

ESTUDIO *IN SILICO* DE LA REACTIVIDAD Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE ADUCTOS DE EPÓXIDO DE EUGENOL Y 2-METOXI-4-ALILIDENO-2,5-CICLOHEXADIENO-1-ONA CON GLUTATIÓN EN *Candida albicans*^a

STUDY *IN SILICO* OF REACTIVITY AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF ADDUCTS OF EPOXIDE OF EUGENOL AND 2-METHOXY-4-ALLYLIDENE-2,5-CICLOHEXADIENE-1-ONE WITH GLUTATION IN *Candida albicans*

JHONATAN RABANAL^b, JULIO RUIZ-QUIROZ^c

Recibido 13-08-2018, aceptado 22-11-2018, versión final 13-12-2018.

Artículo Investigación

RESUMEN: El eugenol es un alilbenceno con actividad antifúngica, diversos estudios han demostrado su capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida albicans*. Se ha propuesto la formación de aductos entre un derivado del eugenol (2-metoxi-4-alilideno-2,5-hexadieno-1-ona) y glutatión como un mecanismo de estrés oxidativo. Asimismo, otro derivado del eugenol, epóxido de eugenol, tiene teóricamente la capacidad para formar aductos. Por lo tanto, este estudio determinó *in silico* las propiedades fisicoquímicas de estos aductos y su reactividad en microorganismos aeróbicos. Se encontró que estos aductos tienen baja hidrofobicidad, por lo que, tendrían baja capacidad para atravesar membranas biológicas y por tanto una distribución intracelular. Asimismo, las reacciones químicas que originan estos aductos son termodinámicamente favorables. Por último, estos aductos son susceptibles a modificaciones químicas en microorganismos aeróbicos; estas reacciones podrían ser catalizadas por enzimas como el citocromo P450.

PALABRAS CLAVE: Aductos con glutatión; *Candida albicans*; derivados del eugenol.

ABSTRACT: Eugenol is an allylbenzene with antifungal activity, many studies have demonstrated its ability to inhibit the growth of *Candida albicans*. The formation of adducts between a derivative of eugenol (2-methoxy-4-allylidene-2,5-cyclohexadiene-1-one) and glutathione as a mechanism of oxidative stress has been proposed. Likewise, another eugenol derivative, eugenol epoxide, theoretically has the capacity to form adducts. Therefore, this study determined *in silico* the physicochemical properties of these adducts and their reactivity in aerobic microorganisms. It was found

^aRabanal, J. & Ruiz-Quiroz, J. (2018). Estudio *in silico* de la reactividad y propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y 2-metoxi-4-alilideno-2,5-ciclohexadieno-1-ona con glutatión en *Candida albicans*. *Rev. Fac. Cienc.*, 8(1), 124–137. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v8n1.74214>

^bEgresado de la Maestría en Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. jhonatan.rabanal@upch.pe

^cInstituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. jruizq@unmsm.edu.pe

that these adducts have low hydrophobicity, therefore, they would have low capacity to cross biological membranes and therefore an intracellular distribution. Likewise, the chemical reactions that originate these adducts are thermodynamically favorable. Finally, these adducts are susceptible to chemical modifications in aerobic microorganisms; these reactions could be catalyzed by enzymes such as cytochrome P450.

KEYWORDS: Adducts with glutathione; *Candida albicans*; eugenol derivatives.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas ha aumentado. Entre los agentes etiológicos de micosis oportunistas más frecuentes se tienen a los géneros *Aspergillus*, *Candida* y *Cryptococcus* (Nucci *et al.*, 2010; Garbee *et al.*, 2017).

En los últimos años se ha reportado, en especies de *Candida*, un importante incremento en la resistencia a algún antifúngico (Sanguinetti *et al.*, 2015). Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de encontrar tratamientos alternativos y estrategias preventivas (Sanguinetti *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016).

El eugenol es un alilbenceno (Figura 1) obtenido a partir de diversas plantas medicinales y aromáticas, siendo las más representativas: *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum tamala*, *Zygium aromaticum* y especies del género *Ocimum* (Charan-Raja *et al.*, 2015). Diversos estudios han demostrado sus propiedades antifúngicas (Charan-Raja *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no se ha esclarecido su mecanismo de acción (Charan-Raja *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2014; Abbaszadeh *et al.*, 2014).

Estudios en *Candida albicans*, sugieren que el eugenol genera estrés oxidativo, peroxidación lipídica, disminución de la concentración de glutatión reducido, disminución de la actividad del glutatión peroxidasa y niveles altos de actividad catalasa y peroxidasa (Khan *et al.*, 2011). Estos estudios sugieren que un derivado del eugenol (Figura 1), 2-metoxi-4-alilideno-2,5-hexadieno-1-ona (MAHO), podría unirse covalentemente al glutatión reducido; lo cual contribuiría a las bajas concentraciones de este (Khan *et al.*, 2011; Bolton *et al.*, 2014).

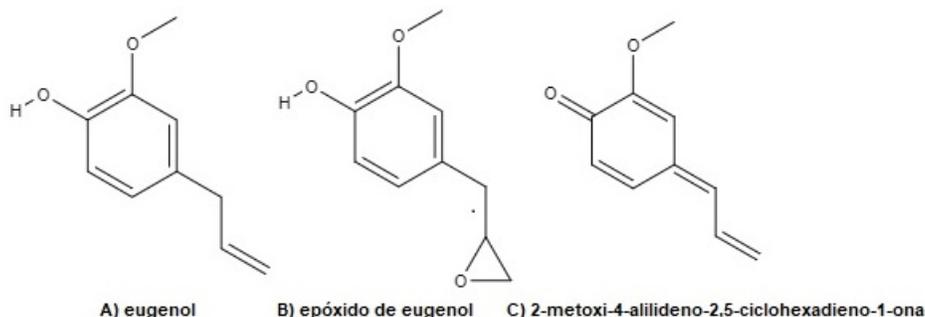


Figura 1: *Candida albicans* Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, el eugenol puede ser metabolizado a 2-metoxi-4-oxiranil-metilfenol (epóxido de eugenol) mediante el citocromo P450, ya que el grupo alqueno del eugenol es susceptible a la epoxidación (Luo & Guenther, 2001). Siendo el grupo epóxido muy reactivo se esperaría encontrar uniones covalentes de esta molécula con macromoléculas celulares (Luo & Guenther, 2001). Sin embargo, no se han encontrado niveles significativos de aductos de epóxido de eugenol con ADN o proteínas (Luo & Guenther, 2001). Por lo que, se sugirieron mecanismos de eliminación de estos epóxidos; siendo uno de ellos la unión covalente del epóxido de eugenol con el glutatión reducido (Figura 2), esta reacción sería catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (Luo & Guenther, 2001).

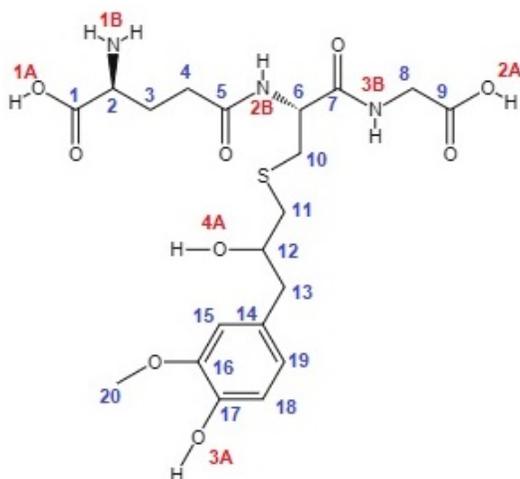


Figura 2: Estructura química del aducto producto de la unión covalente entre el epóxido de eugenol y glutatión (estructura C).

Fuente: Elaboración propia.

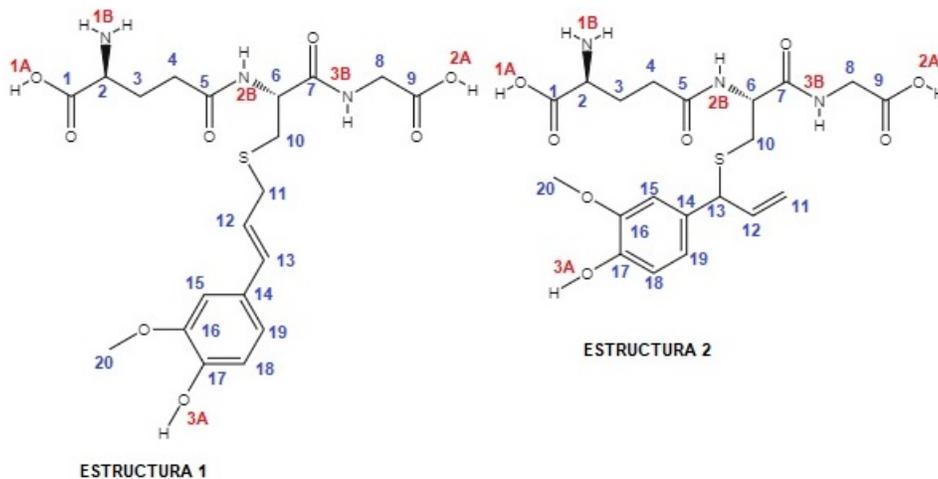


Figura 3: Estructuras químicas de los aductos productos de la unión covalente entre el 2-metoxi-4-alilideno-2,5-ciclohexadieno-1-ona y glutatión (estructuras 1 y 2). Fuente: Elaboración propia.

Las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) son una serie de propiedades fisicoquímicas (como área de la superficie topológica polarizada, refractividad molar, etc.) que permiten la predicción teórica del comportamiento, así como el potencial farmacológico y toxicológico, de una determinada molécula en un entorno biológico (Cherkasov *et al.*, 2014).

El presente estudio determinó las propiedades fisicoquímicas QSAR, utilizando softwares de acceso abierto, de aductos de epóxido de eugenol (estructura C) y MAHO (estructura 1 y 2) con glutatión (Figuras 2 y 3); asimismo, se estudió la reactividad de estos aductos en microorganismos aeróbicos, utilizando el software EAWAG-BBD. Esto permitirá entender el comportamiento fisicoquímico de estos aductos y los posibles mecanismos químicos de biodegradación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Propiedades fisicoquímicas

Se utilizó el software ChemAxon (Southan & Stracz, 2013; Fourches *et al.*, 2010) para la determinación de las siguientes propiedades fisicoquímicas QSAR: área de la superficie topológica polarizada (TPSA), refractividad molar (RM), constante de disociación ácida (pKa), punto isoeléctrico, coeficiente de partición (Log P), número de donantes y aceptores de hidrógeno, fracción de carbonos hibridizados en sp³ (FSP3), volumen de van der Waals y área superficial de van der Waals.

Además se utilizó el método de Joback (Fierro *et al.*, 2016; Constantinou & Gani, 1994) para la determinación de la energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción ($\Delta_f G^\circ$), para los cálculos se utilizó la plataforma web Cheméo.

2.2. Reactividad

Para el estudio de la reactividad de los aductos, se utilizó el software EAWAG-BBD, el cual puede predecir reacciones catabólicas en microorganismos aeróbicos. Este software reconoce grupos funcionales y predice las reacciones metabólicas más probables (Sivakumar *et al.*, 2017).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las propiedades fisicoquímicas de los aductos se observan en la Tabla 1. De la misma manera, en la Tabla 2 puede observarse los resultados del pKa de cada uno de los grupos funcionales ionizables de cada aducto.

Los valores obtenidos de TPSA, de estos aductos, indican baja capacidad para atravesar membranas celulares (Fernandes & Gattass, 2009). Por otro lado, las estructuras 1 y 2 presentan los mismos valores de

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de las estructuras C, 1 y 2.

Propiedades fisicoquímicas	Estructura C	Estructura 1	Estructura 2
FSP3	0.50	0.40	0.40
TPSA (\AA^2)	208.51	188.28	188.28
Refractividad molar (cm^3/mol)	117.74	117.19	115.75
Donantes de hidrógeno	7	6	6
Aceptores de hidrógeno	10	9	9
Punto isoeléctrico	2.70	2.79	2.71
Log P	-3.85	-2.72	-2.66
Volumen de van der Waals (\AA^3)	425.84	409.66	409.92
Área superficial de van der Waals (\AA^2)	681.69	643.17	639.75
$\Delta_f G^\circ$ (KJ/mol)	-694.43	-474.95	-469.77

Tabla 2: pKa de los grupos químicos ionizables.

Grupos químicos	Estructura C	Estructura 1	Estructura 2
-OH (1A)	1.81	1.81	1.80
-OH (2A)	3.60	3.78	3.63
-OH (3A)	10.16	10.08	10.02
-NH ₂ (1B)	9.25	9.23	9.22
-NH (2B)	12.32	12.34	12.43
-NH(3B)	15.38	15.26	14.55
-OH(4A)	14.69	—	—

FSP3, lo cual indica igual número de carbonos en sp^3 ; asimismo, diversos estudios han relacionado los valores FSP3 con la solubilidad (Lovering *et al.*, 2009). Por lo que estos aductos tendrían la misma solubilidad.

De la misma manera, resultados de RM indican que las estructuras C y 1 presentan valores similares, lo cual se debería a su similitud estructural; ya que la refractividad molar depende de la masa molar, densidad e índice de refracción (Malta de Sá *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que las estructuras 1 y 2 poseen similar composición, la variación en su RM podría deberse a diferencias en su densidad y/o índice de refracción.

El volumen de Van der Waals y el área superficial de Van der Waals dependen del valor que tome el radio de Van der Waals (Zhao *et al.*, 2003; Moorthy *et al.*, 2012); por lo que, la estructura C tendría un radio de Van der Waals mayor que las estructuras 1 y 2. Asimismo, la estructura C tendría una mayor área y volumen para interactuar con las moléculas de su medio.

Se considera al LogP como una medida de la hidrofobicidad de una molécula (Ensuncho *et al.*, 2017); los resultados indican que los aductos estudiados presentan baja hidrofobicidad. Por lo tanto, se esperaría que dichos aductos no formen interacciones hidrofóbicas con lípidos.

La energía libre de Gibbs es una función de estado que determina la espontaneidad de una reacción química (Chang, 2008). Todos los aductos estudiados presentan una energía libre de Gibbs de formación ($\Delta_f G^\circ$) negativa, en condiciones estándar de reacción; lo cual indicaría que pueden formarse espontáneamente (Chang, 2008). Siendo la estructura C, la más favorable. Sin embargo, el método de Joback presenta una serie de limitaciones, pues este método simplifica la estructura molecular, además los cálculos se realizan considerando que las reacciones se llevan a cabo a 25°C, 1 atm y 1 molar de concentración de cada reactivo (Fierro *et al.*, 2016; Constantinou & Gani, 1994). Por lo tanto, estos resultados deben comprobarse experimentalmente.

Los resultados del punto isoelectrónico indican que todos los aductos estudiados, en condiciones de pH fisiológico, se presentan como moléculas con carga. De la misma manera, los resultados de pKa de los grupos ionizables indican que estos se ionizan en un amplio rango de pH. A un pH cercano a 7, todos los aductos estudiados presentan átomos cargados en sus grupos amino 1B (NH² 1B), hidroxilo 2A (OH 2A) e hidroxilo 1A (OH 1A). Por lo tanto, tendrían baja capacidad para atravesar membranas biológicas; esto concuerda con los valores de Log P.

Todos los aductos estudiados presentan donantes y aceptores de hidrógeno, lo cual les permitiría formar puentes de hidrógeno con las moléculas de su medio. Sin embargo, debido a esto tendrían baja capacidad para atravesar membranas biológicas.

Por otro lado, un estudio *in silico* realizado en eugenol encontró que, de acuerdo a sus propiedades físico-químicas, el eugenol es un buen candidato para fármaco; ya que posee buena absorción y capacidad para atravesar membranas biológicas. Esto debido a que su Log P es menor a 5, su TPSA es menor a 140 Å², el número de donantes de hidrógeno que tiene es menor a 5, tiene menos de 10 átomos de nitrógeno y oxígeno en su estructura, menos de 10 enlaces rotativos y una masa molecular menor a 500 Dalton (Absalan *et al.*, 2016).

En la Tabla 3 se resumen las principales reacciones catabólicas de los aductos, puede observarse entre paréntesis el tipo de compuesto formado en cada reacción.

Asimismo, en las Figuras 4 y 5 pueden apreciarse los compuestos predichos por el software EAWAG-BBD, derivados de la estructura 1. En las Figuras 6, 7 y 8 pueden apreciarse los compuestos predichos por el software EAWAG-BBD, derivados de la estructura C.

Asimismo, en las Figuras 9, 10, 11 y 12 pueden apreciarse los compuestos predichos por el software EAWAG-BBD, derivados de la estructura 2.

Tabla 3: Reacciones catabólicas de los aductos.

Estructura C	Estructura 1	Estructura 2
Desaminación oxidativa en el carbono 2 (IC)	Desaminación oxidativa en el carbono 2 (IA)	Desaminación oxidativa en el carbono 2 (IB)
O-desalquilación del carbono 20 (IIIC)	O-desalquilación del carbono 20 (IIA)	O-desalquilación del carbono 20 (IIB)
Desaminación oxidativa en el carbono 7 (IVC)	Desaminación oxidativa en el carbono 7 (IIIA)	Desaminación oxidativa en el carbono 7 (VIB)
N-desalquilación oxidativa en el carbono 5 (VC)	N-desalquilación oxidativa en el carbono 5 (IVA)	N-desalquilación oxidativa en el carbono 5 (IVB)
S-desalquilación oxidativa en el carbono 11 (VIIC)	S-desalquilación oxidativa en el carbono 11 (VA)	S-desalquilación oxidativa en el carbono 13 (VIIB)
S-desalquilación oxidativa en el carbono 10 (VIIC)	S-desalquilación oxidativa en el carbono 10 (VIIA)	S-desalquilación oxidativa en el carbono 10 (VIII B)
Oxidación del azufre a sulfóxido (VIC)	Oxidación del azufre a sulfóxido (VIA)	Oxidación del azufre a sulfóxido (VIB)
Oxidación del grupo hidroxilo 4A (IIC)	—	Epoxidación en el grupo olefínico en la cadena lateral (IIIB)

Entre paréntesis, el compuesto formado en cada reacción

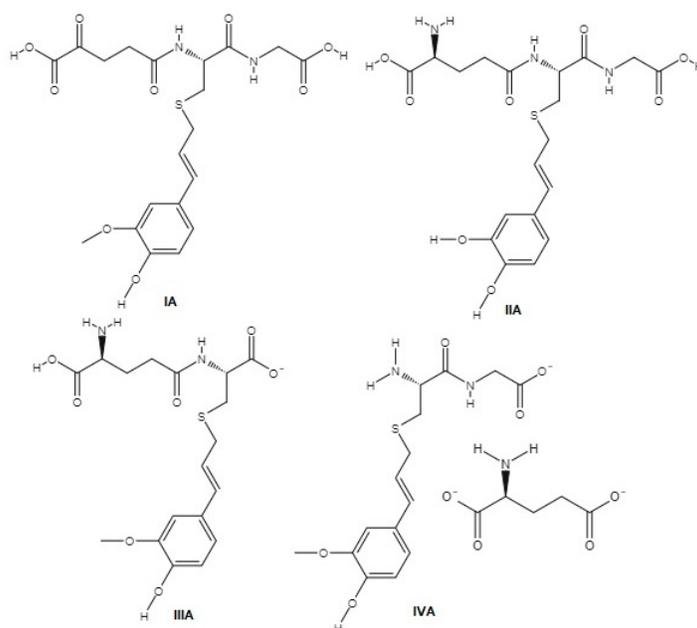


Figura 4: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura 1. Fuente: Elaboración propia.

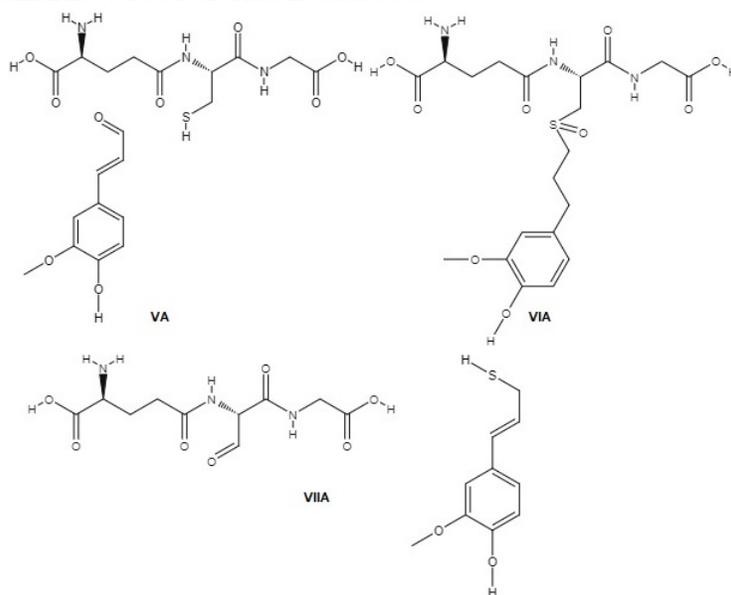


Figura 5: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura 1. Fuente: Elaboración propia.

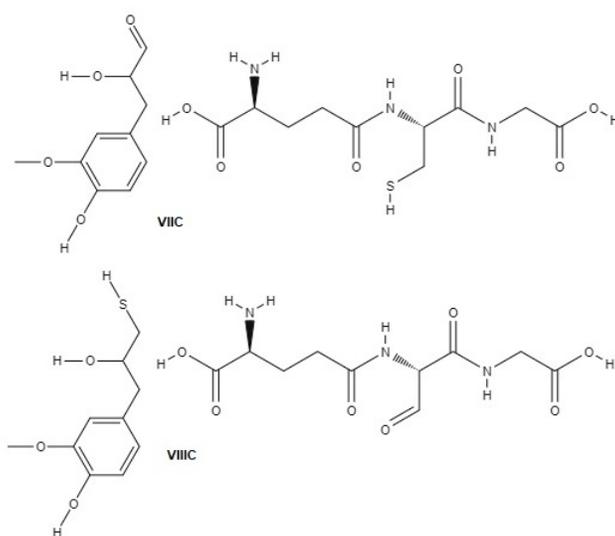


Figura 6: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura C. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, con respecto al catabolismo de los aductos en microorganismos aeróbicos (Tabla 3); se observa que todos los aductos son susceptibles a la desaminación oxidativa en los átomos de carbono 2 y 7, además son susceptibles a la eliminación del grupo metilo en el carbono 20, con la resultante formación de un grupo hidroxilo. De la misma forma, todos los aductos son propensos a una N-desalquilación oxidativa en el carbono 5, a una oxidación del azufre a sulfóxido y a una S-desalquilación oxidativa en los carbonos 10. Asimismo, se observa una S-desalquilación oxidativa en los carbonos 11 de las estructuras 1 y C, y en el carbono 13 de la estructura 2.

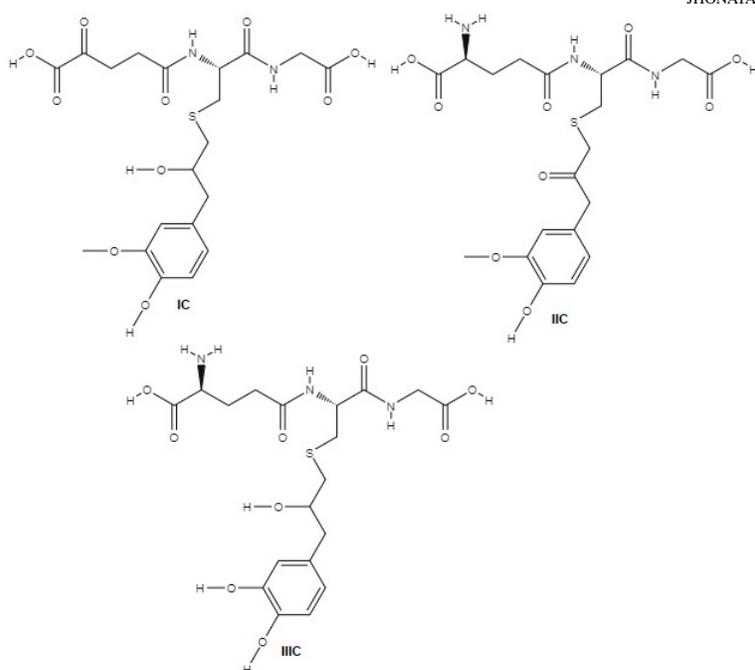


Figura 7: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura C. Fuente: Elaboración propia.

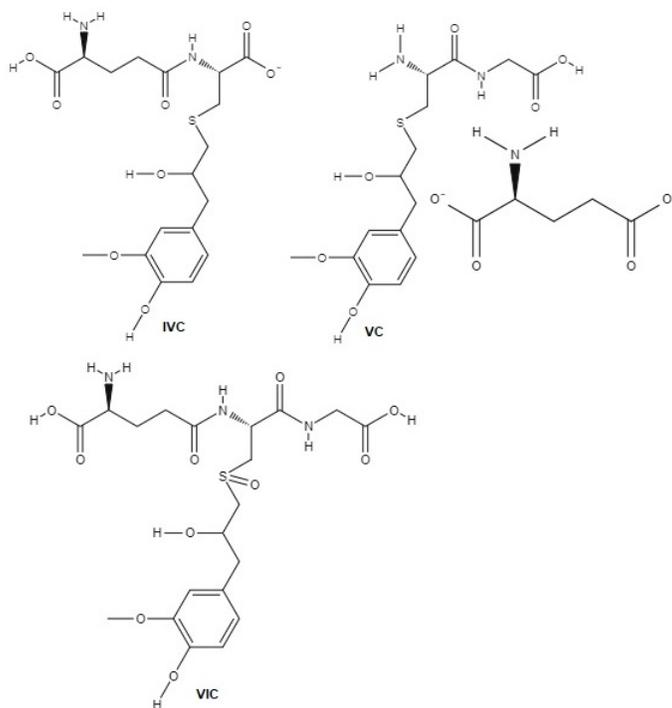


Figura 8: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura C. Fuente: Elaboración propia.

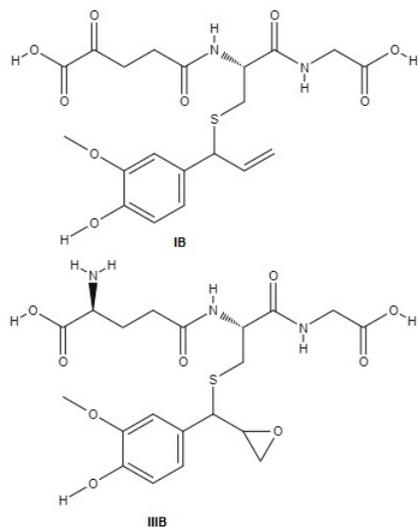


Figura 9: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura 2. Fuente: Elaboración propia.

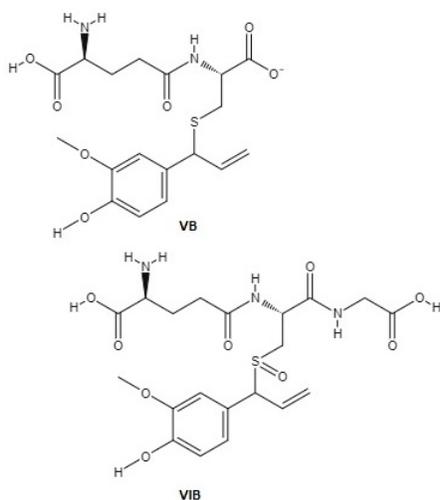


Figura 10: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura 2. Fuente: Elaboración propia.

Por último, el enlace olefínico en la cadena lateral de la estructura 2 es susceptible a la epoxidación; además, el grupo hidroxilo en el oxígeno 7 de la estructura C es susceptible a la oxidación.

Un estudio en eugenol determinó que es susceptible a una epoxidación, O-desalquilación y a una hidroxilación alifática; además, estas reacciones serían catalizadas por el citocromo P450. Podemos observar que estos resultados son similares a los presentados en este estudio (Absalan *et al.*, 2016).

Las reacciones catabólicas presentadas anteriormente pueden ser catalizadas por el citocromo P450

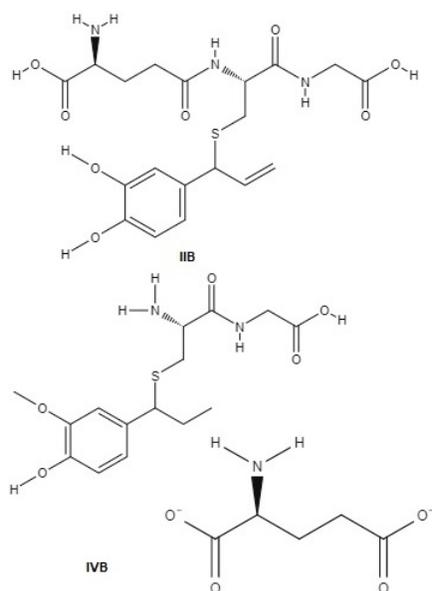


Figura 11: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura 2. Fuente: Elaboración propia.

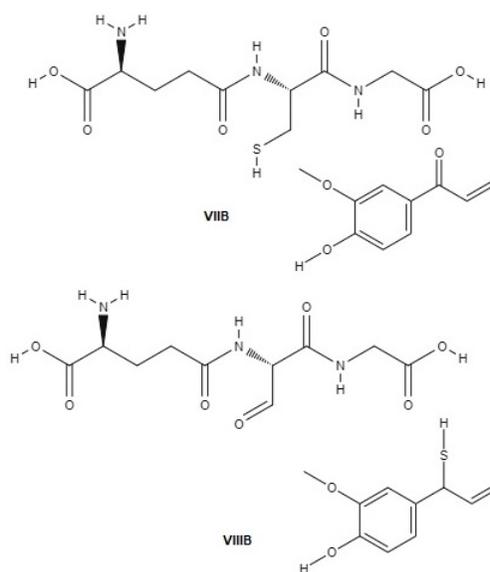


Figura 12: Compuestos derivados del catabolismo de la estructura 2. Fuente: Elaboración propia.

(Guengerich, 2001; Guengerich & Munro, 2013; Isin & Guengerich, 2007). Asimismo, estudios sugieren que estas reacciones se llevan a cabo en probablemente todos los seres vivos (Kim *et al.*, 2007). Por tanto, es posible que estas reacciones se lleven a cabo en *Candida albicans* tratada con eugenol, como un mecanismo de desintoxicación.

4. CONCLUSIONES

Los aductos presentados en este estudio presentan poca capacidad para penetrar membranas biológicas, baja hidrofobicidad, pueden formar puentes de hidrógeno, se presentan como moléculas cargadas a pH fisiológico y las reacciones que los originan son termodinámicamente favorables. Por lo tanto, tendrían una distribución únicamente intracelular. Por otro lado, presentan grupos químicos que podrían ser blanco de enzimas (como el citocromo P450) y de esta manera estos aductos podrían ser eliminados o biotransformados rápidamente.

Referencias

- Abbaszadeh, S.; Sharifzadeh, A.; Shokri, H.; Khosravi, A. R. & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 24(2), e51–e56.
- Absalan, A.; Mesbah-Namin, S. A.; Tiraihi, T. & Taheri, T. (2016). The effects of cinnamaldehyde and eugenol on human adipose-derived mesenchymal stem cells viability, growth and differentiation: a cheminformatics and in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(6), 643–657.
- Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Consonnio, V.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y.; Todeschini, R.; Kuz'min, V.; Cramer, R.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J.; Terfloth, L.; Gasteiger, J.; Richard, A. & Tropsha, A. (2014). QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(12), 4977–5010.
- Bolton, J. L. (2014). Quinone methide bioactivation pathway: contribution to toxicity and/or cytoprotection? *Current Organic Chemistry*, 18(1), 61–69.
- Chang, R. (2008). *Físicoquímica*. México: Mc Graw Hill.
- Charan-Raja, M. R.; Srinivasan, V.; Selvaraj, S. & Mahapatra, S.K. (2015). Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 6(5), 367–372. [https:// doi: 10.4172/2153-2435.1000367](https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000367).
- Constantinou, L. & Gani, R. (1994). New group contribution method for estimating properties of pure compounds. *AIChE Journal*, 40(10), 1697–1710.
- Ensuncho, A. E.; Robles, J. R. & Figueredo, S. F. (2017). Modelado de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de los derivados 5-(nitroheteroaril)-1, 3, 4-tiadiazol con actividad Leishmanicida. *Información Tecnológica*, 28(2), 191–202.
- Fernandes, J. & Gattass, C. R. (2009). Topological polar surface area defines substrate transport by multidrug resistance associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(4), 1214–1218.

- Fierro, E. N.; Faúndez, C. A. & Valderrama, J. O. (2016). Método de contribución de grupos: una herramienta fundamental en cursos avanzados de termodinámica y física de fluidos para la estimación de propiedades de sustancias. *Formación Universitaria*, 9(3), 99–108.
- Fourches, D.; Muratov, E. & Tropsha, A. (2010). Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(7), 1189–1204.
- Garbee, D. D.; Pierce, S. S. & Manning, J. (2017). Opportunistic fungal infections in critical care units. *Critical Care Nursing Clinics*, 29(1), 67–79.
- Gonçalves, S. S.; Souza, A. C. R.; Chowdhary, A.; Meis, J. F. & Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*, 59(4), 198–219.
- Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 611–650.
- Guengerich, F. P. & Munro, A. W. (2013). Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17065–17073.
- Isin, E. M. & Guengerich, F. P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(3), 314–329.
- Khan, A.; Ahmad, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L. A. & Manzoor, N. (2011). Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Research*, 11(1), 114–122.
- Kim, D.; Cryle, M. J.; De Voss, J. J. & de Montellano, P. R. O. (2007). Functional expression and characterization of cytochrome P450 52A21 from *Candida albicans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464(2), 213–220.
- Kong, X.; Liu, X.; Li, J. & Yang, Y. (2014). Advances in pharmacological research of eugenol. *Current Opinion Complement Alternative Medicine*, 1(1), 8–11.
- Lovering, F.; Bikker, J. & Humblet, C. (2009). Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(21), 6752–6756.
- Luo, G. & Guenther, T. M. (2001). Investigation of the role of the 2, 3-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. *Toxicology*, 160(1-3), 47–58.
- Malta de Sá, M.; Mesquita, K. F. & Rangel-Yagui, C. D. O. (2010). A 2D-QSPR approach to predict blood-brain barrier penetration of drugs acting on the central nervous system. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(4), 741–751.

- Moorthy, N. S. H. N.; Ramos, M. J. & Fernandes, P. A. (2012). Analysis of van der Waals surface area properties for human ether-a-go-go-related gene blocking activity: computational study on structurally diverse compounds. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 23(5-6), 521–536.
- Nucci, M.; Queiroz-Telles, F.; Tobón, A. M.; Restrepo, A. & Colombo, A. L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 561–570.
- Sanguinetti, M.; Posteraro, B. & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58, 2–13.
- Sivakumar, S.; Anitha, P.; Ramesh, B. & Suresh, G. (2017). Analysis of EAWAG-BBD pathway prediction system for the identification of malathion degrading microbes. *Bioinformation*, 13(3), 73–77.
- Southan, C. & Stracz, A. (2013). Extracting and connecting chemical structures from text sources using chemicalize. org. *Journal of Cheminformatics*, 5(1), 20.
- Zhao, Y. H.; Abraham, M. H. & Zissimos, A. M. (2003). Fast calculation of van der Waals volume as a sum of atomic and bond contributions and its application to drug compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(19), 7368–7373.