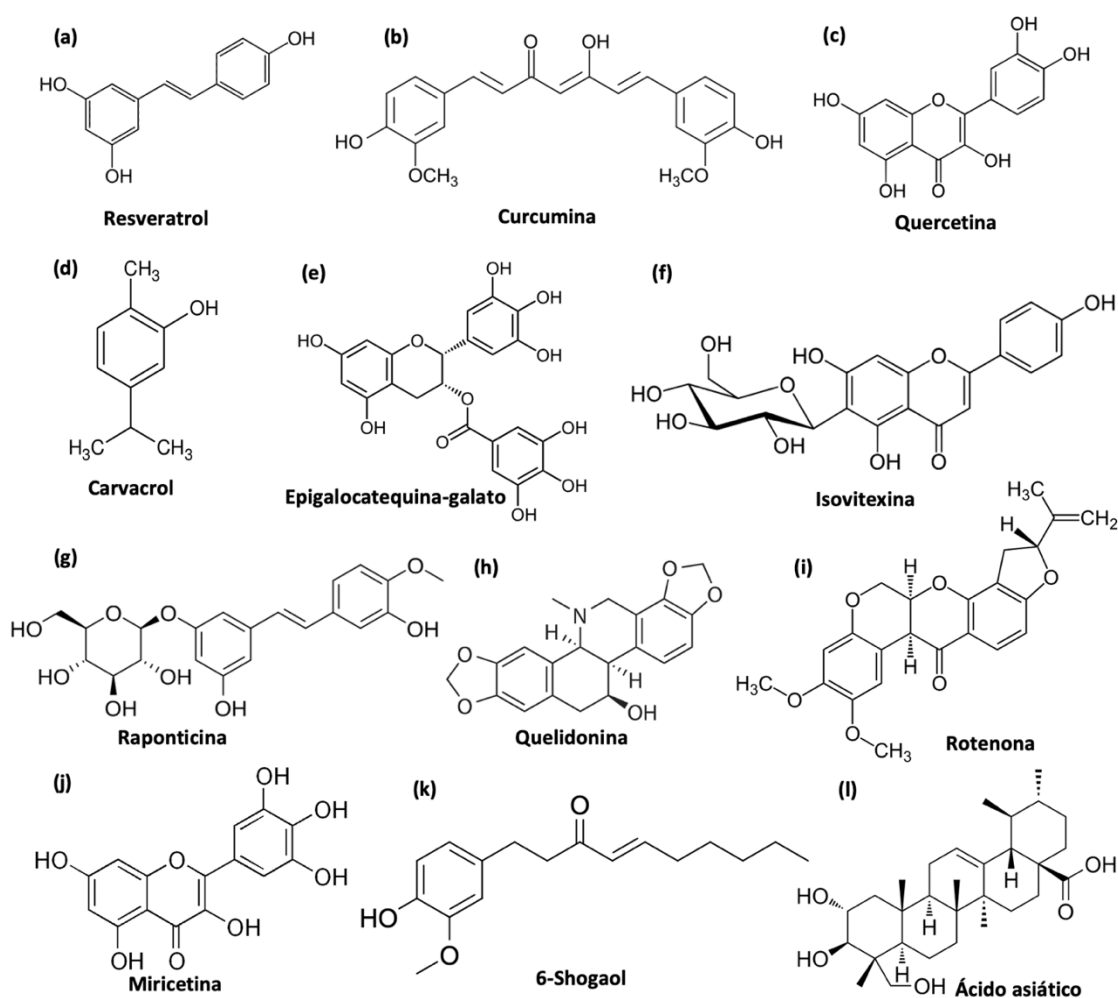
Para o tratamento da periodontite, o uso de constituintes fenólicos como resveratrol (Figura 6a), curcumina (Figura 6b) e quercetina (Figura 6c) tem mostrado resultados promissores, uma vez que esses metabólitos reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, aumentam a expressão de genes osteogênicos e inibem vias de sinalização, como NF- κ B, demonstrando atividades anti-inflamatórias e osteogênicas notáveis para a doença (Tabela 4) (Inchingolo *et al.*, 2022).

Quando combinados com carvacrol (Figura 6d) e epigallocatequina-galato (Figura 6e), esses princípios ativos naturais citados acima, também exibem expressivas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes, incluindo a modulação da expressão de MMP-2 e MMP-9, a inibição das vias MAPK, NF- κ B e JAK/STAT, a ativação da via Nrf2/ARE, além da redução na produção de citocinas e do estresse oxidativo local. Assim, tornando-se potenciais candidatos para o tratamento da periodontite (Hashim *et al.*, 2025).

Além de suas amplas atividades farmacológicas, esses agentes bioativos possuem a vantagem de serem obtidos de fontes naturais. A curcumina, por exemplo, é sintetizada nas raízes de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) (cúrcuma) (Al-Kattan, 2024); o resveratrol é encontrado nas diversas estruturas da videira, inclusive nas uvas, folhas e em seus produtos, como vinho tinto e passas (Capruci, 2025); o carvacrol pode ser extraído do *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) (tomilho) e do *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) (orégano) (Sharifi-Rad *et al.*, 2018); a quercetina é abundante em frutas vermelhas e cítricas, além de cebolas e brócolis (David *et al.*, 2016); e a catequina, especialmente a epigallocatequina-3-galato (EGCG), é encontrada em *Camellia sinensis* L. (Theaceae) (chá-da-índia) (Musial *et al.*, 2020).

No tratamento da periodontite, o resveratrol atua limitando a formação de biofilme e reduzindo a expressão gênica de fatores de virulência, como as fímbrias e as proteinases Kgp e RgpA de *P. gingivalis* (Kugaji *et al.*, 2019). Além disso, controla de forma significativa a inflamação local e a endotoxemia sistêmica (Zhang *et al.*, 2022). Também exibe propriedades regenerativas e anti-inflamatórias, modulando a via ERK/Wnt em células-tronco gengivais e reduzindo a expressão de TLR4, TNF- α e NF- κ B (Tabela 4) (Jiang *et al.*, 2023).

Figura 6. Compostos que apresentam propriedades bioativas aplicadas no tratamento da periodontite.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

A curcumina age reduzindo a expressão de genes associados a fatores de virulência, incluindo os de adesão (fimA, hagA e hagB) e os que codificam proteinases (rgpA, rgpB e kgp) em *P. gingivalis* (Kumbar *et al.*, 2021). Atualmente, sua principal forma de aplicação no tratamento periodontal é o gel de curcumina utilizado como adjuvante à raspagem e alisamento radicular em pacientes com periodontite, apresentando

efeito anti-inflamatório, redução da profundidade de sondagem e diminuição dos níveis salivares de procalcitonina, um marcador de inflamação sistêmica (Abdel-Fatah *et al.*, 2023).

A quercetina, por sua vez, exerce ação na regeneração do osso alveolar em casos de periodontite. Devido a sua baixa solubilidade e biodisponibilidade oral, ela tem sido administrada por meio de sistemas nanoestruturados, que permitem maior eficácia terapêutica. Nessa forma, a quercetina propicia a modulação imunológica de macrófagos, tem efeitos osteoimunomoduladores e restaura a capacidade osteoangiogênica das células-tronco do ligamento periodontal (Tabela 4) (Yang *et al.*, 2024).

No caso da EGCG, estudos experimentais em um modelo de periodontite induzida por *P. gingivalis* demonstraram um pronunciado efeito anti-inflamatório, evidenciado pela redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α na gengiva dos camundongos tratados (Cai *et al.*, 2015).

Em estudos baseados em simulações de *docking* e dinâmica molecular, verificou-se que quercetina, isovitexina (Figura 6f) e raponticina (Figura 6g) são capazes de inibir a citocina pró-inflamatória IL-17 e seu receptor IL-17R, um eixo intimamente associado à periodontite. Entre esses compostos, a isovitexina e a raponticina tiveram as maiores afinidades de ligação e interações mais estáveis com as proteínas-alvo, modulando de forma eficaz a via inflamatória estudada. Esses resultados indicam que ambos os fitoquímicos despontam como potenciais candidatos terapêuticos para o tratamento dessa patologia (Lavru *et al.*, 2025). Já os resultados obtidos para quelidonina (Figura 6h), rotenona (Figura 6i) e miricetina (Figura 6j) mostraram menores energias de ligação, além de indicarem toxicidade insignificante. No entanto, ainda são necessários estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* para confirmar a segurança e a eficácia dessas substâncias (Saini *et al.*, 2025).

6-shogaol (Figura 6k) é um composto majoritário presente nas raízes de *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) (gengibre), pertencente a classe dos fenilpropanoides, que possui efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. No tratamento da periodontite em pacientes que possuem diabetes mellitus essa substância neutralizou as espécies reativas de oxigênio geradas a partir de produtos finais de glicação avançada, além de elevar os níveis das enzimas antioxidantes heme oxigenase-1 e NAD(P)H quinona oxidoreductase 1, em relação às células expostas apenas aos produtos finais de glicação (Nonaka *et al.*, 2019).

O ácido asiático (Figura 6l) é um triterpenoide obtido de *Centella asiatica* (L.) Urban (Apiaceae) (centelha asiática) que demonstra capacidade de suprimir a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 induzidas pelo lipopolissacarídeo de *P. gingivalis* no tecido gengival. Na pesquisa, fibroblastos gengivais humanos e células de macrófagos RAW264.7 foram pré-tratados com ácido asiático por uma hora antes da exposição ao LPS. Os autores observaram que o composto bloqueia a ativação do NF-κB induzida pelo LPS e reduz a produção de mediadores inflamatórios (Hao *et al.*, 2017).

A baicalina (Figura 7a) é um flavonoide glicosilado isolado de *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), reconhecido por sua expressiva atividade anti-inflamatória e por seu uso terapêutico no manejo da periodontite (Cheng *et al.*, 2025). No estudo conduzido por Sun *et al.* (2016) em modelo animal, a administração de baicalina a ratos infectados com *P. gingivalis* reduziu o dano periodontal e a reabsorção óssea alveolar, efeito associado à diminuição da expressão dos receptores TLR2 e TLR4.

O éster fenético do ácido cafeico (CAPE) (Figura 7b) é um composto fenólico, presente na própolis e tem sido apontado como um potencial agente anti-inflamatório para o tratamento de doenças periodontais (Zhang *et al.*, 2014) e pode ser obtido a partir de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae), conhecido como capim-limão. Em fibroblastos gengivais humanos estimulados com LPS, um componente da parede celular da *P. gingivalis*, a aplicação de CAPE em concentrações de até 40 µM reduziu a produção de citocinas IL-6, IL-8, do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da ciclooxygenase-2 (COX-2) (Li *et al.*, 2017).

A cinaropicrina (Figura 7c) é uma lactona sesquiterpênica com reconhecida ação anti-inflamatória (Siedle *et al.*, 2004), encontrada nas folhas de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). Em fibroblastos gengivais humanos estimulados por LPS, esse agente bioativo inibiu a síntese de mRNA e proteína das citocinas IL-6 e IL-8. Além disso, a cinaropicrina reduziu de forma significativa a diferenciação de osteoclastos (Hayata *et al.*, 2018). De forma semelhante, o farrerol (Figura 7d), um 2,3-diidroflavonoide isolado de *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boiss. & Reut.) Hand. Mazz. (Ericaceae), também mostrou efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios, modulando a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos gengivais humanos (Wang *et al.*, 2016).

Tabela 4. Compostos com propriedades bioativas que podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento periodontal.

Nº	Composto	Ação	Formulário usado	Efeitos colaterais esperados	Referências
1	Resveratrol	Anti-inflamatório, antioxidante	Enxaguante bucal ou gel	Raros distúrbios gastrointestinais, reação alérgica.	Botelho <i>et al.</i> , 2009
2	Curcumina	Anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano	Gel tópico	-	Abdel-Fatah <i>et al.</i> , 2023
3	Quercetina	Anti-inflamatório, antioxidante	Enxaguante bucal ou gel tópico	Reações alérgicas mínimas	David <i>et al.</i> , 2016
4	Carvacrol	Antimicrobiano, ruptura de biofilme	Enxaguante bucal ou gel de óleo essencial	Irritação oral, sensação de queimação	Ciandrini <i>et al.</i> , 2014
5	EGCG	Antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante	Enxaguante bucal ou goma de mascar	Possível irritação leve	Steinmann <i>et al.</i> , 2013
6	Isovitexina	-	<i>in vitro</i>	-	Lavu <i>et al.</i> , 2025
7	Raponticina	-	<i>in vitro</i>	-	Lavu <i>et al.</i> , 2025
8	Quelidonina	-	<i>in vitro</i>	-	Saini <i>et al.</i> , 2025
9	Rotenona	-	<i>in vitro</i>	-	Saini <i>et al.</i> , 2025
10	Miricetina	-	<i>in vitro</i>	-	Saini <i>et al.</i> , 2025
11	6-Shogaol	Anti-inflamatórias e antioxidantes	<i>in vitro</i>	-	Nonaka <i>et al.</i> , 2019
12	Ácido asiático	Antioxidante e anti-inflamatório	<i>in vitro</i>	-	Hao <i>et al.</i> , 2017
13	Baicalina	Anti-inflamatória	<i>in vitro</i>	-	Sun <i>et al.</i> , 2016
14	CAPE	Anti-inflamatório	<i>in vitro</i>	-	Zhang <i>et al.</i> , 2014
15	Cinaropicrina	Anti-inflamatório	<i>in vitro</i>	-	Hayata <i>et al.</i> , 2018
16	Farrerol	Antibacteriana e anti-inflamatória	<i>in vitro</i>	-	Wang <i>et al.</i> , 2016

17	Genisteína	Regula a indução da autofagia e inibe a ativação de osteoclastos	Injeção intraperitoneal diária de genisteína (20 mg/kg de peso corporal) durante três semanas	-	Bhattarai <i>et al.</i> 2017
18	Glicirrizina	Anti-inflamatório	<i>in vitro</i>	-	Zhang <i>et al.</i> , 2017
19	Icariina	Anti-inflamatórios e imunomoduladores	Injeção a 0,1 µg mL ⁻¹	-	Zhang <i>et al.</i> , 2018
20	Oridonina	Anti-inflamatório	<i>in vitro</i>	-	Yu <i>et al.</i> , 2019
21	Plantamajoside	Anti-inflamatório	<i>in vitro</i>	-	Liu <i>et al.</i> , 2019
22	Silimarina	Antibacteriana e anti-inflamatória	<i>in vitro</i>	-	Farzanegan <i>et al.</i> , 2019
23	Ácido Vérico	Anti-inflamatória	<i>in vitro</i>	-	Wang <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Adaptado de Hashim *et al.*, 2025.

A genisteína (Figura 7e) é um polifenol dietético abundante em derivados de *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae), popularmente conhecida como soja, e é amplamente reconhecida por seus efeitos benéficos sobre o tecido ósseo. Em modelo animal, a administração intraperitoneal diária de genisteína por três semanas reduziu a perda óssea alveolar induzida por LPS, bem como a degradação do tecido periodontal. Além disso, o tratamento com genisteína suprimiu a formação de osteoclastos e diminuiu a expressão de marcadores inflamatórios na região afetada em camundongos com periodontite (Bhattarai *et al.*, 2017).

Assim como observado para a cinaropicrina e o farrerol, a glicirrizina (Figura 7f), um composto ativo presente nas raízes de *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae), conhecida como alcaçuz, também apresenta atividade anti-inflamatória. Em estudos *in vitro*, a glicirrizina reduziu a produção de IL-6 e IL-8 induzida por LPS, além de diminuir a expressão de COX-2 e iNOS. Esses resultados revelam que a glicirrizina exerce efeitos anti-inflamatórios expressivos em fibroblastos gengivais humanos (Zhang *et al.*, 2017).

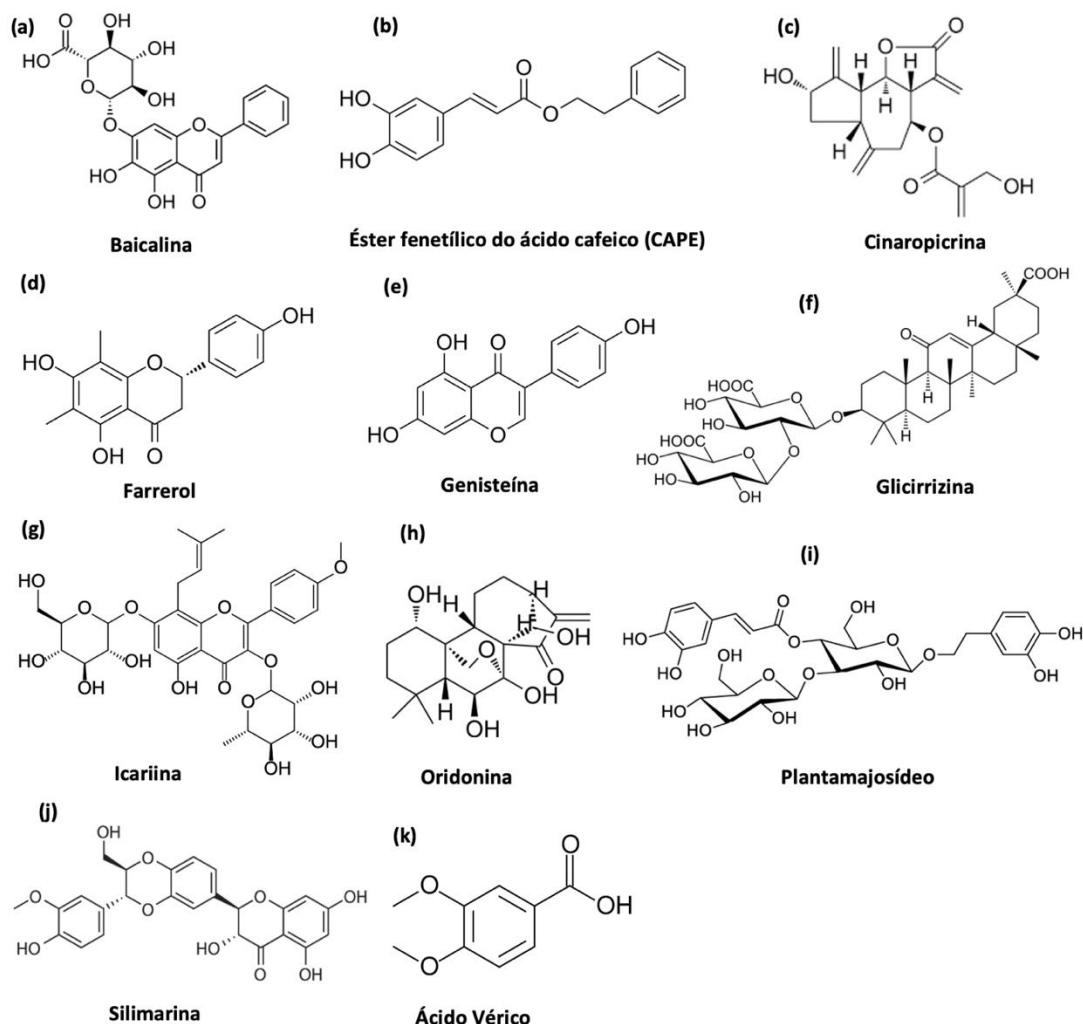
A icariina (Figura 7g) é um flavonoide glicosilado predominante em espécies do gênero *Epimedium*, amplamente utilizado na medicina tradicional chinesa. Em estudos laboratoriais com miniporcos, a administração local de icariina a 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estimulou a regeneração do tecido periodontal e apresentou efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (Zhang *et al.*, 2018).

Outro metabólito que apresenta efeitos positivos no tratamento da periodontite é a oridonina (Figura 7h), o principal terpeno isolado de *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) H. Hara (Lamiaceae), e é reconhecida por sua atividade anti-inflamatória. No estudo de Yu *et al.* (2019), os autores utilizaram um modelo *in vitro* de fibroblastos gengivais humanos estimulados com LPS para avaliar tanto os efeitos anti-inflamatórios quanto o possível mecanismo de ação da oridonina. O composto, aplicado nas concentrações de 10 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi administrado uma hora antes da exposição ao LPS. Os resultados demonstraram que a oridonina reduziu significativamente a produção dos mediadores inflamatórios IL-6 e IL-8.

O plantamajosídeo (Figura 7i) é um glicosídeo fenilpropanóide isolado da *Plantago asiatica* L. (Plantaginaceae), que possui atividade anti-inflamatória. Em fibroblastos gengivais humanos estimulados com LPS de P. gengivais, mostram que o plantamajosídeo exerce efeitos anti-inflamatórios ao inibir a via de sinalização PI3K/AKT composta pela fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e pela proteína quinase B (AKT). Essa inibição impede a ativação do fator de transcrição NF- κ B e,

consequentemente, reduz a expressão de genes pró-inflamatórios em células expostas ao LPS, o lipopolissacarídeo bacteriano utilizado como estímulo inflamatório (Liu *et al.*, 2019).

Figura 7. Metabólitos que apresentam propriedades bioativas aplicadas no tratamento da periodontite.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

A combinação dos polifenóis resveratrol e silimarina (Figura 7j) demonstra potencial para atuar de forma antibacteriana e anti-inflamatória nos tecidos periodontais. O resveratrol reduz a secreção de IL-6 desencadeada por histamina em fibroblastos gengivais humanos, enquanto a silimarina diminui a produção de TNF- α . De acordo com os autores, a associação entre esses dois compostos apresentou efeitos ainda mais pronunciados. Assim, a mistura de resveratrol e silimarina suprimiu de maneira significativa a resposta inflamatória induzida por histamina em fibroblastos gengivais cultivados, reduzindo os níveis de IL-6, IL-8, TPA-1 e TNF- α (Farzanegan *et al.*, 2019).

O ácido verátrico (Figura 7k) é um ácido benzoico simples encontrado em diversas plantas e frutas e possui ações antioxidantes e anti-inflamatórias (Shin *et al.*, 2013). Em fibroblastos gengivais humanos, sua ação foi avaliada frente à resposta inflamatória induzida por LPS. As células foram pré-tratadas com o composto por 1 hora antes da estimulação com LPS. Os resultados indicaram que esse ácido reduziu a produção de IL-6 e IL-8 desencadeada por LPS, além de diminuir a expressão das enzimas inflamatórias iNOS e COX-2 (Wang *et al.*, 2016).

De modo geral, a literatura evidencia a necessidade de ampliar significativamente os estudos *in vivo*, especialmente àqueles voltados à elucidação racional dos mecanismos moleculares que regem as interações estruturais e funcionais entre os compostos bioativos e seus alvos específicos. Investigações desse tipo podem esclarecer de que forma esses metabólitos interferem diretamente nos fatores de virulência de bactérias periodontopatogênicas, fornecendo bases científicas sólidas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas adjuvantes (Hashim *et al.*, 2025).

Hashim *et al.* (2025) também destacam limitações importantes que ainda restringem o avanço de agentes bioativos na prática clínica, como a escassez de ensaios clínicos robustos, a falta de padronização nos desenhos experimentais e problemas relacionados à baixa solubilidade em água, reduzida biodisponibilidade e baixa estabilidade oral de muitos fitoquímicos estudados.

Dentro desse panorama, a análise molecular do cálculo dental surge como uma abordagem particularmente promissora. Estruturalmente estável, o tártaro preserva microrganismos orais, vírus, proteínas humanas, metais pesados e resíduos ambientais e alimentares, constituindo um repositório valioso de informações sobre a saúde bucal (Akcali; Lang, 2018). Essa característica o torna um alvo relevante para estudos *in silico*, permitindo não apenas investigar sua composição e processo de formação, mas também explorar compostos com potencial de agir especificamente sobre bactérias periodontopatogênicas presentes no biofilme (Subbiah *et al.*, 2022).

Nesse contexto, as simulações de *docking* molecular despontam como ferramentas eficazes para prever e analisar a interação de moléculas bioativas com determinados alvos como o cálculo dental, contribuindo para a identificação de agentes terapêuticos inovadores (Forli *et al.*, 2016). Esses recursos contribuem para a seletividade e especificidade de determinados fármacos, reduzindo o risco de resistência antimicrobiana de certas cepas e prevenindo a eliminação indiscriminada de espécies (Chorge *et al.*, 2024).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ALVOS PROTEICOS E A PREPARAÇÃO DOS RECEPTORES

Foram utilizadas três proteínas alvos associadas às bactérias do complexo vermelho, cujas estruturas cristalográficas estão depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (Berman *et al.*, 2000). As estruturas correspondem aos domínios catalíticos da Gingipaína K (Kgp), uma protease lisina-específica de *P. gingivalis* (código: 6I9A) (Guevara *et al.*, 2019), da Cistalisina de *T. denticola* (código: 1C7O) (Krupka *et al.*, 2000) e da Carilisina de *T. forsythia* (código: 4IN9) (Guevara *et al.*, 2013). Todas as estruturas foram determinadas por difração de raios X em complexo com inibidores/ligantes co-cristalizados e apresentam alta resolução (1,20 Å para Kgp; 1,90 Å para cistalisina; 1,55 Å para carilisina), sendo adequadas para estudos de *docking* em nível atômico (Guevara *et al.*, 2019; Krupka *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2013).

A preparação dos receptores seguiu o protocolo padronizado em AutoDockTools (ADT), garantindo consistência entre os três sistemas (Morris *et al.*, 2009). Inicialmente, os arquivos (.pdb) originais foram inspecionados para identificação das principais cadeias e de componentes cristalográficos adicionais. Para cada alvo, manteve-se apenas a cadeia proteica catalítica de interesse, eliminando cópias redundantes presentes na unidade assimétrica e fragmentos de cadeias não envolvidos no sítio ativo. Moléculas de água cristalográficas, íons e ligantes não desejados foram removidos, com exceção de componentes diretamente associados à estrutura/atividade do sítio catalítico quando pertinentes, conforme anotado na entrada estrutural e discutido na literatura correspondente.

Em seguida, procedeu-se à correção de eventuais inconsistências topológicas simples, como resíduos com ocupância parcial ou lacunas distantes do sítio catalítico, quando essas discrepâncias poderiam interferir na definição geométrica do receptor. A protonação dos resíduos foi ajustada para condições fisiológicas (pH ~7,0), aplicando-se o modelo padrão de protonação implementados em AutoDockTools: hidrogênios polares adicionados a resíduos ionizáveis, levando em conta os estados de carga usuais para Asp, Glu, Lys, Arg, His e N- e C-terminais (Morris *et al.*, 2009). Paralelamente, foram atribuídas cargas parciais de Gasteiger a todos os átomos, e, hidrogênios não polares foram fundidos aos átomos pesados correspondentes, conforme o fluxo clássico de preparação de receptores na família AutoDock/Vina (Gasteiger; Marsili, 1980; Morris *et al.*, 2009).

Por fim, os tipos atômicos compatíveis com o campo de força do AutoDock foram definidos no ADT e cada proteína preparada foi salva no formato (.pdbqt), resultando nos arquivos: *6I9A_prepared.pdbqt*, *1C7O_prepared.pdbqt* e *4IN9_prepared.pdbqt*. Esses arquivos constituem as representações finais dos receptores empregadas nas etapas subsequentes de definição das caixas de *docking* e triagem virtual de ligantes.

4.2. CONSTRUÇÃO E FILTRAGEM DA BIBLIOTECA DE LIGANTES

4.2.1. Origem dos Compostos e Limpeza Estrutural

A biblioteca inicial de ligantes foi obtida a partir do banco de dados COCONUT (*COlleCtion of Open Natural prodUCts*), um repositório agregado de produtos naturais construído a partir de múltiplas fontes abertas e disponibilizado para aplicações em quimioinformática e descoberta de fármacos (Sorokina; Steinbeck, 2020). O conjunto bruto foi utilizado em formato (.sdf).

Em um primeiro estágio, os compostos foram submetidos a uma etapa de higienização estrutural utilizando a biblioteca RDKit (disponível em: <<https://www.rdkit.org/>>) uma ferramenta empregada para leitura, padronização e validação de estruturas químicas, além de suportar cálculos de descritores e rotinas de preparo de dados para triagem virtual (Landrum *et al.*, 2015).

Nessa fase, foram removidas moléculas com problemas estruturais críticos que comprometeriam a robustez do *pipeline* nas etapas subsequentes, incluindo casos em que a molécula não era interpretável pelo RDKit (por exemplo, *mol=None*), falhas de sanitização e inconsistências químicas detectadas durante a validação (como erros de valência e conectividade incoerente).

4.2.2. Filtros de Alertas Estruturais (PAINS, BRENK, NIH)

Sobre o conjunto previamente higienizado, foram aplicados filtros de alertas estruturais com o objetivo de priorizar a remoção de moléculas contendo subestruturas frequentemente associadas a interferência em triagens, além de grupos funcionais considerados indesejáveis por risco de reatividade, instabilidade ou recorrência de problemas em bibliotecas de *screening*. Para isso, utilizou-se o RDKit por meio do módulo *FilterCatalog*, configurado com os catálogos PAINS_A, PAINS_B e PAINS_C (Baell; Holloway, 2010), além do catálogo BRENK (Brenk *et al.*, 2008) e do conjunto NIH disponibilizado como catálogo de exclusão no próprio ecossistema do RDKit.

Os filtros PAINS reúnem motivos subestruturais frequentemente relacionados a falsos positivos em múltiplos ensaios, enquanto os catálogos BRENK e NIH agregam padrões ligados a reatividade excessiva, instabilidade e fragmentos com histórico recorrente de problemas em triagens. O critério adotado foi estritamente excludente: qualquer molécula que tivesse ao menos um *match* em qualquer um dos catálogos, foi removida. Essa etapa foi executada no mesmo estágio de triagem em que os filtros físico-químicos foram aplicados, com paralelização por *multiprocessing*, visando reduzir a probabilidade de avançar compostos com maior risco de comportamento artefactual ou quimicamente indesejável na seleção inicial.

4.2.3. Filtros Físico-Químicos (*Drug-Likeness* Estrito)

As moléculas aprovadas na higienização estrutural foram submetidas a um conjunto de filtros físico-químicos conservadores, adotados para restringir a biblioteca a um espaço “*drug-like*” mais estrito em termos de tamanho, lipofilicidade, polaridade e flexibilidade. Esses critérios foram definidos como uma janela operacional inspirada em princípios clássicos de desenvolvimento de fármacos e biodisponibilidade oral, mas ajustada de forma mais restritiva para reduzir custo computacional e priorizar substâncias com maior chance de desempenho em *docking* em fases posteriores (Lipinski *et al.*, 1997; Veber *et al.*, 2002).

A etapa foi implementada no mesmo fluxo do *script coconut_filter_strict_parallel.py*, com cálculo de descritores no RDKit, incluindo massa molecular (MW), logP de Crippen (cLogP), área de superfície polar topológica (TPSA) e número de *ligações* rotáveis. O logP foi estimado pelo método de contribuições atômicas de Wildman–Crippen, amplamente utilizado em *pipeline* de triagem virtual (Wildman; Crippen, 1999), e o TPSA foi calculado por abordagem fragmentária baseada em contribuições, associada à predição de permeabilidade e transporte passivo (Ertl *et al.*, 2000). Foram retidas apenas moléculas que satisfizeram simultaneamente os seguintes limites: $250 \leq \text{MW} \leq 450 \text{ Da}$, $1 \leq \text{logP} \leq 4$, $20 \leq \text{TPSA} \leq 100 \text{ \AA}^2$ e *ligações* rotáveis ≤ 6 . Os filtros físico-químicos foram aplicados conjuntamente aos filtros de alertas estruturais, com paralelização computacional por *multiprocessing*, de modo que qualquer molécula reprovada em pelo menos um dos critérios fosse descartada.

4.2.4. Remoção de Duplicatas e Redução de Redundância Estrutural

Mesmo após a triagem por alertas estruturais e por critérios físico-químicos, a biblioteca resultante ainda poderia conter redundância, tanto na forma de duplicatas exatas quanto na forma de conjuntos de moléculas altamente similares, o que inflacionaria o custo computacional do *docking* e poderia enviesar o *ranking* final por repetição de quimiotipos. Para mitigar esse efeito, realizou-se primeiramente a deduplicação por InChIKey canônico, mantendo-se apenas uma entrada por chave e removendo as duplicatas exatas. O uso de InChI/InChIKey como identificador padronizado é amplamente adotado para colapsar representações equivalentes de uma mesma estrutura em *pipeline* de quimioinformática (Heller *et al.*, 2015).

Em seguida, aplicou-se uma etapa de redução de redundância por similaridade baseada em *fingerprints* circulares e no coeficiente de Tanimoto. Uma estratégia clássica para comparar estruturas representadas por *fingerprints* binários e controlar diversidade química em bibliotecas (Bajusz *et al.*, 2015). Foram geradas *fingerprints* Morgan/ECFP com raio 2 e 2048 bits, que capturam ambientes topológicos locais e são amplamente utilizadas para caracterização molecular e comparação por similaridade (Rogers; Hahn, 2010).

A seleção do subconjunto diverso foi realizada por um esquema sequencial do tipo *leader selection*, no qual uma molécula só era promovida a “centro” quando apresentava similaridade de Tanimoto $< 0,7$ em relação a todos os centros previamente selecionados; caso contrário, era considerada redundante e não era mantida como novo representante. Abordagens de *clustering*, seleção de diversidade baseadas em *fingerprints* e Tanimoto são amplamente empregadas para reduzir conjuntos grandes, preservando cobertura de quimiotipos e evitando super-representação de séries altamente análogas (Butina, 1999).

O conjunto final foi exportado no arquivo *coconut_screen_ready_strict.sdf*, acompanhado do arquivo tabular *coconut_screen_ready_strict.csv*, e foi utilizado como biblioteca consolidada para as etapas subsequentes de geração de conformações 3D e triagem por *docking multitarget*. Toda a rotina foi executada com apoio do ecossistema RDKit, utilizado tanto para geração de *fingerprints* quanto para operações de padronização e manipulação molecular. Essa estratégia prioriza diversidade química e reduz viés por repetição de análogos, ao custo de uma abordagem conservadora que

privilegia representantes por quimiotipo em detrimento da preservação de séries muito próximas nesta fase inicial.

4.3. GERAÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS E PREPARAÇÃO DOS ARQUIVOS (.pdb/.pdbqt)

4.3.1. Geração de Conformações 3D (.pdb)

O conjunto final de ligantes selecionados após as etapas de filtragem do banco COCONUT foi preparado estruturalmente para o *docking* por meio do *script* (*generate_3d_and_pdbqt_meeko_parallel.py*), desenvolvido para operar de forma paralela sobre bibliotecas extensas. A primeira etapa consistiu na geração de uma conformação tridimensional para cada molécula a partir das estruturas contidas em *coconut_screen_ready_strict.sdf*, utilizando RDKit. Para cada ligante, hidrogênios explícitos foram adicionados (*Chem.AddHs*) e mantidos ao longo do processo, uma vez que etapas posteriores de preparação exigem hidrogênios explícitos.

A geometria 3D inicial foi gerada pelo algoritmo *Experimental-Torsion Knowledge Distance Geometry* (ETKDG), na parametrização ETKDGV3 disponibilizada no RDKit, utilizando *seed* fixa (0xF00D) para reprodutibilidade do *embedding* (Riniker; Landrum, 2015). Moléculas que falharam no *embedding* (retorno diferente de zero) foram descartadas nesta etapa, não gerando arquivo de saída correspondente. Cada ligante com conformação 3D válida foi salvo individualmente em formato (.pdb), em diretório dedicado, com nomenclatura baseada no identificador já presente no SDF (*_Name*) quando disponível, ou, alternativamente, no padrão *mol_<chunk_id>_<índice>* para manter rastreabilidade do processamento.

Para viabilizar o processamento em larga escala, o *script* segmentou a biblioteca em blocos de tamanho fixo (*--chunk-size*, padrão 1000 ligantes) e distribuiu esses blocos entre múltiplos processos via *multiprocessing*, reduzindo o tempo total de preparação. O total de moléculas com (.pdb) gerado foi reportado pelo resumo final do *script* (“Total processed molecules”).

4.3.2. Conversão para (.pdbqt) COM MEEKO

Na sequência, as estruturas 3D geradas foram convertidas para o formato (.pdbqt), requerido pelo AutoDock Vina e pelo ecossistema AutoDock para representar, além das coordenadas atômicas, informações essenciais ao *docking*, como tipos atômicos, cargas

parciais e a descrição explícita de torsões/ligação rotável (Morris *et al.*, 2009; Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021). Esse estágio foi realizado com a biblioteca Meeko, que atua como uma camada de preparação molecular programável e de alto desempenho para interoperabilidade com AutoDock/Vina, recebendo moléculas do RDKit já com geometria 3D e hidrogênios explícitos e produzindo uma representação compatível com (.pdbqt), incluindo percepção química, definição de ligações rotáveis e parametrização necessária para o *docking* (Santos-Martins *et al.*, 2025).

Para cada ligante, o *script* carregou a molécula preparada e a submeteu ao fluxo de preparação do Meeko, gerando um arquivo (.pdbqt) individual salvo em diretório dedicado e mantendo o mesmo identificador-base do PDB correspondente, preservando rastreabilidade entre as etapas do *pipeline*. A conversão para (.pdbqt) foi executada em paralelo por *chunks*, seguindo a mesma estratégia de particionamento e distribuição por *multiprocessing* usada na geração 3D, de modo a maximizar o aproveitamento de CPU.

O *script* também incorporou tratamento explícito de falhas: moléculas que apresentaram erros em qualquer etapa (por exemplo, inconsistências químicas residuais, problemas de parametrização ou falha na escrita do (.pdbqt)) tiveram as exceções registradas em log e foram automaticamente descartadas. Com isso, o conjunto final em (.pdbqt) contém apenas ligantes que completaram com sucesso as etapas de geração 3D e parametrização, estando prontos para as campanhas de *docking multitarget* no AutoDock Vina (Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021).

4.4. DEFINIÇÃO DAS CAIXAS DE DOCKING

A caixa de busca do *docking* (*grid box*) foi definida no ADT a partir de evidências estruturais dos complexos cristalográficos, utilizando como referência espacial os ligantes co-cristalizados e a inspeção do sítio catalítico de cada receptor (Morris *et al.*, 2009). Para cada proteína previamente preparada em (.pdbqt) (6I9A_prepared.pdbqt, 1C7O_prepared.pdbqt e 4IN9_prepared.pdbqt), o respectivo ligante experimental foi carregado apenas para orientar o posicionamento e a extensão da caixa, sendo removido antes das execuções de *docking*, de modo a evitar qualquer interferência na busca conformacional (Guevara *et al.*, 2019; Krupka *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2013).

A caixa foi ajustada manualmente para cobrir completamente o volume do sítio de ligação observado experimentalmente e regiões adjacentes, garantindo espaço para acomodar ligantes estruturalmente diversos, o que é particularmente importante para

bibliotecas de produtos naturais. Como verificação adicional, a delimitação do *grid box* foi conferida visualmente para englobar resíduos catalíticos e de reconhecimento relevantes em cada sistema (Guevara *et al.*, 2019; Krupka *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2013).

O centro da caixa foi definido a partir da posição do ligante co-cristalizado e as dimensões foram expandidas até cobrir confortavelmente a cavidade funcional e sub-bolsões adjacentes. As coordenadas finais do centro da caixa e os tamanhos em cada dimensão (em Å) foram definidos (Tabela 5). Em todos os casos, a busca no Vina foi definida exclusivamente pelos parâmetros de centro e dimensões da caixa, mantendo constantes os demais parâmetros do *docking* conforme o protocolo experimental, e as dimensões foram escolhidas para evitar truncamento do sítio e reduzir risco de poses artificiais por restrição espacial (Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021).

Tabela 5. Coordenadas finais do centro da *grid box* e os tamanhos em cada dimensão (Å) para as proteínas virulentas das bactérias do complexo vermelho.

Proteínas	Centralização			Dimensão		
	<i>center_x</i>	<i>center_y</i>	<i>center_z</i>	<i>size_x</i>	<i>size_y</i>	<i>size_z</i>
Gingipaína K	5,555	-16,617	7,942	42	44	42
Cistalisina	20,112	-6,859	21,182	54	46	46
Carilisina	105,821	111,594	-8,598	54	42	56

Fonte: Elaborada pela própria autora.

4.5. PROTOCOLO DE DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular foi conduzido com o AutoDock Vina (v1.2.7), aplicando um protocolo padronizado aos três alvos proteicos (Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina). Em todos os casos, foram utilizados os receptores previamente preparados em (.pdbqt) e a biblioteca de ligantes em (.pdbqt) gerada a partir do conjunto *coconut_screen_ready_strict.sdf* (após filtragem, deduplicação e redução de redundância), garantindo consistência metodológica entre os alvos e possibilitando comparação direta das afinidades estimadas.

A execução em larga escala foi automatizada pelo *script run_vina_batch.py*, que percorre todos os arquivos (*.pdbqt*) do diretório de ligantes, constrói a linha de comando do Vina para cada molécula e executa o *docking* via *subprocess*. Para cada ligante, o *script* incorpora explicitamente os parâmetros da caixa de *docking* (centro e dimensões) previamente definidos para o alvo correspondente (*--center_x*, *--center_y*, *--center_z*, *--size_x*, *--size_y*, *--size_z*) e mantém constantes os parâmetros globais do Vina: *exhaustiveness* = 8, *num_modes* = 9, *energy_range* = 4,0 kcal/mol, *seed* = 12345, além de controlar o número de *threads* por execução individual por meio de *--cpu* (definido pelo argumento *--cpu-per-job*).

A triagem foi paralelizada em nível de processo com *multiprocessing.Pool*, permitindo executar múltiplos *docking* independentes e simultaneamente (*--nprocs*), enquanto o número de *threads* internos por *job* foi mantido sob controle para evitar superalocação de núcleos. Os resultados foram gravados como arquivos individuais no padrão **_out.pdbqt* em um diretório de saída específico por alvo e, quando habilitado, o *script* também gerou log por ligante (*--log-dir*) contendo o comando executado, a saída padrão (*stdout*), mensagens de erro (*stderr*) e o código de retorno, permitindo auditoria de falhas.

Ao final, o *script* reportou um resumo do total de ligantes processados, bem-sucedidos e falhos (retorno diferente de zero), e a padronização da estrutura de saída viabilizou as etapas subsequentes de extração automática de energias, classificação geométrica das poses em relação ao sítio e identificação de *hits multitarget* consistentes.

4.6. DEFINIÇÃO DOS SÍTIOS CATALÍTICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS POSES DE DOCKING

A avaliação da relevância funcional das poses geradas pelo *docking* foi baseada em um critério geométrico objetivo: a proximidade mínima entre a pose do ligante e um conjunto de resíduos representativos do sítio catalítico e dos sub-sítios imediatos de reconhecimento de cada alvo. Para cada uma das proteases estudadas (Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina), foi definido um conjunto de resíduos de referência incluindo resíduos catalíticos e resíduos adjacentes relevantes para reconhecimento, selecionados a partir da literatura estrutural associada às estruturas cristalográficas e da inspeção dos complexos co-cristalizados (Guevara *et al.*, 2019; Krupka *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2013). (Tabela 6).

Tabela 6. Resíduos de referência representando o núcleo catalítico para o *docking* molecular.

Proteínas	Resíduos de Aminoácidos
Gingipaína K	ASP ³⁸⁸ , HSE ⁴⁴⁴ , GLY ⁴⁴⁵ , CYS ⁴⁷⁷ , ILE ⁴⁷⁸ , TRP ⁵¹² , TRP ⁵¹³ , ASP ⁵¹⁶
Cistalisina	VAL ³⁸ , ALA ³⁹ , TYR ⁶⁴ , TYR ¹²³ , TYR ¹²⁴ , ASN ¹⁷⁵ , LYS ²³⁸ , PHE ²⁷³ , ASP ³⁰⁶ , ARG ³⁶⁹
Carilisina	HIS ¹¹⁴ , LEU ¹¹⁵ , TYR ¹⁵² , ILE ¹⁷² , TYR ¹⁷⁴ , PRO ¹⁷⁵ , TYR ¹⁷⁶ , TYR ¹⁷⁷ , LYS ¹⁸¹ , ARG ¹⁸²

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Com base nesses resíduos, definiu-se operacionalmente uma “pose no sítio catalítico” como aquela cuja menor distância entre qualquer átomo do ligante e qualquer átomo pertencente ao conjunto de resíduos de referência do receptor fosse $\leq 5,0$ Å (*cutoff*), um limiar prático para discriminar ocupação efetiva do sítio *versus* poses periféricas dentro da caixa de busca (Trott; Olson, 2010).

A classificação sistemática das poses foi automatizada com o *script classify_poses_by_site.py*, desenvolvido para este projeto, que recebe como entrada o receptor utilizado no *docking* (*.pdb* ou *.pdbqt*), o diretório contendo os arquivos de saída do Vina para um alvo (arquivos *.pdbqt*, tipicamente **_out.pdbqt*) e a lista de resíduos do sítio informada como cadeia:resíduo separada por vírgulas, permitindo também omitir a cadeia (por exemplo, :210 ou 210) para compatibilidade com casos em que a identificação de cadeia não é confiável.

Para cada ligante, o *script* extrai a energia associada à melhor solução reportada pelo Vina a partir da primeira ocorrência de *REMARK VINA RESULT* e reconstrói as coordenadas do ligante a partir do primeiro modo (*MODEL 1*) quando o arquivo contém múltiplos modelos; caso não haja seções *MODEL*, todas as linhas *ATOM/HETATM* são tratadas como uma única pose. Em seguida, são coletadas as coordenadas dos átomos dos resíduos de referência no receptor e é calculada a distância mínima entre o conjunto de átomos do ligante e o conjunto de átomos do sítio, atribuindo-se a *flag in_site* (*True/False*) conforme o *cutoff* definido. Falhas de *parsing* do ligante ou ausência de

átomos recuperáveis resultam em *min_distance* ausente e *in_site=False*, evitando falsos positivos por erro de leitura.

Por fim, os resultados são consolidados em arquivos (.csv) por alvo (por exemplo, *6I9A_site_classification.csv*, *1C7O_site_classification.csv* e *4IN9_site_classification.csv*), contendo para cada ligante: *ligand_id* (derivado do nome do arquivo), *best_energy* (kcal/mol), *min_distance* (Å) e *in_site* (*True/False*), permitindo filtrar rapidamente ligantes com boa afinidade e ocupação efetiva do sítio e sustentar a etapa posterior de integração e *ranking multitarget* entre os três alvos.

4.7. PÓS-PROCESSAMENTO, RANKING E INTERSEÇÃO MULTITARGET

O pós-processamento dos resultados de *docking* teve como objetivo padronizar, ranquear e selecionar *hits multitarget* de forma reprodutível a partir dos arquivos de classificação por sítio gerados na etapa anterior (**_site_classification.csv*). Essa etapa foi automatizada no *script rank_and_select_multitarget_hits.py*, que integra os resultados dos três alvos (Gingipaina K, Cistalisina e Carilissina) e aplica um fluxo único de: (i) leitura e validação dos (.csv) por alvo, (ii) padronização dos identificadores (*ligand_id*) para garantir comparabilidade entre campanhas, (iii) filtragem por ocupação do sítio (*in_site=True*) e por afinidade prevista pelo AutoDock Vina, (iv) geração de *ranking* por alvo e (v) construção de um conjunto final *multitarget* por interseção estrita (3/3), reduzindo o impacto de ruído do *scoring* e variações de pose entre receptores (Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021).

Como entrada, o *script* utiliza os três arquivos *6I9A_site_classification.csv*, *1C7O_site_classification.csv* e *4IN9_site_classification.csv*, contendo ao menos *ligand_id*, *in_site* e uma coluna de afinidade associada à melhor pose reportada pelo Vina (por exemplo, *best_energy*). Durante o carregamento, são realizadas verificações de consistência e padronizações (como conversão de campos para tipos numéricos/booleanos e normalização de nomes), evitando que diferenças de formatação entre execuções prejudiquem a comparação e o ranqueamento.

Em seguida, para cada alvo, mantém-se apenas ligantes classificados como dentro do sítio (*in_site=True*) e que satisfazem um limiar mínimo de afinidade (por exemplo, $\text{best_energy} \leq -7,0$ kcal/mol), priorizando candidatos com interpretação funcional mais direta em termos de possível inibição competitiva/ortostérica (Trott; Olson, 2010). Após a filtragem, os ligantes são ordenados de forma determinística por afinidade (valores mais

negativos primeiro) e, quando aplicável, restringe-se a análise aos *Top N* por alvo para reduzir o espaço de busca da análise *multitarget* sem perder os candidatos mais fortes.

A etapa *multitarget* é construída a partir da integração dos *rankings* por alvo em uma tabela única por *ligand_id*. Como neste trabalho foi adotado exclusivamente o critério estrito 3/3, um ligante só foi mantido como *hit multitarget* quando apresentou simultaneamente ocupação do sítio (*in_site=True*) e afinidade dentro do critério em todos os três alvos. Para priorização final dos *hits multitarget*, o desempenho global foi sintetizado por um escore de consenso baseado nas afinidades previstas nos três sistemas (por exemplo, soma das afinidades), permitindo ordenar candidatos que apresentam bom desempenho de forma consistente nas três proteínas e reduzir a probabilidade de seleção de falsos positivos específicos de um único receptor (Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021).

Como saída, foram gerados arquivos de *ranking* por alvo e uma tabela consolidada *multitarget* (por exemplo, *multitarget_hits.csv*) contendo as métricas por alvo e o escore de consenso, viabilizando diretamente as etapas seguintes de inspeção estrutural, priorização final e anotação química/biológica dos *hits*.

4.8. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE *HITS* FINAIS

A seleção dos *hits* finais foi conduzida com regras objetivas e rastreáveis, combinando (i) afinidade prevista pelo AutoDock Vina, (ii) ocupação geométrica do sítio catalítico (classificação *in_site* baseada na distância mínima aos resíduos de referência) e (iii) consistência *multitarget* entre os alvos (Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina). O uso integrado de critérios energéticos e geométricos busca reduzir falsos positivos associados a limitações do *scoring* e a poses energeticamente favoráveis, porém posicionadas fora da cavidade funcional, aumentando a interpretabilidade mecânica dos candidatos selecionados (Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021). Neste trabalho foi adotado exclusivamente o regime estrito 3/3, de modo que um ligante só foi considerado *hit* final quando apresentou evidência consistente de ocupação do sítio catalítico em todos os sistemas avaliados.

Em termos operacionais, a seleção exigiu o atendimento simultâneo de duas condições em cada um dos três alvos: (1) um limiar mínimo de afinidade por alvo, restando apenas ligantes com $best_energy \leq -7,0$ kcal/mol em Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina; e (2) um critério espacial de ocupação do sítio, exigindo *in_site = True* nos

três alvos (3/3), conforme o *cutoff* geométrico definido no momento de classificação. Assim, o conjunto final de *hits* competitivos (“inibição no sítio”) foi definido como a interseção estrita de ligantes que simultaneamente satisfizeram o critério energético e o critério geométrico nos três receptores, o que aumenta a robustez frente a diferenças estruturais entre proteínas, ruído do *scoring* e variações na pose do melhor modo do *docking*.

Para fins de análise exploratória — sem integração ao conjunto final de *hits* competitivos — ligantes que apresentaram afinidade favorável, mas falharam no critério *in_site* em pelo menos um alvo foi apenas registrado separadamente para inspeção posterior e avaliação de possíveis bolsões periféricos/alostéricos, sem serem considerados *hits* finais no regime 3/3. Dessa forma, os *hits* finais foram definidos de maneira estrita e consistente por ocupação do sítio em 3/3 e afinidade mínima nos três alvos.

4.9. AMBIENTE COMPUTACIONAL

Todos os procedimentos de filtragem da biblioteca COCONUT, geração de estruturas tridimensionais, preparação de receptores, definição das caixas de *docking*, execução das campanhas de acoplamento molecular e pós-processamento dos resultados foram realizados em ambiente Linux em estação de trabalho com CPU *multi-core*, explorando paralelização por múltiplos processos nas etapas de maior custo computacional. A memória RAM disponível foi suficiente para manipulação de bibliotecas em escala de dezenas de milhares de compostos, incluindo leitura/escrita de (*.sdf*) e processamento em lote de milhares de arquivos (*.pdbqt*), sem necessidade de particionamento manual por memória. O *pipeline* foi implementado em *Python* 3.12 e estruturado em *scripts* dedicados.

A filtragem e consolidação da biblioteca foi realizada com RDKit, empregado para leitura e sanitização estrutural, cálculo de propriedades físico-químicas (MW, logP, TPSA e ligações rotáveis), geração de *fingerprints* Morgan (raio 2; 2048 bits) e aplicação de catálogos de alertas estruturais (PAINS_A/B/C, BRENK e NIH) via *FilterCatalog* (Landrum *et al.*, 2015; Baell; Holloway, 2010; Brenk *et al.*, 2008). Essa etapa foi implementada no *script coconut_filter_strict_parallel.py*, combinando uma fase paralela (*multiprocessing*) para sanitização/filtros/cálculo de descritores com uma fase serial no processo principal para deduplicação por InChIKey (Heller *et al.*, 2015) e *leader clustering* por similaridade de Tanimoto com *fingerprints* circulares Morgan/ECFP (Rogers; Hahn, 2010), diminuindo redundância estrutural e preservando diversidade

química (Butina, 1999). Como saída, foi gerada a biblioteca final consolidada (*coconut_screen_ready_strict.sdf*) e um arquivo tabular associado.

A geração de conformações 3D e a preparação dos ligantes foram realizadas no script *generate_3d_and_pdbqt_meeko_parallel.py*, com paralelização por *multiprocessing* e segmentação por blocos (*--chunk-size*). A conformação 3D inicial foi gerada via ETKDGV3 do RDKit, com *seed* fixa para reprodutibilidade, seguindo princípios de *distance geometry* informada e uso de conhecimento torsional experimental para melhorar a qualidade de conformações iniciais (Riniker; Landrum, 2015). Na sequência, as estruturas foram convertidas para (*.pdbqt*) com a biblioteca Meeko, que automatiza a preparação de ligantes para AutoDock/Vina por meio de percepção química, definição de ligações rotáveis e parametrização compatível com esse formato (Santos-Martins *et al.*, 2025). Apenas moléculas cuja escrita do (*.pdbqt*) retornou sucesso, foram mantidas para o *docking*, evitando propagar estruturas inválidas.

Campanhas de *docking* foram executadas com AutoDock Vina v1.2.7, invocado via executável *vina* e orquestrado pelo script *run_vina_batch.py*, mantendo um protocolo padronizado de busca e controle de reprodutibilidade (Trott; Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021). A triagem foi paralelizada em nível de processo (*--nprocs*) e o número de *threads* internos por instância do Vina foi controlado via *--cpu-per-job* (passado ao parâmetro *--cpu*), reduzindo contenção por superalocação de núcleos. Os resultados foram gravados como arquivos individuais (**_out.pdbqt*) por ligante e, quando habilitado, log por ligante foram gerados em diretório dedicado (*--log-dir*) contendo *stdout/stderr* e código de retorno para auditoria de falhas.

O pós-processamento foi automatizado em duas fases: primeiro, as poses foram classificadas quanto à ocupação do sítio catalítico no script *classify_poses_by_site.py*, utilizando um *cutoff* geométrico baseado na distância mínima entre átomos do ligante e resíduos de referência; em seguida, a integração *multitarget* e o *ranking* final foram conduzidos no script *rank_and_select_multitarget_hits.py*, adotando-se exclusivamente o critério estrito 3/3 (ligante elegível no sítio em todos os três alvos) e priorização por consenso de afinidade, gerando saídas consolidadas para inspeção e anotação.

Por fim, a rastreabilidade e o acompanhamento do processamento foram obtidos por mensagens de progresso e sumários impressos pelos *scripts*, podendo ser persistidos como *logs* por redirecionamento da saída padrão; para transparência do custo computacional e reprodutibilidade, recomenda-se reportar em tabela, para cada fase

(filtragem, geração 3D/PDBQT e *docking* por alvo), o número de moléculas processadas, o número final de moléculas válidas e o tempo total, idealmente também normalizado por 1.000 ligantes.

4.10. PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA–LIGANTE COM PLIP E VISUALIZAÇÃO ESTRUTURAL NO PYMOL

A predição de interações intermoleculares entre os ligantes selecionados e os três alvos proteicos foi realizada a partir dos complexos proteína–ligante em coordenadas atômicas (*.pdb*), contendo simultaneamente o receptor e o ligante de interesse na pose final do *docking*. Para padronizar a análise, cada complexo foi salvo como um arquivo PDB único, garantindo que o ligante estivesse definido como heteroátomo (HETATM) e que a identidade do ligante (resname/ID) fosse consistente ao longo dos alvos. Em seguida, as interações foram calculadas com o PLIP (*Protein–Ligand Interaction Profiler*) (Salentin *et al.*, 2015), que identifica automaticamente contatos proteína–ligante a partir de critérios geométricos e químicos. Para cada complexo, o PLIP foi executado em modo de análise de estrutura, detectando e classificando as principais categorias de interação (ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos, pontes salinas, interações π – π e π –cátion, além de outras quando aplicáveis), e produzindo como saída um relatório estruturado e arquivos auxiliares para inspeção.

A visualização e a produção das figuras foram conduzidas no PyMOL (disponível em: <<https://www.pymol.org/>>), utilizando os mesmos complexos analisados no PLIP, com foco em duas escalas complementares: (i) visão global do alvo para contextualizar a localização do ligante na superfície, e (ii) *zoom* do sítio para detalhar resíduos e interações. Em cada estrutura, a proteína foi representada como superfície semitransparente combinada com *cartoon* para evidenciar a topologia global, enquanto o ligante foi exibido em *sticks* com coloração contrastante. Para o painel ampliado, os resíduos do sítio e/ou aqueles reportados pelo PLIP como participantes de interações foram selecionados e mostrados em *sticks*, com rótulos apenas para os resíduos diretamente envolvidos. As interações previstas foram desenhadas como elementos gráficos sobrepostos: ligações de hidrogênio foram destacadas como linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos foram representados como linhas tracejadas cinza, seguindo um padrão visual único entre os três alvos para facilitar comparação. As figuras finais foram geradas por renderização de alta qualidade (*ray tracing*) e exportadas em alta resolução, mantendo a mesma orientação de câmera e escala quando possível, e com

indicação explícita da região ampliada por elipses/contornos e linhas-guia ligando a visão global ao detalhe do sítio.

4.11. PREDIÇÃO *IN SILICO* DE PROPRIEDADES ADME E AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE ORAL (SWISSADME)

Para caracterizar, de forma padronizada, o perfil de propriedades físico-químicas associado a biodisponibilidade oral dos *hits* selecionados, foram gerados gráficos do tipo Radar de biodisponibilidade com a plataforma SwissADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção). Para cada composto, foi utilizado como entrada o código *SMILES* correspondente à estrutura química do ligante. Esses *SMILES* foram obtidos a partir da etapa de anotação/identificação dos ligantes no *pipeline*, garantindo que cada *string* representasse exatamente o composto associado ao respectivo *ligand_id*. Em seguida, cada *SMILES* foi inserido individualmente no campo de consulta do SwissADME e a predição foi executada com as configurações padrão da ferramenta.

A partir do *SMILES* fornecido, o SwissADME calcula automaticamente descritores-chave (incluindo lipofilicidade, tamanho molecular, polaridade, solubilidade, flexibilidade e grau de insaturação) e os sintetiza no Radar de biodisponibilidade, no qual o polígono do composto é comparado a uma faixa de referência (“área rosa”) que representa intervalos típicos considerados favoráveis para biodisponibilidade oral. Neste trabalho, esses gráficos foram utilizados como um instrumento comparativo entre os candidatos finais, permitindo identificar rapidamente moléculas com perfil global compatível com a zona recomendada e aquelas que extrapolam limites em eixos específicos.

5. RESULTADOS

5.1. COMPOSIÇÃO FINAL DA BIBLIOTECA MOLECULAR

A curadoria do banco COCONUT foi conduzida para obter uma biblioteca de produtos naturais em escala manejável, com qualidade estrutural adequada para triagem virtual e diversidade química preservada. O conjunto inicial continha 715.818 moléculas em formato (.sdf). A filtragem foi realizada por um *pipeline* automatizado em Python utilizando RDKit, com execução paralela (*nprocs* = 20), combinando limpeza estrutural, exclusão por alertas subestruturais, filtros físico-químicos estritos e redução de redundância por similaridade.

Após a sanitização/higienização estrutural, foram aplicados filtros de alertas estruturais (PAINS, BRENK e NIH) com critério estritamente excludente, visando reduzir o avanço de compostos frequentemente associados à interferência em triagens e comportamento artefactual (Baell; Holloway, 2010; Brenk *et al.*, 2008). Na sequência, foram aplicados filtros físico-químicos conservadores ($250 \leq MW \leq 450$ Da, $1 \leq \log P \leq 4$, $20 \leq TPSA \leq 100$ Å² e ligações rotáveis ≤ 6), resultando em 57.476 candidatos prováveis.

Para controlar redundância, realizou-se deduplicação por InChIKey, removendo 844 duplicatas exatas (Heller *et al.*, 2015). Em seguida, foi aplicada redução de redundância por similaridade com *fingerprints* Morgan (raio = 2; 2048 bits) e índice de Tanimoto $< 0,7$ em um esquema sequencial de seleção de centros, removendo 32.607 moléculas como redundantes (Rogers; Hahn, 2010). O quantitativo de 24.025 compostos foi exportado como *coconut_screen_ready_strict.sdf*, acompanhado do arquivo tabular *coconut_screen_ready_strict.csv*, para geração 3D no RDKit.

Durante a geração das estruturas 3D e a conversão para (.pdbqt), 254 moléculas apresentaram erro, totalizando 23.771 compostos finais que constituíram a biblioteca definitiva para a realização do *docking multitarget*.

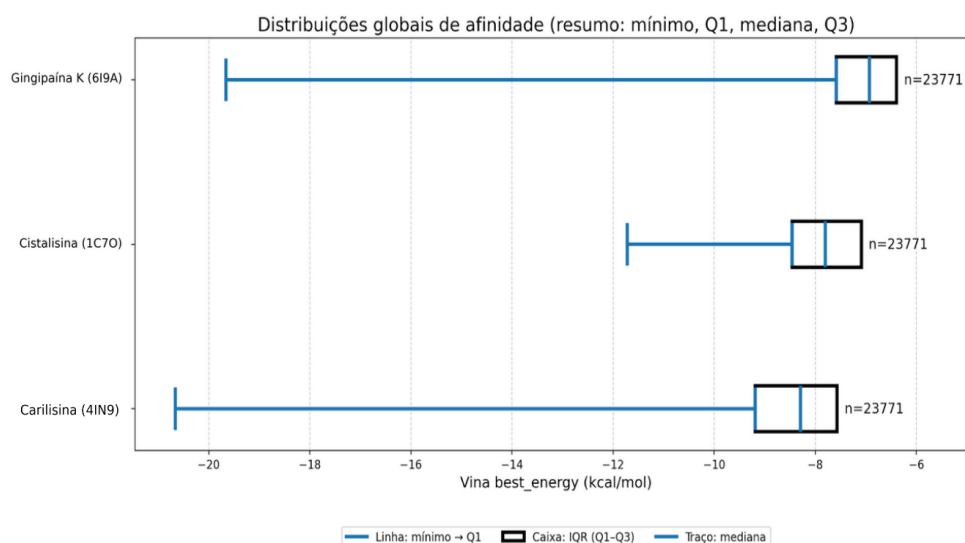
5.2. DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DAS AFINIDADES POR ALVO

A distribuição global das afinidades previstas (kcal/mol), obtidas a partir da melhor pose de cada ligante, revelou perfis distintos entre os alvos avaliados. Para a Gingipaina K, os escores variaram até -19,66, com Q1 = -7,58, mediana = -6,93 e Q3 =

-6,39, indicando uma distribuição concentrada em valores moderados e uma cauda limitada de ligantes com escores altamente favoráveis. Para a Cistalisina, observou-se um deslocamento da distribuição para valores mais negativos, com mínimo de -11,72, Q1 = -8,46, mediana = -7,80 e Q3 = -7,09, sugerindo uma maior proporção de ligantes com escores favoráveis nesse alvo. Esse deslocamento foi ainda mais acentuado para a Carilisina, que apresentou mínimo de -20,66, Q1 = -9,19, mediana = -8,29 e Q3 = -7,57, refletindo, no contexto do escore do AutoDock Vina, uma maior frequência de poses com valores mais negativos (Figura 8).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a mesma biblioteca molecular gerou distribuições de escore distintas para cada receptor sob o mesmo protocolo de *docking*. Essas diferenças refletem variações no comportamento do modelo de pontuação e na exploração conformacional específica de cada sistema, não devendo ser interpretadas como medidas diretamente comparáveis de afinidade real entre proteínas diferentes. Ainda assim, o contraste entre as distribuições fornece um panorama quantitativo relevante para contextualizar os estágios subsequentes de análise, incluindo a classificação geométrica das poses em relação ao sítio catalítico, o ranqueamento específico por alvo e a seleção *multitarget* baseada em critérios combinados.

Figura 8. Distribuições globais das afinidades previstas (*AutoDock Vina*) por alvo. Resumo estatístico das energias do melhor modo de *docking* (*best_energy*, kcal/mol) para os três receptores: Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina; $n = 23.771$ ligantes por alvo). A linha horizontal representa o intervalo do mínimo até o primeiro quartil (Q1); a caixa representa o intervalo interquartil (IQR = Q1–Q3); e o traço interno indica a mediana. Valores mais negativos correspondem a escores de *docking* mais favoráveis segundo a função de pontuação do Vina.

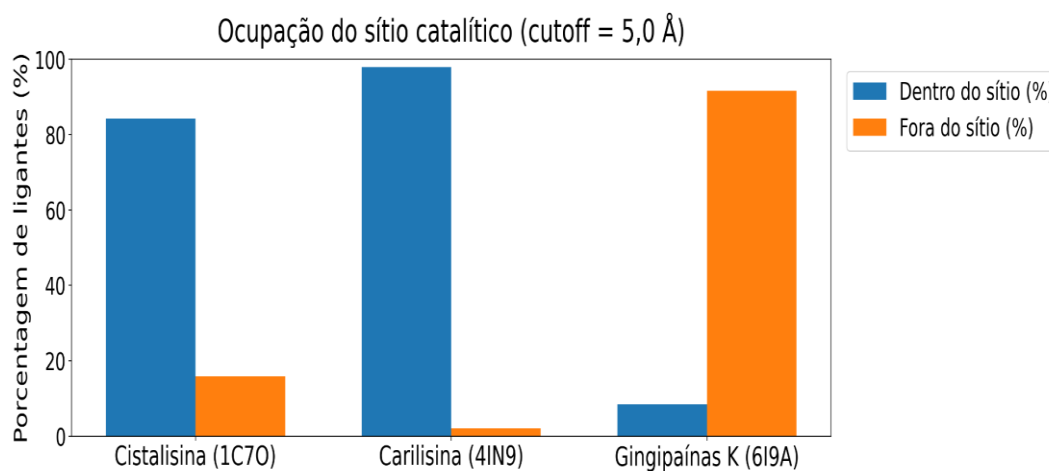


Fonte: Elaborada pela própria autora.

5.3. OCUPAÇÃO DO SÍTIO: *IN_SITE* VS *OUT_SITE* (*CUTOFF* = 5,0 Å)

Os resultados evidenciaram diferenças marcantes entre os receptores quanto à ocupação do sítio ativo pela melhor pose dos ligantes. Para a Cistalisina, 20.008 dos 23.771 ligantes (84,17%) apresentaram a melhor pose classificada como *in_site*, enquanto 3.763 (15,83%) foram classificados como *out_site*. Na Carilisina, a ocupação do sítio foi ainda mais pronunciada, com 23.290 ligantes (97,98%) classificados como *in_site* e apenas 481 (2,02%) como *out_site*. Em contraste, a Kgp apresentou um padrão oposto, no qual a maioria dos ligantes teve a melhor pose fora do sítio catalítico: apenas 2.004 ligantes (8,43%) foram classificados como *in_site*, enquanto 21.767 (91,57%) permaneceram *out_site* (Figura 9; Tabela 7).

Figura 9. Ocupação do sítio catalítico pelas melhores poses de *docking* (*cutoff* = 5,0 Å). Gráfico de barras mostrando, para cada alvo (1C7O, 4IN9 e 6I9A), a porcentagem de ligantes cuja melhor pose (*best_energy*) foi classificada como dentro do sítio (*in_site* = *True*) ou fora do sítio (*in_site* = *False*), com base na menor distância (*min_distance*) entre átomos do ligante e resíduos de referência do sítio (*min_distance* ≤ 5,0 Å). *n* = 23.771 ligantes por alvo.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Tabela 7. Ocupação do sítio catalítico pelas melhores poses de *docking* por alvo (cutoff = 5,0 Å). Número absoluto e porcentagem de ligantes classificados como *in_site* ou *out_site* em cada receptor, considerando a melhor pose por ligante (menor *best_energy*) e o critério geométrico *min_distance* ≤ 5,0 Å. *n* = 23.771 ligantes por alvo.

Alvo	Total	Número de poses dentro do sítio	Número de poses fora do sítio	Porcentagem de poses dentro do sítio	Porcentagem de poses fora do sítio
Cistalisina	23771	20008	3763	84,17%	15,83%
Carilisina	23771	23290	481	97,98%	2,02%
Gingipaína K	23771	2004	21767	8,43%	91,57%

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Essas diferenças indicam que, sob o modelo de pontuação e a estratégia de busca adotados, a melhor solução reportada pelo AutoDock Vina tende a se localizar na cavidade catalítica da Cistalisina e da Carilisina para a maioria dos ligantes, enquanto, na Gingipaína K, a melhor pose é mais frequentemente posicionada fora do sítio definido pelos resíduos de referência. Essa discrepância tem implicações diretas para o pós-processamento dos resultados e justifica a priorização de critérios combinados que incluam a ocupação do sítio (*in_site*), evitando que poses energeticamente favoráveis, porém fora da região funcional, dominem o ranqueamento. Além disso, considerando que o Vina reporta múltiplos modos por ligante, análises complementares podem selecionar, para cada composto, o melhor modo localizado no sítio ativo entre os modos disponíveis, reduzindo o risco de que poses periféricas com escores ligeiramente mais favoráveis obscureçam interações ortostéricas relevantes.

5.4. TOP HITS POR ALVO (RANKING INDIVIDUAL)

Os resultados de ranqueamento por energia evidenciaram comportamentos distintos entre os alvos. Para a Kgp, grande parte dos ligantes melhor pontuados teve a melhor pose fora do sítio catalítico (*in_site* = False), exigindo a análise em dois recortes: um *ranking* global por energia e um *ranking* restrito ao sítio, focado em ligantes compatíveis com ocupação ortostérica. Em contraste, para a cistalisina e a carilisina, os ligantes melhor ranqueados permaneceram predominantemente no sítio catalítico (*in_site* = True), tornando o *ranking* energético mais diretamente interpretável. A Carilisina

apresentou, ainda, escores geralmente mais negativos, refletindo diferenças no comportamento do *scoring* entre os sistemas, e não afinidades reais comparáveis entre proteínas. Portanto, dois perfis emergiram: Cistalisina e Carilisina com *top hits* majoritariamente *in_site*, e Gingipaína K com necessidade de filtragem adicional por ocupação do sítio (Tabela 8).

Tabela 8. *Top 10* ligantes por alvo (*ranking* individual) e afinidade prevista pelo AutoDock Vina (*best_energy*, kcal/mol).

<i>Ranking</i>	Cistalisina		Carilisina		Gingipaína K	
	Ligantes	Afinidade	Ligantes	Afinidade	Ligantes	Afinidade
1	mol_5_268	-11.724	mol_15_491	-20.658	mol_6_729	-17.507
2	mol_4_348	-11.649	mol_12_307	-20.369	mol_17_383	-16.187
3	mol_20_888	-11.600	mol_9_259	-20.124	mol_19_961	-15.681
4	mol_16_10	-11.421	mol_19_71	-19.691	mol_17_219	-15.263
5	mol_5_199	-11.321	mol_10_314	-19.589	mol_19_893	-15.151
6	mol_22_607	-11.283	mol_11_468	-18.723	mol_6_126	-14.572
7	mol_20_451	-11.244	mol_24_9	-18.407	mol_7_495	-14.040
8	mol_18_241	-11.244	mol_6_729	-18.262	mol_19_712	-14.034
9	mol_13_983	-11.212	mol_19_527	-18.184	mol_15_914	-13.913
10	mol_22_368	-11.212	mol_16_493	-18.056	mol_1_136	-13.857

Fonte: Elaborada pela própria autora.

5.5. CONSISTÊNCIA *MULTITARGET* E SELEÇÃO FINAL POR CONSENSO

Após a aplicação do *cutoff* energético, 8.811 dos 23.771 ligantes que passaram pelo *docking* (37,1%) exibiram afinidade satisfatória simultânea nos três alvos. A seleção

final adotou o critério estrito de ocupação do sítio em todos os receptores (3/3 *in_site*), resultando em 296 ligantes, o que corresponde a 3,36% dos elegíveis por afinidade e a 1,25% do total pós-*docking*. Esses 296 ligantes foram priorizados pelo valor médio de energia entre os três alvos (*E_mean*), visando selecionar candidatos com desempenho equilibrado. O conjunto principal reportado corresponde aos 80 ligantes com *E_mean* mais favorável, cujas energias médias variaram aproximadamente de -10,65 a -9,34 kcal/mol, mantendo simultaneamente a ocupação do sítio catalítico em todos os alvos (Tabela 11 – Anexo).

5.6. HIT MULTITARGET PRINCIPAL: ANÁLISE COMPARATIVA NOS TRÊS ALVOS

A aplicação do consenso *multitarget* com critério estrito de ocupação do sítio (3/3 *in_site*) e *cutoff* energético comum resultou em um conjunto final de *hits* com ocupação consistente da cavidade catalítica nos três receptores. Esses ligantes foram ranqueados por um escore de consenso baseado nas afinidades combinadas entre os alvos, priorizando desempenho equilibrado. O *Top 10* final reúne os candidatos mais robustos, com bons escores simultâneos em Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina, e é apresentado na Tabela 9, juntamente com as afinidades por alvo, os *rankings* individuais e o escore de consenso global.

Em seguida, os compostos do *Top 10* foram anotados quimicamente por identificadores do COCONUT (InChIKey, nome, ID e *SMILES*) para garantir rastreabilidade e facilitar etapas posteriores de curadoria e interpretação estrutural. Essa anotação é apresentada na Tabela 10, permitindo vincular cada *ligand_id* do *pipeline* aos respectivos registros químicos, reduzindo ambiguidade e possibilitando reprodutibilidade do conjunto final.

Tabela 9. *Top 10* candidatos *multitarget* (3/3 *in_site*) com melhor consenso energético entre Gingipaina K, Cistalisina e Carilisina.

Ligante	Cistalisina		Carilisina		Gingipaina K		Sum_Afinidade (kcal/mol)
	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	
mol_18_267	-8.599	4832	-14.618	196	-12.268	49	-35.485
mol_12_803	-8.932	3016	-13.435	615	-11.680	107	-34.047
mol_16_59	-8.736	4020	-13.609	520	-11.494	135	-33.839
mol_22_155	-10.808	38	-10.932	2226	-8.253	335	-29.993
mol_1_481	-10.429	112	-10.403	2595	-8.894	312	-29.726
mol_5_367	-10.739	49	-10.579	2450	-8.272	333	-29.590
mol_0_343	-9.995	356	-11.533	1926	-8.012	358	-29.540
mol_0_899	-10.267	177	-10.844	2268	-8.194	339	-29.305
mol_5_159	-10.223	203	-10.698	2358	-8.370	328	-29.291
mol_14_957	-10.559	76	-10.296	2704	-8.315	330	-29.169

Fonte: Elaborada pela própria autora

Tabela 10. Identificação química dos *Top 10 hits multitarget* (3/3). *Ligand_id* do *pipeline* e anotação correspondente no COCONUT (InChIKey, nome, identificador CNP e SMILES).

Ligand_id	InChIKey	Name	Identifier	Smiles
mol_18_267	KDFQABSFVYLGPM-UHFFFAOYSA-N	1-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-3-yl)-3-(3-methylphenyl)urea	CNP0277213.0	<chem>Cc1cccc(NC(=O)NC2N=C(c3ccccc3)c3ccccc3N(C)C2=O)c1</chem>
mol_12_803	XOIUKMRZCKJXAA-KSSFIOAISA-N	N-[(6aS,8S)-2-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-6,11-dioxo-6a,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yl]-2-(methylamino)acetamide	CNP0591052.1	<chem>CNCC(=O)N[C@H]1C[C@H]2C(=O)Nc3ccc(-c4cc(Cl)ccc4OC)cc3C(=O)N2C1</chem>
mol_16_59	YDPUVJFHVSAJSZ-KRWZBQOSA-N	N-benzyl-3-[(3S)-2,5-dioxo-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]-N-methylpropanamide	CNP0310204.1	<chem>CN(Cc1ccccc1)C(=O)CC[C@@H]1NC(=O)c2ccccc2NC1=O</chem>
mol_22_155	LTDIMIUZRAXQDV-UHFFFAOYSA-N	2-[(1'-acetyl-4-oxo-3,4-dihydrospiro[chromene-2,4'-piperidin]-6-yl)oxy]-N-(4-methylbenzyl)acetamide	CNP0572590.0	<chem>CC(=O)N1CCC2(CC1)CC(=O)c1cc(OCC(=O)Nc3ccc(C)cc3)ccc1O2</chem>
mol_1_481	ISAZHTWGN SGJLD-VWNXMTODSA-N	(3aR,10aS)-2-(cyclohexanecarbonyl)-8-(3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,3,3a,10a-tetrahydropyrrolo[3,4-b][1,4]benzoxazepin-5-one	CNP0016509.1	<chem>COc1cccc(-c2ccc3c(c2)O[C@H]2CN(C(=O)C4CCCCC4)[C@H]2N(C)C3=O)c1</chem>
mol_5_367	NCGBVLQPZRZGSN-TYPHKJRUSA-N	~{N}-[[(1~{R},2~{R},4~{S},5~{R})-5-(2-methyl-5-phenyl-pyrazol-3-yl)quinuclidin-2-yl)methyl]-1,3-benzodioxole-5-carboxamide	CNP0010982.1	<chem>Cn1nc(-c2ccccc2)cc1[C@H]1C[N@]2CC[C@H]1C[C@H]2CNC(=O)c1ccc2c(c1)OCO2</chem>
mol_0_343	WWXKFRDVUQFJDQ-CJRSTVEYSA-N	N-[(3S,3aR,6S,6aR)-3-[[4-(4-phenylphenyl)pyrimidin-2-yl]amino]-2,3,3a,5,6,6a-hexahydrofuro[3,2-b]furan-6-yl]cyclopropanecarboxamide	CNP0411686.1	<chem>O=C(N[C@H]1CO[C@H]2[C@@H]1OC[C@H]2Nc1cccc(-c2ccc(-c3ccccc3)cc2)n1)C1CC1</chem>
mol_0_899	KYUAOMWDTQZNKQ-SFTDATJTSA-N	1-(4-phenylpiperazin-1-yl)-2-[(3R,4S)-3-[(5-pyridin-2-yl-1,2-oxazol-3-yl)methyl]piperidin-4-yl]ethanone	CNP0011291.1	<chem>O=C(C[C@@H]1CCNC[C@@H]1Cc1cc(-c2ccccc2)on1)N1CCN(c2ccccc2)CC1</chem>
mol_5_159	PISRNDJXDSKAFL-	1-benzyl-3-[[[(1~{R},2~{R},4~{S},5~{R})-5-(5-cyclopentyl-2-methyl-pyrazol-3-yl)quinuclidin-2-	CNP0011366.1	<chem>Cn1nc(C2CCCC2)cc1[C@H]1C[N@]2CC[C@</chem>

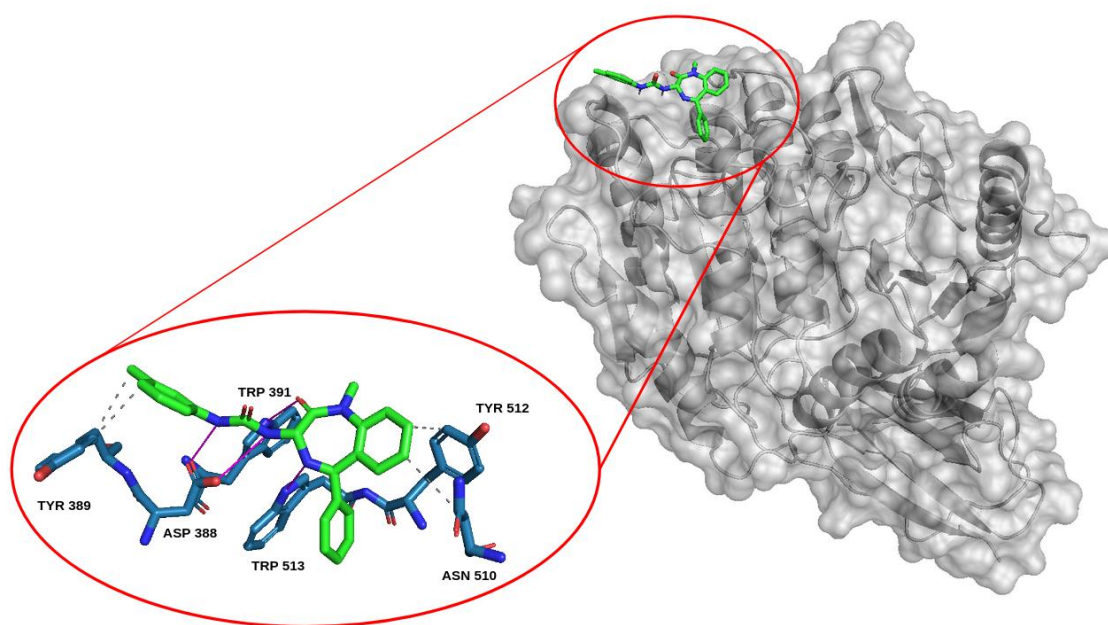
	BDTNDASRSA-N	yl)methyl]urea		H]1C[C@@H]2CNC(=O)NCc1cccc1
mol_14_957	RYUYJWKHQLDRNA-FQEVSTJZSA-N	1-[(6S)-2-phenyl-6,8-dihydro-5H-imidazo[2,1-c][1,4]oxazin-6-yl]-N-(quinolin-2-ylmethyl)methanamine	CNP0495414.1	c1ccc(-c2cn3c(n2)CO[C@@H](CNCc2ccc4cccc4n2)C3)cc1

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Dentre os inibidores testados virtualmente, o resultado mais promissor com a Kgp de *P. gingivalis* mostrou que o ligante líder está acomodado em uma cavidade delimitada pelos resíduos rotulados ASP³⁸⁸, TYR³⁸⁹, TRP³⁹¹, TRP⁵¹³, ASN⁵¹⁰ e TYR⁵¹², que compõem o microambiente imediato do bolso de ligação observado no *zoom*. O arranjo desses resíduos define um *pocket* com caráter misto: de um lado, a presença de ASP³⁸⁸ e ASN⁵¹⁰ indicando a disponibilidade de grupos polares no interior/entrada da cavidade; de outro, a cavidade é fortemente moldada por resíduos aromáticos e hidrofóbicos, como TRP³⁹¹, TRP⁵¹³ e TYR⁵¹², que formam parte da parede do sítio e contribuem para o contorno estérico que envolve o ligante. TYR³⁸⁹ aparece adjacente a essa região, completando a moldura do bolso na vizinhança do composto, sugerindo que a ancoragem ocorre em um segmento do *pocket* onde há simultaneamente espaço para encaixe do esqueleto aromático do ligante e pontos de interação polar.

Quanto às interações explicitamente indicadas na Figura 10, o ligante estabelece uma ligação de hidrogênio representada pela linha rosa, localizada na região próxima de ASP³⁸⁸, TRP³⁹¹, TRP⁵¹³ o que sugere um contato polar específico que ajuda a “fixar” a pose no sítio. Em paralelo, a estabilização é reforçada por contatos hidrofóbicos (linhas tracejadas cinza) distribuídos ao longo do ligante, envolvendo principalmente os resíduos aromáticos ASN⁵¹⁰, TYR³⁸⁹ e TYR⁵¹², consistentes com empacotamento apolar contra as paredes do *pocket*.

Figura 10. Complexo do ligante líder no sítio catalítico da Kgp de *P. gingivalis*. À direita, a proteína é mostrada em superfície semitransparente (cinza) e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) posicionado na cavidade catalítica; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua localização no contexto global da estrutura. À esquerda, um *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos de contato com o ligante (ASP³⁸⁸, TYR³⁸⁹, TRP³⁹¹, TRP⁵¹³, ASN⁵¹⁰ e TYR⁵¹²), ilustrando o padrão de ancoragem do composto na cavidade ativa. Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são representados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio.



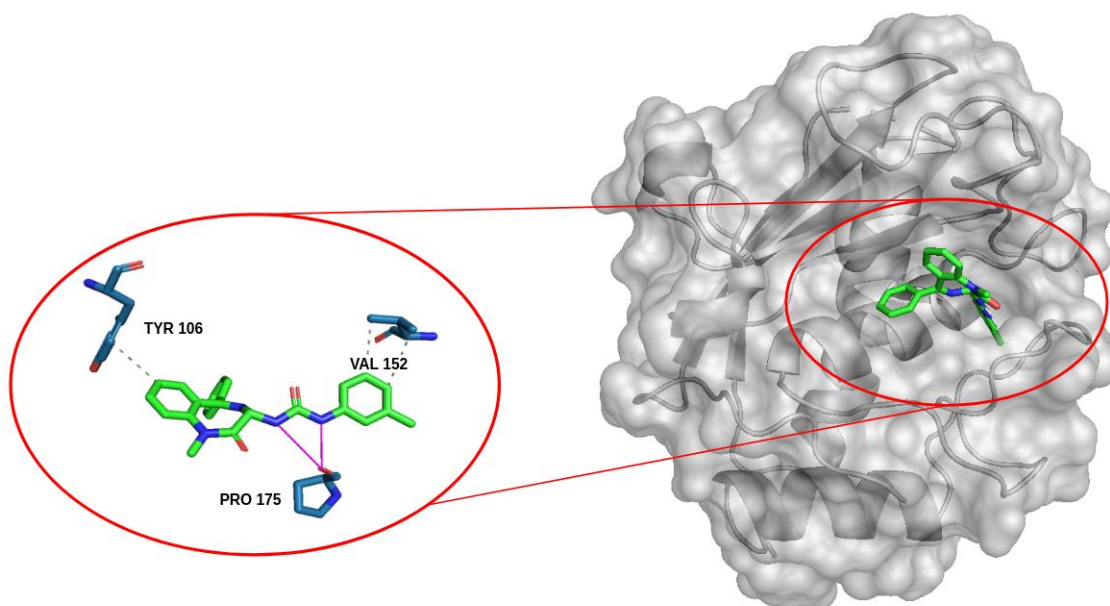
Fonte: Elaborada pela própria autora.

O ligante líder aparece acomodado em uma cavidade bem definida da Carilisina de *T. forsythia*, delimitada pelos resíduos rotulados TYR¹⁰⁶, VAL¹⁵² e PRO¹⁷⁵, que compõem o microambiente imediato do *pocket* observado no *zoom* (Figura 11). A disposição desses resíduos sugere um bolso relativamente compacto, em que a cavidade combina um componente hidrofóbico, associado principalmente a VAL¹⁵² e à própria cadeia lateral de PRO¹⁷⁵, que contribuem para o contorno estérico e apolar do sítio, com a presença de um resíduo aromático/polarizável (TYR¹⁰⁶) que marca uma das bordas do *pocket*. No painel global, a posição do ligante destaca que a ancoragem ocorre dentro da depressão mostrada na superfície, indicando que a pose apresentada está inserida no interior da cavidade e não em uma região superficial aleatória.

Quanto às interações explicitamente indicadas, o ligante estabelece ligações de hidrogênio representadas por linhas rosas, concentradas na região central do composto e direcionadas ao entorno de PRO¹⁷⁵, sugerindo um ponto de ancoragem polar importante

nessa vizinhança imediata. Além disso, observam-se contatos hidrofóbicos (linhas tracejadas cinza) conectando o ligante a TYR¹⁰⁶ e VAL¹⁵², consistentes com estabilização apolar ao longo das extremidades do ligante dentro do *pocket*.

Figura 11. Complexo do ligante líder no sítio catalítico da Carilisina de *T. forsythia* (4IN9). À direita, a proteína é mostrada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) acomodado na cavidade catalítica; o círculo vermelho delimita a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos envolvidos na estabilização da pose (TYR¹⁰⁶, VAL¹⁵² e PRO¹⁷⁵). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são representados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio.



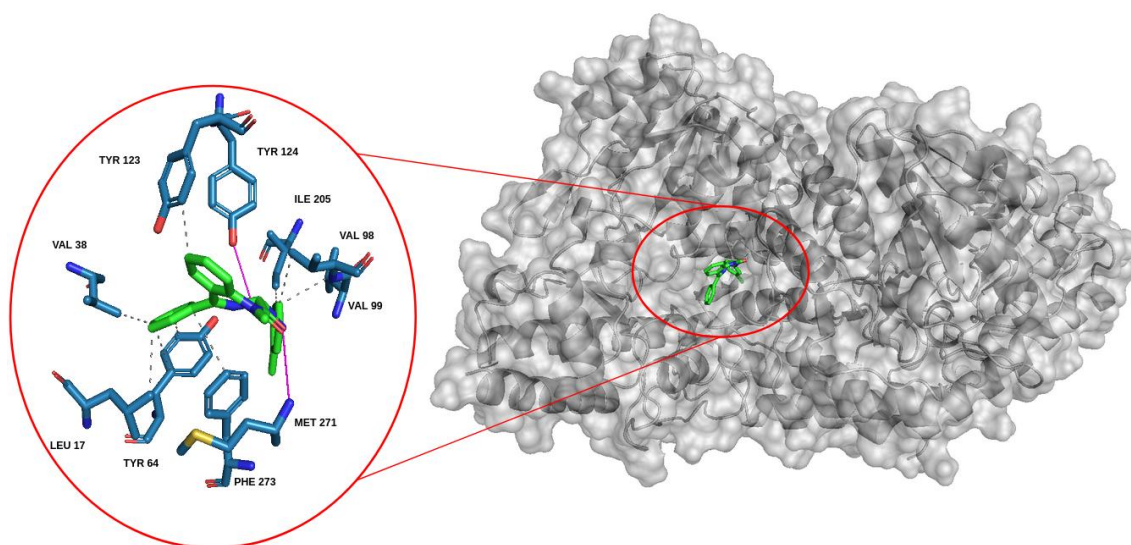
Fonte: Elaborada pela própria autora.

A Figura 12 evidencia que o ligante líder está encaixado no bolso catalítico de Cistalisina de *T. denticola*, cercado principalmente por resíduos apolares (VAL³⁸, LEU¹⁷, VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, ILE²⁰⁵, MET²⁷¹) e por um “anel” aromático que molda a cavidade (TYR⁶⁴, TYR¹²³, TYR¹²⁴, PHE²⁷³). Esse conjunto delimita um *pocket* majoritariamente hidrofóbico, com superfícies rígidas fornecidas por tirosinas/fenilalanina e ajuste estérico dado por valinas/isoleucina/leucina/metionina.

No detalhamento das interações, predominam contatos hidrofóbicos (tracejado cinza) entre o ligante e VAL³⁸, LEU¹⁷, TYR⁶⁴, VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, ILE²⁰⁵, MET²⁷¹ e PHE²⁷³. Há também ligações de hidrogênio (linhas rosas) envolvendo o ligante e a região de TYR¹²³/TYR¹²⁴ e MET²⁷¹, que ajudam a orientar a pose dentro do sítio. O ligante líder está encaixado no bolso catalítico de Cistalisina de *T. denticola*, cercado principalmente por resíduos apolares (VAL³⁸, LEU¹⁷, VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, ILE²⁰⁵, MET²⁷¹) e por um “anel”

aromático que molda a cavidade (TYR⁶⁴, TYR¹²³, TYR¹²⁴, PHE²⁷³). Esse conjunto delimita um *pocket* majoritariamente hidrofóbico, com superfícies rígidas fornecidas por tirosinas/fenilalanina e ajuste estérico dado por valinas/isoleucina/leucina/metionina.

Figura 12. Complexo do ligante líder no sítio catalítico da Cistalisina de *T. denticola* (1C7O). À direita, a proteína é apresentada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) posicionado na cavidade catalítica; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos que estabilizam a pose e delimitam o bolso de ligação (VAL³⁸, LEU¹⁷, TYR⁶⁴, TYR¹²³, TYR¹²⁴, VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, ILE²⁰⁵, MET²⁷¹ e PHE²⁷³). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são representados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

5.7. PREVISÃO ADME DOS COMPOSTOS TOP 10

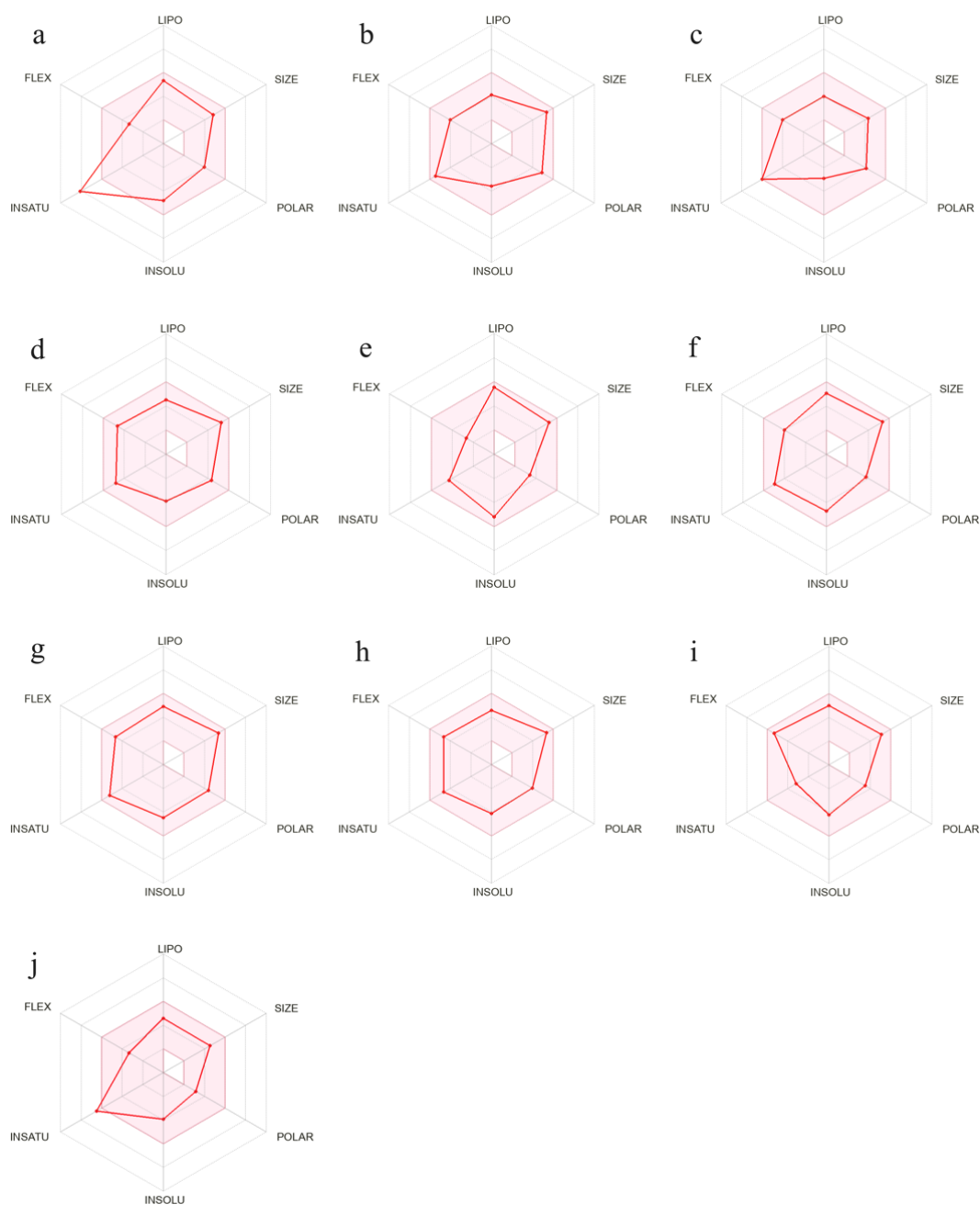
A avaliação do perfil ADME e das propriedades físico-químicas preditas indicou que mol_22_155, mol_0_343, mol_5_367 e mol_0_899, representados pelos polígonos em vermelho, apresentaram o conjunto mais equilibrado de características associadas à biodisponibilidade oral, com uma distribuição uniforme na área rosada (Figura 13). Esses compostos exibiram lipofilicidade moderada, pesos moleculares dentro da faixa recomendada (< 450 g/mol), polaridade adequada e solubilidade predita aceitável. Além disso, apresentaram fração Csp³ compatível com boa complexidade estrutural e flexibilidade molecular moderada, favorecendo interações proteína–ligante (Tabela 12). No entanto, compostos como mol_18_267, mol_16_59 e mol_14_957, apesar de

apresentarem os demais parâmetros adequados, exibiram insaturação fora dos padrões, respectivamente, 0,12/0,25/0,22 o que pode representar limitações farmacocinéticas.

Os diagramas *BOILED-Egg* indicaram que a maioria dos compostos: mol_18_267, mol_1_481, mol_5_367, mol_0_899, mol_5_159 e mol_14_957, apresentaram potencial penetração na barreira hematoencefálica, estando contidos no círculo amarelo, com possibilidade de agir no sistema nervoso central, o que não é esperado. Os compostos mol_22_155, mol_0_343, mol_12_803 e mol_16_59, apresentaram considerável probabilidade de absorção intestinal, sem indicação de permeabilidade pela barreira hematoencefálica e também, mostraram-se substratos da P-gp, ou seja, com menor absorção pelo trato gastro-intestinal, representado pelo ponto azul, o que é esperado para compostos que tenham indicações aplicação tópica oral, como enxaguantes, pastas dentais, microdispositivos orais (Figura 14).

Portanto, diante da análise dos perfis do radar de disponibilidade e do diagrama de *BOILED-Egg*, as moléculas mol_22_155 e mol_0_343 são indicadas como os candidatos com perfil farmacocinético mais favorável para administração oral, tendo o primeiro resultado obtido as propriedades físico-químicas e perfil farmacocinéticos preditos mais equilibrados.

Figura 13. Perfis de Radar de biodisponibilidade (SwissADME) dos 10 *hits* finais (*Top 10 multitarget*), mostrando a adequação simultânea às faixas consideradas favoráveis para biodisponibilidade oral. Em cada radar, os seis eixos representam LIPO (lipofilicidade), SIZE (tamanho), POLAR (polaridade), INSOLU (insolubilidade), INSATU (insaturação) e FLEX (flexibilidade). A área rosa indica a zona de propriedades desejável; o polígono vermelho corresponde às propriedades previstas para cada composto. Painéis: a) mol_18_267; b) mol_12_803; c) mol_16_59; d) mol_22_155; e) mol_1_481; f) mol_5_367; g) mol_0_343; h) mol_0_899; i) mol_5_159; j) mol_14_957.



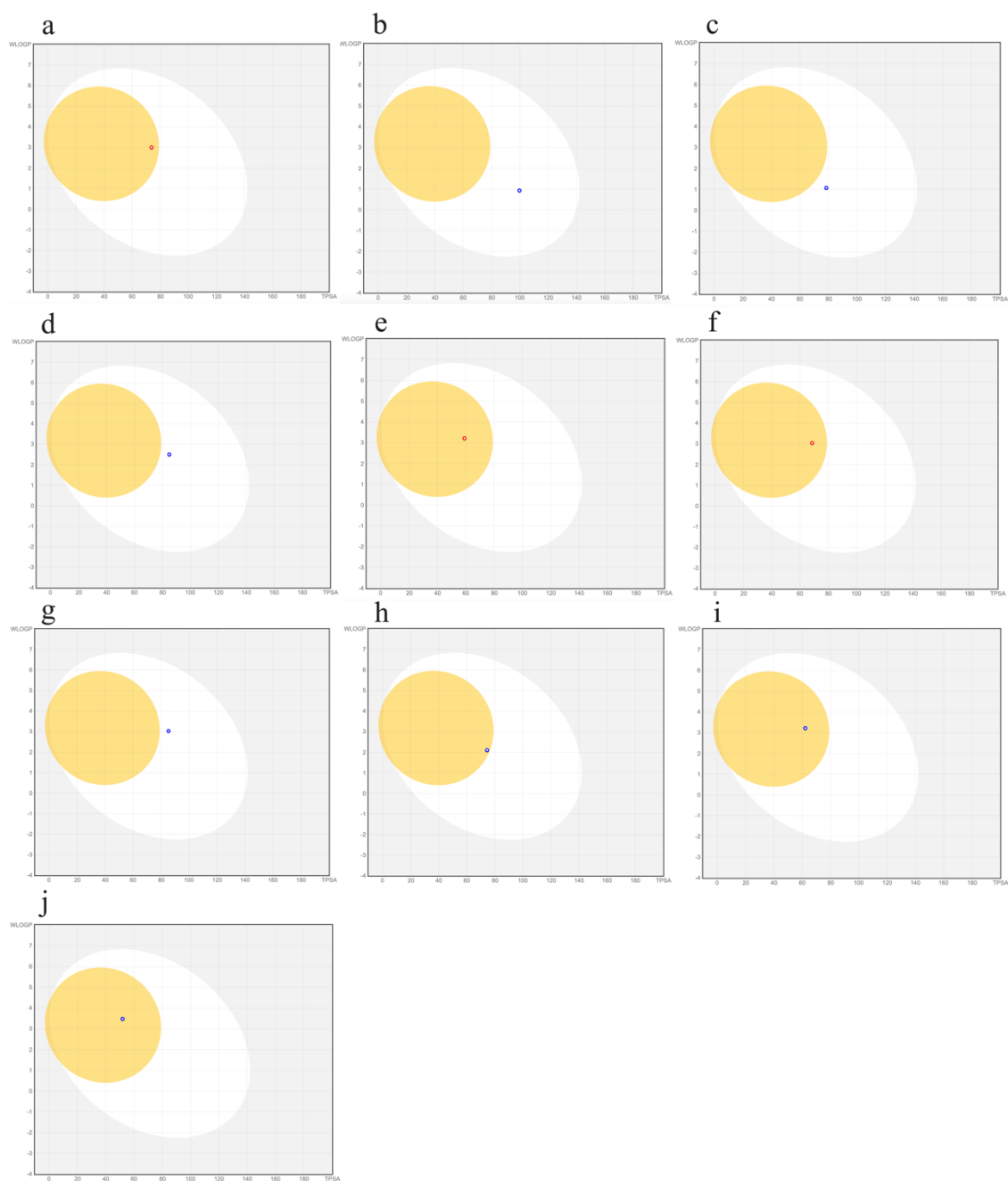
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Tabela 12. Propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético preditos (*in silico*) dos compostos selecionados, incluindo lipofilicidade (XLOGP3), peso molecular (MW), polaridade superficial total (TPSA), solubilidade aquosa estimada (ESOL), fração de carbonos sp³ (Csp³) e flexibilidade molecular (número de ligações rotáveis), avaliados com base em critérios de *drug-likeness* e potencial de biodisponibilidade oral.

Parâmetros	mol_18_267	mol_12_803	mol_16_59	mol_22_155	mol_1_481	mol_5_367	mol_0_343	mol_0_899	mol_5_159	mol_14_957
(0,7 < XLOGP3 < 5)	3.79	1.74	1.50	2.42	4.21	3.39	3.10	2.53	3.24	2.50
(150 < MW < 500 g/mol)	398.46	442.90	351.40	436.50	434.53	444.53	442.51	445.56	421.58	370.45
(20 < TPSA < 130 Å ²)	73.80	99.77	78.51	84.94	59.08	68.62	85.37	74.50	62.19	51.97
(-6 < LogS < 0)	-4.81	-3.57	-2.91	-3.89	-5.20	-4.72	-4.48	-4.12	-4.23	-3.94
(0,25 < Fraction Csp ³ < 1)	0.12	0.32	0.25	0.40	0.46	0.38	0.35	0.42	0.60	0.22
(ligações rotáveis, n)	5	6	6	7	4	6	7	7	8	5

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 14. Diagramas *BOILED-Egg* dos 10 hits finais (*Top 10 multitarget*). Os gráficos apresentam a relação entre WLOGP (eixo y) e TPSA (eixo x) para cada composto (painéis a–j: a = *mol_18_267*, b = *mol_12_803*, c = *mol_16_59*, d = *mol_22_155*, e = *mol_1_481*, f = *mol_5_367*, g = *mol_0_343*, h = *mol_0_899*, i = *mol_5_159*, j = *mol_14_957*). A região amarela (BBB) indica a faixa de propriedades associada à permeabilidade pela barreira hematoencefálica, enquanto a região branca (HIA) indica a faixa associada à alta absorção intestinal humana. Os marcadores indicam o *status* previsto de substrato da P-glicoproteína: PGP+ (azul) e PGP– (vermelho).

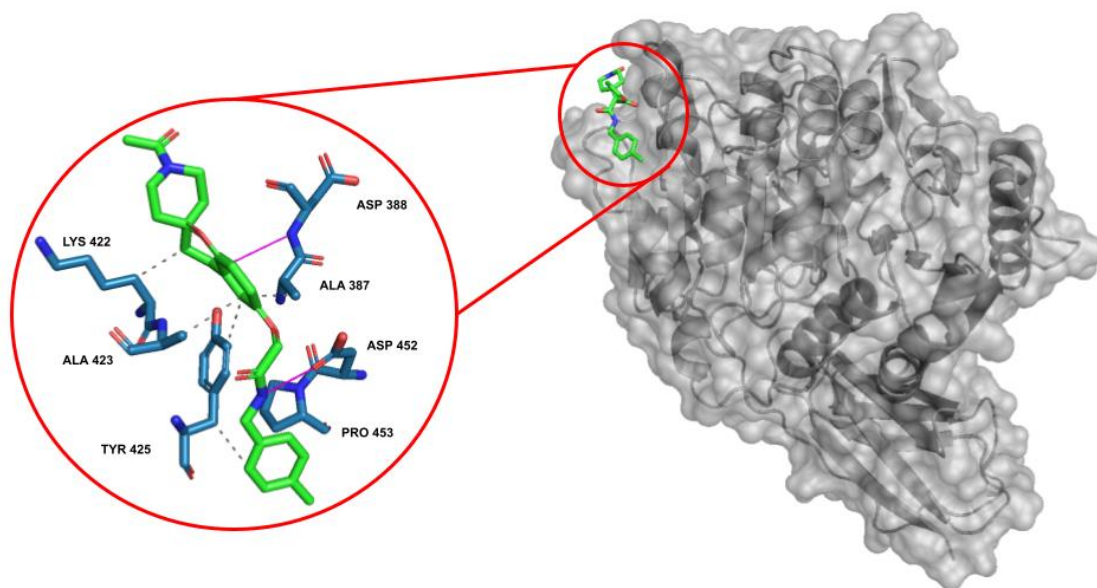


Fonte: Elaborada pela própria autora.

A molécula mol_22_155 está presente no *Top 10* que representa o conjunto de ligantes com desempenho equilibrado entre os três alvos, além de conter os desempenhos mais adequados nos parâmetros ADME e BOILED-Egg. Na imagem (Figura 15), o ligante mol_22_155 aparece acomodado em uma cavidade superficial/bolso delimitado principalmente por ALA³⁸⁷ e ASP³⁸⁸ em uma extremidade, e por ASP⁴⁵² e PRO⁴⁵³ na região oposta, com participação lateral de LYS⁴²², ALA⁴²³ e TYR⁴²⁵. Esse arranjo sugere um microambiente misto, no qual dois resíduos ácidos (ASP³⁸⁸ e ASP⁴⁵²) conferem forte componente polar/aniônico ao bolso, enquanto ALA³⁸⁷/ALA⁴²³ e PRO⁴⁵³ contribuem com contorno hidrofóbico/estérico e TYR⁴²⁵ adiciona uma parede aromática que ajuda a “moldar” a cavidade ao redor do ligante. LYS⁴²², por sua vez, posiciona uma cadeia lateral carregada que tende a atuar como elemento de reconhecimento eletrostático e de orientação do composto dentro do sítio.

Quanto às interações indicadas no *zoom*, observa-se uma ligação de hidrogênio (linha rosa) conectando o ligante ao entorno polar do *pocket*, coerente com o papel de ASP³⁸⁸/ASP⁴⁵² como pontos de ancoragem para grupos doadores/aceptores do ligante. Em paralelo, a estabilização é reforçada por contatos hidrofóbicos (tracejado cinza) distribuídos ao longo do esqueleto do ligante, envolvendo principalmente a vizinhança de ALA³⁸⁷/ALA⁴²³, PRO⁴⁵³ e a face aromática de TYR⁴²⁵, o que é compatível com empacotamento apolar e complementaridade estérica. No conjunto, a pose mostrada combina um “pino” polar (*H-bond*) com múltiplos contatos apolares, um padrão típico de acomodação estável quando a cavidade oferece simultaneamente pontos de reconhecimento eletrostático e paredes hidrofóbicas para travar o ligante na geometria observada.

Figura 15. Visualização do complexo 6I9A–mol_22_155 na gingipaína K (*P. gingivalis*). À direita, a proteína é apresentada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) acomodado na cavidade; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua posição no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* evidencia os resíduos do microambiente de ligação (ALA³⁸⁷, ASP³⁸⁸, LYS⁴²², ALA⁴²³, TYR⁴²⁵, ASP⁴⁵² e PRO⁴⁵³) e as principais interações intermoleculares observadas. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas rosa, enquanto contatos hidrofóbicos são indicados por linhas tracejadas cinza. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio.



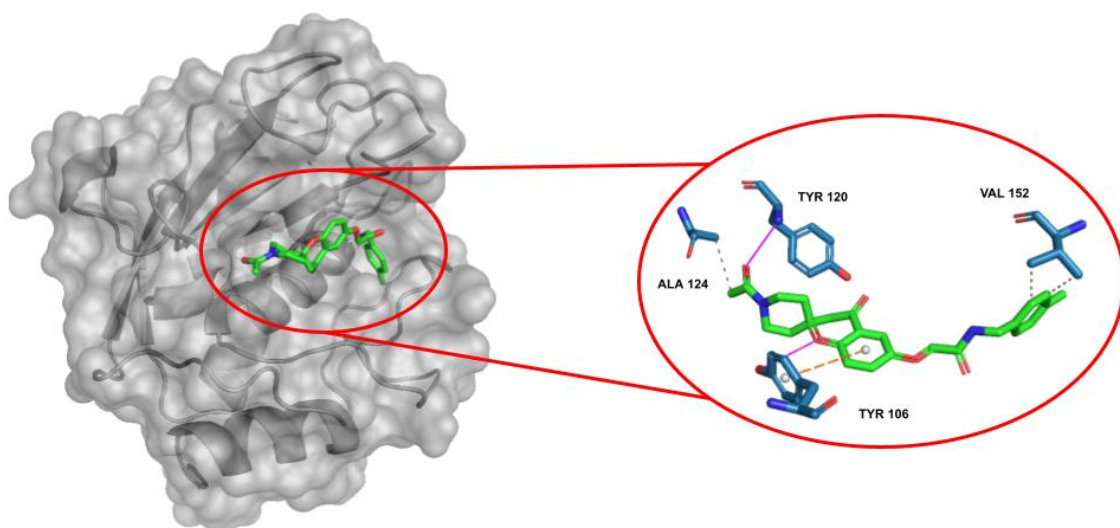
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Em relação à proteína Carilisina, a molécula mol_22_155 acomoda-se em uma depressão bem definida da proteína, claramente inserido no interior da cavidade destacada na visão de superfície. O *zoom* mostra que o bolso onde o composto se ancora é delimitado principalmente por TYR¹⁰⁶, TYR¹²⁰, ALA¹²⁴ e VAL¹⁵², compondo um microambiente misto: VAL¹⁵² e ALA¹²⁴ contribuem para o contorno apolar/estérico do *pocket*, enquanto TYR¹⁰⁶ e TYR¹²⁰ introduzem uma borda aromática que tende a moldar a cavidade e oferecer superfície para empacotamento do esqueleto do ligante.

Quanto às interações indicadas, o ligante estabelece uma ligação de hidrogênio (linha rosa) com TYR¹²⁰, sugerindo um ponto de ancoragem polar que ajuda a orientar a pose no sítio. A estabilização é reforçada por contatos hidrofóbicos (tracejado cinza) envolvendo VAL¹⁵², consistentes com encaixe apolar de uma das extremidades do ligante contra a parede do *pocket*. Além disso, observa-se uma interação π -stacking (tracejado laranja) com TYR¹⁰⁶, compatível com empilhamento/aromático entre o anel do ligante e

o anel fenólico do resíduo, o que tende a contribuir para a fixação do núcleo aromático do composto dentro da cavidade (Figura 16).

Figura 16. Visualização do ligante mol_22_155 no sítio catalítico do alvo 4IN9 (Carilissina de *T. forsythia*). À esquerda, a proteína é mostrada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) acomodado na cavidade; o círculo vermelho delimita a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À direita, o *zoom* destaca os principais resíduos do microambiente imediato do bolso de ligação (TYR¹⁰⁶, TYR¹²⁰, ALA¹²⁴ e VAL¹⁵²) e as interações intermoleculares observadas. Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa, contatos hidrofóbicos por linhas tracejadas cinza e interações π -stacking por linhas tracejadas laranja. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio.

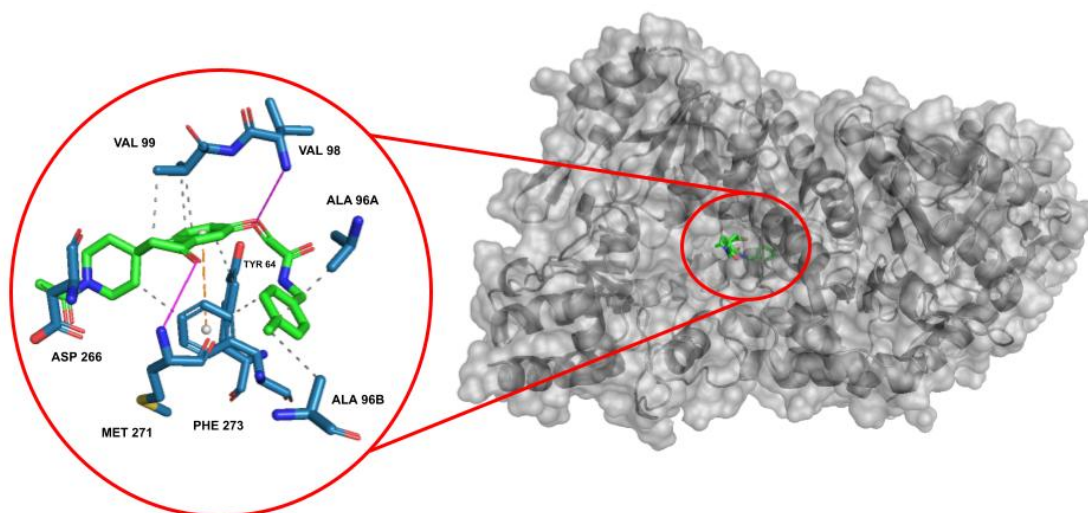


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Para a Cistalisina a molécula mol_22_155 aparece acomodada no sítio de ligação, em uma região delimitada por um núcleo majoritariamente apolar formado por VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, ALA^{96A} e ALA^{96B}, que contribuem para o ajuste estérico e o “encaixe” do esqueleto do ligante. Esse microambiente é complementado por resíduos aromáticos, em especial TYR⁶⁴ e PHE²⁷³, que definem uma parede rígida do *pocket* e favorecem a estabilização por empacotamento e interações com sistemas aromáticos. MET²⁷¹ surge como componente adicional da cavidade, reforçando o caráter hidrofóbico local, enquanto ASP²⁶⁶ marca uma borda mais polar do sítio, sugerindo um ponto potencial de ancoragem eletrostática/polar na periferia imediata do ligante.

Quanto às interações explicitamente indicadas, observa-se que a pose é sustentada por uma combinação de ligações de hidrogênio (linhas rosa) e contatos hidrofóbicos (tracejado cinza). As ligações de hidrogênio aparecem associadas ao entorno de VAL⁹⁸/VAL⁹⁹ e também na região próxima de TYR⁶⁴, sugerindo um alinhamento do ligante guiado por contatos polares que ajudam a orientar a conformação dentro do bolso. Em paralelo, predominam contatos hidrofóbicos com ALA^{96A}/ALA^{96B}, além de interações apolares com MET²⁷¹ e PHE²⁷³, consistentes com estabilização por complementaridade de superfície. Adicionalmente, as linhas tracejadas laranja indicam interações do tipo π -stacking, associando o sistema aromático do ligante a resíduos aromáticos do sítio (notadamente TYR⁶⁴/PHE²⁷³), o que reforça o travamento da pose e a manutenção do ligante no interior da cavidade observada no painel global (Figura 17).

Figura 17. Visualização do ligante mol_22_155 no sítio de ligação do alvo 1C7O (Cistalisina de *T. denticola*). À direita, a proteína é mostrada em superfície semitransparente e *cartoon* (cinza), com o ligante em *sticks* (verde) posicionado na cavidade; o círculo vermelho destaca a região do sítio e sua localização no contexto estrutural global. À esquerda, o *zoom* do sítio evidencia os principais resíduos que delimitam e estabilizam a pose (VAL⁹⁸, VAL⁹⁹, TYR⁶⁴, ALA^{96A}, ALA^{96B}, PHE²⁷³, MET²⁷¹ e ASP²⁶⁶). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas rosa; contatos hidrofóbicos por linhas tracejadas cinza; e interações π -stacking por linhas tracejadas laranja. As elipses e linhas vermelhas indicam a área ampliada e a correspondência entre a visão global e o detalhe do sítio.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

6. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica de elevada prevalência mundial e reconhecida como um relevante problema de saúde pública (Papapanou *et al.*, 2018). Sua progressão compromete de forma significativa a qualidade de vida, com impactos físicos, funcionais e psicossociais, incluindo perda dentária, disfunção mastigatória, comprometimento estético, redução da autoestima e agravamento de doenças sistêmicas (Reynolds; Duane, 2018; Kwon *et al.*, 2021; Hashim *et al.*, 2024; Freitas *et al.*, 2025). Diante desse cenário, o manejo da periodontite não se restringe à resolução de sinais clínicos locais, mas demanda abordagens terapêuticas capazes de contribuir para a restauração do equilíbrio sistêmico, psicológico e social do indivíduo (Wulandari *et al.*, 2022).

O tratamento convencional baseia-se principalmente na remoção mecânica do biofilme bacteriano por meio de raspagem e alisamento radicular, frequentemente associada a procedimentos cirúrgicos e terapias adjuvantes (Abdulkareem *et al.*, 2021). Embora essas intervenções apresentem resultados clínicos favoráveis, suas limitações são bem documentadas, incluindo recorrência da doença, efeitos adversos pós-tratamento e o surgimento de resistência microbiana associada ao uso de antibióticos (Sanz *et al.*, 2020; Kaufmann *et al.*, 2020; Tawfig, 2023). Essas restrições reforçam a necessidade de estratégias terapêuticas complementares, mais seletivas e biologicamente direcionadas.

Sob a perspectiva etiológica, a periodontite é uma condição multifatorial fortemente associada à disbiose microbiana e à evasão da resposta imune do hospedeiro (Kwon *et al.*, 2021). Nesse contexto, bactérias do complexo vermelho desempenham papel central na progressão da doença, não apenas pela sua presença no biofilme, mas principalmente pela ação de seus fatores de virulência, capazes de modular a resposta imunológica, intensificar o processo inflamatório e promover a destruição do tecido periodontal (Dashper *et al.*, 2011; Diego *et al.*, 2014; Schäffer & Andrukhov, 2024; Yashnova *et al.*, 2025).

Entre esses fatores de virulência, destacam-se três proteases-chave: a Kgp de *P. gingivalis*, envolvidas em múltiplas etapas do processo infeccioso, incluindo adesão, colonização, aquisição de nutrientes e modulação da resposta imune (Guo *et al.*, 2010); a Cistalisina de *T. denticola*, que contribui para a produção de piruvato e H₂S, favorecendo a obtenção e o compartilhamento de nutrientes em bolsas periodontais profundas, além de intensificar sangramentos gengivais e a progressão da doença (Chu *et al.*, 1994; 1999;

2002); e a Carilisina de *T. forsythia*, que inibe mecanismos imunológicos antimicrobianos do hospedeiro, exacerba a resposta inflamatória e induz destruição do tecido periodontal, favorecendo a persistência desse microrganismo no ambiente patológico (Jusko *et al.*, 2012; Bryzek *et al.*, 2014).

Os resultados de *docking* molecular obtidos neste estudo fornecem evidências estruturais relevantes para a exploração dessas proteases como alvos terapêuticos. Observou-se um deslocamento progressivo para valores mais negativos nas distribuições de afinidade para Kgp de *P. gingivalis* (−6,93 kcal/mol), Cistalisina de *T. denticola* (−7,80 kcal/mol) e Carilisina de *T. forsythia* (−8,29 kcal/mol). Nesse contexto, a Carilisina apresentou o melhor desempenho em termos de compatibilidade geométrica e físico-química entre o *pocket* amostrado e o espaço químico da biblioteca, de acordo com o modelo de pontuação do AutoDock Vina (Trott; Olson, 2010).

Entretanto, valores mais negativos em *docking* molecular devem ser interpretados com cautela, pois podem refletir cavidades mais amplas e permissivas, maior contribuição hidrofóbica no cálculo do *score* ou limitações de parametrização, especialmente no caso de metaloproteases. Nessas enzimas, a presença e a coordenação do metal catalítico podem distorcer tanto a geometria quanto a energia prevista quando o método não descreve a coordenação metálica de forma realista (Trott; Olson, 2010; Kacprzak *et al.*, 2010). Para a Carilisina, o deslocamento observado é consistente com sua natureza MMP-like e com a tendência do *docking* em gerar *scores* mais favoráveis em cavidades amplas e hidrofóbicas; ainda assim, esses achados exigem validação adicional por inspeção estrutural detalhada e aplicação de filtros antiartefato.

A análise do sítio de ocupação (*cutoff* = 5 Å) reforça essa interpretação estrutural. A Carilisina apresentou o maior percentual de poses localizadas no sítio catalítico (~98%), enquanto a Kgp exibiu apenas ~8% de ocupação nessa região. Esse padrão indica que, para a Kgp, os *scores* obtidos pelo Vina frequentemente derivam de *pockets* periféricos, e não do núcleo catalítico, uma vez que aproximadamente 92% das poses ficaram fora da região definida como sítio de ocupação. Esse comportamento é coerente com o perfil funcional da Kgp, cujos inibidores clássicos são, em geral, peptidomiméticos e dependem de encaixe altamente específico no sítio ativo (Cerdà-Costa *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2019). Assim, os resultados sugerem que uma biblioteca *drug-like* de produtos naturais tende a favorecer sítios alternativos nessa protease, enquanto, para Cistalisina e

Carilisina, a cavidade catalítica principal se apresenta como o sítio geometricamente mais favorável.

As visualizações estruturais do melhor ligante nos três alvos corroboram essas observações ao permitir distinguir entre um bom valor de *score* e um modo de ligação estruturalmente plausível. Em todas as proteínas, os ligantes se posicionaram no interior da cavidade, estabelecendo um padrão típico de interações, com predominância de contatos hidrofóbicos, incluindo resíduos aromáticos como TYR e TRP, e a formação de ligações de hidrogênio com resíduos polares do sítio.

Diante desses achados, a inibição simultânea dessas proteases de virulência emerge como uma estratégia promissora para reduzir a patogenicidade do biofilme periodontal. A abordagem *multitarget* proposta neste estudo, sustentada pelos resultados de *docking* molecular, busca enfraquecer o consórcio bacteriano por meio da modulação seletiva de fatores de virulência, em vez da eliminação indiscriminada dos microrganismos. Essa estratégia tem potencial para reduzir a pressão seletiva por resistência e contribuir para a manutenção ou restauração do equilíbrio ecológico oral.

Os resultados apresentados reforçam a viabilidade estrutural dessa estratégia ao indicar candidatos capazes de interagir de forma plausível com sítios catalíticos ou regiões funcionalmente relevantes das três proteases avaliadas. Embora o *docking* represente uma etapa exploratória e não substitua validações experimentais, os achados fornecem uma base racional consistente para a priorização de compostos com potencial modulador *multitarget* de fatores de virulência críticos da periodontite, em consonância com evidências prévias sobre o uso de compostos bioativos naturais (Sun *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Hayata *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Saini *et al.*, 2025; Chorge *et al.*, 2024; Hashim *et al.*, 2025).

Nesse contexto, os produtos naturais destacam-se como alternativas adjuvantes promissoras, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antioxidantes e antimicrobianas (Sorrenti *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024; Lavu *et al.*, 2025). A integração dessas evidências com os resultados de *docking* apresentados neste estudo sustenta o potencial dos produtos naturais como fontes de compostos *multitarget* direcionados à modulação da virulência bacteriana, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais seletivas e sustentáveis no controle da periodontite.

Entre os principais compostos identificados no *top hit do docking* molecular, destacam-se moléculas semissintéticas e sintéticas derivadas de produtos naturais. Dentre elas, a 2-[(1'-acetyl-4-oxo-3,4-dihydrospiro[chromene-2,4'-piperidin]-6-yl)oxy]-N-(4-methylbenzyl)acetamide, um composto organo-heterocíclico, derivado semissintético da cumarina (Ghatpande *et al.*, 2020), mostrou-se especialmente promissora para a inibição *multitarget* de proteínas de virulência das bactérias do complexo vermelho, por apresentar a melhor pose de ligação e um perfil farmacocinético mais favorável à administração oral.

Embora os produtos naturais sejam uma fonte valiosa de estruturas bioativas, muitos deles apresentam limitações quanto às suas propriedades farmacológicas, como baixa potência, especificidade restrita, toxicidade relevante e perfis farmacocinéticos desfavoráveis, o que dificulta sua aplicação direta como fármacos (Aware *et al.*, 2022). Nesse sentido, a otimização e a modificação racional das estruturas moleculares tornam-se etapas essenciais para aprimorar suas propriedades biológicas e viabilizar o desenvolvimento de compostos com maior segurança, eficácia e controle em aplicações farmacêuticas (Ding & Xue, 2024).

A modificação e a otimização racional de estruturas moleculares permitem a geração de bibliotecas diversificadas de compostos, explorando o potencial químico dos produtos naturais e ampliando as perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, o banco de dados COCONUT reúne uma ampla coleção de compostos associados a produtos naturais, incluindo não apenas metabólitos isolados diretamente de organismos, mas também derivados semissintéticos e compostos sintéticos inspirados em produtos naturais.

Portanto, a triagem e do desenvolvimento de fármacos baseados em produtos naturais avançou de forma expressiva com a incorporação de ferramentas de bioinformática, inteligência artificial e computação de alto desempenho (Malandraki-Miller & Riley, 2021). Abordagens como predição de alvos, análise de perfis metabólicos, modelagem molecular e estudos da dinâmica e da termodinâmica de farmacóforos têm ampliado substancialmente a capacidade de identificar compostos líderes a partir de fontes naturais. Essas estratégias possibilitam a exploração sistemática de transformações estruturais, iniciando-se a partir do produto natural intacto, avançando para a identificação de fragmentos bioativos e culminando em processos de otimização estrutural, orientados por propriedades biológicas e farmacocinéticas (Ding & Xue, 2024).

7. CONCLUSÃO

Portanto, as proteases Kgp, Cistalisina e Carilisina, produzidas por bactérias do complexo vermelho, desempenham papel central na progressão da periodontite e constituem alvos relevantes para estratégias de inibição de fatores de virulência. A triagem por *docking* molecular com compostos do banco de dados COCONUT identificou a substância 2-[(1'-acetyl-4-oxo-3,4-dihydrospiro[chromene-2,4'-piperidin]-6-yl)oxy]-N-(4-methylbenzyl)acetamide promissora para a inibição *multitarget* de proteínas de virulência das bactérias do complexo vermelho, por apresentar a melhor pose de ligação e um perfil farmacocinético mais favorável à administração oral. Os *tops hits* obtidos correspondem majoritariamente a moléculas sintéticas ou semissintéticas inspiradas em produtos naturais e devem ser interpretados como candidatos estruturais prioritários, cuja relevância biológica requer validação adicional. Etapas subsequentes, incluindo *redocking*, inspeção estrutural, *rescoring* e dinâmicas moleculares, são essenciais para consolidar a seleção final e avançar no desenvolvimento racional de moduladores *multitarget* para o controle da periodontite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATAH, R. *et al.* Efficacy of curcumin gel as an adjunct to scaling and root planing on salivary procalcitonin level in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health*, v. 23, n. 1, p. 883, 2023.
- ABDULKAREEM, A. *et al.* Classic vs. Novel antibacterial approaches for eradicating dental biofilm as adjunct to periodontal debridement: An evidence-based overview. *Antibiotics*, v. 11, n. 1, p. 9, 2021.
- AKCALI, A.; LANG, N. P. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontology 2000*, v. 76, n. 1, p. 109-115, 2018.
- AL-JANABI, A. O. *et al.* Detection of Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* and Periodontal Diseases in Chronic Disease Patients. *Medical Journal of Babylon*, v. 22, n. 1, p. 212-215, 2025.
- AL-KATTAN, R. The role of curcumin in periodontal therapy: Na update. *Functional Foods in Health and Disease*, v. 14, n. 5, p. 290-298, 2024.
- ALEKSIJEVIĆ, L. H. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* virulence factors and clinical significance in periodontal disease and coronary artery diseases. *Pathogens*, v. 11, n. 10, p. 1173, 2022.
- ALIPRANTIS, A. O. *et al.* Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through *toll-like* receptor-2. *Science*, v. 285, n. 5428, p. 736-739, 1999.
- AMOR SAÚDE. **Sintomas de periodontite**. Disponível em: <https://blog.amorsaude.com.br/sintomas-de-periodontite/>. Acesso em: 06 nov. 2025.
- ANDRIAN, E.; *et al.* *In vitro* models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*, v. 72, n. 8, p. 4689-4698, 2004.
- ARABACI, T. *et al.* Sonic and ultrasonic scalers in periodontal treatment: a review. *International journal of dental hygiene*, v. 5, n. 1, p. 2-12, 2007.
- AWARE, C B. *et al.* Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. *South African Journal of Botany*, v. 151, p. 512-528, 2022.
- BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 7, p. 2719–2740, 2010.
- BAJUSZ, D. *et al.* Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics*, v. 7, 2015.
- BAMFORD, C. V. *et al.* The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infection and immunity*, v. 75, n. 9, p. 4364-4372, 2007.
- BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
- BHATTARAI, G. *et al.* Anti-inflammatory, anti-osteoclastic, and antioxidant activities of genistein protect against alveolar bone loss and periodontal tissue degradation in a mouse model of periodontitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 105, n. 9, p. 2510-2521, 2017.

- BLOCH, S. *et al.* Nonulosonic acids contribute to the pathogenicity of the oral bacterium *Tannerella forsythia*. **Journal of the Royal Society Interface Focus**, v. 9, n. 2, p. 20180064, 2019.
- BOTELHO, J. *et al.* An umbrella review of the evidence linking oral health and systemic noncommunicable diseases. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 7614, 2022.
- BOTELHO, M. A. *et al.* Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 9, p. 1214-1219, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Estratégias e Políticas de Saúde Comunitária. SB Brasil 2023 : Pesquisa Nacional de Saúde Bucal : relatório final [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde, Departamento de Estratégias e Políticas de Saúde Comunitária. – 1. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2025.
- BRAUN, M. L. *et al.* Shut-down of type IX protein secretion alters the host immune response to *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 835509, 2022.
- BRENK, R. *et al.* Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435–444, 2008.
- BRIGHTBILL, H. D. *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through *toll-like* receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-736, 1999.
- BRYZEK, D. *et al.* A pathogenic trace of *Tannerella forsythia*–shedding of soluble fully active tumor necrosis factor α from the macrophage surface by karilysin. **Molecular oral microbiology**, v. 29, n. 6, p. 294-306, 2014.
- BUTINA, D. Unsupervised Data Base Clustering Based on Daylight’s Fingerprint and Tanimoto Similarity: A Fast and Automated Way To Cluster Small and Large Data Sets. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 39, n. 4, p. 747–750, 1999.
- CAI, Y. *et al.* Green tea epigallocatechin-3-gallate alleviates *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice. **International immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 839-845, 2015.
- CAPRUCIU, R. Resveratrol in grapevine components, products and by-products—a review. **Horticulturae**, v. 11, n. 2, p. 111, 2025.
- CERDÀ-COSTA, N. *et al.* Structural insights unravel the zymogenic mechanism of the virulence protease gingipain K (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Biological Chemistry**, 2020.
- CHAN, E. C. S. *et al.* *Treponema denticola* (ex Brumpt 1925) sp. nov., nom. rev., and identification of new spirochete isolates from periodontal pockets. **International journal of systematic bacteriology**, v. 43, n. 2, p. 196-203, 1993.
- CHATZOPOULOS, G. S. *et al.* Clinical effectiveness of herbal oral care products in periodontitis patients: a systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 16, p. 10061, 2022.

- CHENG, Y. *et al.* Baicalin attenuates LPS-induced periodontal inflammation response by inhibiting autophagy. **BMC Oral Health**, v. 25, n. 1, p. 513, 2025.
- CHOI, B. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase expression by the lipooligosaccharide of *Treponema denticola*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 226-233, 2003.
- CHOPRA, A. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* adopts intricate and unique molecular mechanisms to survive and persist within the host: a critical update. **Journal of Oral Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1801090, 2020.
- CHORGE, S. S.; *et al.* A review on: molecular *docking* of antibacterial agent. **Journal of Emerging Technologies and Innovative Research (JETIR)**, v. 11, n. 5, p.b715-b725 2024
- CHU, L. *et al.* Characterization of hemolysis and hemoxidation activities by *Treponema denticola*. **Microbial pathogenesis**, v. 16, n. 3, p. 183-195, 1994.
- CHU, L. *et al.* Hemoxidation and binding of the 46-kDa cystalysin of *Treponema denticola* leads to a cysteine-dependent hemolysis of human erythrocytes. **Oral microbiology and immunology**, v. 14, n. 5, p. 293-303, 1999.
- CHU, L. *et al.* Role of glutathione metabolism of *Treponema denticola* in bacterial growth and virulence expression. **Infection and immunity**, v. 70, n. 3, p. 1113-1120, 2002.
- CIANDRINI, E. *et al.* In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clinical oral investigations*, v. 18, n. 8, p. 2001-2013, 2014.
- DAI, W. *et al.* Microbiological and Metabolomic Analysis of Biomarkers for Grades A and B in Stage II Periodontitis. **Inflammation**, p. 1-13, 2025.
- DASHPER, S. G. *et al.* Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. **Journal of dental research**, v. 90, n. 6, p. 691-703, 2011.
- DAUPHINEE, S. M.; KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory investigation**, v. 86, n. 1, p. 9-22, 2006.
- DAVID, A. V. A. *et al.* Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy reviews**, v. 10, n. 20, p. 84, 2016.
- DENTISTASP. **Gengivite**. Disponível em: <https://www.dentistasp.com.br/periodontia/gengivite>. Acesso em: 06 nov. 2025.
- DIEGO, I. *et al.* Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 32291-32302, 2014.
- DING, Y.; XUE, X. Estratégias de química medicinal para a modificação de produtos naturais bioativos. **Molecules**, v. 29, n. 3, p. 689, 2024.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34-50, 2010.
- EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.
- ECHEVERRÍA, J. J. *Et al.* Adherence to supportive periodontal

- treatment. **Periodontology** 2000, v. 79, n. 1, p. 200-209, 2019.
- ERTL, P. *et al.* Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714–3717, 2000.
- FAISAL, R. H.; ALI, A. O. Increased bacterial load of *Filifactor alocis* in deep periodontal pockets discriminate between periodontitis stage 3 and 4. **Frontiers in Oral Health**, v. 6, p. 1543030, 2025.
- FARZANEGAN, A. *et al.* Anti-histaminic effects of resveratrol and silymarin on human gingival fibroblasts. **Inflammation**, v. 42, n. 5, p. 1622-1629, 2019.
- FENNO, J. C. *et al.* Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 1884-1892, 2000.
- FERNANDES, G. V. O. *et al.* Revisiting Socransky's complexes: a review suggesting updated new bacterial clusters (GF-MoR Complexes) for periodontal and peri-implant diseases and conditions. **Microorganisms**, v. 12, n. 11, p. 2214, 2024.
- FIGUERO, E. *et al.* Supra and subgingival application of antiseptics or antibiotics during periodontal therapy. **Periodontology** 2000, p. 1-34, 2023.
- FORLI, S. *et al.* Computational protein–ligand *docking* and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nature Protocols**, v. 11, n. 5, p. 905–919, maio 2016.
- FREITAS, G. S. R. *et al.* Inter-relações entre Doença Periodontal e Doenças Sistêmicas: uma revisão sobre repercussões sistêmicas e implicações para a saúde bucal. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 8, n. 3, p. e79426-e79426, 2025.
- FRIEDRICH, V. *et al.* Outer membrane vesicles of *Tannerella forsythia*: biogenesis, composition, and virulence. **Molecular oral microbiology**, v. 30, n. 6, p. 451-473, 2015.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity — a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1980.
- GHATPANDE *et al.* A brief overview on recent advances in spiro [chromane-2, 4'-piperidine]-4 (3H)-one-functionalized compounds in medicinal chemistry research. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 23, p. 115813, 2020.
- GOH, V. *et al.* Impact of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life in individuals receiving supportive periodontal care. **Journal of clinical periodontology**, v. 43, n. 7, p. 595-602, 2016.
- GUEVARA, T. *et al.* Structural determinants of inhibition of *Porphyromonas gingivalis* gingipain K by KYT-36, a potent, selective, and bioavailable peptidase inhibitor. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4935, 2019.
- GUEVARA, T. *et al.* Structure of the catalytic domain of the *Tannerella forsythia* matrix metallopeptidase karilysin in complex with a tetrapeptidic inhibitor. **Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69, n. 5, p. 472-476, 2013.
- GUO, Y. *et al.* Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. **Periodontology** 2000, v. 54, n. 1, p. 15, 2010.
- HAJISHENGALLIS, G. *et al.* Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-

mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2359-2367, 2007.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 15, n. 1, p. 30-44, 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Molecular oral microbiology**, v. 27, n. 6, p. 409-419, 2012.

HAO, C. *et al.* Asiatic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts. **International Immunopharmacology**, v. 50, p. 313-318, 2017.

HASEGAWA, Y.; NAGANO, K. *Porphyromonas gingivalis* FimA and Mfa1 fimbriae: Current insights on localization, function, biogenesis, and genotype. **Japanese Dental Science Review**, v. 57, p. 190-200, 2021.

HASHIM, N. T. *et al.* Natural bioactive compounds in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. **Molecules**, v. 29, n. 13, p. 3044, 2024.

HASHIM, N. T. *et al.* New insights in natural bioactive compounds for periodontal disease: Advanced molecular mechanisms and therapeutic potential. **Molecules**, v. 30, n. 4, p. 807, 2025.

HAYATA, M. *et al.* Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. suppresses *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced production of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264. 7 cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 73, n. 1, p. 114-123, 2018.

HELLER, S. R. *et al.* InChI, the IUPAC International Chemical Identifier. **Journal of Cheminformatics**, v. 7, 2015.

HERATH, T. DK *et al.* Tetra-and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58496, 2013.

HINSON, A. N. *et al.* *Treponema denticola* induces interleukin-36 γ expression in human oral gingival keratinocytes via the parallel activation of nf- κ b and mitogen-activated protein kinase pathways. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 10, p. e00247-22, 2022.

HOLT, S. *et al.* Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology 2000**, v. 20, p. 168-238, 1999.

HONMA, K. *et al.* Sialic acid transporter NanT participates in *Tannerella forsythia* biofilm formation and survival on epithelial cells. **Microbial pathogenesis**, v. 94, p. 12-20, 2016.

IKEGAMI, A. *et al.* Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 8, p. 4619-4627, 2004.

IMAMURA, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 74, n. 1, p. 111-118, 2003.

INAGAKI, S. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by “*Tannerella forsythia*”. **Infection and immunity**, v. 74, n. 9, p. 5023-5028, 2006.

- INCHINGOLO, A. D. *et al.* Effects of resveratrol, curcumin and quercetin supplementation on bone metabolism—a systematic review. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3519, 2022.
- INNOCENTI, G. *et al.* Dental calculus microbiome correlates with dietary intake. **Molecular Oral Microbiology**, [s.l.], 2023.
- JENNINGS, M. P. *et al.* How bacteria utilize sialic acid during interactions with the host: snip, snatch, dispatch, match and attach. **Microbiology**, v. 168, n. 3, p. 001157, 2022.
- JIANG, H. *et al.* Resveratrol may reduce the degree of periodontitis by regulating ERK pathway in gingival-derived MSCs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11294, 2023.
- JUSKO, M. *et al.* A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 5, p. 2338-2349, 2012.
- KACPRZAK, M. *et al.* A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. **Biological Chemistry**, 2010.
- KAMARAJ, B. Exploring the Therapeutic Potential of Epigallocatechin-3-gallate (Green Tea) in Periodontitis Using Network Pharmacology and Molecular Modeling Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 18, p. 9144, 2025.
- KAMETANI, M. *et al.* Relationship Between the Presence of Red Complex Species and the Distribution of Other Oral Bacteria, Including Major Periodontal Pathogens in Older Japanese Individuals. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 22, p. 12243, 2024.
- KARIM, A. Y. *et al.* A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. **Biological chemistry**, v. 391, n. 1, p. 105, 2010.
- KARIN K. A. *et al.* Association of the *rgpB* gingipain genotype to the major fimbriae (fimA) genotype in clinical isolates of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Oral Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 29124, 2015.
- KAUFMANN, M. E. *et al.* Gingival recession after scaling and root planing with or without systemic metronidazole and amoxicillin: a re-review. **Clinical oral investigations**, v. 24, p. 1091-1100, 2020.
- KOZIEL, J. *et al.* Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 3, p. 288-293, 2010.
- KRUPKA, H. I. *et al.* Crystal structure of cystalysin from *Treponema denticola*: a pyridoxal 5'-phosphate-dependent protein acting as a haemolytic enzyme. **The EMBO journal**, 2000.
- KSIAZEK, M. *et al.* KLIKK proteases of *Tannerella forsythia*: putative virulence factors with a unique domain structure. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 312, 2015.
- KSIAZEK, M. *et al.* Mirolase, a novel subtilisin-like serine protease from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. 2015.
- KUGAJI, M. S. *et al.* Effect of Resveratrol on biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. **Apmis**, v. 127, n.

4, p. 187-195, 2019.

KUMBAR, V. M. *et al.* Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. **Odontology**, v. 109, n. 1, p. 18-28, 2021.

KWON, T. *et al.* Current concepts in the management of periodontitis. **International dental journal**, v. 71, n. 6, p. 462-476, 2021.

LAKHAN, S. E. *In Silico* research is rewriting the rules of drug development: Is It the End of Human Trials?. **Cureus**, v. 17, n. 5, 2025.

LANDRUM, G. *et al.* **RDKit: Open-source cheminformatics**. Zenodo, 2015.

LAVU, V. *et al.* *In silico* identification of potential inhibitors from fenugreek against the pro-inflammatory cytokine IL-17 and its receptor. **Odontology**, p. 1-11, 2025.

LAZARUS, H. P. S. *et al.* Membrane vesicles from Red Complex bacteria: key players in oral pathogenesis, immune disruption, systemic diseases, and therapeutic insights. **Frontiers in Oral Health**, v. 6, p. 1607931, 2025.

LI, C. *et al.* Spirochete periplasmic flagella and motility. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 345-354, 2000.

LI, F. *et al.* Gingipains may be one of the key virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* to impair cognition and enhance blood–brain barrier permeability: An animal study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 51, n. 7, p. 818-839, 2024.

LI, L. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 794, p. 61-68, 2017.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, 1997.

LIU, F. *et al.* Plantamajoside attenuates inflammatory response in LPS-stimulated human gingival fibroblasts by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 208-211, 2019.

LUX, R. *et al.* Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *Treponema denticola*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 10, p. 6276-6283, 2001.

MALANDRAKI-MILLER, S.; RILEY, P. R. Use of artificial intelligence to enhance phenotypic drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 26, n. 4, p. 887-901, 2021.

MARTINS, O. *et al.* The efficacy of air polishing devices in supportive periodontal therapy: Clinical, microbiological and patient-centred outcomes. A systematic review. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 21, n. 1, p. 41-58, 2023.

MAYER, V. M.T. *et al.* Utilization of different MurNAc sources by the oral pathogen *Tannerella forsythia* and role of the inner membrane transporter AmpG. **Bmc Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 352, 2020.

MCDOWELL, J. V. *et al.* Analysis of a unique interaction between the complement regulatory protein factor H and the periodontal pathogen *Treponema denticola*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 4, p. 1417-1425, 2009.

MESSINA, B. M. *et al.* The Key Role of *Porphyromonas gingivalis* in the Pathogenesis of Periodontitis Linked with Systemic Diseases. **Applied Sciences**, v. 15, n. 12, p. 6847,

2025.

MITCHELL, H. L. *et al.* *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin–antitoxin systems and transposases. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 774-788, 2010.

MIYAMOTO, M. *et al.* The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and immunity**, v. 74, n. 4, p. 2462-2467, 2006.

MOHANTY, R. *et al.* Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. **Journal of family medicine and primary care**, v. 8, n. 11, p. 3480-3486, 2019.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated *docking* with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MUSIAL *et al.* Beneficial properties of green tea catechins. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 5, p. 1744, 2020.

NASCIMENTO, G. G. *et al.* Burden of severe periodontitis and edentulism in 2021, with projections up to 2050: The Global Burden of Disease 2021 study. **Journal of Periodontal Research**, v. 59, n. 5, p. 823-867, 2024.

NAZIR, M. *et al.* Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. **The Scientific World Journal**, v. 2020, n. 1, p. 2146160, 2020.

NEWMAN, M. G., *et al.* Newman e Carranza: **Periodontia Clínica Essencial**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN Guanabara Koogan; 2023.

NEWMAN, M. G.; CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Grupo Gen Guanabara Koogan, 2020.

NG, H. M. *et al.* The role of *Treponema denticola* motility in synergistic biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 432, 2019.

NONAKA, K. *et al.* 6-Shogaol inhibits advanced glycation end-products-induced IL-6 and ICAM-1 expression by regulating oxidative responses in human gingival fibroblasts. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3705, 2019.

NOURBAKHS, F. *et al.* From plants to antimicrobials: Natural products against bacterial membranes. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 33-52, 2022.

OLIVEIRA, N. N. C. *et al.* Alternativas Terapêuticas para o Cálculo Dentário: uma análise prospectiva científica e tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, v. 16, n. 6, p. 1927-1942, 2023.

ONISHI, S. *et al.* Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 10, p. 4872-4880, 2008.

PAPAPANOU, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, v. 89, p. S173-S182, 2018.

PEI J.; GRISHIN, N. V. Prediction of a caspase-like fold in *Tannerella forsythia* virulence factor PrtH. **Cell cycle**, v. 8, n. 9, p. 1453-1455, 2009.

- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular *docking*: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.
- POSCH, G. *et al.* Structure and immunogenicity of the rough-type lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 945-953, 2013.
- POTEMPA, J. *et al.* Titration and Mapping of the Active Site of Cysteine Proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (Gingipains) Using Peptidyl Chloromethanes. **Biological chemistry**, v. 378, n. 4, p. 223-230, 1997.
- RAETZ, C. RH; WHITFIELD, C.. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635-700, 2002.
- RAJASEKARAN, J. J. *et al.* Oral microbiome: a review of its impact on oral and systemic health. **Microorganisms**, v. 12, n. 9, p. 1797, 2024.
- REYNOLDS, I.; DUANE, B. Periodontal disease has an impact on patients' quality of life. **Evidence-based dentistry**, v. 19, n. 1, p. 14-15, 2018.
- RINIKER, S.; LANDRUM, G. A. Better Informed Distance Geometry: Using What We Know To Improve Conformation Generation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 12, p. 2562–2574, 28 dez. 2015.
- ROGERS, D.; HAHN, M. Extended-connectivity fingerprints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 5, p. 742–754, 2010.
- ROSEN, G. *et al.* Coaggregation of *Treponema denticola* with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* is mediated by the major outer sheath protein of *Treponema denticola*. **FEMS microbiology letters**, v. 289, n. 1, p. 59-66, 2008.
- RUBY, J. D.; CHARON, N. W. Effect of temperature and viscosity on the motility of the spirochete *Treponema denticola*. **FEMS microbiology letters**, v. 169, n. 2, p. 251-254, 1998.
- SABINE E. G. *et al.* Systemic, Lifestyle and Environmental Modifying Factors in the Pathogenesis of Periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, 2025.
- SAINI, R. S. *et al.* *In silico docking* of medicinal herbs against *P. gingivalis* for chronic periodontitis intervention. **International Dental Journal**, v. 75, n. 2, p. 1113-1135, 2025.
- SAKAKIBARA, J. *et al.* Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. **Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 866-876, 2007.
- SAKAMOTO, M. *et al.* Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.* 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 841-849, 2002.
- SALENTIN, S. *et al.* PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W443-447, 2015.
- SANTOS-MARTINS, D. *et al.* Meeko: molecule parameterization and software interoperability for docking and beyond. **ChemRxiv** (preprint), 2025
- SANTOS, D. Y. A. C. Biossíntese, funções e aplicações dos metabólitos secundários em plantas. 1ª ed. Curitiba: Appris, 2020. 401 p.
- SANZ, M. *et al.* Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical

- practice guideline. **Journal of clinical periodontology**, v. 47, p. 4-60, 2020.
- SCHÄFFER, C.; ANDRUKHOV, O. The intriguing strategies of *Tannerella forsythia*'s host interaction. **Frontiers in Oral Health**, v. 5, p. 1434217, 2024.
- SCHULTZ, C. P. *et al.* Evidence for a new type of outer membrane lipid in oral spirochete *Treponema denticola*: functioning permeation barrier without lipopolysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15661-15666, 1998.
- SETTEM, R.P. *et al.* A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. **Mucosal immunology**, v. 6, n. 2, p. 415-426, 2013.
- SHARIFI-RAD, M. *et al.* Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, 2018.
- SHIN, S. W. *et al.* Antagonist effects of veratric acid against UVB-induced cell damages. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5405-5419, 2013.
- SIEDLE, B. *et al.* Quantitative structure– activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription Factor NF- κ B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 24, p. 6042-6054, 2004.
- SMALLEY, J. W.; OLCZAK, T.. Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*—strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. **Molecular Oral Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 1-23, 2017.
- SMILEY, C. J. *et al.* Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. **The Journal of the American Dental Association**, v. 146, n. 7, p. 525-535, 2015.
- SOCRANSKY, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of clinical periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.
- SOROKINA, M.; STEINBECK, C. COCONUT: ColleCtion of Open NatUral prodUcTs. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, 2020. DOI: 10.1186/s13321-020-00478-9.
- SORRENTI, V. *et al.* Recent advances in health benefits of bioactive compounds from food wastes and by-products: Biochemical aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2019, 2023.
- SOUeidAN, A. *et al.* Pooled analysis of oral microbiome profiles defines robust signatures associated with periodontitis. **mSystems**, v. 9, n. 11, p. e00930-24, 2024.
- STEINMANN, J. *et al.* Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 5, p. 1059-1073, 2013.
- SUBBIAH, H. V. *et al.* *In silico* targeting of red complex bacteria virulence factors of periodontitis with β -defensin 1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 59, 2022.
- SUN, H. *et al.* Advances in the use of chlorhexidine for periodontitis treatment in diabetic patients: A review. **Medicine**, v. 103, n. 36, p. e39627, 2024.
- SUN, J. *et al.* Baicalin inhibits *toll-like* receptor 2/4 expression and downstream

- signaling in rat experimental periodontitis. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 86-93, 2016.
- SUVAN, J. *et al.* Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. **Journal of clinical periodontology**, v. 47, p. 155-175, 2020.
- SUZUKI, Y. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce osteoclastogenesis via toll-like receptors in RAW264 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 15293, 2022.
- TADA, H. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152794, 2016.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TANABE, S. *et al.* *Treponema denticola* lipooligosaccharide activates gingival fibroblasts and upregulates inflammatory mediator production. **Journal of cellular physiology**, v. 216, n. 3, p. 727-731, 2008.
- TAWFIG, A. The effect of *Nigella sativa* extracts against *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis patients. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 21, 2023.
- TRAVIS, J. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 32, n. 1, p. 120-125, 1997.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.
- USHANTHIKA, T. *et al.* An *in silico* approach towards identification of virulence factors in red complex pathogens targeted by reserpine. **Natural product research**, v. 35, n. 11, p.1893-1898, 2021.
- VEBER, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.
- VEITH, P. D. *et al.* Characterization of the O-Glycoproteome of *Tannerella forsythia*. **MSphere**, v. 6, n. 5, p. 10.1128/msphere. 00649-21, 2021.
- WANG, H. *et al.* The role and mechanism of bacterial outer membrane vesicles in the development of periodontitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1654137, 2025.
- WANG, Q. *et al.* Farrerol inhibits IL-6 and IL-8 production in LPS-stimulated human gingival fibroblasts by suppressing PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway. **Archives of Oral Biology**, v. 62, p. 28-32, 2016.
- WANG, Q. *et al.* Veratric acid inhibits LPS-induced IL-6 and IL-8 production in human gingival fibroblasts. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 237-242, 2016.
- WILDMAN, S. A.; CRIPPEN, G. M. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 39, n. 5, p. 868–873, 1999.
- WILLIAMS, D. A. *et al.* Metabolic inhibitors of bacterial glycan biosynthesis. **Chemical science**, v. 11, n. 7, p. 1761-1774, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global oral health status report: towards**

universal health coverage for oral health by 2030. Regional summary of the Region of the Americas. Geneva: World Health Organization, 2022.

WU, D. *et al.* Discovery of specific inhibitors of *Porphyromonas gingivalis* gingipains from food-derived flavonoids by high-throughput virtual screening and molecular simulations. **Food Bioscience**, v. 61, p. 104596, 2024.

WU, Y. *et al.* Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2019.

WULANDARI, P. *et al.* Quality of Life and Its Relationship with Periodontal Disease. **Dentika Dental Journal**, v. 25, n. 2, p. 97-10, 2022.

YAMADA, M. *et al.* Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS microbiology letters**, v. 250, n. 2, p. 271-277, 2005.

YANG, S. *et al.* Quercetin-loaded mesoporous nano-delivery system remodels osteoimmune microenvironment to regenerate alveolar bone in periodontitis via the miR-21a-5p/PDCD4/NF- κ B pathway. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 22, n. 1, p. 94, 2024.

YASHNOVA, N. B. *et al.* Role of red complex bacteria in the severity of chronic periodontitis. **Parodontologia**, v. 30, n. 3, p. 230, 2025

YEKANI, M. *et al.* Microbiological and molecular aspects of periodontitis pathogenesis: an infection-induced inflammatory condition. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, p. 1533658, 2025.

YONEDA, M. *et al.* Stimulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* by cell extracts from *Tannerella forsythia*. **Journal of periodontal research**, v. 40, n. 2, p. 105-109, 2005.

YU, T. *et al.* Oridonin inhibits LPS-induced inflammation in human gingival fibroblasts by activating PPAR γ . **International Immunopharmacology**, v. 72, p. 301-307, 2019.

ZHANG, N. *et al.* Inhibition of IL-6 and IL-8 production in LPS-stimulated human gingival fibroblasts by glycyrrhizin via activating LXR α . **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 135-139, 2017.

ZHANG, P. *et al.* Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16458-16476, 2014.

ZHANG, Q. *et al.* Resveratrol decreases local inflammatory markers and systemic endotoxin in patients with aggressive periodontitis. **Medicine**, v. 101, n. 25, p. e29393, 2022.

ZHANG, X. *et al.* Local icariin application enhanced periodontal tissue regeneration and relieved local inflammation in a minipig model of periodontitis. **International Journal of Oral Science**, v. 10, n. 2, p. 19, 2018.

ZHAO, Y. *et al.* *Treponema denticola* major surface protein (Msp): a key player in periodontal pathogenicity and immune evasion. **Archives of Microbiology**, v. 207, n. 2, p. 36, 2025.

ANEXO

Tabela 11. *Top 80* candidatos *multitarget* (3/3 *in_site*) com melhor consenso energético entre Gingipaína K, Cistalisina e Carilisina.

Ligante	Cistalisina		Carilisina		Gingipaína K		Sum_Afinidade (kcal/mol)
	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	
mol_18_267	-8.599	4832	-14.618	196	-12.268	49	-35.485
mol_12_803	-8.932	3016	-13.435	615	-11.680	107	-34.047
mol_16_59	-8.736	4020	-13.609	520	-11.494	135	-33.839
mol_22_155	-10.808	38	-10.932	2226	-8.253	335	-29.993
mol_1_481	-10.429	112	-10.403	2595	-8.894	312	-29.726
mol_5_367	-10.739	49	-10.579	2450	-8.272	333	-29.590
mol_0_343	-9.995	356	-11.533	1926	-8.012	358	-29.540
mol_0_899	-10.267	177	-10.844	2268	-8.194	339	-29.305
mol_5_159	-10.223	203	-10.698	2358	-8.370	328	-29.291
mol_14_957	-10.559	76	-10.296	2704	-8.315	330	-29.170
mol_8_175	-10.362	135	-10.217	2805	-8.489	319	-29.068
mol_22_368	-11.212	9	-9.818	3569	-7.918	372	-28.948
mol_14_653	-9.994	358	-10.963	2208	-7.970	366	-28.927
mol_1_499	-9.176	2016	-11.270	2053	-8.188	342	-28.634
mol_13_58	-9.474	1156	-11.130	2134	-8.021	354	-28.625

Ligante	Cistalisina		Carilisina		Gingipaina K		Sum_Afinidade (kcal/mol)
	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	
mol_19_591	-10.404	119	-10.261	2739	-7.790	383	-28.455
mol_22_804	-9.240	1811	-10.711	2345	-8.478	320	-28.429
mol_17_179	-9.821	451	-10.183	2847	-8.424	322	-28.428
mol_9_745	-10.266	179	-10.411	2590	-7.749	388	-28.426
mol_6_901	-9.144	2139	-10.447	2563	-8.155	313	-28.406
mol_4_864	-10.202	218	-10.098	2976	-8.003	359	-28.303
mol_21_301	-10.146	261	-10.452	2556	-7.572	419	-28.170
mol_12_438	-9.073	2401	-10.991	2191	-8.081	350	-28.145
mol_15_409	-9.897	444	-10.255	2749	-7.981	361	-28.133
mol_19_380	-9.591	908	-10.061	3035	-8.422	323	-28.074
mol_8_566	-9.679	744	-10.329	2665	-7.978	365	-27.986
mol_12_360	-9.768	613	-9.515	4510	-8.657	316	-27.940
mol_5_958	-10.407	118	-9.388	4979	-8.143	344	-27.938
mol_10_968	-9.873	469	-9.605	4182	-8.418	325	-27.896
mol_16_862	-9.297	1626	-9.525	4456	-8.973	310	-27.795
mol_2_42	-10.300	161	-9.961	3232	-7.509	440	-27.770
mol_7_329	-9.460	1193	-10.309	2688	-7.980	362	-27.749

Ligante	Cistalisina		Carilisina		Gingipaina K		Sum_Afinidade (kcal/mol)
	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	
mol_9_354	-8.947	2941	-10.668	2379	-8.119	346	-27.734
mol_8_990	-9.702	709	-10.083	2997	-7.936	369	-27.721
mol_4_893	-9.358	1444	-10.605	2428	-7.672	398	-27.635
mol_12_962	-9.945	403	-10.072	3012	-7.610	410	-27.627
mol_11_391	-9.793	479	-9.898	3377	-7.924	370	-27.615
mol_8_299	-9.650	795	-9.873	3444	-8.070	351	-27.593
mol_6_916	-9.111	2254	-11.134	2131	-7.344	504	-27.589
mol_16_824	-10.200	220	-9.406	4919	-7.961	368	-27.567
mol_22_676	-8.878	3281	-10.289	2717	-8.400	326	-27.567
mol_2_254	-8.729	4050	-10.555	2470	-8.252	336	-27.536
mol_15_882	-10.23	196	-10.108	2957	-7.151	581	-27.489
mol_4_218	-9.729	670	-9.529	4442	-8.190	341	-27.448
mol_13_345	-8.721	4101	-10.279	2723	-8.445	321	-27.445
mol_21_871	-7.570	420	-9.873	470	-9.999	3158	-27.442
mol_12_213	-9.714	688	-9.683	3942	-7.968	367	-27.365
mol_0_976	-10.003	351	-9.550	4364	-7.788	384	-27.341
mol_23_640	-10.254	185	-9.584	4241	-7.495	445	-27.333

Ligante	Cistalisina		Carilisina		Gingipaina K		Sum_Afinidade (kcal/mol)
	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	
mol_2_315	-10.136	267	-9.450	4735	-7.607	411	-27.193
mol_22_86	-9.811	551	-9.796	3627	-7.559	423	-27.166
mol_21_808	-9.191	1969	-9.897	3381	-8.016	357	-27.104
mol_7_186	-9.075	2396	-10.378	2619	-7.479	452	-26.932
mol_8_734	-8.843	3462	-9.850	3486	-8.129	345	-26.822
mol_5_231	-9.846	501	-9.461	4703	-7.471	455	-26.778
mol_15_267	-9.159	2081	-10.355	2636	-7.257	532	-26.771
mol_5_334	-9.105	2268	-9.799	3615	-7.863	377	-26.767
mol_6_265	-8.626	4656	-10.065	3026	-8.016	355	-26.707
mol_21_985	-9.154	2106	-9.729	3801	-7.757	386	-26.640
mol_9_205	-9.393	1351	-9.556	4344	-7.683	397	-26.632
mol_21_219	-8.766	3856	-10.222	2799	-7.630	407	-26.618
mol_13_446	-8.945	2954	-9.542	4398	-8.109	347	-26.596
mol_21_558	-9.006	2690	-10.476	2532	-7.066	627	-26.548
mol_7_168	-9.973	375	-9.435	4794	-7.135	588	-26.543
mol_4_839	-9.08	2375	-9.883	3411	-7.570	421	-26.533
mol_8_236	-8.735	4023	-9.996	3161	-7.693	395	-26.424

Ligante	Cistalisina		Carilisina		Gingipaína K		Sum_Afinidade (kcal/mol)
	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	Afinidade (kcal/mol)	Rank	
mol_16_520	-9.319	1559	-9.890	3397	-7.159	579	-26.368
mol_23_768	-9.002	2710	-10.098	2974	-7.256	533	-26.356
mol_20_752	-9.573	942	-9.565	4303	-7.207	558	-26.345
mol_0_740	-8.822	3579	-9.797	3621	-7.651	403	-26.270
mol_11_465	-9.058	2470	-9.427	4818	-7.623	408	-26.108
mol_21_860	-8.580	4065	-9.600	4203	-7.887	375	-26.067
mol_3_762	-8.643	4539	-9.956	3250	-7.394	487	-25.993
mol_10_696	-8.910	3118	-9.698	3895	-7.366	499	-25.974
mol_17_370	-8.998	2734	-9.497	4574	-7.422	472	-25.917
mol_0_471	-9.110	2256	-9.547	4377	-7.175	571	-25.832
mol_8_367	-9.142	2143	-9.548	4376	-7.127	593	-25.817
mol_0_147	-8.728	4059	-9.527	4451	-7.470	458	-25.725
mol_20_626	-9.122	2221	-9.389	4973	-7.096	612	-25.607
mol_0_507	-8.751	3924	-9.626	4124	-7.114	602	-25.491