



CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DE CAVIDADES E ACOPLAMENTO MOLECULAR DE SAIS IMIDAZÓLICOS A PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO BIOFILME BACTERIANO ORAL

Clarissa M. L. Schrekker^{1,2}, Leonardo da S. Bittencourt^{1,3}, Leonardo Francisco Diel¹,
Fatima M. Bento², Marcelo L. Lamers¹, Henri S. Schrekker⁴

¹*Laboratório de Migração Celular, Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

³*Escola Estadual de Educação Profissional em Saúde no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Secretaria de Educação do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

⁴*Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

Palavras-Chave: *Quorum sensing*, Sortases, Modelagem molecular

Introdução

A cavidade oral humana abriga uma microbiota complexa e diversificada, organizada em comunidades microbianas aderidas às superfícies bucais e envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A formação desses biofilmes ocorre por meio de uma sucessão ecológica na qual colonizadores precoces, como *Streptococcus oralis* e *Actinomyces oris*, estabelecem as condições necessárias para a adesão de outros microrganismos (Wade, 2021; Jakubovics et al., 2021). Espécies como *Veillonella dispar* participam de interações metabólicas com estreptococos, enquanto *Fusobacterium nucleatum* atua como ponte estrutural entre colonizadores precoces e tardios (Nyvad & Takahashi, 2020). Em condições de disbiose, a proliferação de espécies acidogênicas e acidúricas, particularmente *Streptococcus mutans*, contribui para o desenvolvimento da cárie dentária e para a formação de uma matriz extracelular que aumenta a coesão e a tolerância do biofilme aos agentes antimicrobianos (Koo et al., 2017).

A adesão, a maturação e a comunicação das comunidades bacterianas são reguladas por proteínas relacionadas à virulência e à organização do biofilme (Karygianni et al., 2020). As sortases promovem a ancoragem covalente de proteínas à parede celular de bactérias Gram-positivas. Nesse contexto, a Sortase A de *S. mutans* participa da exposição de adesinas associadas à colonização das superfícies dentárias, enquanto a Sortase C-1 de *A. oris* está relacionada à montagem de pili e à coagregação bacteriana (Hajishengallis & Lamont, 2021). Paralelamente, a comunicação célula a célula é coordenada por sistemas de



quorum sensing. A enzima LuxS participa da síntese do precursor do autoindutor-2 (AI-2), envolvido na sinalização interespecífica, enquanto o domínio peptidase da proteína ComA de *S. mutans* atua no processamento e na exportação do peptídeo estimulador de competência, influenciando a formação do biofilme, a tolerância ao estresse e a produção de bacteriocinas (Munir et al., 2020; Bowen et al., 2018). Por desempenharem funções relacionadas à adesão e à comunicação bacteriana, essas proteínas constituem alvos potenciais para estratégias destinadas a interferir na organização do biofilme.

O controle das infecções bucais associadas a biofilmes permanece desafiador devido à proteção proporcionada pela matriz de EPS, à heterogeneidade metabólica e à presença de células com reduzida suscetibilidade aos antimicrobianos (Flemming et al., 2016). A matriz extracelular pode limitar a difusão de compostos, enquanto os gradientes de nutrientes e oxigênio favorecem a ocorrência de subpopulações metabolicamente distintas. Embora a clorexidina seja amplamente utilizada como antisséptico bucal, seu uso prolongado pode ocasionar efeitos adversos, como alteração do paladar e manchamento dentário, além de não eliminar integralmente biofilmes já estabelecidos (Bonez et al., 2013). Nesse cenário, a identificação de compostos capazes de interagir com proteínas associadas à adesão e à comunicação bacteriana pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias complementares de controle dos biofilmes.

Os sais imidazólicos constituem uma classe de compostos cuja atividade biológica pode ser modulada pela estrutura do cátion, pelo comprimento e pela funcionalização das cadeias laterais e pela natureza do ânion (Ferraz et al., 2011; Egorova et al., 2017). Os derivados contendo cadeias alquílicas longas apresentam atividade antimicrobiana e antibiofilme associada, principalmente, a interações eletrostáticas e hidrofóbicas com membranas e outros componentes celulares (Postleb et al., 2013; Zheng et al., 2016; Reddy et al., 2017). Além desse mecanismo membranolítico, permanece pouco esclarecido se esses compostos podem estabelecer interações favoráveis com proteínas envolvidas na adesão e na sinalização bacteriana. A investigação dessa possibilidade não demonstra, isoladamente, inibição enzimática ou atividade antibiofilme, mas pode identificar interações moleculares prioritárias para posterior validação experimental.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar as cavidades de ligação e avaliar, por acoplamento molecular, a interação dos sais imidazólicos C₁₆MImCl e C₁₆BnImCl com a LuxS de *Bacillus subtilis*, a Sortase A de *Streptococcus mutans*, a Sortase C-1 de *Actinomyces oris* e o domínio peptidase da ComA de *S. mutans*. A abordagem buscou comparar os perfis de acoplamento dos dois compostos e formular hipóteses sobre possíveis interações com proteínas associadas à adesão, à maturação e à comunicação de bactérias relacionadas ao biofilme oral.

Material e Métodos

Delineamento do estudo: Foi realizado um estudo computacional de caracterização de cavidades proteicas e acoplamento molecular de dois sais imidazólicos, C₁₆MImCl e C₁₆BnImCl, a proteínas relacionadas à adesão e à comunicação bacteriana. O estudo não envolveu ensaios experimentais de formação ou inibição de biofilmes; portanto, os resultados obtidos foram interpretados como predições de interação molecular a serem posteriormente validadas por métodos experimentais.



Seleção e preparação dos alvos macromoleculares: As estruturas tridimensionais das proteínas-alvo foram obtidas no Protein Data Bank (PDB): LuxS de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 2FQT), Sortase C-1 de *Actinomyces oris* (PDB ID: 2XWG), Sortase A de *Streptococcus mutans* (PDB ID: 4TQX) e o domínio peptidase da ComA de *S. mutans* (PDB ID: 5XE9). A estrutura da LuxS de *B. subtilis* foi empregada como modelo estrutural devido à conservação do sítio catalítico da enzima entre diferentes espécies bacterianas. As estruturas foram inspecionadas quanto à presença de ligantes cocrystalizados, moléculas de água, íons, cofatores, resíduos incompletos e cadeias proteicas alternativas. Foram adicionados átomos de hidrogênio e atribuídos os estados de protonação e as cargas dos resíduos antes do acoplamento molecular.

Identificação e caracterização das cavidades de ligação: A identificação e o mapeamento das cavidades potencialmente capazes de acomodar os ligantes foram realizados no servidor ProteinsPlus (<https://proteins.plus/>), utilizando a ferramenta DoGSiteScorer. As cavidades foram inicialmente classificadas de acordo com seus valores de Drug Score e Simple Score. Os bolsões com Drug Score igual ou superior a 0,70 foram considerados prioritários; entretanto, sítios com pontuação inferior também foram analisados quando correspondiam à posição de ligantes cocrystalizados ou apresentavam possível relevância estrutural para a comparação entre os alvos. Dessa maneira, o valor de 0,70 foi utilizado como critério de priorização, e não como critério absoluto de exclusão. A caracterização das cavidades incluiu descritores geométricos e dimensionais, volume ($\text{\AA}^3$), área superficial ($\text{\AA}^2$), profundidade ($\text{\AA}$), coeficiente de confinamento e proporções entre os eixos principais do elipsoide (c/a e b/a), composição atômica, grupos funcionais e propriedades dos resíduos. Foram contabilizados os átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, os grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e os centros de interação hidrofóbica. Também foram determinadas a razão de hidrofobicidade e as proporções de resíduos apolares, polares e carregados positiva ou negativamente. Nos alvos que apresentavam ligantes cocrystalizados, os sítios experimentais foram avaliados separadamente das cavidades previstas pelo DoGSiteScorer. Na LuxS (2FQT), foi analisado o sítio ocupado pelo ligante H1D. No domínio peptidase da ComA (5XE9), foi analisado o sítio do ligante 6CH, além das cavidades selecionadas pela análise topográfica.

Modelagem e preparação dos ligantes imidazólicos: As estruturas tridimensionais dos compostos $C_{16}MImCl$ e $C_{16}BnImCl$ foram submetidas à otimização conformacional e à minimização de energia no UCSF Chimera, versão 1.2. O protocolo foi realizado em duas etapas consecutivas: inicialmente, aplicou-se o algoritmo Steepest Descent por 100 passos, com tamanho de passo de 0,02 $\text{\AA}$; em seguida, empregou-se o método Conjugate Gradient por 10 passos, também com tamanho de passo de 0,02 $\text{\AA}$. Foi adotado intervalo de atualização igual a 10, sem manutenção de átomos fixos. Para a atribuição das cargas parciais, utilizou-se o campo de força AMBER ff14SB para os resíduos padrão das proteínas e o método AM1-BCC para os ligantes imidazólicos.

Validação do protocolo por redocking: A validação do protocolo de acoplamento molecular foi realizada por redocking nos receptores que possuíam ligantes cocrystalizados: LuxS de *B. subtilis* (2FQT), contendo o ligante H1D, e domínio peptidase da ComA de *S. mutans* (5XE9), contendo o ligante 6CH. Os ligantes foram removidos de suas posições cristalográficas e reacoplados aos respectivos sítios de ligação utilizando os mesmos parâmetros adotados nas simulações com os compostos imidazólicos. As poses obtidas por redocking foram comparadas às conformações cristalográficas por alinhamento estrutural



no servidor LS-Align (<https://zhanggroup.org/LS-align>). A capacidade de reprodução da pose experimental foi avaliada pelo desvio quadrático médio (root mean square deviation, RMSD), adotando-se $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ como indicativo de desempenho satisfatório do protocolo. Os valores obtidos foram de $0,97 \text{ \AA}$ para o ligante H1D na LuxS e $0,9075 \text{ \AA}$ para o ligante 6CH na ComA.

Acoplamento molecular: O acoplamento molecular de $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ foi realizado no servidor DockThor. As grades de busca foram centralizadas nas cavidades delimitadas pelo DoGSiteScorer ou nos sítios definidos pelos ligantes cocrystalizados. Para o sítio H1D da LuxS, foi empregada uma grade de $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}$. Para as cavidades das sortases e da ComA, foram utilizadas grades de $25 \times 25 \times 23 \text{ \AA}$. As coordenadas centrais das grades foram definidas individualmente de acordo com a localização das cavidades preditas ou dos ligantes cocrystalizados. Os resultados foram comparados por meio dos escores de afinidade fornecidos pelo DockThor e das contribuições estimadas das interações de van der Waals e eletrostáticas. Valores mais negativos do escore de afinidade foram considerados indicativos de poses de acoplamento energeticamente mais favoráveis.

Análise das interações intermoleculares: A visualização das poses selecionadas e a caracterização das interações entre os compostos e os resíduos das cavidades foram realizadas no Discovery Studio Visualizer 2025. A análise incluiu representações bidimensionais e tridimensionais das interações intermoleculares, com identificação de contatos hidrofóbicos, interações eletrostáticas, interações aromáticas, ligações de hidrogênio e contatos de van der Waals. Também foram examinados os mapas de hidrofobicidade, aromaticidade, ionizabilidade, carga interpolada, potencial de formação de ligações de hidrogênio e superfície acessível ao solvente. Os resultados foram utilizados para comparar os perfis de acomodação de $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ nas diferentes cavidades. A presença de poses energeticamente favoráveis foi interpretada como evidência de compatibilidade estrutural, sem atribuição direta de inibição enzimática, atividade anti-virulência ou atividade antibiofilme na ausência de validação experimental.

Resultados e Discussão

A caracterização topográfica e o acoplamento molecular indicaram que $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ apresentam compatibilidade estrutural com cavidades das quatro proteínas avaliadas: LuxS de *Bacillus subtilis* (2FQT), Sortase A de *Streptococcus mutans* (4TQX), Sortase C-1 de *Actinomyces oris* (2XWG) e domínio peptidase da ComA de *S. mutans* (5XE9). Os escores de afinidade variaram de $-7,963$ a $-9,718 \text{ kcal/mol}$, com diferenças dependentes da cavidade e da estrutura do composto. Esses valores foram utilizados para comparar as poses produzidas pelo mesmo protocolo computacional e não foram interpretados como medidas experimentais de energia livre de ligação ou de inibição enzimática.

LuxS de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 2FQT): O mapeamento da LuxS identificou seis cavidades, com volumes entre $121,02$ e $353,47 \text{ \AA}^3$. A cavidade 0 apresentou o maior volume e o maior *Drug Score* ($0,60$). Entretanto, como esse valor foi inferior ao corte de priorização, o acoplamento foi realizado no sítio experimental do ligante cocrystalizado H1D (**Tabela 1**). Embora esse valor seja inferior ao corte de $0,70$ adotado para a priorização das cavidades preditas, o acoplamento foi conduzido no sítio do ligante



cocrystalizado H1D, cuja localização experimental forneceu uma referência estrutural independente da pontuação do DoGSiteScorer.

O *redocking* do H1D reproduziu a conformação cristalográfica com RMSD de 0,97 Å, valor inferior ao limite de 2,0 Å e, portanto, compatível com a capacidade do protocolo de recuperar a pose experimental. No sítio do H1D, C₁₆MImCl apresentou escore de afinidade de −9,371 kcal/mol, enquanto C₁₆BnImCl apresentou −8,865 kcal/mol (**Tabela 2**). Os escores foram utilizados exclusivamente para a comparação relativa das poses produzidas pelo mesmo protocolo computacional.

A pose de C₁₆MImCl apresentou contribuição de van der Waals mais favorável (−25,897 kcal/mol) do que a observada para C₁₆BnImCl (−21,018 kcal/mol). Esse resultado sugere que, no sítio analisado, a ausência do grupo benzila pode favorecer a acomodação da cadeia C16, possivelmente em razão da menor demanda estérica do C₁₆MImCl. Entretanto, a possível interferência na atividade da LuxS somente poderá ser estabelecida se as poses ocuparem regiões relevantes para o reconhecimento do substrato, a coordenação do metal ou a catálise enzimática.

A utilização da LuxS de *B. subtilis* como modelo estrutural fundamenta-se na conservação do sítio catalítico dessa enzima entre diferentes bactérias (Ruzheinikov et al., 2001; Shen et al., 2006). Apesar disso, a extrapolação dos resultados para espécies da microbiota oral requer cautela e deverá ser sustentada pela comparação entre sequências, resíduos catalíticos e estruturas dos respectivos sítios de ligação. Assim, os resultados obtidos com 2FQT devem ser entendidos como uma primeira aproximação estrutural para a investigação da possível interação dos compostos com a via de sinalização mediada por AI-2.

Tabela 1. Síntese das cavidades preditas e das regiões selecionadas para o acoplamento molecular.

Proteína-alvo	PDB ID	Cavidades caracterizadas	Faixa de volume (Å ³)	Maior Drug Score (cavidade)	Regiões avaliadas no docking
LuxS de <i>Bacillus subtilis</i>	2FQT	0–5	121,02–353,47	0,60 (cavidade 0)	Sítio do ligante H1D
Sortase A de <i>Streptococcus mutans</i>	4TQX	0 e 1	478,78–636,54	0,83 (cavidade 0)	Cavidades 0 e 1
Sortase C-1 de <i>Actinomyces oris</i>	2XWG	0–5	381,29–936,01	0,83 (cavidades 0 e 1)	Cavidades 0–5
Domínio peptidase da ComA de <i>Streptococcus mutans</i>	5XE9	0, 4 e 6	250,82–460,48	0,81 (cavidade 0)	Cavidades 0, 4 e 6 e sítio do ligante 6CH

Nota: cavidades com Drug Score $\geq 0,70$ foram priorizadas, sem aplicação desse valor como critério absoluto de exclusão. Os sítios dos ligantes cocrystalizados H1D, na LuxS, e 6CH, na ComA, foram definidos com base nas respectivas estruturas cristalográficas e não correspondem necessariamente às cavidades preditas pelo DoGSiteScorer.

Tabela 2. Acoplamento molecular dos compostos imidazólicos no sítio do ligante cocrystalizado H1D da LuxS de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 2FQT).



Composto	Escore de afinidade (kcal/mol)	Energia de van der Waals (kcal/mol)	Energia de Coulomb (kcal/mol)
C ₁₆ MImCl	-9,371	-25,897	-0,154
C ₁₆ BnImCl	-8,865	-21,018	-0,503

Nota: o protocolo foi validado por *redocking* do ligante H1D, obtendo-se RMSD de 0,97 Å em relação à pose cristalográfica. Valores mais negativos indicam resultados mais favoráveis segundo a função de pontuação empregada e não correspondem a medidas experimentais de afinidade.

Sortase A de *Streptococcus mutans* (PDB ID: 4TQX): A Sortase A apresentou duas cavidades favoráveis à acomodação dos compostos. A cavidade 0 exibiu maior volume (636,54 Å³), *Drug Score* de 0,83, proporção de resíduos apolares de 0,59 e 44 centros de interação hidrofóbica, enquanto a cavidade 1 apresentou volume de 478,78 Å³, *Drug Score* de 0,74, proporção de resíduos apolares de 0,33 e 42 centros hidrofóbicos. Na cavidade 0, C₁₆BnImCl e C₁₆MImCl apresentaram escores de -9,718 e -9,646 kcal/mol, respectivamente, com contribuições de van der Waals de -28,799 e -28,412 kcal/mol. Na cavidade 1, os escores foram de -9,091 e -8,969 kcal/mol, respectivamente. A cavidade 0, portanto, apresentou os resultados mais favoráveis para ambos os compostos, em concordância com seu maior volume e caráter predominantemente apolar. Entretanto, as pequenas diferenças entre os ligantes, de 0,072 kcal/mol na cavidade 0 e 0,122 kcal/mol na cavidade 1, não permitem estabelecer superioridade inequívoca de um deles (**Tabelas 1 e 3**).

Tabela 3. Acoplamento molecular de C₁₆MImCl e C₁₆BnImCl nas cavidades da Sortase A de *Streptococcus mutans* (PDB ID: 4TQX).

Cavidade	Composto	Escore de afinidade (kcal/mol)	Energia de van der Waals (kcal/mol)	Energia de Coulomb (kcal/mol)
0	C ₁₆ MImCl	-9,646	-28,412	-0,652
0	C ₁₆ BnImCl	-9,718	-28,799	-2,174
1	C ₁₆ MImCl	-8,969	-21,087	-5,185
1	C ₁₆ BnImCl	-9,091	-21,901	-6,933

Nota: valores mais negativos indicam resultados energeticamente mais favoráveis segundo a função de pontuação empregada. Os escores devem ser utilizados para comparação relativa entre poses geradas pelo mesmo protocolo e não correspondem a medidas experimentais de energia livre ou afinidade.

A Sortase A participa da ancoragem de proteínas de superfície relacionadas à adesão de *S. mutans* e à formação do biofilme (Wallock-Richards et al., 2015; Jacobitz et al., 2017; Schander et al., 2021). Embora os resultados indiquem compatibilidade estrutural dos dois compostos com suas cavidades, uma possível inibição funcional somente poderá ser proposta após a confirmação de que as poses interferem no sítio catalítico, no acesso do substrato ou em uma região alostérica relevante.

Sortase C-1 de *Actinomyces oris* (PDB ID: 2XWG): A Sortase C-1 apresentou seis cavidades, com volumes entre 381,29 e 936,01 Å³ e *Drug Scores* entre 0,72 e 0,83. A cavidade 0 apresentou o maior volume (936,01 Å³), enquanto as cavidades 0 e 1 alcançaram o maior *Drug Score* (0,83). Entretanto, os escores de acoplamento mais favoráveis foram observados nas cavidades 3 e 4, que apresentaram proporções de resíduos apolares de 0,46 e 0,48, respectivamente. Esses resultados mostram que o maior volume ou



Drug Score não determinou isoladamente a melhor acomodação dos compostos, ressaltando a influência conjunta da geometria e da composição físico-química das cavidades (**Tabela 1**).

Na Sortase C-1, C₁₆MImCl apresentou os escores mais favoráveis nas cavidades 3 (−9,620 kcal/mol), 4 (−9,611 kcal/mol) e 1 (−9,596 kcal/mol), enquanto C₁₆BnImCl apresentou seu melhor resultado na cavidade 4 (−9,654 kcal/mol). Na melhor pose de C₁₆MImCl, localizada na cavidade 3, foram observadas contribuições de van der Waals e de Coulomb de −26,278 e −10,237 kcal/mol, respectivamente. Para C₁₆BnImCl, a melhor pose, identificada na cavidade 4, apresentou contribuições de −26,331 kcal/mol para as interações de van der Waals e de −11,623 kcal/mol para as interações de Coulomb. Esses resultados indicam a participação conjunta de componentes hidrofóbicos e eletrostáticos na acomodação dos compostos e sugerem que a presença do grupo benzila influencia a preferência relativa pelas cavidades. A cavidade 0, apesar de possuir o maior volume e um dos maiores *Drug Scores*, produziu os escores menos favoráveis para ambos os ligantes, demonstrando que o volume e a pontuação de *druggability* não determinaram isoladamente a acomodação molecular. Entretanto, a diferença de apenas 0,034 kcal/mol entre os melhores escores de C₁₆BnImCl e C₁₆MImCl encontra-se abaixo da precisão atribuível à função de pontuação empregada, não permitindo estabelecer superioridade inequívoca de um composto sobre o outro (**Tabela 4**).

Tabela 4. Comparação dos escores de acoplamento molecular de C₁₆MImCl e C₁₆BnImCl nas cavidades da Sortase C-1 de *Actinomyces oris* (PDB ID: 2XWG).

Cavidade	C ₁₆ MImCl (kcal/mol)	C ₁₆ BnImCl (kcal/mol)
0	−7,963	−8,261
1	−9,596	−9,462
2	−9,095	−9,162
3	−9,620	−9,460
4	−9,611	−9,654
5	−9,462	−9,078

Nota: valores mais negativos indicam resultados mais favoráveis segundo a função de pontuação empregada. Os escores permitem a comparação relativa das poses produzidas pelo mesmo protocolo, mas não correspondem a medidas experimentais de energia livre ou afinidade.

A cavidade 0, apesar de possuir o maior volume e um dos maiores *Drug Scores*, produziu os escores menos favoráveis para ambos os ligantes. Portanto, o volume e a pontuação de *druggability* não determinaram isoladamente a acomodação dos compostos. Além disso, a diferença de apenas 0,034 kcal/mol entre os melhores escores de C₁₆BnImCl e C₁₆MImCl encontra-se abaixo da precisão normalmente atribuível às funções de pontuação de *docking*, não permitindo estabelecer superioridade inequívoca de um derivado sobre o outro.

A obtenção de poses favoráveis em diferentes cavidades pode refletir a capacidade das moléculas anfífilas de se acomodarem em superfícies com distintas combinações de regiões apolares e carregadas. Esse comportamento pode indicar flexibilidade de interação, mas também pode estar associado a ligação pouco específica. Por isso, a presença de múltiplas poses favoráveis não deve ser interpretada, isoladamente, como evidência de atuação politópica funcional. A relevância de cada cavidade deverá ser avaliada com base em sua proximidade ao sítio catalítico ou às regiões envolvidas no reconhecimento do



substrato e na montagem dos pili de *A. oris* (Persson, 2011; Jacobitz et al., 2017; Bhat et al., 2024).

Domínio peptidase da ComA de *Streptococcus mutans* (PDB ID: 5XE9): O domínio peptidase da ComA apresentou três cavidades selecionadas. A cavidade 0 destacou-se pelo maior volume (460,48 Å³), Drug Score de 0,81, proporção de resíduos apolares de 0,81 e 52 centros de interação hidrofóbica. A cavidade 4 apresentou volume de 261,70 Å³, Drug Score de 0,54 e a maior razão de hidrofobicidade entre as regiões analisadas (0,61). Em contraste, a cavidade 6 apresentou volume de 250,82 Å³, Drug Score de 0,72 e caráter predominantemente polar, com proporção de resíduos polares de 0,71. Essas diferenças evidenciam ambientes físico-químicos distintos para a acomodação dos compostos imidazólicos. Além das cavidades previstas, foi avaliado o sítio experimental ocupado pelo ligante cocrystalizado 6CH (Tabela 1).

O *redocking* do ligante 6CH resultou em RMSD de 0,9075 Å, indicando reprodução satisfatória da pose cristalográfica. No sítio do 6CH, C₁₆MImCl apresentou escore de -9,406 kcal/mol, ligeiramente mais favorável que o valor de -9,257 kcal/mol obtido para C₁₆BnImCl. Na cavidade 0, os escores foram de -9,289 kcal/mol para C₁₆MImCl e -9,331 kcal/mol para C₁₆BnImCl (Tabela 5).

Os valores próximos indicam que os dois compostos apresentam comportamento comparável na principal cavidade predita e no sítio do ligante cocrystalizado. Embora o C₁₆MImCl tenha obtido escore ligeiramente mais favorável no sítio do 6CH e o C₁₆BnImCl na cavidade 0, as diferenças são insuficientes para sustentar uma classificação robusta de afinidade. A elevada hidrofobicidade da cavidade 0 pode favorecer a acomodação das cadeias C₁₆; entretanto, a eventual interferência no processamento e na exportação do peptídeo estimulador de competência depende da localização da pose em relação aos resíduos necessários à função da ComA (Ishii et al., 2017; Lemos et al., 2019).

Tabela 5. Comparação dos escores de acoplamento molecular de C₁₆MImCl e C₁₆BnImCl nas cavidades previstas e no sítio do ligante 6CH do domínio peptidase da ComA de *Streptococcus mutans* (PDB ID: 5XE9).

Região analisada	C ₁₆ MImCl (kcal/mol)	C ₁₆ BnImCl (kcal/mol)
Sítio 6CH	-9,406	-9,257
Cavidade 0	-9,289	-9,331
Cavidade 4	-9,003	-8,945
Cavidade 6	-8,511	-8,824

Nota: o protocolo foi validado por *redocking* do ligante 6CH, obtendo-se RMSD de 0,9075 Å em relação à pose cristalográfica. Valores mais negativos indicam resultados mais favoráveis segundo a função de pontuação empregada e não correspondem a medidas experimentais de afinidade.

Análise integrada dos alvos: A comparação entre as quatro proteínas demonstrou que os dois compostos produziram escores relativamente próximos nos diferentes alvos, sem predominância consistente de C₁₆MImCl ou C₁₆BnImCl. C₁₆MImCl apresentou o resultado mais favorável no sítio H1D da LuxS e no sítio 6CH da ComA, enquanto C₁₆BnImCl apresentou valores discretamente mais negativos na cavidade 0 da Sortase A e na cavidade 4 da Sortase C-1. As diferenças observadas sugerem que o grupo benzila modifica a acomodação do ligante de maneira dependente da geometria e da composição de cada



cavidade, mas os dados não demonstram, isoladamente, uma relação estrutura-atividade conclusiva.

As contribuições de van der Waals observadas nas poses são compatíveis com a participação da cadeia alquílica C_{16} na interação com regiões hidrofóbicas. Já a cabeça imidazólio pode contribuir para a orientação do ligante em regiões polares ou carregadas. Entretanto, essa interpretação estrutural deve considerar a natureza anfifílica dos compostos, que pode favorecer sua associação com diferentes superfícies proteicas sem necessariamente resultar em inibição seletiva. Simulações de dinâmica molecular, estimativas de energia livre por métodos mais robustos e ensaios com proteínas não relacionadas seriam úteis para avaliar a estabilidade e a especificidade das interações previstas.

Do ponto de vista biológico, as proteínas analisadas participam de processos relacionados à adesão, à montagem de estruturas superficiais e à comunicação bacteriana. A Sortase A e a Sortase C-1 estão associadas à exposição de adesinas e à formação de pili, enquanto LuxS e ComA participam de sistemas de sinalização envolvidos na organização das comunidades microbianas (Huang et al., 2009; Persson, 2011; Lemos et al., 2019). Dessa forma, a interação com essas proteínas constitui uma hipótese molecular relevante para investigar possíveis efeitos dos sais imidazólicos sobre a formação e a maturação do biofilme oral.

Todavia, o acoplamento molecular não demonstra que os compostos inibem essas proteínas, interrompem o quorum sensing ou reduzem a formação de biofilmes. Também não permite concluir que atuem exclusivamente por um mecanismo anti-virulência ou que preservem a viabilidade bacteriana. Essa ressalva é particularmente importante porque sais imidazólicos com cadeias alquílicas longas apresentam atividade antimicrobiana associada à interação com membranas celulares (Postleb et al., 2013; Zheng et al., 2016; Pan et al., 2022). Assim, uma eventual interação com alvos proteicos poderá representar um mecanismo complementar à ação membranolítica, e não necessariamente uma via independente ou seletiva.

Em conjunto, os resultados identificam cavidades e poses prioritárias para estudos subsequentes, com destaque para o sítio H1D da LuxS, a cavidade 0 da Sortase A, as cavidades 3 e 4 da Sortase C-1 e o sítio 6CH e a cavidade 0 da ComA. A confirmação da relevância funcional dessas interações requer ensaios enzimáticos, determinação experimental da afinidade, avaliação da seletividade e testes de formação e desestruturação de biofilmes orais. Esses experimentos deverão ser associados a análises de viabilidade bacteriana e citotoxicidade em células humanas para distinguir um possível efeito sobre processos de virulência da atividade antimicrobiana geral dos compostos.

Conclusões

A caracterização topográfica e os ensaios de acoplamento molecular indicaram que $C_{16}MImCl$ e $C_{16}BnImCl$ apresentam compatibilidade estrutural com cavidades da LuxS, da Sortase A, da Sortase C-1 e do domínio peptidase da ComA, proteínas relacionadas à comunicação, à adesão e à organização de bactérias associadas ao biofilme oral. Os dois compostos produziram escores de afinidade semelhantes, com diferenças dependentes da geometria e da composição físico-química de cada cavidade, sem predominância consistente de um dos derivados. Os resultados permitiram identificar regiões prioritárias



para investigação experimental, destacando-se o sítio H1D da LuxS, a cavidade 0 da Sortase A, as cavidades 3 e 4 da Sortase C-1 e o sítio 6CH e a cavidade 0 da ComA. As contribuições de van der Waals observadas nas poses sugerem participação relevante da cadeia alquílica C_{16} na acomodação dos compostos em regiões hidrofóbicas, enquanto as diferenças entre $C_{16}MImCl$ e $C_{16}BnImCl$ apontam para influência do grupo benzila sobre o ajuste estérico em cavidades específicas. Esses achados sustentam a hipótese de que a interação com proteínas associadas à formação e à maturação do biofilme possa constituir um mecanismo complementar à atividade antimicrobiana já atribuída aos sais imidazólicos de cadeia longa. Entretanto, o acoplamento molecular não comprova inibição enzimática, interferência no quorum sensing ou atividade antibiofilme. A relevância funcional das interações previstas deverá ser confirmada por ensaios enzimáticos, determinação experimental da afinidade, avaliação da seletividade e testes em modelos de biofilmes orais. Essas análises, associadas a estudos de viabilidade bacteriana e citotoxicidade em células humanas, serão necessárias para distinguir possíveis efeitos sobre fatores de virulência da atividade antimicrobiana geral dos compostos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

Referências

- BHAT, Aadil H.; CHANG, Chungyu; DAS, Asis; TON-THAT, Hung. Molecular basis for sortase-catalyzed pilus tip assembly. **mBio**, v. 15, n. 9, e01484-24, 2 ago. 2024. DOI: 10.1128/mbio.01484-24.
- BONEZ, Pauline Cordenonsi; ALVES, Camilla Filippi dos Santos; DALMOLIN, Tanise Vendruscolo; AGERTT, Vanessa Albertina; MIZDAL, Caren Rigon; FLORES, Vanessa da Costa; MARQUES, Jaciane Baggiotto; SANTOS, Roberto Christ Vianna; CAMPOS, Marli Matiko Anraku de. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 12, p. e119-e122, dez. 2013. DOI: 10.1016/j.ajic.2013.05.002.
- BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; WU, H.; KOO, H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in dental caries. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 229-242, 2018.
- EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P. Biological activity of ionic liquids: toxicity costs and sustainability benefits. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 7132-7189, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00562.
- FERRAZ, Ricardo; BRANCO, Luís C.; PRUDÊNCIO, Cristina; NORONHA, João Paulo; PETROVSKI, Željko. Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. **ChemMedChem**, v. 6, n. 6, p. 975-985, 6 jun. 2011. DOI: 10.1002/cmdc.201100082.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.



- HAIJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Polymicrobial communities in periodontal disease: their role in induction and progression. **Periodontology** **2000**, v. 86, n. 1, p. 21-34, 2021. DOI: 10.1111/prd.12372.
- HUANG, Z.; MERIC, G.; LIU, Z.; MA, R.; TANG, Z.; LEJEUNE, P. luxS-based quorum-sensing signaling affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 12-19, 2009. DOI: 10.1159/000159193.
- ISHII, S.; FUKUI, K.; YOKOSHIMA, S.; KUMAGAI, K.; BENIYAMA, Y.; KODAMA, T.; FUKUYAMA, T.; OKABE, T.; NAGANO, T.; KOJIMA, H.; YANO, T. High-throughput screening of small molecule inhibitors of the *Streptococcus mutans* quorum-sensing signal pathway. **Scientific Reports**, v. 7, art. 4029, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-04352-1.
- JACOBITZ, A. W.; KATTKE, M. D.; WERESZCZYNSKI, J.; CLUBB, R. T. Sortase transpeptidases: structural biology and catalytic mechanism. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 109, p. 223-264, 2017. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2017.04.006.
- JAKUBOVICS, N. S.; GOODMAN, S. D.; MASHBURN-WARREN, L.; STAFFORD, G. P.; CIEPLIK, F. The dental plaque biofilm matrix. **Periodontology** **2000**, v. 86, n. 1, p. 32-56, 2021. DOI: 10.1111/prd.12361.
- KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668-681, ago. 2020. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.016.
- KOO, H.; ALLAN, R. N.; HOWLIN, R. P.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740-755, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.99.
- LEMOES, J. A.; PALMER, S. R.; ZENG, L.; WEN, Z. T.; KAJFASZ, J. K.; FREIRES, I. A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L. J. The biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, p. GPP3-0051-2018, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
- MUNIR, Samman; MANZOOR, Irfan; HASNAIN, Shahida. Quorum sensing interfering strategies and their implications in the management of biofilm-associated bacterial infections. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, e20190555, 2020. DOI: 10.1590/1678-4324-2020190555.
- NYVAD, B.; TAKAHASHI, N. Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. **Journal of Oral Microbiology**, v. 12, n. 1, art. 1710953, 2020. DOI: 10.1080/20002297.2019.1710953.
- PAN, Ting; LIU, Feng-Shou; LIN, Huancai; ZHOU, Yan. Anti-biofilm studies of synthetic imidazolium salts on dental biofilm in vitro. **Journal of Oral Microbiology**, v. 14, n. 1, art. 2075309, 17 maio 2022. DOI: 10.1080/20002297.2022.2075309.
- PERSSON, Karina. Structure of the sortase AcSrtC-1 from *Actinomyces oris*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 3, p. 212-217, mar. 2011. DOI: 10.1107/S0907444911004215.
- POSTLEB, Frank; STEFANIK, Danuta; SEIFERT, Harald; GIERNOTH, Ralf. BIONic Liquids: Imidazolium-based Ionic Liquids with Antimicrobial Activity. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 68, n. 10, p. 1123-1128, out. 2013. DOI: 10.5560/ZNB.2013-3150.



- REDDY, G. Kiran Kumar; NANCHARAI, Y. V.; VENUGOPALAN, V. P. Long alkyl-chain imidazolium ionic liquids: antibiofilm activity against phototrophic biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 487-496, 1 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.040.
- RUZHEINIKOV, S. N.; DAS, S. K.; SEDELNIKOVA, S. E.; HARTLEY, A.; FOSTER, S. J.; HORSBURGH, M. J.; COX, A. G.; CHOUDHURY, C. W.; BAKER, P. J.; RICE, D. W. The 1.2 Å structure of a novel quorum-sensing protein, *Bacillus subtilis* LuxS. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 1, p. 111-122, 2001. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5033.
- SCHANDER, A. J.; WALLOCK-RICHARDS, D. J.; CAMPOPIANO, D. J. Targeting Gram-positive bacterial sortase A with small-molecule inhibitors to combat cell adhesion and biofilm formation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 40, art. 116172, 2021. DOI: 10.1016/j.bmc.2021.116172.
- SHEN, Gang; RAJAN, Rakhi; ZHU, Jinge; BELL, Charles E.; PEI, Dehua. Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-ribosylhomocysteinase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 3003-3011, 18 maio 2006. DOI: 10.1021/jm060047g.
- WADE, W. G. Resilience of the oral microbiome. **Periodontology 2000**, v. 86, n. 1, p. 113-122, 2021. DOI: 10.1111/prd.12365.
- WALLOCK-RICHARDS, D. J.; MARLES-WRIGHT, J.; CLARKE, D. J.; MAITRA, A.; DODDS, M.; HANLEY, B.; CAMPOPIANO, D. J. Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. **Chemical Communications**, v. 51, n. 52, p. 10483-10485, 2015. DOI: 10.1039/c5cc03183b.
- ZHENG, Lin; CHEN, Jiandong; ZHANG, Shulin. Electrostatic and hydrophobic interaction driven membrane disruption by imidazolium-based ionic liquids. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 5, p. 1801-1810, 2016. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00247.