

## **ESTUDO DA ABSORÇÃO E METABOLISMO *IN SILICO* DO COMPOSTO 4-(2-HIDROXILO)-1-PIPERAZINA ÁCIDO ELFNÔNICO UM PROMISSOR INIBIDOR DA PROTEÍNA SPIKE DA VARIANTE ÔMICRON – SARS-COV-2**

**Elcio Ferreira Santana<sup>1</sup>  
Cezimar de Paula Lima<sup>2</sup>  
Adriano Carlos Soares<sup>3</sup>**

professoradrianosoares@gmail.com

**ÁREA DO CONHECIMENTO:** Ciências da Saúde

### **RESUMO**

No final de 2019 foi descoberta uma nova linhagem de coronavírus, o SARS-CoV-2, o qual foi responsável por uma pandemia entre os anos de 2020 a 2022, ocasionando várias mortes e prejuízos globais. (AHMAD *et al.*, 2021). A infecção se dá pela interação do SARS-CoV-2 com a enzima conversora de angiotensina II, presente principalmente no epitélio respiratório (GUEDES *et al.*, 2021). O presente estudo teve por objetivo avaliar os parâmetros farmacocinéticos do composto 4-(2-hidroxilo) -1-piperazina ácido elfnônico, o qual apresentou-se com um potencial inibidor da proteína responsável pela endocitose do vírus pelas células humanas (SANTANA; SOARES, 2021). A análise foi realizada por meio das plataformas *SwissADME* e *ADMETlab*, e da avaliação quanto à adequação às regras de Lipinski, apontando para uma baixa permeabilidade na pele, inexistência de afinidade pela glicoproteína-P e não violação às regras de Lipinski. Foram encontradas divergências quanto à absorção intestinal do composto, apontando para a necessidade de mais estudos com a substância.

**PALAVRAS-CHAVE:** bioinformática, variante ômicron, lipinski.

### **INTRODUÇÃO**

No final de 2019 foi descoberta uma nova linhagem de coronavírus, o SARS-CoV-2, que no início de 2020 causou uma pandemia que perdurou até o início de 2022 causando várias mortes e prejuízos globais. A COVID-19 é uma infecção causada pelo coronavírus que infecta o ser humano trazendo vários sinais respiratórios e outras complicações (AHMAD *et al.*, 2021).

---

<sup>1</sup> Graduando em Farmácia do Centro Universitário Vértice - Univértix – Acadêmico do PIBIC/UNIVÉRTIX.

<sup>2</sup> Graduando em Farmácia do Centro Universitário Vértice - Univértix

<sup>3</sup> Farmacêutico Bioquímico (FAFAR/UFOP), Cirurgião Dentista (UNIVÉRTIX); Doutor em Bioquímica Aplicada (Biotecnologia) (UFV); Mestre em Ciências Naturais e da Saúde (UNEC); Especialista em Docência do Ensino Superior (UCAM, RJ); Professor dos cursos de Farmácia, Psicologia, Enfermagem, Biomedicina e Odontologia do Centro Universitário Univértix.

Para a infecção viral mediada pelo coronavírus um dos principais locais de ação é o sistema respiratório. Assim como no SARS-CoV, o SARS-CoV-2 também interage com a enzima conversora de angiotensina II (ECA2), porém uma nova linhagem apresenta maior afinidade pelo receptor e age em local diferente. Desde o início da pandemia os esforços voltados para elucidação desta linhagem foram imensos no mundo todo, vários bancos de dados já possuem o genoma, proteoma e alguns transcriptomas depositados, sendo permitido o acesso a pesquisadores. O SARS-CoV-2 é um RNA vírus que possui uma fita simples positiva (*single strangle*) (+*ssRNA*), apresentando um total de 15 genes de aproximadamente 30kb, produzindo um total de 29 proteínas (GUEDES *et al.*, 2021). O seu genoma apresenta duas regiões codificadoras essenciais, sendo: pp1a (codifica proteínas NSP1 ao NSP11), pp1ab (codifica proteínas NSP1 ao NSP16) e a região de codificação das proteínas M, S, E e N, no total essas regiões codificam 29 proteínas (TUEKPRAKHON *et al.*, 2022; GUEDES *et al.*, 2021). Há depositado em banco de dados todas as linhagens descobertas até então, uma delas é a variante *ômicron* que causa um grande aumento do número de infecções devido a mutações em seu domínio de ligação ao receptor da proteína *spike* (pico), que leva a maior afinidade a enzima conversora de angiotensina II (ECA2). Em um estudo *in silico* realizado por Santana e Soares (2022) foi obtido uma sequência de 202 resíduos de aminoácidos onde as posições 452 (Arginina) e 486 (Valina) foram demonstradas como um potencial sítio inibidor. Neste, inibidores foram então testados na busca de combater a variante *ômicron* através do estudo de *Docking* Molecular (Acoplamento Molecular). Como resultado, foi obtido uma forte ligação do composto 4-(2-hidroxilo) -1-piperazina ácido elfnônico, sendo esse um potencial inibidor do sítio de ligação da proteína *spike* (SANTANA e SOARES, 2022).

Os estudos *in silico* são aqueles que utilizam ferramentas computacionais para pesquisa, sendo que, o grande avanço da bioinformática permitiu que servidores e softwares de diversos países promovessem a elucidação e estudos de diversas áreas da ciência (SOARES, 2015). Atualmente, é possível prever, a partir da estrutura molecular dados diversos, parâmetros, tais como: estudos ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), Modelagem Molecular, dentre

outros. Dessa forma, esses estudos permitem grandes avanços na pesquisa científica e combate de patógenos (DAOUD et al., 2021).

Os estudos ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) são responsáveis por prever parâmetros farmacocinéticos que descrevem o comportamento de um possível fármaco no organismo, podendo eles serem preditos *in silico* a partir de sua estrutura molecular. Este estudo busca preencher a seguinte lacuna: ainda não há estudos que comprovem como a substância 4-(2-hidroxilo)-1-piperazina ácido elfnônico irá agir no organismo humano, como será sua atuação no corpo humano de acordo com a Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade pois estes parâmetros são fundamentais para que este possível composto bioativo seja validado nos estudos farmacocinéticos. Visto que a ligação é formada com a proteína *spike* é necessário analisar como esta molécula irá agir no organismo a partir de estudos ADMET (DAOUD et al., 2021). A validação desses parâmetros pode demonstrar o comportamento deste composto nos diversos órgãos, sistemas, tecidos e células (DAOUD et al., 2021). As pesquisas *in vitro* demandam muito tempo e recursos. Desse modo, grandes servidores pertencentes a empresas de todo o mundo permitem a realização da análise desses parâmetros, fornecendo dados de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (DAOUD et al., 2021; AHMAD et al., 2021).

Portanto, o objetivo deste projeto é realizar uma predição *in silico* das propriedades ADMET do composto 4-(2-hidroxilo)-1-piperazina ácido elfnônico que é um candidato a inibidor da proteína *spike* da variante *ômicron* do SARS-CoV-2.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, devem de alguma forma adentrar na célula do hospedeiro para se reproduzir e proliferar a espécie (ADIL et al., 2021). No vírus da COVID-19 há regiões codificadoras que são alvos de vários enfoques terapêuticos a ORF1a codificadora da PP1a e ORF1b ou ORF1ab codificadora da PP1ab. Uma das regiões codifica a proteína *spike* (S ou pico) que é um dos maiores alvos de possíveis agentes inibidores (TUEKPRAKHON et al., 2022). Recentemente foi demonstrado que o composto 4-(2-hidroxilo)-1-piperazina ácido

elfnônico demonstrou atividade inibitória contra a proteína *spike* nas regiões 452 e 486 em seu domínio de ligação ao receptor, apresentando energia livre de ligação favorável e pose confirmada a partir de estudos *in silico* (SANTANA e SOARES, 2022).

Com a apresentação dessa energia e pontes de hidrogênio foi observada relevância na inibição da proteína *spike* da variante *ômicron*, esse é um grande passo para que posteriores estudos possam comprovar sua ação terapêutica (SANTANA e SOARES, 2022).

Alguns dos servidores mais sofisticados em bioinformática são utilizados para estudo ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) com grande eficácia, utilizando cálculos e aprendizado de máquina bem elaborados (DAOUD *et al.*, 2021). Os melhores para predição *in silico* desses parâmetros é o *SwissADME* (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção Suíço), um servidor suíço que a partir da estrutura molecular ou código SMILES fornece todos os dados de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (IBRAHIM, UZAIRU, SHALLANGWA e ABECHI, 2021). Também é necessário o uso do servidor *ADMETlab*, o qual também retorna dados de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção, mas também os dados de Toxicidade; o *ADMETlab* possui mais de 250 mil compostos depositados e aparenta dados aprimorados de aprendizado de máquina, bioinformática, cálculos, modelos robustos e grande taxa de sucesso (XIONG *et al.*, 2021).

## **METODOLOGIA**

Se trata de um estudo descritivo com abordagem quantitativa, procura delinear softwares que realizam cálculos de *docking* molecular para obtenção de afinidade da proteína *spike* com compostos bioativos. Sendo também uma pesquisa de caráter qualitativa (CATHALA e MOORLEY, 2018). Essa pesquisa foi aprovada pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC – Univértix.

## **BUSCA DO COMPOSTO MOLECULAR**

Para busca da molécula a ser analisada é necessário acessar o banco de dados *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteínas) (<https://www.rcsb.org/>) onde a

partir da proteína 7nsz a molécula com o nome: 4-(2-hidroxilo)-1-piperazina ácido elfnônico pode ser extraída e preparada para análises posteriores (SANTANA e SOARES, 2022).

### **PREDIÇÃO DA ABSORÇÃO**

A absorção é um dos parâmetros que irá dizer como ocorrerá a passagem do composto bioativo para a corrente sanguínea, isso irá depender do local onde o fármaco irá ser administrado (VERTZONI *et al.*, 2019).

Logo, para este tipo de análise será feita a predição de absorção gastrointestinal, permeabilidade da pele, substrato da glicoproteína-P (um transportador de fármacos) estes serão analisados no *SwissADME*. A permeabilidade em células caco-2 (utilizadas *in vitro* para prever a permeabilidade em células intestinais), absorção intestinal humana, biodisponibilidade oral – 20 e 30% e possível inibição da glicoproteína-P no *ADMETlab*. Por fim, verificar a análise da regra de Lipinski que faz um equilíbrio ente a lipossolubilidade e hidrossolubilidade de fármacos que é um fator muito importante na absorção de fármacos (BITEW *et al.*, 2021).

### **PREDIÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO**

Na distribuição a circulação do composto a diversas partes do organismo é analisada, permeabilidade a barreiras o que pode demonstrar sua distribuição. Serão analisados a permeabilidade na Barreira Hematoencefálica pelo *SwissADME*; ligação a proteínas plasmáticas e volume de distribuição pelo *ADMETlab* (ISIK *et al.*, 2022; NIE *et al.*, 2022).

### **PREDIÇÃO DO METABOLISMO**

Uma análise do metabolismo pode ser muito importante no desenvolvimento de fármacos pois acarreta consequências como na biodisponibilidade oral, tempo de meia vida e toxicidade. Então é preciso ser feita a análise das interações com as enzimas da família do citocromo P450, nos quais destacamos a predição da inibição da CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 que podem ser feitas no servidor *SwissADME* (GAIDHANE, GHATOLE, LANJEWAR e HATZADE, 2020). Para análise de substrato da CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 utiliza-se o servidor *ADMETlab* (SWARGIARY, MAHMUD, e SALEH, 2020).

### **PREDIÇÃO DE EXCREÇÃO**

Um processo de eliminação é fundamental para que o organismo excrete os resíduos deixados pelo fármaco a fim de evitar efeitos indesejados. Uma boa eliminação é fundamental para que o efeito terapêutico seja atingido sem que haja outras complicações posteriores (KUNDU, DAS, CHATTOPADHYAY, 2019).

Sendo assim, para predição da eliminação do composto a análise pode ser feita a partir do *ADMETlab* que retorna as taxas de *clearance* (também chamado de “depuração” é a taxa de eliminação de um fármaco pelo organismo) e tempo de meia vida (NIE *et al.*, 2022).

### **PREDIÇÃO DE TOXICIDADE**

O efeito tóxico é um dos grandes problemas na formulação de fármacos pois podem ter efeitos nocivos no organismo humano, causando problemas a diferentes órgãos (GIMENEZ-BASTIDA, MARTINEZ, MOYA-PÉREZ e LAPARRA, 2017).

Na predição de toxicidade o servidor *ADMETlab* fornece dados muito precisos, os que podem ser analisados para toxicidade humana são: bloqueador da hERG (gene responsável por codificar a subunidade  $\alpha$  (alpha) de um canal de íon potássio) sua inibição pode levar a arritmias, hepatotoxicidade humana (capacidade de desenvolver danos ao fígado), mutagenidade (AMES) que identifica a capacidade de agentes químicos de causar mutações carcinogênicas, sensibilidade da pele ( diz sobre possíveis reações a pele), toxicidade respiratória, lesão hepática induzida por drogas, irritação ocular e corrosão ocular (ZADOROZHNI, KISELEV e KHARCHENKO, 2020).

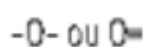
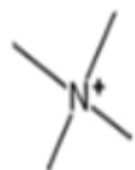
### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

O composto 4-(2-hidroxilo)-1-piperazina ácido elfnônico foi extraído a partir da proteína 7nsz no banco de dados *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteínas) (<https://www.rcsb.org/>). Sua estrutura foi otimizada utilizando o software Avogadro (.) aplicando o campo de força MMFF94 e buscando a confirmação de menor energia e salva em arquivo mol2.

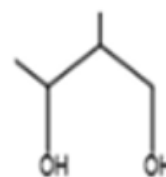
A permeabilidade da pele é calculada por um modelo de regressão linear múltipla (relaciona tamanho molecular e lipofilicidade) obtendo o valor de Log K (p) igual a -10,59 cm/s considerado um valor baixo para permeabilidade na pele. O

composto não é substrato da glicoproteína P que é um transportador de moléculas, esse cálculo é feito através da análise da estrutura e por um modelo de classificação binária. Todos os cálculos anteriores feitos no *swissADME*. Os próximos preditores foram obtidos no servidor *ADMETlab*, o qual utiliza alguns parâmetros quantitativos para a predição farmacocinética, sendo alguns desses parâmetros relativos à presença de estruturas moleculares específicas na substância (Tabela 1), e outros derivados de propriedades físico-químicas da mesma. Para a permeabilidade em células caco-2 foram utilizados a regressão linear multivariada (MLR), mínimos quadrados parciais (PLS), regressão de máquina de vetor de suporte (SVM) e *Boosting*. Esses auxiliaram para previsão e elucidação com 30 descritores moleculares demarcados por um algoritmo genético de classificação não dominada-II (NSGA-II), que obteve o resultado de -5,765 cm/s sendo insatisfatório. Para a glicoproteína-P o resultado obtido demonstrou que não é substrato deste transportador, assim o composto apresenta maior liberdade de ação. O modelo de absorção usado pelo *SwissADME* relata o uso dos descritores TSA e AlogP98 como sendo os fatores fundamentais na absorção, onde o primeiro já relata as interações, área polar e fracionária de *Van der Waals*, considera ainda interações de H e grau de ionização do composto, avalia a área de superfície dos nitrogênios e oxigênios, os métodos para validação de compostos outliers (pontos fora da curva) teve 99,9% de confiança, já o AlogP98 descreve a lipofilicidade baseada dia compostos validada por comparação a compostos permeáveis a células Caco-2. Para o *ADMETlab* descreve a absorção intestinal humana (AIH) utilizando descritores 2D, 3D, Estate e MACCS como demonstrado na tabela 1:

Tabela 1: Estruturas moleculares utilizadas como parâmetros no *software ADMETlab*

| Parâmetro   | Representação esquemática da estrutura  |
|---|---|
| Número de oxigênios >3  |  |
| Nitrogênio positivamente carregado, ligado a 3 ou mais átomos |  |

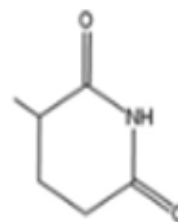
OH a 4 ligações de distância de outro OH



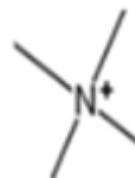
Grupos OH

-AH

NH ou OH, a quatro ligações de distância de um CH<sub>2</sub>



Soma de  $\langle N \rangle$  em estado +



Soma dos oxigênios na forma de (-OH)

-AH

Soma dos oxigênios em estado de (=O)

=O

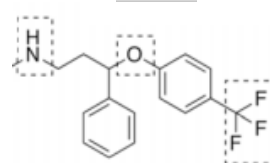
Soma dos  $\langle CH \rangle$

$\rangle CH -$

Somas dos estados  $\langle C \rangle$

$= C \langle$

Número de átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio



Existência de átomo de N carregado positivamente



A partir do modelo de *Randon Forest* (Floresta Aleatória), demonstrou que o composto não apresentou absorção intestinal, além de apresentar baixa biodisponibilidade oral (valores preditos abaixo de 20%), visto que esses parâmetros foram fornecidos por outputs de comando binário. Relacionando os descritores apresentam 16 em comum (~ 76%) e os outros que não estavam presentes no

*SwissADME* na inspeção visual realizada não estavam presentes no composto estudado; ambos devolvem as predições com comandos binários “SIM” ou “NÃO” para AIH, sendo o *SwissADME* prevendo Alta absorção e o *ADMETlab* prevendo não absorção, trazendo contradição entre os dois preditores. As diferenças foram demonstradas pois o primeiro baseia sua lipofilicidade na absorção em células Caco-2 (muito utilizada mundialmente) o segundo em solvatação e descritores moleculares; o primeiro utiliza redes neurais e *smallest-half* volume (Meio volume menor) (SHV) enquanto o segundo utiliza o *Randon Forest* (Floresta Aleatória).

Os autores do *SwissADME* relatam a elevada confiança do método e que seus descritores são suficientes para descrever a solubilidade intestinal, já os autores do *ADMETlab* em seu quadro de propriedades físico-químicas demonstraram lipofilicidade e solubilidade favorável (o que é um fator importante na absorção), apesar de predição da AIH baixa. Mesmo com a predição de absorção alta em um dos servidores são necessários mais testes, mesmo que *in vitro*, para confirmar estes dados e a discrepância nas predições. O composto não violou nenhuma das regras de Lipinski (Massa Molecular menor ou igual a 500, logP menor ou igual a 5, doadores de hidrogênio menor ou igual a 5, aceitadores de hidrogênio menor ou igual a 10), respeitando todos os parâmetros o servidor *SwisADME* retornou “sim” para todos.

Os dados de metabolismo obtidos no *SwissADME* demonstraram por meio do modelo de Máquina de Vetor de Suporte (MVS) com dados de compostos já conhecidos como inibidores ou substratos, resultando em uma saída de comando binário “sim” ou “não”; foi predito que o composto não é inibidor de nenhuma das isoenzimas do citocromo P450, evitando assim interações medicamentosas indesejáveis. No *ADMETlab* são feitas as predições de possível substrato das isoenzimas os algoritmos usados incluem um conjunto de métodos de análise, contendo floresta aleatória, árvore de decisão de aumento de gradiente e aumento de gradiente *eXtreme* (*XGBoost*), dois métodos de aprendizagem profunda, sendo eles as redes neurais profundas e redes neurais convencionais dando um modelo sofisticado de predição. A saída resultou em valor de substrato para a isoenzima CYP2C19, uma atividade característica desta é ser monooxigenase e epoxigenase.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente à necessidade de novas tecnologias para combater a Covid-19, o presente estudo fundamentou-se em uma análise de um potencial composto bioativo contra a doença, tendo por objetivo prever os parâmetros farmacocinéticos da substância 4-(2-hidroxido)-1-piperazina ácido elfenônico, por meio de um estudo *in silico* em dois softwares: SwissADME e ADMETlab, sendo este complementado com a avaliação da adequação à regras de Lipinski.

Após análise dos resultados, foi possível concluir que o trabalho atingiu seus objetivos. Contudo, houveram algumas limitações, constatadas frente à divergência encontrada no que se refere ao parâmetro absorção, sendo esta apontada como alta pelo *SwissADME* e ausente no *ADMETlab*. Quanto à metabolização, o composto apresentou-se como um substrato da CYP2C19, não possuindo atividade de inibição ou indução de enzimas do metabolismo.

Ressalta-se a necessidade de mais estudos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* para a confirmação dos resultados do presente estudo, tendo em vista a complexidade de organismos biológicos.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, S *et al.* Molecular screening of glycyrrhizin-based inhibitors against ACE2 host receptor of SARS-CoV-2. **Journal of Molecular Modeling**. Peshawar, Paquistão, v. 27, nº 7, p.206-219. Junho de 2021.

ALGHAMDI, H *et al.* Repurposing the inhibitors of COVID-19 key proteins through molecular docking approach. **Process Biochem**. Abha, Arábia Saudita, v. 1, nº 10, p. 216-222. Novembro de 2021.

ALKHATIB, M *et al.* Update on SARS-CoV-2 Omicron Variant of Concern and Its Peculiar Mutational Profile. **Microbiology Spectrum**. Roma, Itália, v.10, nº 2, p. 2732-2749. Março de 2022.

ANAND, R.; RAGHUWANSHI, R. Insights into the molecular docking study of Wedelolactone to improve the performance of computer-aided drug design. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Allahabad, Índia, v. 7, nº 2, p. 798-806. Abril de 2016.

BARRETO-VIEIRA, D *et al.* SARS-CoV-2: Ultrastructural Characterization of Morphogenesis in an In Vitro System. **Viruses**. Rio de Janeiro, Brasil, v.14, n° 2, p.0. Janeiro de 2022.

CATHALA, X.; MOORLEY, C. How to appraise quantitative research. *Evid Based Nurs. Evidence-Based Nursing*. Londres, Reino Unido, v. 21, n°4, p. 99-101. Outubro de 2018.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, Suíça, n. 1, v. 7, p. 42717- 42730, mar. 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v.11, p.1117-1121, 2016.

DONG, J.; WANG, N.; YAO, Z.; ZHANG, L.; CHENG, Y.; OUYANG, D.; LU, A.; CAO, D. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of cheminformatics**, Oxford, v. 10, p. 29, 2018.

DUTTA, B.; BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, P.; BANDOPADHYAY, R. In silico studies on bacterial xylanase enzyme: Structural and functional insight. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**. Bengala Ocidental, Índia, v.16, n°2, p. 749–756. Dezembro de 2018.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **J. Med. Chem.**, Washington, v.43, n.21, p.3867–3877, 2000.  
FOROUTAN, M *et al.* Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase 4 (CDPK4) as *Toxoplasma gondii* vaccine target. **BMC research notes**, Behbahan, Irã, v.14, n.1, p.1-9, 2021. Disponível no endereço eletrônico: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05467-1>. Acesso em: 26/11/2021.

FU, L.; LIU, L.; YANG, Z.; LI, P.; DING, J.; YUN, Y.; LU, A.; HOU, D.; CAO, D. Systematic Modeling of log D7.4 Based on Ensemble Machine Learning, Group Contribution, and Matched Molecular Pair Analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v.60, p.63-76, 2020.

GHAFFARI, A *et al.* Immunoinformatic analysis of immunogenic B-and T-cell epitopes of MIC4 protein to designing a vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* through an in-silico approach. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, Teerã, Irã, v.10, n.1, p.59, 2021. Disponível no endereço eletrônico: <https://ecevr.org/DOIx.php?id=10.7774/cevr.2021.10.1.59>. Acesso em: 27/11/2021.

GOODSELL, D.; SANNER, M.; OLSON, A.; FORLI, S. A suíte AutoDock aos 30. **Protein Science**. Piscataway New Jersey, Estados Unidos, v. 30, n. 1, p. 31-43. Setembro de 2020.

GUEDES, I *et al.* Novas funções de aprendizagem de máquina e pontuação baseada em física para descoberta de drogas. **Science Republic**. Petrópolis, Brasil, v. 11, nº1, p. 3198-3217. Fevereiro de 2021.

GUEDES, I *et al.* Projeto e reaproveitamento de medicamentos com o servidor web DockThor-VS com foco em alvos terapêuticos SARS-CoV-2 e suas variantes não sinônimas. **Science Republic**. Petrópolis, Brasil, v. 11, nº 1, p. 5543 – 5563. Março de 2021.

HAQ, A *et al.* Annotation of Potential Vaccine Targets and Design of a Multi-Epitope Subunit Vaccine against *Yersinia pestis* through Reverse Vaccinology and Validation through an Agent-Based Modeling Approach. **Vaccines**. Suate, Paquistão, v.9, nº 11, p. 1327-1346. Novembro de 2021.

HE, X *et al.* SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. **MedComm**. Chengdu, China, v.2, nº 4, p. 838-845. Dezembro de 2021.

HEINZELMANN, G.; GILSON, M. Automation of absolute protein-ligand binding free energy calculations for docking refinement and compound evaluation. **Science Republic**. Santa Catarina, Brasil, v. 11, nº 1, p. 1116-1134. Janeiro de 2021.

HODA, A.; TAJAJ, M.; SALLAKU, E. In silico Structural, Functional and Phylogenetic Analyses of cellulase from *Ruminococcus albus*. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**. Tirana, Albania, v. 19, nº 1, p. 58-73. Abril de 2021.

JIANG, D.; LEI, T.; WANG, Z.; SHEN, C.; CAO, D.; HOU, T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. 20. Prediction of Breast Cancer Resistance Protein Inhibition through Machine Learning. **Journal of Cheminformatics**, Oxford, v.12, p.1-26, 2020.

KAUR, T.; MADGULKAR, A.; BHALEKAR, M.; ASGAONKAR, K. Molecular Docking in Formulation and Development. **Drug Discovery Technologies**. Maharashtra, Índia, v. 19, nº 1, p. 30-39. Junho de 2019.

KHAN, M *et al.* COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. **Molecules**. Basileia, Suíça, v. 26, nº 1, p. 39-64. Dezembro de 2020.

KYTE, J.; DOOLITTLE, F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Molecular Biology**. Califórnia, Estados Unidos, v. 157, nº 1, p. 105-132. Maio de 1982.

LAN, J *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**. Pequim, China, v.581, nº 7807, p. 215-220. Março de 2020.

LEI, T.; CHEN, F.; LIU, H.; SUN, H.; KANG, Y.; LI, D.; LI, Y.; HOU, T. ADMET evaluation in drug discovery. Part 17: development of quantitative and qualitative prediction models for chemical-induced respiratory toxicity. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v.14, p.2407-2421, 2017.

LEI, T.; LI, Y.; SONG, Y.; LI, D.; SUN, H.; HOU, T. ADMET evaluation in drug discovery: 15. Accurate prediction of rat oral acute toxicity using relevance vector machine and consensus modeling. **Journal of cheminformatics**, Londres, v.8, p.6, 2016.

LEI, T.; SUN, H.; KANG, Y.; ZHU, F.; LIU, H.; ZHOU, W.; WANG, Z.; LI, D.; LI, Y.; HOU, T. ADMET evaluation in drug discovery. 18. Reliable prediction of chemical-induced urinary tract toxicity by boosting machine learning approaches. **Molecular pharmaceutics**, Washington, v.14, p.3935-3953, 2017.

LIBERMAN, F (2004). Análise dos fatores determinantes para a qualidade da anotação genômica automática. **Tese de Mestrado (Biotecnologia e Ciências genômicas) – Universidade Católica de Brasil**. Brasília, 2004.

LIU, L.; FU, L.; ZHANG, J.; WEI, H.; YE, W.; DENG, Z.; ZHANG, L.; CHENG, Y.; OUYANG, D.; CAO, Q.; CAO, D. Three-Level Hepatotoxicity Prediction System Based on Adverse Hepatic Effects. **Molecular pharmaceutics**, Washington, v.16, p.393-408, 2018.

MORGAT, A *et al.* Enzyme annotation in UniProtKB using Rhea. **Bioinformatics**. Genebra, Suíça, v.36, nº 6, p.1896–1901. Março de 2020.

MOTAMEDPOUR, L *et al.* *In silico* analysis and expression of a new chimeric antigen as a vaccine candidate against cutaneous leishmaniasis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1409, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33235698/>. Acesso em: 26/11/2021.

PATIL, N.; ROHANE, S. Organization of Swiss Dock: In study of Computational and Molecular Docking Study. **Asian Journal of Research in Chemistry**. Satara, Índia, v. 14, nº. 2, p. 145-148. Abril de 2021.

POTTS, R. O.; GUY, R. H. Predicting Skin Permeability. **Pharmaceutical Research**, Estados Unidos, v.9, p.663-669, 1992.

ROBSON, F *et al.* Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. **Molecular Cell**. Bristol, Reino Unido, v. 79, nº 5, p. 710-727. Setembro de 2020.

ROUKA, E.; GOURGOULIANIS, K.; ZAROGIANNIS, S. *In silico* investigation of the viroporin E as a vaccine target against SARS-CoV-2. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**. Larissa, Grécia, v. 320, nº 6, p.1057-1063. Junho de 2021.

SANOS, L.; FERREIRA, R.; CAFFARENA, E. Integrating Molecular docking and Molecular Dynamics Simulations. **Metods Molecular Biology**. Belo Horizonte, MG, Brasil, v. 2053, nº 1, p. 13-34. Agosto de 2019.

SHANNON, A *et al.* **Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase.** 15 de maio de 2020. Marseille, França. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.15.098731v1>. Acesso em: 26/11/2021.

SOARES, A. (2015). Identificação de lipocalinas com domínio de ligação a histamina e serotonina e validação de genes de referência em transcriptomas de glândula salivar, intestino e ovário do carrapato *Amblyomma sculptum*. **Tese de doutorado (tese em Bioquímica Aplicada) - UFV**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Viçosa. 113p.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Versão 11. **Molecular Biology and Evolution**. Pensilvânia, Estados Unidos, v.38, nº 7, p. 3022-3027. Junho de 2021.

TANTIVITAYAKUL, P *et al.* **Identification and *in silico* functional prediction of lineage-specific SNPs distributed in DosR-related proteins and resuscitation-promoting factor proteins of Mycobacterium tuberculosis.** *Heliyon*. Bangkok, Tailândia, v. 6, n.12, p. e05744, 2020. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.101616. Disponível em: [https://cell.com/heliyon/retrieve/pii/S2405844020325871?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844020325871%3Fshowall%3Dtrue](https://cell.com/heliyon/retrieve/pii/S2405844020325871?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844020325871%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 26/11/2021.

TUEKPRAKHON, A *et al.* **Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum.** *Cell*. Oxford, Reino Unido, v. 185, nº 14, p. 2422-2433. Julho de 2022.

WANG, N.; DENG, Z.; HUANG, C.; DONG, J.; ZHU, M.; YAO, Z.; CHEN, A.F.; LU, A.; MI, Q.; CAO, D. ADME properties evaluation in drug discovery: Prediction of plasma protein binding using NSGA-II combining PLS and consensus modeling. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdã, v.170, p.84-95, 2017.

WANG, N.; DONG, J.; DENG, Y.; ZHU, M.; WEN, M.; YAO, Z.; LU, A.; WANG, J.; CAO, D. ADME properties evaluation in drug discovery: prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of NSGA-II and boosting. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v.56, p.763-773, 2016.

WANG, N.; HUANG, C.; DONG, J.; YAO, Z.; ZHU, M.; DENG, Z.; LV, B.; LU, A.; CHEN, A.F.; CAO, D. Predicting human intestinal absorption with modified random forest approach: a comprehensive evaluation of molecular representation, unbalanced data, and applicability domain issues. **RSC Advances**, Londres, v.7, p.19007-19018, 2017.

WANG, S.; SUN, H.; LIU, H.; LI, D.; LI, Y.; HOU, T. ADMET evaluation in drug discovery. 16. Predicting hERG blockers by combining multiple pharmacophores and

machine learning approaches. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v.13, p.2855-2866, 2016.

WATERHOUSE, A *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**. Basel, Suíça, v. 46, nº 1, p. 296-303. Julho de 2018.

WU, N *et al.* **Um modo de ligação alternativo de anticorpos IGHV3-53 ao domínio de ligação do receptor SARS-CoV-2**. Cell Reports. Califórnia, Estados Unidos, v.33, nº3, p. 108274, 2020. Disponível no endereço eletrônico: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S22111247\(20\)312638?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124720312638%3Fshowall%3Dtrue#](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S22111247(20)312638?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124720312638%3Fshowall%3Dtrue#). Acesso em: 12/05/2022.

WU, Z.; LEI, T.; SHEN, C.; WANG, Z.; CAO, D.; HOU, T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. 19. Reliable Prediction of Human Cytochrome P450 Inhibition Using Artificial Intelligence Approaches. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v.59, p.4587-4601, 2019.

XIONG, G.; WU, Z.; YI, J.; FU, L.; YANG, Z.; HSIEH, C.; YIN, M.; ZENG, X.; WU, C.; CHEN, X.; HOU, T.; CAO, D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 49, p. W5-W14, 2021.

YANG, Z.; YANG, Z.; LU, A.; HOU, T.; CAO, D. Scopy: an integrated negative design python library for desirable HTS/VS database design. **Briefings em Bioinformática**, Oxford, no prelo, 2020.