



**Modelagem e Comparação da HPPD em Culturas Agrícolas: Bases para Herbicidas com**

**Maior Segurança ao Cultivar**

**Luiz R. Capucho (PG)¹\*, Elaine F. F. Cunha (PQ)¹, Matheus P. de Freitas (PQ)¹**

¹ Departamento de Quimica, Intituto de Ciencias Naturais, Universidade Federal de Lavras

\* luiz.capucho2@estudante.ufla.br

**RESUMO**

A obtenção de estruturas tridimensionais das enzimas em diferentes culturas é essencial para uma melhor triagem no desenvolvimento teórico de novos herbicidas. Neste estudo, modelos de homologia de alta qualidade da enzima HPPD para espécies de sorgo, soja e algodão foram construídos utilizando enzimas de milho e *Arabdopsis thaliana* como organismos de referência. A validação estrutural, guiada por análises de RMSD, violações e parâmetros estatísticos, confirmou a confiabilidade dos modelos propostos. O ancoramento molecular com a mesotriona revelou conservação da cavidade ativa, com resíduos corretamente posicionados para a efetivação da coordenação com Fe II e das interações π-π já relatadas. Apesar desta conservação, especificidades trazem diferentes níveis de afinidade do ligante na cavidade enzimática, respaldando a importância destes modelos no desenvolvimento de herbicidas seletivos.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_



*Palavras-chave: Modelagem por Homologia, HPPD, Sorgo, Soja, Algodão*

*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_*



**Introdução**



O sucesso da modelagem tridimensional de proteínas esta diretamente relacioando à correta representação do seu dobramento, fator essencial para a compreensão de suas funções biológicas. Considerando a relação entre conservação estrutural e função, é amplamente aceito que proteínas homólogas compartilham dobramentos semelhantes, especialmente em regiões funcionalmente relevantes (1).

A enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), presente em todos os seres vivos com exceção a algumas bactérias gram-positivas, é um alvo promissor no desenvolvimento de herbicidas seletivos (2). Por atuar por inibição competitiva, a conservação da cavidade ativa entre diferentes espécies é um aspecto crucial para o reconhecimento de inibidores que mimetizam o substrato natural. Interações específicas, como a coordenação de ligantes ao íon metálico e empilhamentos π-π com resíduos aromáticos, são fundamentais para a estabilidade do complexo enzima-ligante (3).

No entanto, a ausência de estruturas cristalográficas para variantes da HPPD em culturas agrícolas relevantes limita o avanço racional no desenvolvimento de novos compostos. Diante disso, este trabalho propõe a modelagem tridimensional da HPPD em espécies de sorgo, soja e algodão, com o objetivo de gerar modelos estruturais confiáveis para triagens virtuais (4). A conservação da cavidade ativa foi avaliada por meio de análises de afinidade, contribuindo com subsídios estruturais para a proposição de novos inibidores seletivos.

**Experimental**

Para a modelagem da enzima HPPD, foram selecionadas estruturas com alta identidade e resolução por meio de buscas no NCBI BLAST. Uma estrutura de milho foi utilizada como molde para os modelo de sorgo, enquanto estruturas de *Arabdopsis thaliana* foram adotadas para os modelos de soja e algodão. As diferenças nas sequências foram analisadas com o PRABI CLUSTALW, e a modelagem tridimensional foi realizada no Geno3D. Entre os cinco modelos gerados para cada espécie, foi selecionado aquele com menor número de violações estereoquímicas e energia interna mais baixa. O refinamento estrutural foi conduzido com a ferramenta Galaxy.

A qualidade dos modelos foi avaliada por meio do desvio quadrático médio (RMSD) em relação à sequência FASTA, análise do gráfico de Ramachandran e comparação estrutural com predições obtidas pelo AlphaFold 3.

Para o teste de afinidade, foi utilizada a estrutura cristalográfica 5YWG (PDB), que compreende a mesotriona como ligante e o íon cobalto (II) como cofator. O redocking rígido foi realizado no software AutoDock4, utilizando o algoritmo genético como método de busca, com os seguintes parâmetros: população de 150 indivíduos, taxa de mutação de 0,02, taxa de cruzamento de 0,8 e 27.000 gerações. Os modelos gerados foram preparados com adição do cofator metálico, e o ligante foi submetido às mesmas condições do redocking. As conformações resultantes foram analisadas quanto à energia de ligação e interações moleculares.

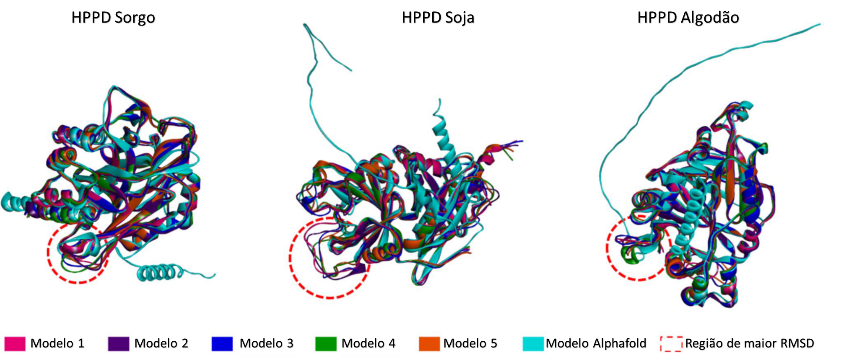
**Resultados e Discussão**

Os modelos construídos apresentaram identidades de sequência em relação aos respectivos moldes e resolução como descrito na Tabela 1. A análise por alinhamento revelou que as regiões ausentes nos moldes correspondiam, em sua maioria, a segmentos de alça, os quais não possuem dobramento definido. Nos modelos tridimensionais gerados, essas mesmas regiões apresentaram valores elevados de RMSD, refletindo a capacidade do método em propor conformações alternativas para segmentos estruturalmente mais flexíveis.

Tabela 1. Identidade estrutural entre modelos e molde

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Modelo | Molde | PDB ID (molde) | Resolução | identidade |
| Sorgo | Milho | 1SP8 | 2.00A | 93,78% |
| Soja | *A. thaliana* | 1SP9 | 3.00A | 72.35% |
| Algodão | *A. thaliana* | 1SQD | 1.80A | 77.62% |

A comparação com as estruturas preditas pelo AlphaFold 3 demonstrou alta convergência entre os modelos, especialmente nas regiões de dobramento secundário definidas. Enquanto os modelos por homologia não incluíam os trechos terminais, o AlphaFold os propôs com dobramento indefinido (Figura 1). A capacidade reduzida do webserver Alphafold em propor regiões não conservadas, porém, ja foi previamente relatada (5).



**Figura 1.** Comparação entre modelos confeccionados por homologia e modelo criado pelo Alphafold 3.

A seleção final dos modelos foi baseada no consenso entre menores valores de energia interna e menor número de violações estereoquímicas no gráfico de Ramachandran. Após refinamento, todos os resíduos passaram a ocupar regiões permitidas, com exceção dos resíduos THR210 e LYS241 no modelo de algodão. No entanto, por se localizarem em regiões de alça e distantes do sítio ativo, esses desvios não comprometeram a qualidade geral do modelo.

Nos ensaios de afinidade, utilizou-se a mesotriona como ligante padrão, visando uma comparação direta com a enzima cristalizada (5YWG). As interações críticas, como a coordenação ao íon metálico e os empilhamentos π-π, foram monitoradas, bem como a energia de ligação do ligante na cavidade ativa. O redocking da mesotriona apresentou RMSD de 0,89 Å em relação à pose experimental, validando a metodologia empregada.



Embora os ligantes tenham se estabilizado nas cavidades das enzimas modeladas e reproduzido as interações esperadas, nenhuma das energias de ligação superou a do modelo cristalizado de *A. thaliana* (-13,95 kcal·mol⁻¹). Isso sugere uma menor afinidade dos ligantes pelas variantes da enzima em sorgo, soja e algodão, ainda que todas conservem a arquitetura do sítio ativo — característica comum entre enzimas homólogas de mesmo mecanismo. Em ordem decrescente de afinidade, observou-se a seguinte tendência: soja (-12,04 kcal·mol⁻¹), sorgo (-11,26 kcal·mol⁻¹) e algodão (-10,58 kcal·mol⁻¹).



**Conclusões**

Os modelos por homologia apresentaram boa qualidade estrutural e conservaram o sítio ativo da enzima, apesar de variações em regiões flexíveis. A metodologia de acoplamento foi validada com redocking da mesotriona e os ligantes mostraram menor afinidade nas variantes de sorgo, soja e algodão em relação à enzima de *A. thaliana*, sugerindo diferenças sutis na interação que podem guiar o desenho de novos inibidores. Nesse contexto, o presente trabalho se consolida como uma abordagem teórica robusta para a modelagem de estruturas da HPPD, oferecendo subsídios relevantes para o desenvolvimento racional de novos herbicidas seletivos.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, número de processo 306830/2021-3) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

**Referências**

1. O.A. Santos Filho, R.B. Alencastro, *Quím. Nova* **2003**, 26 (2), 253-259.
2. G.R. Moran, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 433 (1), 117-128.
3. T. Ms, S. Gao, L-X. Zhao, J. Agric. Food Chem. **2024**, 72 (31), 17125-17137.
4. L.R. Capucho, E.F.F. Cunha, M.P. Freitas. **2025**, 18 (54).
5. T. Wang, L. Wang, X. Zhang et al., *Brief. Bioinform*. **2024**, 25 (1).