

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformações da bacarina da própolis verde utilizando fungos filamentosos e
bactérias da microbiota intestinal**

ADRIANY DIAS FONSECA

**Ribeirão Preto
2020**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANY DIAS FONSECA

Biotransformações da bacarina da própolis verde utilizando fungos filamentosos e bactérias da microbiota intestinal

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Adriany Dias Fonseca

Orientador: Prof. Dra. Niede A. J. C. Furtado

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 27 de Março de 2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Fonseca Dias, Adriany

Biotransformações da bacarina da própolis verde utilizando fungos filamentosos e bactérias da microbiota intestinal, 112p;30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos
Orientador: Furtado, Nieve Araçari Jacometti Cardoso

1. Metabolismo. 2. Análogos. 3. Microrganismos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriany Dias Fonseca

Biotransformações da bacarina da própolis verde utilizando fungos filamentosos e bactéria da microbiota intestinal.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais Naasson e Adriana e
minha avó Ilda. Este trabalho não é somente meu, mas de vocês que
me apoiaram e me deram suporte físico, mental e espiritual para
caminhar por essas estradas.*

“Si le quieres enseñar algo a un perro, lo primero que tienes que hacer es saber más que el perro.”

Roberto Gómez Bolaños (Chespirito)

RESUMO

FONSECA, A. D. **Biotransformações da bacarina da própolis verde utilizando fungos filamentosos e bactérias da microbiota intestinal**. 2020. 112p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A própolis verde (PV) é um produto apícola de grande valor comercial e medicinal e dentre seus constituintes encontra-se a bacarina, uma das substâncias majoritárias encontradas na *Baccharis dracunculifolia*, principal fonte botânica da própolis verde. A bacarina (Ba) destaca-se por inibir a enzima aldó-ceto redutase 1C3, responsável por aumentar a proliferação de células cancerígenas na próstata e na mama. Os estudos de biotransformação são uma das alternativas de obtenção de análogos bioativos partindo do princípio da química verde. Neste estudo foram realizados estudos de biotransformação da bacarina com fungos filamentosos, bactérias do trato gastrointestinal e levedura probiótica. Na primeira etapa procedeu-se com o isolamento da bacarina para o qual foram usadas duas estratégias: cromatografia contracorrente de alta velocidade e cromatografia sob pressão reduzida. Após a obtenção da substância isolada foram realizados ensaios de microdiluição em microplaca com objetivo de determinar os valores de concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima e concentração bactericida mínima frente aos microrganismos utilizados nos processos de biotransformação. Posteriormente, realizou-se triagens com os fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b e *Aspergillus alliaceus* ATCC 10060, com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, com a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, e com as bactérias probióticas *Lactobacillus jhonsonii* ATCC 53544 e *L. acidophilus* ATCC 3320. Após as análises optou-se por ampliar os processos de biotransformação conduzidos com os fungos, com a bactéria *E. coli* e com a levedura. Foram isolados dois produtos de biotransformação do processo desenvolvido com *A. alliaceus* com 7,2 e 9,5% de rendimento, um produto de cada um dos processos conduzidos com o fungo *C. elegans*, bactéria *E. coli* e a levedura *S. boulardii* com 5,5, 50 e 11 % de rendimento, respectivamente. Dois produtos de biotransformação isolados foram descritos na literatura como metabólitos secundários de fungo marinho e de fungo endofítico e um como derivado do ácido cumárico descrito em uma patente. Dos processos conduzidos com *E. coli* e *S. boulardii* obteve-se o produto de biotransformação identificado como drupanina, um metabólito secundário encontrado na própolis verde. De maneira geral, os resultados obtidos neste estudo contribuem com a obtenção de novos análogos da bacarina, bem como para o entendimento do metabolismo de um dos constituintes da própolis verde.

Palavras-chave: análogos, metabolismo, microrganismos.

ABSTRACT

Biotransformations of baccharin from green propolis using filamentous fungi and bacteria from intestinal microbiota. 2020. 112p. Dissertation (Masters). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Green propolis is a bee product of high commercial and medicinal value. Its main botanical source is *Baccharis dracunculifolia* and one of its major constituents is baccharin. This substance inhibits the enzyme aldo-keto reductase 1C3, responsible for increasing the proliferation of cancer cells in the prostate and breast. Biotransformation studies are one of the alternatives for obtaining bioactive analogs based on green chemistry principle. In this study, we carried out biotransformation of baccharin with filamentous fungi, bacteria from intestinal microbiota and probiotic yeast. In the first step, baccharin was isolated using two strategies: high-speed countercurrent chromatography and vacuum liquid chromatography. After the obtention of the isolated compound, microdilution assays were performed in microplate to determine the values of minimum inhibitory concentration, minimum fungicidal concentration and minimum bactericidal concentration against the microorganisms used in biotransformation processes. Subsequently, screenings were performed with the fungi *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b and *Aspergillus alliaceus* ATCC 10060 fungi, with the bacterium *Escherichia coli* ATCC 25922, with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and with the probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* ATCC 53544 and *L. jhonsonii* ATCC 3320. After the analyses, the biotransformation processes carried out with fungi, *E. coli* and yeast were selected to scale up. Two biotransformation products were isolated from the process developed with *A. alliaceus* with 7.25 and 9.57% yield, one product of each process carried out with *C. elegans*, *E. coli* and *S. boulardii* was isolated with 5.5, 50 and 11.11% yield, respectively. Two isolated biotransformation products have been reported in the literature as secondary metabolites of marine and endophytic fungi, and one as a derivative of coumaric acid described in a patent. The processes carried out with *E. coli* and *S. boulardii* resulted in the biotransformation product identified as drupanin, a secondary metabolite found in green propolis. The achieved results contribute to obtaining new baccharin analogues, as well as to the understanding of the metabolic pathways of one green propolis constituent.

Keywords: metabolism, analogs, microorganisms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Própolis e bacarina: atividades biológicas</i>	11
1.2 <i>Biotransformação: um processo “ecofriendly”</i>	16
2 OBJETIVOS	22
2.1 <i>Objetivo geral</i>	22
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 <i>Origem da própolis verde</i>	Erro! Indicador não definido.
3.2 <i>Estudo fitoquímico</i>	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 <i>Obtenção do extrato etanólico da própolis verde</i>	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 <i>Partição do extrato etanólico</i>	Erro! Indicador não definido.
3.2.3 <i>Fracionamento da fração diclometano por cromatografia contracorrente para isolamento da bacarina</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.5 <i>Análises cromatográficas das frações e subfrações obtidas.</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3 <i>Estudos de Biotransformação</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.1 <i>Microrganismos e condições de manutenção</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.2 <i>Determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM)</i> Erro! Indicador não definido.	
3.3.3 <i>Produção de esporos e biomassa dos fungos em meio pré- fermentativo</i> Erro! Indicador não definido.	
3.3.4 <i>Crescimento da bactérias da microbiota intestinal e da levedura</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.5 <i>Biotransformações da bacarina</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.5.3 <i>Isolamento dos produtos de biotransformação das culturas de A. alliaceus, C. elegans, E. coli e S. boulardii</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4 <i>Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com os fungos Filamentos, E. coli e S. boulardii</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4.1 <i>Análise dos produtos de biotransformação por Espectrometria de Massas</i> Erro! Indicador não definido.	
4. RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1. <i>Estudo Fitoquímico</i>	Erro! Indicador não definido.
4.1.1 <i>Perfil cromatográfico do extrato etanólico da própolis verde</i>	Erro! Indicador não definido.
4.1.2 <i>Identificação da bacarina</i>	Erro! Indicador não definido.

C Erro! Indicador não definido.

4.2 Ensaio de microdiuição em microplacas para determinação dos valores de concentração inibitória mínima da bacarina**Erro! Indicador não definido.**

4.3 Biotransformações com os fungos filamentosos *A. alliaceus* e *C. elegans*.....**Erro! Indicador não definido.**

4.4 Biotransformação com *E. coli***Erro! Indicador não definido.**

4.5 Biotransformação com *S. boulardii***Erro! Indicador não definido.**

4.6 Biotransformação em escala ampliada com *A. alliaceus***Erro! Indicador não definido.**

4.6.1 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação isolados do processo realizado com *A. alliaceus*..... **Erro! Indicador não definido.**

C Erro! Indicador não definido.

C Erro! Indicador não definido.

Erro! Indicador não definido.

4.7 Biotransformação em escala ampliada do fungo *C. elegans* e da bactéria *E. coli* **Erro! Indicador não definido.**

C **Erro! Indicador não definido.**

C **Erro! Indicador não definido.**

4.8 Biotransformação em escala ampliada da levedura *S. boulardii***Erro! Indicador não definido.**

4.9 Biotransformações realizadas com *L. jhonsonii* e *L. acidophilus***Erro! Indicador não definido.**

5. CONCLUSÕES 23

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 24

1. INTRODUÇÃO

1.1 Própolis e bacarina: atividades biológicas

A própolis consiste em um material resinoso complexo resultante de exsudados e partes vegetais coletados pelas abelhas *Apis mellifera* e enzimas produzidas nas glândulas salivares das abelhas (Cardinault et al., 2012; Sforcin, 2016). A própolis é utilizada na colmeia para selar buracos dos seus favos de mel e recobrir carcaças de insetos que morreram na colmeia para evitar sua decomposição (Toreti et al., 2013).

A utilização da própolis tem sido relatada há muito tempo. Existem registros que sugerem seu uso pelos povos Egípcios em processos de mumificação e pelos Greco Romanos no tratamento de feridas, lesões cutâneas e intervenções cirúrgicas. (Kuropatnikcki et al., 2013; Houghton, 1998; Ghisalberti, 1979). A partir de suas utilizações empíricas, surgiu o interesse em pesquisas científicas que demonstraram o forte potencial da própolis como fonte de compostos bioativos (Lustosa et al., 2008).

Os compostos químicos encontrados na própolis podem variar de acordo com a espécie da abelha, o tipo de vegetação que podem acessar e a sazonalidade (Sforcin & Banrva, 2011; da Cunha et al., 2013; Nascimento et al., 2020). A coloração da própolis também se altera, variando entre amarelo claro e marrom esverdeado ao negro (Freires, et al., 2016).

De acordo com Viuda-Martos e colaboradores (2008), a própolis é composta por mais de 300 substâncias, sendo que 50-55% correspondem aos constituintes das resinas e bálsamos, 30% a ceras e ácidos graxos, 10% aos constituintes dos óleos essenciais e 5% são substâncias orgânicas e minerais (Viuda-Martos et al., 2008). Os principais metabólitos secundários de própolis responsáveis pelas atividades biológicas são os flavonoides, terpenos e derivados do ácido cinâmico que estão presentes na maioria dos tipos de própolis (Rocha et al., 2012; Falcão et al., 2013).

Devido a complexa composição da própolis que varia com a fonte botânica, sazonalidade e espécie de abelha, dependendo dos constituintes químicos presentes, este material pode apresentar diversas atividades biológicas incluindo antibacteriana, antiparasitária, antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante, neuroprotetora, antitumoral,

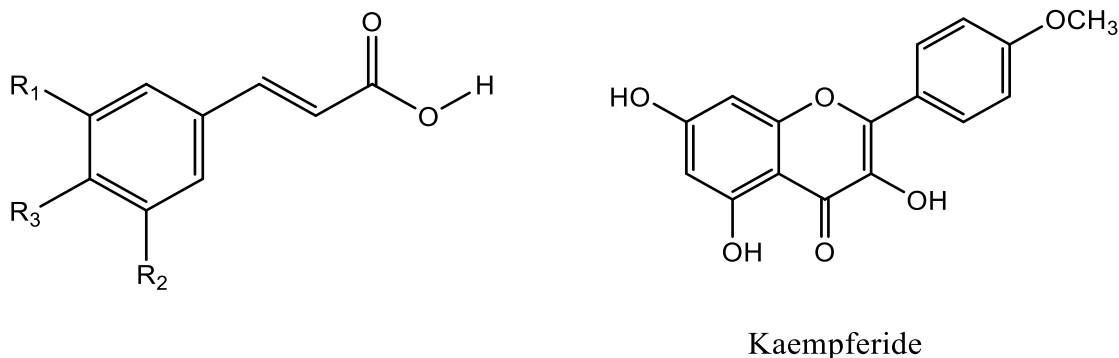
dentre outras (Bueno et al., 2017; Dantas Silva et al., 2017; da Silveira et al., 2018; Shahinozzaman et al., 2018 Brihoum et al., 2018).

Dentre os diferentes tipos de própolis, a própolis verde se destaca dentre as demais do ponto de vista econômico (Belmiro et al., 2011) e também devido à diferenciada composição química, sendo produzida no cerrado brasileiro, comumente na região Sudeste do país, principalmente no estado de Minas Gerais (Faemg, 2014). A sua principal fonte botânica é a *Baccharis dracunculifolia* D.C, popularmente conhecida como alecrim do campo (Figueiredo-Rhinhel et al., 2013; Freires et al, 2016).

Segundo a CONAP, 8 toneladas de própolis verde são exportadas por ano. Os países asiáticos apresentam maior demanda na importação de própolis, tendo um valor de R\$ 170/kg. No Japão 92% da própolis *in natura* consumida é proveniente do Brasil, tendo como preço do extrato alcoólico comercializado no país US\$110 o frasco (CONAP, 2015; FAEMG, 2014; SEBRAE, 2014).

As principais substâncias que compõem a própolis verde (Figura 1) são em sua grande parte derivados do ácido cinâmico, como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, flavonoides como kaempferide, aminoácidos e fenilpropanoides prenilados, como a drupanina, o artepelin C, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) e a bacarina, a qual é foco dos nossos estudos (Salatino et al., 2011; Figueiredo et al., 2017; Ramos et al., 2016; de Sousa et al., 2007; Huang S et al., 2014).

A fração volátil possui perfis químicos distintos relatados na literatura que variam de acordo com a região onde é coletada a própolis (Bankova, Popova, Trusheva, 2014). Kusumoto e colaboradores (2001) detectaram vinilprenilfenóis, acetofenonas, alilbenzeno e espatulenol. No entanto, De Albuquerque e colaboradores (2008) relataram a presença de sesquiterpenos e dentre estes β -cariofileno e nerolidol como majoritários. Porém, Oliveira e colaboradores (2010) detectaram uma composição química distinta relatando a presença de acetofenona, β -farneseno, α -terpineol, γ -cadineno, espatulenol e α -ylangeno, como principais substâncias.



ácido *p*-cumárico: R2= H, R3= H, R4= OH

artepelin C: R1= prenil; R2= prenil, R3= OH

bacarina: R1=prenil, R2= H, R3=

drupanina: R1=prenil, R2=H, R3=OH

ácido cafeico: R1=H, R2=OH, R3=OH

ácido ferúlico: R1=H, R3=OH, R2=OCH₃

Figura 1. Estruturas químicas de alguns constituintes da própolis verde

Devido a essa variedade na composição química também observada para a própolis verde, dependendo dos constituintes químicos presentes, esta pode apresentar diversas atividades biológicas.

A bacarina (Figura 1), um dos constituintes majoritários comumente encontrados na própolis verde, é reportada na literatura por apresentar atividade antitumoral, a qual está relacionada ao bloqueio da enzima alfa-ceto redutase AKR1C3 (Byrns et al., 2011).

A enzima aldo-ceto redutase é capaz de estimular a proliferação celular através do metabolismo de hormônios esteroidais e prostaglandina na mama e, portanto, o bloqueio dessa enzima, auxiliaria na prevenção e tratamento do câncer de mama (Byrns et al., 2011). A aldo-ceto redutase AKR1C3 é capaz de converter 4-androstano-3,17-diona em testosterona nos tecidos mamários, a qual está relacionada a metástases em casos de câncer de mama (Suzuki et al., 2005). Na próstata a enzima aldo-ceto redutase AKR1C3 converte 4-androstene-3,17-diona

e 5 α -androstano-3,17-diona para testosterona e 5 α -dihidrotestosterona, respectivamente, os quais são ligantes dos receptores de andrógenos que estão relacionados ao câncer de próstata (Adeniji et al., 2011; Byrns et al., 2011; Bishr, Saad, 2013).

Estudos conduzidos por Verma e colaboradores (2016) demonstraram a importância do papel da enzima AKR1C3 na regulação da via que controla a proliferação, diferenciação e apoptose em células mieloides. Neste trabalho foram testados alguns inibidores da AKR1C3, incluindo a bacarina, os quais foram administrados em conjunto com os quimioterápicos de linhagens celulares de leucemia mieloide aguda. O tratamento realizado com o etoposídeo nas células HL-60 de Leucemia Humana em uma concentração de 1 μ M reduziu em 40% a viabilidade celular. Já a bacarina quando administrada a 0,1 μ M juntamente com o etoposídeo (1 μ M) proporcionou uma potencialização significativa ($p < 0,0001$) da citotoxicidade do quimioterápico, reduzindo a viabilidade celular em 70%. Portanto, os autores sugeriram que os compostos inibidores da AKR1C3 em co-administração com agentes quimioterápicos em uso clínico podem aumentar o índice terapêutico e beneficiar os efeitos da quimioterapia nestes casos (Verma et al., 2016).

Estudos de relação estrutura atividade (REA) realizados com análogos da bacarina demonstraram que esta possui forte afinidade ($IC_{50}=0,10 \mu$ M) para se ligar a enzima AKR1C3 e bloqueá-la. O ensaio de docagem da bacarina com a enzima AKR1C3.NADP⁺ demonstrou que o grupo prenil realiza interações com sítios SP3 e que este auxilia na orientação do ácido cinâmico e do grupo 4-diidrocinaoiloxi nos sítios SP1 e SP3. Esses efeitos de interações são observados através da potência inibitória diminuída de um dos análogos obtidos (figura 2) apresentando um IC_{50} de 68 μ M e perda da seletividade, após as modificações de remoção no grupo 3-prenil e substituição do grupo fenil por um anel de piridina (Zang et al., 2015). Portanto, sugere-se que a inibição seletiva da AKR1C3 está relacionada à porção 3-prenil da bacarina devido a essas interações hidrofóbicas extras entre a substância e o sítio SP3 (Endo et al., 2012; Zang et al., 2015).

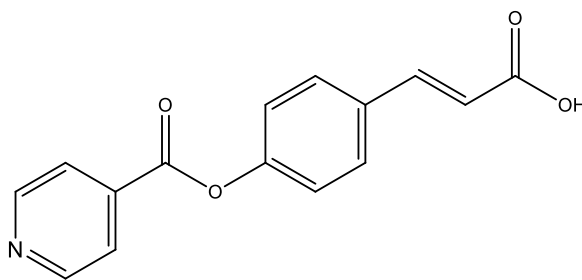
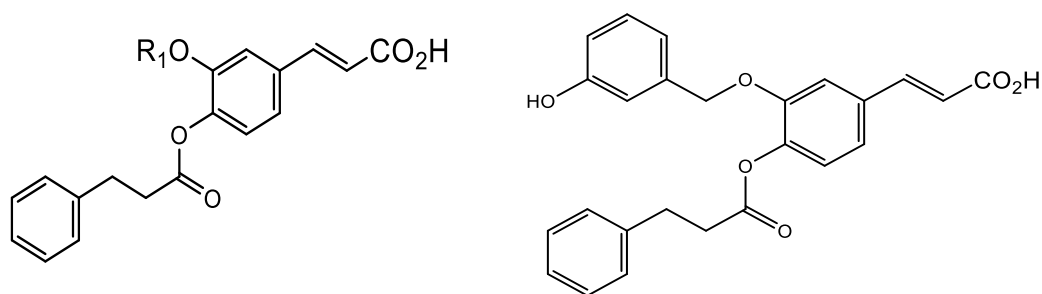


Figura 2. Estrutura química de um análogo da bacarina obtido por Zang et al., 2015.

Estudos realizados por Endo e colaboradores (2014) demonstraram que dois análogos da bacarina, (**6m e 6n**, Figura 3), com modificações cujo grupo prenil foi substituído por éteres benzílicos, apresentaram afinidade para se ligar a enzima AKR1C3 e bloqueá-la de forma semelhante a bacarina. Neste mesmo estudo os autores reportaram que um outro análogo (**14**, Figura 3) com grupo hidroxílico no anel fenil do éter benzílico apresentou afinidade pela enzima AKR1C3 maior que a bacarina com seletividade comparável à essa substância.



Análogo 6m, R1= metil-benzil; IC_{50} = 0,11 μ M

Análogo 6n, R1= 3-fluorobenzil; IC_{50} = 0,11 μ M

Análogo 14 IC_{50} = 20 nM

Figura 3. Estruturas químicas de análogos da bacarina obtidos por Endo e colaboradores (2014).

Estudos de Oliveira e colaboradores (2012) realizados com indução de danos ao DNA por metanossulfonato de metila, demonstraram que houve redução de danos após o tratamento das células com a bacarina, sugerindo um potencial antioxidante (Oliveira et al., 2012).

De Oliveira e colaboradores (2014) avaliaram efeito antiproliferativo do extrato da própolis verde, do extrato da planta *B. dracunculifolia*, bem como dos constituintes majoritários isolados, incluindo artepelin C e bacarina, em diversas linhagens tumorais. Os menores valores

de IC_{50} observados foram de $41,0 \pm 4,5 \mu\text{g} / \text{mL}$ para o extrato de própolis verde frente a linhagem de glioblastoma humano (U343) e de $44,9 \pm 7,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ para o extrato de *B. dracunculifolia* frente a linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Quanto as substâncias isoladas, artepelin C e bacarina, os menores valores de IC_{50} foram de $20,1 \pm 2,9$ frente a linhagem U343 e $13,0 \pm 1,5 \mu\text{g} / \text{mL}$ frente a linhagem de melanoma murino B16F10, respectivamente. A associação dessas duas substâncias apresentou maior citotoxicidade que os extratos de própolis e de *B. dracunculifolia*, porém os autores não observaram efeito sinérgico significativo entre o artepelin C e a bacarina (De Oliveira et al., 2014).

Em um outro estudo conduzido por Kumazaki e colaboradores (2014), após o tratamento das linhagens celulares de câncer de cólon humano DLD-1r com bacarina, foi observado um efeito indutor de apoptose significativo por ativação das vias de sinalização de apoptose. Em outro estudo foi observado efeito citotóxico em linhagens de cânceres de próstata CWR22Rv1 após 24h de tratamento com bacarina (Endo et al., 2018).

1.2 Biotransformação: um processo “ecofriendly”

Na década de 80' houve uma crescente preocupação em relação as quantidades exorbitantes de resíduos gerados pela indústria química. Iniciou-se então, a busca alternativa por uma química mais limpa, mas que fosse eficiente e tivesse menor desperdício de recursos. Isso resultou em um aumento da conscientização ambiental e em um controle maior de poluição por resíduos gerados em processos químicos (Sheldon, 2012).

No início dos anos 90, houve uma mudança na ênfase da lei de prevenção da poluição nos EUA, onde a cobrança por menor geração de resíduos e redução da poluição ambiental foi mais acentuada. Posteriormente, estratégias à proteção ambiental foram aumentadas, levando ao surgimento do termo “green chemistry”, ou seja, química verde na Agência de proteção ambiental dos EUA (Environmental Protection Agency (EPA),1990).

A definição do termo química verde é a utilização preferencialmente de matérias primas renováveis, que elimina o desperdício evitando o uso de reagentes e solventes tóxicos e perigosos na produção e aplicação de produtos químicos. O principal ponto da química verde é a prevenção da poluição ambiental. O termo foi formalizado após a publicação do livro Green Chemistry: Theory and Practice, por Anastas e Warner em 1998.

A utilização de processos químicos “verdes” vem se destacando como alternativa aos métodos tradicionais da síntese clássica, devido a redução ou até mesmo eliminação de geração de resíduos que prejudicam o meio ambiente e a saúde humana (Koenig, et al., 2019) O planejamento de mudanças químicas estruturais de produtos naturais tem fornecido uma variedade de “lead compounds” para a indústria farmacêutica. (Jung et al. 2015; Guo 2017).

Várias abordagens podem ser usadas para obter análogos estruturais de produtos naturais, dentre essas a utilização de células inteiras ou enzimas isoladas. (Conceição et al., 2019; del Arco et al., 2020). Essas abordagens são alternativas ecologicamente corretas e eficientes aos métodos químicos tradicionais de várias etapas, diminuindo o uso de solventes prejudiciais ao meio ambiente.

A biotransformação consiste na utilização de sistemas biológicos para promover mudanças estruturais em compostos químicos que não são seus substratos naturais (Muffler et al., 2011; Baipining et al., 2010; Patel, 2008). As vantagens desse processo estão relacionadas a especificidade das reações que são regio e enantioespecíficas, e também ao custo, o qual é muitas vezes menor do que ao demandado para obtenção de derivados por química clássica (Sultana, Saify, 2013).

A biocatálise também é uma alternativa tecnológica atrativa para obtenção de novos compostos para indústria farmacêutica, devido a enantiosseletividade das reações para produção de intermediários farmacêuticos ativos (Sheldon & Woodley 2018). Muitas vezes o termo biocatálise e biotransformação são usados como sinônimos, no entanto, possuem diferenças. Na biocatálise são usadas enzimas isoladas e/ou imobilizadas, ao contrário do processo de biotransformação onde se utiliza as células íntegras do microrganismo. No entanto, existem algumas desvantagens que restringem a aplicação de enzimas como biocatalisadores industriais, como o curto tempo de vida das enzimas sob condições agressivas de reação usadas na indústria (altas temperaturas e pressões), impossibilidade de reutilização e dificuldade para a recuperação do meio reacional (Stepankova et al., 2013).

A utilização de células íntegras de microrganismos em comparação com enzimas purificadas tem demonstrado um grande atrativo devido a boa eficiência, preparação relativamente fácil e baixo custo, o que é interessante para aplicações industriais em larga escala (Schuurmann et al. 2014). Além disso, permite uma grande diversidade enzimática e de

cofatores, que a utilização de enzimas isoladas não possui. Contudo, os estudos de biotransformação também podem ser uma ferramenta na investigação de vias metabólicas de xenobióticos (de Sousa et al., 2018; Paludo et al., 2017).

Existem vários modelos de estudos de biotransformação *in vitro* que utilizam microrganismos como fungos filamentosos, bactérias, leveduras, bem como microalgas e células vegetais, além de modelos intestinais e hepáticos como microsomos hepáticos e células Caco-2 (Carrão et al., 2017; Orbach et al., 2017). Diante disso, essa estratégia tem ganhado espaço nas áreas farmacêutica e química, visando a busca de novas rotas para produção de compostos bioativos (Hou et al., 2016; Cruz de Carvalho et al., 2020).

A biotransformação para a compreensão do metabolismo de medicamentos é muito utilizada, como por exemplo em medicamentos fluorados, que apesar de apresentarem átomos de carbono e flúor conectados por ligação covalente, podem ser parcialmente metabolizados em um metabólito mais tóxico. Assim, podemos citar vários fármacos que foram submetidos a biotransformação utilizando modelos microbianos como: flurbiprofen, citalopram e antibióticos fluoroquinolonas (Murphy, 2016).

Os fungos filamentosos são modelos clássicos para estudos de biotransformação e contam com aparato enzimático semelhante ao dos mamíferos e de ampla diversidade proteica, sendo muitas vezes úteis para a predição de vias metabólicas em humanos (Paludo et al., 2017). É reportado na literatura que espécies de *Aspergillus* podem introduzir grupos hidroxílicos em diferentes classes de produtos naturais como terpenóides, cumarinas, lignanas e flavonoides, além de biotransformar esteroides como as espirolactonas e alcaloides (Al-Aboudi et al., 2017; Silva et al., 2013; da Silva et al., 2017). Um estudo conduzido por Torres-Mancera e colaboradores (2013) demonstrou forte potencial de uma espécie de *Aspergillus* para biotransformar o ácido clorogênico em ácidos cafeico, quínico e protocatecóiico. Reações de desmetilação, redução de grupos funcionais, e metoxilação também foram reportadas (Porto et al., 2012; Teng et al., 2014).

O fungo *Cunninghamella elegans* é reportado na literatura por realizar reações de hidroxilação em cumarinas e hidroxinaftoquinonas (Nascimento et al., 2019; de Oliveira et al., 2016). Em um estudo conduzido por Sponchiado 2019, este fungo foi utilizado para biotransformar um medicamento denominado ambrisentan que é utilizado no tratamento contra

hipertensão arterial pulmonar. O fungo *C. elegans* demonstrou potencial para converter o medicamento ambrisentan em um metabólito glicosilado (Sponchiado, 2019).

A microbiota intestinal também pode influenciar na farmacocinética dos medicamentos administrados por via oral, podendo haver implicações significativas na biodisponibilidade e atividade biológica devido as modificações ocasionadas pelas enzimas microbianas (Yoo et al., 2014; Yoo et al., 2016). Como exemplo pode-se citar os estudos conduzidos pelo nosso grupo que demonstraram que o microrganismo *Lactobacillus acidophilus* foi capaz de biotransformar a naftoquinona lapachol em um metabólito mais ativo contra uma linhagem de câncer de mama conforme a figura 4 (Silva et al., 2014).

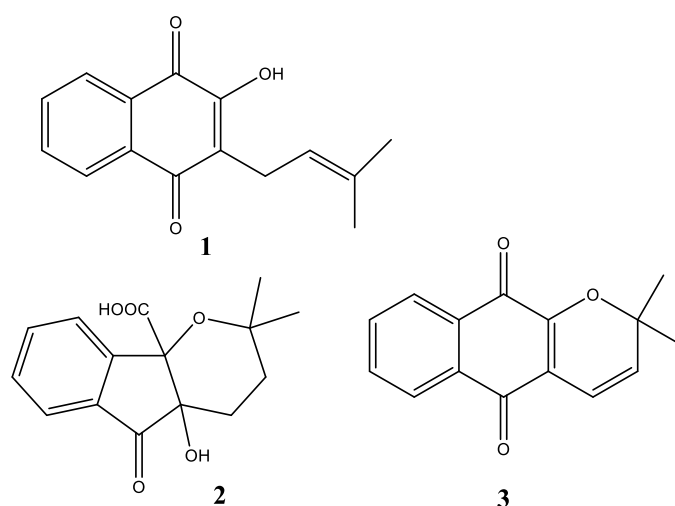


Figura 4. Estrutura química do Lapachol (1) e dos dois produtos de biotransformação obtidos pelo *L. acidophilus* (2) e (3).

Nos estudos conduzidos por Zimmermann e colaboradores em 2019, 76 bactérias intestinais humanas foram utilizadas para avaliar seus efeitos metabólicos em 271 medicamentos, dentre estes o diltiazem, dexametazona, fufenazina e fanciclovir que são administradas por via oral. As análises foram realizadas com auxílio da engenharia genética e a espectrometria de massas para identificar os genes microbianos que metabolizam xenobióticos. Cerca de dois terços dos fármacos analisados foram metabolizados por pelo menos uma linhagem de bactéria. Portanto, esses resultados demonstram o quão significativo é o papel da microbiota intestinal no metabolismo de xenobióticos (Zimmermann et al., 2019).

A interação entre os medicamentos e a microbiota intestinal é importante para a compreensão dos mecanismos farmacológicos e o desenvolvimento de reações adversas ocasionada por estes fármacos (Doestzada et al., 2018; Imhann et al., 2017). No entanto, sabe-se que a microbiota intestinal é alterada em certas enfermidades como exemplo artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, dentre outras, sugerindo que alguns efeitos colaterais dos medicamentos podem ser induzidos pelo impacto no ambiente intestinal (Vich et al., 2018; Chem et al., 2016).

Na China, em 2008, a contaminação do leite com melamina ocasionou mais de 50.000 hospitalizações infantis por insuficiência renal, provocando investigação científica sobre os mecanismos responsáveis (Ingelfinger, 2008; Spanogiannopoulos et al., 2016; Hau et al., 2009). Após a investigação os pesquisadores constataram que a melamina era convertida em ácido cianúrico através de etapas de desaminação pela ação enzimática da bactéria *Klebsiella terrigena*, a qual se encontra na microbiota intestinal de mamíferos. A toxicidade é provocada pelo acúmulo dos complexos precipitados de ácido cianúrico nos túbulos renais (Zheng et al 2013).

Estudos na literatura demonstram interações entre a microbiota intestinal e o metabolismo de um grupo de xenobióticos no fígado. O ensaio foi desenvolvido com ratos machos e experimentos de metabolômica que possibilitaram inferir que o grupo desprovido de bactérias intestinais teve a regulação do sistema enzimático prejudicada, incluindo a família enzimática Cyp1a2 e Cyp3a11 (Li et al., 2017).

É relatado na literatura que o ácido acetilsalicílico pode ser também metabolizado pela microbiota intestinal e que a ampicilina altera a flora intestinal (Kim et al., 2016). Diante disso, Zhang e colaboradores (2019) verificaram a possível interação da amoxicilina, se afetaria a biotransformação da Aspirina[®] através da alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal. Para monitorar alterações na microbiota bacteriana foi utilizado o método 16S rRNA4. Através deste método notou-se que a população microbiana do grupo tratado com amoxicilina foi drasticamente reduzida, comparado ao grupo da Aspirina[®], demonstrando que a amoxicilina reduz a abundância da microbiota intestinal em ratos. Posteriormente, a Aspirina[®] foi incubada com extratos fecais dos ratos, notando-se que quando o tempo de incubação se prolongava a produção de ácido salicílico no grupo de tratamento com amoxicilina era mais

lenta. Após as análises por LC/MS-MS e avaliação da taxa de depuração nos grupos, constatou-se que a amoxicilina afetou a farmacocinética da Aspirina[®] ativa, diminuindo a atividade metabólica da microbiota intestinal. A interação entre amoxicilina e aspirina mediada pela microbiota intestinal pode afetar a eficácia da Aspirina[®] e causar efeitos adversos mais significativos, alertaram os pesquisadores (Zhang et al., 2019).

Um outro exemplo da influência da microbiota intestinal na ação de fármacos é o da levodopa. O principal tratamento para sintomas motores na doença de Parkinson nos últimos 50 anos tem sido a droga levodopa (L-dopa). Após atravessar a barreira hematoencefálica a L-dopa é metabolizada no cérebro pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) para produzir dopamina, o agente terapêutico ativo (Jameson & Hsiao, 2019). No entanto, essa fármaco tem a eficácia reduzida quando é metabolizada por órgãos periféricos como intestino delgado, sugerindo a participação de bactérias intestinais nessa bioconversão, o que resulta no metabólito dopamina, antes que a L-dopa chegue ao cérebro. As bactérias envolvidas no metabolismo da L-dopa foram identificadas: *Enterococcus faecalis*, que converte a L-dopa em dopamina através da ação da tirosina descarboxilase e a bactéria *Eggerthella lenta* que metaboliza em sequência a dopamina em m-tiramina pela ação da dopamina desidroxilase. (Rekdal et al., 2019).

As leveduras têm sido amplamente utilizadas em processos fermentativos, como exemplo em biotransformações de compostos aromáticos na produção de cerveja. Um estudo conduzido por King e Dickinson, em 2000, demonstrou a capacidade enantiosseletiva de algumas leveduras em biotransformar monoterpenóides. Dentre as leveduras utilizadas uma delas foi a *Saccharomyces cerevisiae* que foi capaz de reduzir o geraniol em citronelol, que são monoterpenóides biossintetizados pelo lúpulo (*Humulus lupulus*) muito importantes na aromatização de cervejas. A partir disso outro estudo avaliou o processo de biotransformação de álcoois terpenóides e sua contribuição para o sabor da cerveja com lúpulo a partir de técnicas sensoriais (Takoi,2010).

Considerando que nenhum estudo de biotransformação foi realizado com a bacarina e que os estudos realizados até o momento ainda não geraram grande variedade estrutural (Endo et al., 2014; Zang et al., 2015), o objetivo deste trabalho foi contribuir para a obtenção de novos

derivados, bem como obter informações para compreender como esta substância poderia ser transformada no organismo humano

Este projeto de mestrado esteve vinculado ao projeto de pesquisa aprovado pela Fapesp na modalidade temático (processo 2017/04138-8, coordenado pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos), intitulado “Realização de estudos químicos, analíticos, biológicos, farmacológicos e tecnológicos para preenchimento das lacunas no desenvolvimento do setor brasileiro de própolis”. Segundo a assessoria científica da FAPESP, o potencial inovador do projeto está justamente nos estudos de biotransformação dos constituintes dos diferentes tipos de própolis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudos de biotransformação da bacarina utilizando fungos filamentosos e bactérias da microbiota intestinal, bem como isolar os produtos majoritários de biotransformação do processo selecionado.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os valores de CIM da bacarina frente aos microrganismos que serão empregados nos estudos de biotransformação;
- Desenvolver processos de biotransformação da bacarina com as bactérias do trato gastrointestinal *Escherichia coli* ATCC - 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC – 53544 e *L. jhonsonii* – 33200 em culturas isoladas e mistas, bem como com os fungos filamentosos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b, *Aspergillus alliaceus* ATCC 10060;
- Selecionar o processo mais promissor para o isolamento dos produtos de biotransformação;
- Conduzir o processo selecionado em escala ampliada visando o isolamento dos produtos majoritários e a elucidação das estruturas químicas destes produtos.

3. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que os estudos fitoquímicos deste trabalho forneceram resultados semelhantes aos já encontrados na literatura, confirmando a presença da bacarina entre as substâncias majoritárias da própolis verde.

O método de cromatografia contracorrente é muito eficaz para separação e isolamento da bacarina presente na fração diclorometano da própolis verde.

Os fungos filamentosos avaliados, as bactérias da microbiota intestinal e a levedura *S. boulardii* demonstraram potencial para biotransformar a bacarina, contribuindo para o conhecimento do possível metabolismo dessa substância e para obtenção de novos análogos. Além de demonstrar reações que são mais laboriosas de se obter a síntese química, nos produtos de biotransformações, como a clivagem na cadeia carbônica que ocorre no produto de biotransformação pbAa1 e pbAa2, que exigem uma alta energia de ativação.

Por fim, a estratégia de utilização de processos de biotransformação para obtenção de derivados da bacarina foi eficiente, além de ter possibilitado o isolamento de produtos de biotransformação que poderão ser avaliados quanto a atividade biológica e utilizados como padrões em estudos de farmacocinética, além de contribuir com a biblioteca de análogos á substancia com variedade estrutural

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Lateff, A., König, G. M., Fisch, K. M., Höller, U., Jones, P. G., & Wright, A. D. (2002). New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acronium sp.* *Journal of natural products*, 65(11), 1605-1611, doi: 10.1021/np020128p.

Adeniji, A. O., Twenter, B. M., Byrns, M. C., Jin, Y., Winkler, J. D., & Penning, T. M. (2011). Discovery of substituted 3-(phenylamino) benzoic acids as potent and selective inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(5), 1464-1468. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.010>

Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., & Nakajima, S. (1994). Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(5), 945-946, doi: 10.1271/bbb.58.945.

Al-Aboudi, A., Kana'an, B. M., Zarga, M. A., Bano, S., Javed, K., & Choudhary, M. I. (2017). Fungal biotransformation of diuretic and antihypertensive drug spironolactone with *Gibberella fujikuroi*, *Curvularia lunata*, *Fusarium lini*, and *Aspergillus alliaceus*. *Steroids*, 128, 15-22., doi: 10.1016/j.steroids.2017.10.003

Baiping, M., Bing, F., Hongzhi, H., & Yuwen, C. (2010). Biotransformation of Chinese herbs and their ingredients. *World Science and Technology*, 12(2), 150-154. doi: 10.1016/S1876-3553(11)60012-4

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28>

Bhatti, H. N., & Khera, R. A. (2014). Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *Journal of Asian natural products research*, 16(1), 70-104. <https://doi.org/10.1080/10286020.2013.846908>

Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1). doi: 10.1590/s2175-97902018000117396

Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2017). The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition

and antibacterial activity. *Natural product research*, 31(11), 1318-1324.doi: 10.1080/14786419.2016.1239088

Byrns, M.C.; Jin, Y; Penning, T.M. (2011). Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 125, 95-104. [https://doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.004).

Cabanillas, B. J., Le Lamer, A. C., Castillo, D., Arevalo, J., Estevez, Y., Rojas, R., ... & Fabre, N. (2012). Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. *Planta medica*, 78(09), 914-918.. [https://doi: 10.1055/s-0031-1298459](https://doi.org/10.1055/s-0031-1298459).

Cardinault, N., Cayeux, M.O., e du Sert, P.P (2012). Própolis: origem, composição e propriedades. *Fitoterapia* , 10 (5), 298-304.. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0733-y>

Carrão, D. B., De Albuquerque, N. C. P., Marques, L. M. M., Crotti, A. E. M., Pilon, A. C., Bolzani, V. D. S., ... & De Oliveira, A. R. M.. In Vitro Metabolism of Artepillin C by Rat and Human Liver Microsomes. *Planta medica*, 83(08), 737-745, 2017.Asha, S., & Vidyavathi, M. (2009). Cunninghamella—a microbial model for drug metabolism studies—a review. *Biotechnology advances*, 27(1), 16-29.doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.005

Cavalaro, R. I., da Cruz, R. G., Dupont, S., de Moura, J. M. L. N., & de Souza Vieira, T. M. F. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food chemistry: X*, 4, 100054.doi: 10.1016/j.fochx.2019.100054.

Chen, J., Wright, K., Davis, J. M., Jeraldo, P., Marietta, E. V., Murray, J., ... & Taneja, V. (2016). An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome medicine*, 8(1), 43.<https://doi.org/10.1186/s13073-016-0299-7>

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; 2nd ed. Approved standard M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 28, n. 16, 2008.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; 8th ed. Approved standard M11-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 32, n. 5, 2012.

CONAP. Crise econômica faz crescer o uso da própolis verde. <http://www.conap.coop.br/2016/05/05/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolis-verde/>

Costa, F. D. N., Silva, A. J. M. D., Netto, C. D., Domingos, J. L., Costa, P. R. R., & Leitão, G. G. (2012). Purification of a synthetic pterocarpanquinone by countercurrent

chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(6), 1114-1118.. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000600016>.

Costa, P., Almeida, M. O., Lemos, M., Arruda, C., Casoti, R., Somensi, L. B., ... & dos Santos, A. C. (2018). Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. *Journal of ethnopharmacology*, 226, 82-89.. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.006>.

da Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L., de Ruiz, A., de Carvalho, J. E., Ikegaki, M., ... & Rosalen, P. L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 23.doi: 10.1186/1472-6882-13-23.2013.

da Silva J, E. A., Paludo, C. R., Gouvea, D. R., Kato, M. J., Furtado, N. A. J. C., Lopes, N. P., ... & Pupo, M. T. (2017). Gas-phase fragmentation of protonated piplartine and its fungal metabolites using tandem mass spectrometry and computational chemistry. *Journal of Mass Spectrometry*, 52(8), 517-525. doi: <https://doi.org/10.1002/jms.3955>

da Silveira Regueira-Neto, M., Tintino, S. R., Rolón, M., Coronal, C., Vega, M. C., de Queiroz Balbino, V., & de Melo Coutinho, H. D. (2018). Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 215-221.<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.029>

de Albuquerque, I. L., Alves, L. A., Lemos, T. L., Dorneles, C. A., & de Moraes, M. O. (2008). Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(5), 414-415.<https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9700044>

de Jesus, L. I., Albuquerque, N. C., Borges, K. B., Simões, R. A., Calixto, L. A., Furtado, N. A., ... & de Oliveira, A. R. (2011). Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction. *Electrophoresis*, 32(19), 2765-2775.doi: 10.1002/elps.201100328

de Oliveira S, E., dos Santos Gonçalves, N., dos Santos, R. A., & Furtado, N. A. J. C. (2016). Microbial metabolism of atovaquone and cytotoxicity of the produced phase I metabolite. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 41(5), 645-650. <https://doi.org/10.1007/s13318-015-0294-1>

de Oliveira, P. F., de Souza Lima, I. M., Munari, C. C., Bastos, J. K., da Silva Filho, A. A., & Tavares, D. C. (2014). Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. *Planta medica*, 80(06), 490-492. doi: 10.1055/s-0034-1368298

de Sousa, I. P., Ferreira, A. G., Crotti, A. E. M., dos Santos, R. A., Kiermaier, J., Kraus, B., ... & Furtado, N. A. J. C. (2020). New antifungal ent-labdane diterpenes against *Candida glabrata* produced by microbial transformation of ent-polyalthic acid. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103560. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103560

de Sousa, J. P., Bueno, P. C., Gregório, L. E., da Silva Filho, A. A., Furtado, N. A., de Sousa, M. L., & Bastos, J. K. (2007). A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 30(16), 2656-2665.. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700228>

do Nascimento, T. G., dos Santos Arruda, R. E., da Cruz Almeida, E. T., dos Santos Oliveira, J. M., Basílio-Júnior, I. D., de Moraes Porto, I. C. C., ... & Clements, C. (2019). Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. *Scientific Reports*, 9(1), 1-16. Doi: 10.1038/s41598-019-54591-3

Doestzada, M., Vila, A. V., Zhernakova, A., Koonen, D. P., Weersma, R. K., Touw, D. J., ... & Fu, J. (2018). Pharmacomicrobiomics: a novel route towards personalized medicine?. *Protein & cell*, 9(5), 432-445. doi: <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0547-2>

Douradinha, B., Reis, V. C., Rogers, M. B., Torres, F. A., Evans, J. D., & Marques Jr, E. T. (2014). Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Bioengineered*, 5(1), 21-29. doi:10.4161/bioe.26271.

El-Salam, M. A., Furtado, N., Haskic, Z., Lieske, J., & Bastos, J. (2019). Antiuro lithic activity and biotransformation of galloylquinic acids by *Aspergillus alliaceus* ATCC10060, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, and *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 18, 101012.. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.050>

Endo, S., Hoshi, M., Matsunaga, T., Inoue, T., Ichihara, K., & Ikari, A. (2018). Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artepillin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. *Biochemical and biophysical research communications*, 497(1), 437-443. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.105>

Endo, S., Hu, D., Matsunaga, T., Otsuji, Y., El-Kabbani, O., Kandeel, M., ... & Toyooka, N. (2014). Synthesis of non-prenyl analogues of baccharin as selective and potent inhibitors for aldo-keto reductase 1C3. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(19), 5220-5233. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.007>

Endo, S., Matsunaga, T., Kanamori, A., Otsuji, Y., Nagai, H., Sundaram, K., ... & Hara, A. (2012). Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase

(AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. *Journal of natural products*, 75(4), 716-721. <https://doi.org/10.1021/np201002x>

Faemg. Preço da própolis em alta no mercado. 2014. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/Noticia.aspx?Code=5620&ContentVersion=C&Show=all>>. Acessado em 2019 Fevereiro de 2019;

Fasano, A., Bove, F., Gabrielli, M., Petracca, M., Zocco, M. A., Ragazzoni, E., ... & Di Giacopo, R. (2013). The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(9), 1241-1249. doi: <https://doi.org/10.1002/mds.25522>

Figueiredo-Rinhel, A. S., de Melo, L. L., Bortot, L. O., Santos, E. O., Andrade, M. F., Azzolini, A. E. C., ... & Lucisano-Valim, Y. M. (2017). *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(12), 1829-1845. <https://doi.org/10.1111/jphp.12822>

Freires, I. A., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European journal of medicinal chemistry*, 110, 267-279. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.033.

Gaulton, A., Hersey, A., Nowotka, M., Bento, A. P., Chambers, J., Mendez, D., ... & Davies, M. (2017). The ChEMBL database in 2017. *Nucleic acids research*, 45(D1), D945-D954. doi:10.1093/nar/gkw1074.

Gaya, P., Peirotén, Á., & Landete, J. M. (2017). Transformation of plant isoflavones into bioactive isoflavones by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Functional Foods*, 39, 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.029>

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>

Hashim, H., Azmin, S., Razlan, H., Yahya, N. W., Tan, H. J., Manaf, M. R. A., & Ibrahim, N. M. (2014). Eradication of *Helicobacter pylori* infection improves levodopa action, clinical symptoms and quality of life in patients with Parkinson's disease. *PLoS One*, 9(11). doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112330>

Hata, T., Tazawa, S., Ohta, S., Rhyu, M. R., Misaka, T., & Ichihara, K. (2012). Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels. *PLoS One*, 7(11). <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048072>

Hau, A. K. C., Kwan, T. H., & Li, P. K. T. (2009). Melamine toxicity and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 245-250. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008101065>

Heffernan, C., Ukrainczyk, M., Gamidi, R. K., Hodnett, B. K., & Rasmuson, Å. C. (2017). Extraction and purification of curcuminoids from crude curcumin by a combination of crystallization and chromatography. *Organic Process Research & Development*, 21(6), 821-826. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00347>

Herrera-Canché, S. G., Sánchez-González, M., Loyola, L. A., Bórquez, J., García-Sosa, K., & Peña-Rodríguez, L. M. (2020). Biotransformation of a mulinane diterpenoid by *Aspergillus alliaceus* and *Mucor circinelloides*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(1), 1-6. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1596083>

Hou, Y., Hossain, G. S., Li, J., Shin, H. D., Liu, L., Du, G., & Chen, J. (2016). Two-Step production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine by growing and resting cells of engineered *Escherichia coli*: process optimization and kinetics modeling. *PloS one*, 11(11). doi: 10.1371/journal.pone.0166457.

Houghton, P. J. (1998). Propolis as a medicine. Are there scientific reasons for its reputation?. *Beeswax and Propolis for Pleasure and Profit*, 10. doi:

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632. doi: 10.3390/molecules191219610

Imhann, F., Vich Vila, A., Bonder, M. J., Lopez Manosalva, A. G., Koonen, D. P., Fu, J., ... & Weersma, R. K. (2017). The influence of proton pump inhibitors and other commonly used medication on the gut microbiota. *Gut Microbes*, 8(4), 351-358. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1284732>

Ingelfinger, J. R. (2008). Melamine and the global implications of food contamination. *New England Journal of Medicine*, 359(26), 2745-2748. Doi: 10.1056/NEJMp0808410

Jameson, K. G., & Hsiao, E. Y. (2019). A novel pathway for microbial metabolism of levodopa. *Nature medicine*, 25(8), 1195-1197. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0544-x>

Jobin, C. (2017). Cancer treatment: Bacterial snack attack deactivates a drug. *Nature*, 550(7676), 337-339. <https://doi.org/10.1038/550337a>

Ke, C., Yang, X., Rao, H., Zeng, W., Hu, M., Tao, Y., & Huang, J. (2016). Whole-cell conversion of L-glutamic acid into gamma-aminobutyric acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Springerplus*, 5(1), 591. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2217-2>

Korbekandi, H., Jouneghani, R. M., Mohseni, S., Pourhossein, M., & Iravani, S. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using biotransformations by *Saccharomyces boulardii*. *Green Processing and Synthesis*, 3(4), 271-277. <https://doi.org/10.1515/gps-2014-0035>

Kotowska, M., Albrecht, P., & Szajewska, H. (2005). *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 21(5), 583-590. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02356.

Kumagai, H., Umekita, M., Sawa, R., Takahashi, Y., Arisawa, A., Isshiki, K., ... & Akamatsu, Y. (2008). Generation of new benanomycin analogues by biotransformation using *Escherichia coli* expressing actinomycete cytochrome P450. *The Journal of antibiotics*, 61(6), 394-399. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.55>

Kunjapur, A. M., Tarasova, Y., & Prather, K. L. (2014). Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 136(33), 11644-11654. <https://doi.org/10.1021/ja506664a>

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>

Kusumoto, T., Miyamoto, T., Higuchi, R., Doi, S., Sugimoto, H., & Yamada, H. (2001). Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49(9), 1207-1209. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.1207>

Lee, H. R., Kim, B. G., & Ahn, J. H. (2016). Biosynthesis of ferulic acid 4-O-glucoside and feruloyl glucoside using *Escherichia coli* harboring regioselective glucosyltransferases. *Applied Biological Chemistry*, 59(3), 481-484. <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0186-3>

Leitão, S. G., Leitão, G. G., Vicco, D. K., Pereira, J. P. B., de Moraes Simão, G., Oliveira, D. R., ... & Rastrelli, L. (2017). Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia organoides*. *Journal of Chromatography A*, 1520, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>.

Leitão, S. G., Leitão, G. G., Vicco, D. K., Pereira, J. P. B., de Moraes Simão, G., Oliveira, D. R., ... & Rastrelli, L. (2017). Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia organoides*. *Journal of Chromatography A*, 1520, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>

Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C., Randau, K. P., & Rolim Neto, P. J. (2008). Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 447-454. Doi: 10.1590/S0102-695X2008000300020

Marston, A., & Hostettmann, K. (2006). Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 181-194. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.018>

Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H., Arantes, R. M., Teixeira, M. M., & Nicoli, J. R. (2009). Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives of microbiology*, 191(8), 623-630. doi:10.1007/s00203-009-0491-x.

McFarland, L. V., & Goh, S. (2019). Are probiotics and prebiotics effective in the prevention of travellers' diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Travel medicine and infectious disease*, 27, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.09.007>

Melvin Jr, L. S., Ullrich, M., Hege, H. G., & Weymann, J. (2012). U.S. Patent No. 8,217,155. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Miyake, Y., Fukumoto, S., Okada, M., Sakaida, K., Nakamura, Y., & Osawa, T. (2005). Antioxidative catechol lignans converted from sesamin and sesaminol triglucoside by culturing with *Aspergillus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 22-27. <https://doi.org/10.1021/jf048743h>

Miyakoshi, S., Azami, S., & Kuzuyama, T. (2010). Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(3), 320-321. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.015>

Miyazawa, M., Ando, H., Okuno, Y., & Araki, H. (2004). Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(2-3), 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.09.008>

Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M. C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., ... & Ulber, R. (2011). Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*, 46(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.015>

Neves Costa, F. D., & Leitão, G. G. (2010). Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. *Journal of separation science*, 33(3), 336-347. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900632>

- Oliveira A, França H, Kuster R, Teixeira L and Rocha L, Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Disease* 121–130 (2010). doi: 10.1590/S1678-91992010005000007
- Oliveira, P. F. D., Leandro, L. F., Montanheiro, G., Bastos, J. K., Filho, A. A. D. S., & Tavares, D. C. (2012). Baccharin prevents genotoxic effects induced by methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide in V79 cells. *Journal of food science*, 77(8), T138-T142. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02808.x
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Patel, R. N. (2008). Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(5-7), 659-701.. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.031>
- Peng, J., Li, K., Zhu, W., Deng, X., & Li, C. (2018). Separation and purification of four phenolic compounds from persimmon by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. B* 1072, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.010>.
- Penning, T. M. (2014). Androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, 21(4), T67-T78. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0109>
- Porto, T. S., Simão, M. R., Carlos, L. Z., Martins, C. H., Furtado, N. A., Said, S., ... & Ambrósio, S. R. (2013). Pimarane-type diterpenes obtained by biotransformation: antimicrobial properties against clinically isolated Gram-positive multidrug-resistant bacteria. *Phytotherapy Research*, 27(10), 1502-1507. <https://doi.org/10.1002/ptr.4887>
- Ramos C, F., Bressan, J., Godoy Jasinski, V. C., Zuccolotto, T., da Silva, L. E., & Bonancio Cerqueira, L. (2016). Baccharis (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. *Chemistry & biodiversity*, 13(1), 1-17. doi: 10.1002/cbdv.201400363
- Rekdal, V. M., Bess, E. N., Bisanz, J. E., Turnbaugh, P. J., & Balskus, E. P. (2019). Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science*, 364(6445), eaau6323. doi: 10.1126/science.aau6323
- Rocha, B. A., Rodrigues, M. R., Bueno, P. C. P., de Mello Costa-Machado, A. R., Leite, M. M. D. O. L., Nascimento, A. P., ... & Berretta-Silva, A. A. (2012). Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 108(1), 87-94. doi: 10.1007/s10973-011-1713-4

Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural product reports*, 28(5), 925-936. <https://doi.org/10.1039/C0NP00072H>

Sanchez-Gonzalez, M., & Rosazza, J. P. (2006). Biocatalytic synthesis of butein and sulfuretin by *Aspergillus alliaceus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(13), 4646-4650. <https://doi.org/10.1021/jf060900k>

Schüürmann, J., Quehl, P., Festel, G., & Jose, J. (2014). Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(19), 8031-8046. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5897-y>

SEBRAE. O mercado da Propolis. Disponível em: 2011 [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf) Accessed Fevereiro de 2019.

Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30(6), 894-905. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>

Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of ethnopharmacology*, 133(2), 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>

Shahinozzaman, M., Taira, N., Ishii, T., Halim, M. A., Hossain, M. A., & Tawata, S. (2018). Anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-Alzheimer's effects of prenylated flavonoids from Okinawa propolis: an investigation by experimental and computational studies. *Molecules*, 23(10), 2479. <https://doi.org/10.3390/molecules23102479>

Shao-Hua, X. U., Chen-Hui, D. U., ZHANG, J., & Bo-Yang, Y. U. (2015). Glycosylation and sulfation of emodin by *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086. *Chinese journal of natural medicines*, 13(10), 796-800. doi: 10.1016/S1875-5364(15)30082-0

Silva ,E O., Furtado, N. A. J. C., Aleu, J., & Collado, I. G. (2013). Terpenoid biotransformations by *Mucor* species. *Phytochemistry reviews*, 12(4), 857-876. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9374-0>

Silva, E. O., de Carvalho, T. C., Parshikov, I. A., dos Santos, R. A., Emery, F. S., & Furtado, N. J. C. (2014). Cytotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics. *Letters in applied microbiology*, 59(1), 108-114. Doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12251>

Silva, R. P. D., Machado, B. A. S., de Abreu Barreto, G., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., ... & Umsza-Guez, M. A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic,

and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos one*, 12(3).. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>

Simplicio, J. A., Simão, M. R., Ambrosio, S. R., & Tirapelli, C. R. (2016). The Labdane Ent-3-Acetoxy-Labda-8 (17), 13-Dien-15-Oic Decreases Blood Pressure In Hypertensive Rats. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 106(6), 481-490. <https://doi.org/10.5935/abc.20160058>

Song, H., Lin, J., Zhu, X., & Chen, Q. (2016). Developments in high-speed countercurrent chromatography and its applications in the separation of terpenoids and saponins. *Journal of separation science*, 39(8), 1574-1591. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501199>.

Sponchiado, R., Sorrentino, J. M., Olegário, N., Oliveira, S. S., Cordenonsi, L. M., Silveira, G. P., ... & Garcia, C. V. (2019). Microbial transformation of ambrisentan to its glycosides by *Cunninghamella elegans*. *Biomedical Chromatography*, 33(6), e4496. <https://doi.org/10.1002/bmc.4496>

Sultana, N., & Saify, Z. S. (2013). Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 28(6), 1113-1128. doi: <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.727411>

Suzuki, T., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Ito, K., Ohuchi, N., & Sasano, H. (2005). Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 12(4), 701-720. doi: <https://doi.org/10.1677/erc.1.00834>

Taira, J., Toyoshima, R., Ameku, N., Iguchi, A., & Tamaki, Y. (2018). Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, *Aspergillus luchuensis*. *AMB Express*, 8(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0569-4>.

Tang, C. D., Ding, P. J., Shi, H. L., Jia, Y. Y., Zhou, M. Z., Yu, H. L., ... & Kan, Y. C. (2019). One-Pot Synthesis of Phenylglyoxylic Acid from Racemic Mandelic Acids via Cascade Biocatalysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(10), 2946-2953. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07295>

Teng, W. Y., Huang, Y. L., Huang, R. L., Chung, R. S., & Chen, C. C. (2004). Biotransformation of imperatorin by *Aspergillus flavus*. *Journal of natural products*, 67(6), 1014-1017. Doi: <https://doi.org/10.1021/np049933p>

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/697390>

Torres-Mancera, M. T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E., & Saucedo-Castañeda, G. (2013). Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnology progress*, 29(2), 337-345. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1696>

Verma, K., Zang, T., Gupta, N., Penning, T. M., & Trippier, P. C. (2016). Selective AKR1C3 inhibitors potentiate chemotherapeutic activity in multiple acute myeloid leukemia (AML) cell lines. *ACS medicinal chemistry letters*, 7(8), 774-779. doi: <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00163>

Vila, A. V., Collij, V., Sanna, S., Sinha, T., Imhann, F., Bourgonje, A. R., ... & Kurilshikov, A. (2020). Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nature Communications*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z>

Vila, A. V., Imhann, F., Collij, V., Jankipersadsing, S. A., Gurry, T., Mujagic, Z., ... & Dekens, J. (2018). Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Science translational medicine*, 10(472), eaap8914. doi: 10.1126/scitranslmed.aap8914

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*, 73(9), R117-R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>

Yoo, H. H., Kim, I. S., Yoo, D. H., & Kim, D. H. (2016). Effects of orally administered antibiotics on the bioavailability of amlodipine: gut microbiota-mediated drug interaction. *Journal of hypertension*, 34(1), 156-162. doi: 10.1097/HJH.0000000000000773

Zang, T., Verma, K., Chen, M., Jin, Y., Trippier, P. C., & Penning, T. M. (2015). Screening baccharin analogs as selective inhibitors against type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Chemico-biological interactions*, 234, 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.015>.

Zawadzka, K., Felczak, A., Szemraj, J., & Lisowska, K. (2018). Novel metabolites from *Cunninghamella elegans* as a microbial model of the β -blocker carvedilol biotransformation in the environment. *International biodeterioration & biodegradation*, 127, 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.12.005>

Zhang, J., Sun, Y., Wang, R., & Zhang, J. (2019). Gut Microbiota-Mediated Drug-Drug Interaction between Amoxicillin and Aspirin. *Scientific reports*, 9(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52632-5>

Zhang, Y., Liu, C., Qi, Y., Li, S., Pan, Y., & Li, Y. (2015). Circulating ultrasound-assisted extraction, countercurrent chromatography, and liquid chromatography for the simultaneous extraction, isolation, and analysis of the constituents of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Chromatography A*, 1388, 36-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.028>

Zheng, X., Zhao, A., Xie, G., Chi, Y., Zhao, L., Li, H., ... & Su, M. (2013). Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota. *Science translational medicine*, 5(172), 172ra22-172ra22. doi: 10.1126/scitranslmed.3005114

Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R., & Goodman, A. L. (2019). Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*, 570(7762), 462-467. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1291-3>