UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei*

LUCIANA SILVA DE ARAÚJO

Ribeirão Preto
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANA SILVA DE ARAÚJO

Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei*

Ribeirão Preto
2021

LUCIANA SILVA DE ARAÚJO

Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei*

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: Prof.ª Dr.ª Niege A. J. C. Furtado

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 27/09/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2021

ARAÚJO, L.S.	**Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei***		MESTRADO FCFRPUSP 2021

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.

Araújo, Luciana Silva de

Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei*. Ribeirão Preto, 2021.

79 p. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Furtado, Niege Araçari Jacometti Cardoso.

1. ácido *ent*-poliáltico. 2. células Caco-2. 3. probiótico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Silva de Araújo
Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei*

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que se encontram à margem da “sociedade” e que resistem de alguma forma à opressão. Dedico também a todos os Nortistas e Paraenses que fazem uso da oleorresina de copaíba.

Agradecimentos

A Deus Uno e Trino, e sua Mãe Santíssima pela poderosa intercessão. “Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos” Provérbios 16:3.

À minha avó, Francisca, por todo o apoio, orações, carinho, incentivo e por ser a motivação de tudo que fiz, faço ou farei na minha vida. Amo-te!

Ao meu pai Raimundo, minha irmã Fabiana, ao meu avô Sebastião (*in memoriam*), ao meu bisavô Augusto e a toda minha família que para mim são símbolos de amor e inspiração, e que entenderam a minha falta e momentos de afastamento e reclusão.

À minha professora-orientadora, Dra. Niege, por me receber como aluna de mestrado no seu laboratório, pela confiança, orientação excepcional e por prontamente me ajudar sempre que a procurei. Além de ser uma profissional extraordinária, é um ser humano incrível. Sou eternamente grata!

Aos professores Dr. Jairo Bastos e Dr. Fernando Batista por me receberem no Laboratório de Farmacognosia com tanta hospitalidade.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia, Mário e Valtinho, por toda a ajuda concedida, em especial à Angélica Gelly, pelo encorajamento, paciência, amizade, e apoio constante nas grandes e pequenas coisas.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia, em especial aos colegas do grupo NEPIBio-USP pelo auxílio nos experimentos.

Ao professor Dr. Luiz Alberto do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), por todos os ensinamentos e apoio concedido.

Ao técnico Dr. Eduardo Crevelin do Departamento de Química da FFCLRP-USP pelas análises de UPLC/MS-MS realizadas, e por todo o apoio concedido.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas por todo o apoio concedido nas atividades de suporte à pesquisa, e por prontamente me ajudar sempre que precisei.

A todos os amigos que fiz em Ribeirão Preto por tornarem a jornada mais leve, em especial Aline Mayrink, Lucas David e Tsvetelina Mandova: as três pessoas que sempre estiveram comigo nos melhores e piores momentos. Muito obrigada por tudo, por sempre me ouvirem, rirem das minhas aventuras e me darem os melhores conselhos.

Não posso deixar de agradecer aos amigos da casa 12 da pós-graduação. Todos, de alguma forma, foram importantes nesta jornada, às vezes, cada um no seu canto, juntos confraternizando ou discutindo: fomos como uma grande família.

Agradeço à Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto, e ao setor de Assistência Social pelo apoio de moradia concedido. Isso, sem dúvidas, é importante para a inclusão social e permitiu que esse sonho fosse possível.

Ao professor Dr. Leopoldo Baratto por ter sido um orientador excepcional durante a iniciação científica na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), que despertou a paixão pelo estudo de produtos naturais.

À professora Dra. Gabriela Bianchi por ser uma professora excelente e um ser humano incrível que me fez acreditar que era possível chegar até aqui. Muito obrigada! O mundo precisa de mais professores iguais a senhora.

Aos professores da UFOPA, Dra. Tânia Morais, Dr. Waldiney Pires, e Dr. Lauro Barata por terem me ensinado tanto, e me proporcionado oportunidades de crescimento profissional que me permitiram chegar até aqui.

Agradeço também a todos que foram meus professores nas instituições que passei. Educadores devem ser sempre muito valorizados.

A todos, enfim, que contribuíram direta ou indiretamente. Muito obrigada!

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001".

Epígrafe

“Não vê que isto aqui é como filho nascendo? Dói. Dor é vida exacerbada. O processo dói. Vir-a-ser é uma lenta e lenta dor boa.”

– Clarice Lispector, em “Água viva”

RESUMO

ARAÚJO, L. S. **Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei.*** 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O biomarcador ácido *ent*-poliáltico (AP) da oleorresina de *Copaifera duckei* possui várias atividades biológicas reportadas. No entanto, para que um composto seja um produto oral bem-sucedido, não deve ser somente farmacologicamente ativo, mas também deve ter características de permeabilidade intestinal razoáveis. A monocamada de células Caco-2 é um modelo *in vitro* amplamente aceito para prever a permeabilidade intestinal, mas possui variabilidade intrínseca ao método, levando a alta variabilidade em seu desempenho. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar a influência do uso de agitação no sistema, e da presença de probiótico na permeabilidade intestinal do AP. Os procedimentos experimentais para a avaliação da permeabilidade intestinal foram divididos em algumas etapas principais: avaliação da viabilidade celular; determinação da concentração inibitória mínima do AP sobre *Lactobacillus fermentum*; padronização das condições de cocultivo; medida da resistência elétrica transepitelial (RET) durante o crescimento até 20 dias; e determinação das permeabilidades apical-basolateral (A-B) e basolateral-apical (B-A) por 4 h. O controle foi realizado com os compostos atenolol (AT) e propranolol (PROP), que são os marcadores de transporte transcelular para uma baixa e alta permeabilidade, respectivamente. Os estudos de viabilidade celular indicaram que o AP não era tóxico para as células Caco-2 a 12,5 µM, além disso, essa concentração não inibiu o crescimento de *L. fermentum*. AT e PROP não inibiram o crescimento de *L. fermentum* e não foram tóxicos para as células Caco-2 a 10 µM e 5 µM, respectivamente. O meio de cultivo padronizado para o experimento com a cocultura foi o meio de Eagle modificado por Dulbecco, sem antibióticos e sem soro fetal bovino. As propriedades da barreira foram consideradas aceitáveis para a RET ≥ 300 $\Omega.cm^2$ em todos os experimentos, e *L. fermentum* induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) na RET após 24 h. Considerando a classificação que foi reportada na literatura, o AP apresentou permeabilidade moderada através dos enterócitos em todas as condições de cultivo avaliadas, não ocorrendo transporte reverso. A permeabilidade aparente (P_{app}) do AP no experimento sob agitação ($2,83 \pm 0,58 \times 10^{-6}$ cm/s) apresentou diferença significativa em relação ao experimento sem agitação, e os valores obtidos nos experimentos de cocultivo não foram estatisticamente significativos em relação ao experimento sem agitação. Portanto, foi demonstrado que as condições de cultivo podem influenciar as propriedades de barreira da monocamada Caco-2, bem como a permeabilidade do AP.

Palavras-chave: ácido *ent*-poliáltico; células Caco-2; probiótico.

ABSTRACT

ARAÚJO, L. S. **Impact of Caco-2 cell culture conditions on the evaluation of intestinal permeability of the biomarker *ent*-polyaltic acid from *Copaifera duckei* oleoresin.** 2021. 79 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The *ent*-polyalthic acid (AP) biomarker of *Copaifera duckei* oleoresin has several reported biological activities. However, for a compound to be a successful oral product, it must not only be pharmacologically active, but it must also have reasonable intestinal permeability characteristics. The Caco-2 cell monolayer is a widely accepted in vitro model to predict intestinal permeability, but it has inherent variability in the method, leading to high variability in its performance. Therefore, the aim of this study was to determine the influence of use of agitation in the system, and presence of probiotics on intestinal permeability of the AP. The experimental procedures for the assessment of intestinal permeability were divided into some main steps: assessment of cell viability; determination of the minimum inhibitory concentration of AP on *Lactobacillus fermentum*; standardization of co-cultivation conditions; measurement of transepithelial electrical resistance (RET) during growth up to 20 days; and determination of apical-basolateral (A-B) and basolateral-apical (B-A) permeabilities for 4 h. The control was performed with the compounds atenolol (AT) and propranolol (PROP), which are transcellular transport markers for low and high permeability, respectively. Cell viability studies indicated that AP was not toxic to Caco-2 cells at 12.5 µM, in addition, this concentration did not inhibit the growth of *L. fermentum*. AT and PROP did not inhibit the growth of *L. fermentum* and were not toxic to Caco-2 cells at 10 µM and 5 µM, respectively. The standardized culture medium for the coculture experiment was Dulbecco's modified Eagle's medium, without antibiotics and without fetal bovine serum. Barrier properties were considered acceptable for RET ≥ 300 $\Omega.cm^2$ in all experiments, and *L. fermentum* induced a significant increase in RET after 24 h. Considering the classification reported in the literature, AP presented moderate permeability through enterocytes in all culture conditions evaluated, no reverse transport. The apparent permeability (P_{app}) of the AP in the experiment under agitation ($2.83 \pm 0.58 \times 10^{-6}$ cm/s) showed a significant difference in relation to the experiment without agitation, and the values obtained in the co-cultivation experiments were not statistically significant in relation to the experiment without agitation. Therefore, it was demonstrated that the growing conditions can influence the barrier properties of the Caco-2 monolayer, as well as permeability of the AP.

Keywords: *ent*-polyalthic acid; Caco-2 cells; probiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variações na estereoquímica dos diterpenoides labdanos. **13**

Figura 1. Estrutura química do AP. **14**

Figura 3. Representação esquemática das células Caco-2 em modelo experimental *in vitro*. **16**

Figura 4. Representação esquemática da parte experimental **21**

Figura 5. Espectro de RMN de ^{1}H do AP ($CDCl_3$, 400 MHz). **22**

Figura 6. Esquema do processo de SPE das amostras retiradas dos compartimentos apical e basolateral. **31**

Figura 7. Esquema do processo de extração do conteúdo do compartimento celular **32**

Figura 8. Citotoxidade em células Caco-2 em suspensão **37**

Figura 9. Citotoxidade em células Caco-2 cultivadas por 20 dias. **37**

Figura 10. Garrafas contendo as células bacterianas cocultivadas com células Caco-2 **39**

Figura 11. RET de células Caco-2 cultivadas em suportes permeáveis Transwell™ por 20 dias **42**

Figura 12. RET de células Caco-2 antes dos ensaios de permeabilidade intestinal ... **43**

Figura 13. RET de células Caco-2 antes e após os ensaios de permeabilidade intestinal **44**

Figura 14. RET de células Caco-2 antes e após a realização do cocultivo **45**

Figura 15. Curva de calibração 1 referente ao método para quantificação do AP **47**

Figura 16. Curva de calibração 2 referente ao método para quantificação do AP **47**

Figura 17. Curva de calibração 3 referente ao método para quantificação do AP **48**

Figura 18. Curva de calibração referente ao método para quantificação do PROP ... **48**

Figura 19. Curva de calibração referente ao método para quantificação do AT **49**

Figura 20. P_{app} do diterpeno e PROP nos experimentos que avaliam a permeabilidade das amostras para o compartimento basolateral, ou seja, no sentido de A-B **52**

Figura 21. P_{app} do fármaco controle PROP nos experimentos que avaliam o transporte reverso para o compartimento apical, ou seja, no sentido de B-A **52**

Figura 22. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas sem agitação **55**

Figura 23. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas com agitação **56**

Figura 24. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade em

células Caco-2 organizadas em monocamadas com células bacterianas 57

Figura 25. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas com debris celulares ...57

Figura 26. Cromatograma obtido por CLUE-MS/MS para AP proveniente de amostra do compartimento celular. MRM ES-; 315,2 > 205,2. 58

Figura 27. Cromatograma obtido por CLUE-MS/MS para AP proveniente de amostra do compartimento basolateral, tempo de retenção de 7,87 min. MRM ES-; 315,2 > 205,2. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades biológicas do ácido poliáltico.....12
Tabela 2 - Propriedades moleculares do AP.....14
Tabela 3 - Artigos elencados e seus respectivos métodos utilizados para a agitação 17
Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado nas análises cromatográficas do AP, expresso em porcentagem de acordo com o tempo.....33
Tabela 5 - Gradiente da fase móvel utilizado nas análises cromatográficas do AT e PROP, expresso em porcentagem de acordo com o tempo.....34
Tabela 6 - Valores de pH do meio MRS *e* nas condições de cultivo *de L. fermentum* 38
Tabela 7 - Valores de pH dos meios de cultura utilizados para *a padronização d*o cocultivo com *L. fermentum*.....39
Tabela 8 - P_{app} em cm/s do diterpeno e substâncias controles nos experimentos com e sem agitação 51
Tabela 9 - P_{app} em cm/s do diterpeno e substâncias controles nos experimentos de cocultivo.....51
Tabela 10 - Propriedades moleculares obtidas através do programa Molinspiration..54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Ácido *ent*-poliáltico
AT	Atenolol
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D.C.	Densidade celular
D.O.	Densidade óptica
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização por electrospray
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HBA	Número de aceptores de ligação de H
HBD	Número de doadores de H
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanosulfônico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iCMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LDH	Lactato Desidrogenase
Log P	Coeficiente de partição octanol-água
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MRM	Multiple reaction monitoring
MRS	Meio de Man Rogosa e Sharpe
MS/MS	Espectrometria de Massas
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio)
MW	Peso molecular
NROTB	Número de ligações rotacionáveis

Ors	Oleorresinas de Copaíba
P.I.	Padrão interno
PBS	Tampão Fosfato Salino
Ph	Potencial hidrogeniônico
PROP	Propranolol
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REF	Referência do produto
RET	Resistência elétrica transepitelial
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBF	Soro Bovino Fetal
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SPE	Extração em fase sólida
SUS	Sistema Único de Saúde
TPSA	Área de superfície polar
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
a	coeficiente angular
r^2	coeficiente de correlação
b	coeficiente linear de intersecção da reta
x	concentração analisada
A → B	direção do compartimento apical para o basolateral
B → A	direção do compartimento basolateral para o apical
g	força gravitacional
h	Hora
^1H	Hidrogênio-1 (prótio)
kV	Kilovolt
®	marca registrada
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
nm	Nanômetro
p	nível descritivo ou probabilidade de significância
Ω	Ohm
P_{app}	permeabilidade aparente
%	Porcentagem
y	resposta analítica
Rev	Revolução por minuto
rpm	rotações por minuto
™	Trademark
v/v	volume de soluto pelo volume da solução

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v
Lista de abreviaturas e siglas vi
Lista de símbolos viii

1. INTRODUÇÃO 11
1.1 Oleorresina de Copaíba 11
1.2 Ácido *ent*-poliáltico 12
1.3 Permeabilidade intestinal – células Caco-2 14
1.4 Probióticos 18
2. OBJETIVOS 20
2.1 Objetivo geral 20
2.2 Objetivos específicos 20
3. MATERIAL E MÉTODOS 20
3.1 Obtenção do diterpeno 21
3.2 Cultivo Celular 22
3.3 Viabilidade Celular 23
3.3.1 Método de exclusão com azul de Tripan 23
3.3.2 Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) 24
3.4 Preparo do probiótico para o estudo de permeabilidade intestinal 25
3.4.1 Seleção do meio de cultivo 26
3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) 27
3.5 Estudo de permeabilidade intestinal 28
3.5.1 Variação das condições de cultivo 29
3.5.2 Processamento das amostras e quantificação 30
3.6 Análise Estatística 34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4.1 Viabilidade Celular 34
4.2 Preparo do probiótico para o estudo de permeabilidade intestinal 38
4.2.1 Seleção do meio de cultivo 38
4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) 40
4.3 Estudo de permeabilidade intestinal 41

4.3.1 Permeabilidade aparente (P_{app}) 46
5. CONCLUSÕES 59
6. REFERÊNCIAS 60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oleorresina de Copaíba

As oleorresinas de copaíba (ORs) são extraídas das espécies pertencentes ao gênero *Copaifera* (Fabaceae), popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo, sendo encontradas 16 espécies no território brasileiro. As ORs são líquidos com viscosidade e cores variáveis, alternando do amarelo ao marrom claro. Podem ser facilmente encontradas em mercados populares, principalmente na região Amazônica, onde é bem conhecida pelo uso tradicional como cicatrizante de feridas, anti-hemorroidária, purgante, anticarcinogênico, antiinflamatório, antimicrobiano, antiviral, anestésico local, inseticida e bactericida (ARRUDA et al., 2019). No estado do Pará, as ORs são consideradas uma das mais importantes alternativas naturais para a cura de doenças (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018).

A origem do nome dessas árvores veio da língua indígena "tupi": eram chamadas de "cupa-yba", que significa a árvore de reservatório/depósito, devido às ORs extraídas do tronco (ARRUDA et al., 2019; VEIGA; PINTO, 2002). A extração dessas ORs constitui uma atividade de grande importância econômica, sendo consideradas, em 2012, a matéria-prima de origem vegetal mais empregada na medicina popular no Brasil, predominantemente nas regiões Norte e Nordeste (CARVALHO, 2012).

Copaifera spp. foram incluídas na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (Renisus), na qual constam 71 espécies divulgadas pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, com o objetivo de orientar o desenvolvimento de pesquisas com plantas que possuem potencial de avanço e podem gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2020). De fato, *Copaifera* spp. possuem relevância biológica e perspectivas promissoras que são atribuídas aos sesquiterpenos (terpenoides de 15 carbonos) e diterpenos (terpenoides de 20 carbonos) presentes nas ORs (LEANDRO et al., 2012).

1.2 Ácido *ent*-poliáltico

Entre os diterpenoides encontrados nas ORs está o ácido poliáltico, um diterpeno furano-labdânico, o qual foi reportado por apresentar inúmeras propriedades biológicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Propriedades biológicas do ácido poliáltico.

Atividades biológicas	Referências
antinociceptiva	(RODRÍGUEZ-SILVERIO et al., 2021)
antialodínica	(RODRÍGUEZ-SILVERIO et al., 2021)
anti-hiperalgésica	(RODRÍGUEZ-SILVERIO et al., 2021)
antiinflamatória	(RODRÍGUEZ-SILVERIO et al., 2021; SENEDESE et al., 2019)
antibacteriana	(ABRÃO et al., 2018; ÇIÇEK et al., 2020; TINCUSI et al., 2002)
antifúngica	(BARBOSA et al., 2019; ÇIÇEK et al., 2020; SOUSA et al., 2020)
citotóxica	(CHIBAS et al., 2019; ÇIÇEK et al., 2020; GARCÍA-TAPIA et al., 2017)
genotóxica	(CHIBAS et al., 2019)
esquistossomicida	(BORGES et al., 2016)
leishmanicida	(MIZUNO et al., 2015)
tripanocida	(MIZUNO et al., 2015)
gastroprotetora	(REYES-TREJO et al., 2010)
antimutagênica	(MIYAZAWA et al., 1995)
antimuscarínica	(SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2008)

Os diterpenos labdanos emergiram como uma alternativa promissora para a descoberta de novos candidatos a fármacos, sendo que o interesse pelo estudo desses compostos foi intensificado nas últimas décadas devido, principalmente, a ampla gama de atividades biológicas associadas a essa subclasse de compostos (TRAN; WONG; CHAI, 2017).

Os labdanos são nomeados de acordo com as regras gerais de nomenclatura dos diterpenoides. Esses compostos podem ser classificados por sua estereoquímica em C9 e C10, de acordo com suas orientações. Dessa forma, as nomenclaturas dos esqueletos labdanos são definidas de acordo com a configuração da junção do anel e os substituintes em C9 e C10 (Figura 1), resultando na utilização de quatro termos, “normal-“, “ent- “, “syn- “ e “syn-ent-“ (PETERS, 2010; TRAN; WONG; CHAI, 2017).

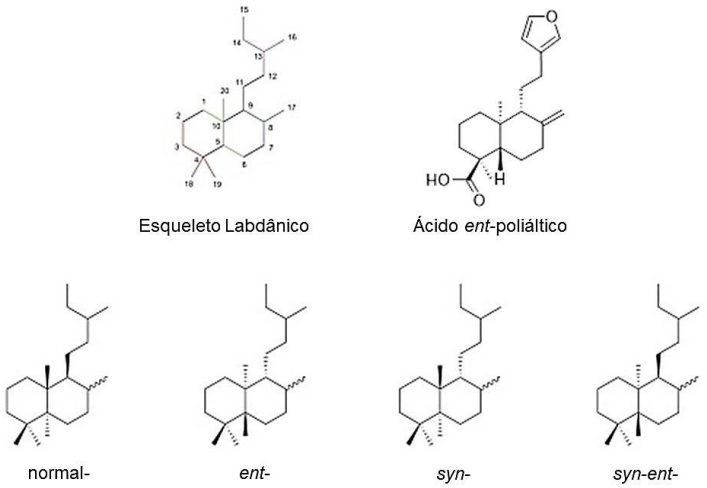

Figura 1. Variações na estereoquímica dos diterpenoides labdanos.
(Adaptado de Tran; Wong; Chai, 2017)

O labdano ácido *ent*-poliáltico (AP) (Figura 2) foi identificado como constituinte majoritário das oleorresinas de *Copaifera duckei* (BORGES et al., 2016) e *Copaifera reticulata* (CARNEIRO et al 2018; BARBOSA et al., 2019; SENEDESE et al., 2019), sendo também um dos principais constituintes de oleorresinas de *Copaifera* de outras espécies incluindo *Copaifera guianensis* e *Copaifera lucens*, além de ter sido isolado e/ou identificado em oleorresinas de *Copaifera paupera* e *Copaifera officinalis* (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). As propriedades moleculares desse composto estão elencadas na Tabela 2.

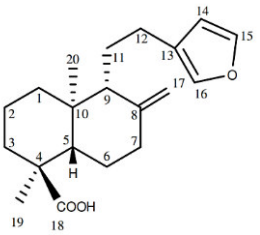

Figura 1. Estrutura química do AP.

Tabela 2 - Propriedades moleculares do AP.

Propriedades moleculares*						
Peso Molecular	Número de doadores de ligação de H	Número de aceptores de ligação de H	Coeficiente de partição octanol-água (LogP)	Número de ligações rotacionáveis	Área de superfície polar	pKa
316,44	1	3	4,69	4	50,44	4,6

*obtidas através do programa Molinspiration.

Apesar da diversidade de trabalhos envolvendo a avaliação biológica do AP, levantamentos bibliográficos realizados nas principais bases de dados, incluindo SciFinder Scholar, Web of Science, PubMed, Thomson Reuters Integrity e Scopus apresentam 60 resultados, mas nenhum resultado diz respeito a estudos de absorção deste diterpeno.

1.3 Permeabilidade intestinal – células Caco-2

Sabe-se que a permeabilidade intestinal é um fator primordial que influencia diretamente a biodisponibilidade de fármacos, principalmente aqueles administrados pela via oral (WANG, 2017) e, por isso, a ação biológica depende de uma absorção e distribuição adequadas antes da eliminação. Nesse contexto, é imprescindível que além de estudos que investiguem as possíveis aplicações terapêuticas, seja determinada a absorção de produtos naturais em suas formas purificadas ou misturas complexas para

viabilizar o estabelecimento de doses eficazes e seguras (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O transporte de uma substância através do epitélio intestinal depende da sua solubilidade relativa em água e lipídeos, e pode ocorrer por transporte transcelular, através das próprias células epiteliais usando uma combinação de mecanismos de transporte ativo e passivo; e por transporte paracelular, pelo qual a passagem de substâncias se dá através das junções entre células adjacentes (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; PLEUVRY, 2005). A área de superfície envolvida na absorção transcelular é muito maior, sendo que no intestino delgado, por exemplo, apenas 0,01% da área de superfície total corresponde a área das junções entre células adjacentes (THOMAS, 2007). Há também várias proteínas localizadas nas membranas apical e basolateral que movem substâncias através das membranas (TAMAI; NAKANISHI, 2013).

É possível estudar todas as vias de transporte utilizando-se a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, que ao ser comparada com resultados de estudos que utilizam modelos *in vivo*, foi constatado que se trata de um modelo também capaz de predizer a permeabilidade intestinal com certa precisão (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012). Isso ocorre pois as células Caco-2 quando totalmente diferenciadas possuem inúmeras características morfológicas e bioquímicas que produzem semelhanças funcionais com o intestino delgado, pois, ao atingir a confluência, apresentam microvilosidades na borda apical e expressam enzimas e proteínas de transporte (CHEN; SINGH; KITTS, 2020; HUBATSCH et al., 2007; PINTO et al., 1983). A avaliação do transporte intestinal *in vitro* é possível porque as células humanas tumorais podem crescer rapidamente proporcionando um sistema ideal para os estudos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A monocamada celular que cresce na membrana microporosa delimita dois lados: o apical e o lado basolateral (Figura 3). Uma vez que a monocamada das células é polarizada, o lado apical representa o lúmen intestinal e o lado basolateral representa a circulação sistêmica. A substância de interesse pode ser extraída de cada lado e das células para ser quantificada (MANGAS-SANJUAN et al., 2014).

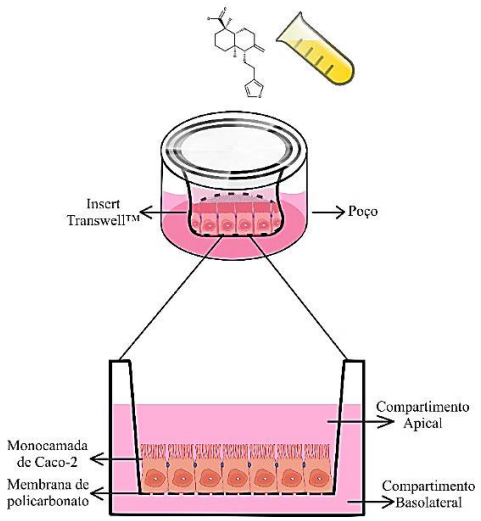

Figura 3. Representação esquemática das células Caco-2 em modelo experimental *in vitro*.

Apesar das monocamadas de Caco-2 predizerem a absorção oral de fármacos em humanos, há várias inconsistências nas condições experimentais, pois alguns fatores podem influenciar os processos de absorção intestinal de substâncias e, dentre esses, pode ser mencionada a taxa de agitação, considerando-se que as forças hidrodinâmicas que atuam no trato gastrointestinal são muito complexas (HAGESAETHER et al., 2013).

Foi realizada uma busca na literatura com os seguintes descritores: "Caco-2, *agitation* e *permeability*" nas principais bases de dados, incluindo: *SciFinder* (26 resultados), *Web of Science* (12 resultados), *Scopus* (9 resultados) e *PubMed* (9 resultados). Excetuando-se os artigos escritos em outros idiomas que não seja inglês, artigos repetidos ou que não estavam disponíveis na íntegra, os resultados estão disponíveis na Tabela 3. É possível observar que, dentre os trabalhos que utilizaram a agitação no modelo experimental, há diferentes métodos para tal, contendo taxas de agitação distintas.

O *Monolayer Integrity and Drug Transport Guidelines* da Millipore® recomenda a utilização de 60 rpm, e valores de 30, 50, 135 e 767 rpm foram comparados à absorção humana (HAGESAETHER et al., 2013). A inclusão da agitação do sistema é um fator muito importante em trabalhos que avaliam a permeabilidade de substâncias, isso porque o epitélio intestinal é coberto por muco que forma e mantém uma camada de água não agitada, a qual provavelmente possui uma espessura na superfície do epitélio intestinal

muito maior em experimentos *in vitro* do que *in vivo*, pois em condições fisiológicas há a redução dessa camada por meio do movimento peristáltico do intestino (KONO et al., 2016).

Tabela 3 - Artigos elencados e seus respectivos métodos utilizados para a agitação.

	Título do artigo	Agitação	Células	Referência
1	Experimental demonstration of the unstirred water layer effect on drug transport in Caco-2 cells	Snapwell/borbulhamento de gás O_2/CO_2 (95/5%) - fluxo: 45 mL/min	Caco-2	(NARUHASHI et al., 2003)
2	Application of fractal kinetics for carrier-mediated transport of drugs across intestinal epithelial membrane	Snapwell/borbulhamento de gás O_2/CO_2 (95/5%) - fluxo: 15, 30 e 45 mL/min	Caco-2	(OGIHARA; TSUJI, 1998)
3	A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers	Agitação orbital utilizando agitador de placa - 135 e 1090 rpm	Caco-2	(KARLSSON; ARTURSSON, 1991)
4	*In vitro* measurement of drug transport using a new diffusion chamber compatible with Millicell® culture supports: performance with Caco-2 monolayers	Agitação de fluido por barras de agitação acionadas magneticamente - 100, 300, 600, 750 rev./minuto	Caco-2	(KUHFELD; STRATFORD, 1996)
5	An openable artificial intestinal tract system enables the evaluation of drug absorption in Caco-2 cells through the reduction in thickness of the unstirred water layer	Agitação mecânica usando um agitador de banho de água - 60 e 120 rpm	Caco-2	(KONO; KONISHI; FUJITA, 2019)
6	Effect of mechanical agitation on cationic liposome transport across an unstirred water layer in Caco-2 cells	Agitação mecânica usando um agitador de banho de água - 75 e 125 rpm	Caco-2	(KONO et al., 2016)
7	Mucus can change the permeation rank order of drug candidates	Agitação orbital - 70 e 50 rpm	HT29	(HAGESAETHER et al., 2013)
8	The asymmetry of the unstirred water layer in permeability experiments	Agitação orbital - 250, 320, 370 e 420 rpm com uso de agitação magnética basolateral	Caco-2	(KORJAMO et al., 2008)
9	Biorelevant refinement of the Caco-2 cell culture model to assess efficacy of paracellular permeability enhancers	Agitação orbital em agitador rotativo - 80 rpm, 120 rpm e160 rpm	Caco-2	(TIPPIN; THAKKER, 2008)
10	Metabolism of testosterone during *in vitro* transport across Caco-2 cell monolayers: evidence for β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in differentiated Caco-2 cells	Agitador de placa - (100 - 800 rpm) e ângulo (2,5°) em relação à posição horizontal	Caco-2	(BUUR; MARK, 1992)
11	High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells	Snapwell/borbulhamento de gás O_2/CO_2 (95/5%) - fluxo 24 mL/min	Caco-2	(WILS et al., 1994)

1.4 Probióticos

Além da aplicação em estudos de permeabilidade intestinal, a linhagem de células Caco-2 é amplamente utilizada também como um modelo laboratorial para avaliar a capacidade de adesão de bactérias probióticas (VASIEE et al., 2020). O termo “probiótico” foi derivado do latim e grego; significa "para a vida", pois são microrganismos vivos muito utilizados por conferir inúmeros benefícios à saúde do hospedeiro se administrados em quantidades adequadas (SETTA; MATEMU; MBEGA, 2020).

Entre os benefícios dos probióticos, estão: proteção contra patógenos, regulação da imunidade do hospedeiro e fortalecimento da integridade intestinal (WIERZBICKA et al., 2021), que, ao exibir efeitos no epitélio intestinal alterando sua permeabilidade, esses microrganismos podem ter um impacto sobre parâmetros farmacocinéticos de fármacos administrados concomitantemente (ĐANIĆ et al., 2021; KIM et al., 2017; MATUSKOVA et al., 2016). O impacto na integridade da barreira intestinal se dá por meio da secreção de metabólitos, por exemplo, o ácido butírico, um ácido graxo de cadeia curta (BHATHENA et al., 2012; KAHOULI et al., 2015).

A interação entre a microbiota intestinal e os medicamentos ocorre também por meio da composição da microbiota comensal e da modulação dos processos de metabolismo, além da função da barreira intestinal. Por isso, a microbiota intestinal é considerada um “órgão” metabólico indispensável, e pesquisar os efeitos desses microrganismos intestinais sobre os medicamentos pode ajudar a promover o uso racional de medicamentos (LI et al., 2020b).

Probióticos estão presentes em muitos produtos, incluindo leite fermentado, iogurtes, kefir, kombucha (TURKMEN et al., 2019), que é uma bebida probiótica feita a

partir da fermentação do chá verde e do chá preto. São empregados na nutrição animal (JAHANGIRI; ESTEBAN, 2018), em suplementos e em nutracêuticos (WANG et al., 2019).

Apesar do conhecimento da influência dos probióticos no epitélio intestinal *in vivo* e no aumento da integridade da barreira epitelial intestinal *in vitro*, nenhum trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o efeito desses micro-organismos sobre a permeabilidade intestinal de fármacos em células Caco-2. Dentre os probióticos, linhagens de *Lactobacillus* são amplamente utilizadas por serem capazes de resistir a passagem pelo trato gastrointestinal, resistindo ao pH ácido do estômago e aos sais biliares (KAHOULI et al., 2015; PANICKER et al., 2018), sendo inclusive utilizadas em medicamentos como Prolive®, Leiba® e ProVance®, com a finalidade de melhorar o balanço microbiano intestinal de forma a aumentar a prevalência de probióticos para que exerçam efeitos benéficos a saúde do hospedeiro.

A espécie *Lactobacillus fermentum* foi selecionada para este estudo com base em dados da literatura que reportam importantes propriedades probióticas, como tolerância extrema a pH baixo, hidrólise de sais biliares e adesão a células epiteliais, além disso, pode ser considerado como agente bioterapêutico contra o câncer colorretal (KAHOULI et al., 2015; PANICKER et al., 2018).

Considerando o exposto, os resultados dos estudos realizados são inéditos, pois além de verificar a permeabilidade intestinal do AP levando em consideração os impactos da taxa de agitação, também foi avaliada a presença de probiótico em células Caco-2, o que poderá fornecer subsídios para que outros trabalhos sejam desenvolvidos utilizando esse modelo *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto das condições de cultura de células Caco-2 na permeabilidade intestinal do biomarcador AP da oleorresina de *C. duckei*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração do diterpeno a ser utilizada nos experimentos em células Caco-2;
- Avaliar a influência da utilização de agitação na permeabilidade intestinal do biomarcador AP em células Caco-2;
- Padronizar as condições de cocultivo de células Caco-2 com a bactéria probiótica *L. fermentum;*
- Determinar a concentração do diterpeno a ser utilizada nos experimentos em células Caco-2 sob cocultivo bacteriano;
- Avaliar a influência da presença da bactéria probiótica *L. fermentum* na permeabilidade intestinal do biomarcador ácido *ent*-poliáltico em células Caco-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O resumo gráfico da parte experimental está demonstrado na Figura 4, e será detalhada nos próximos tópicos abaixo.

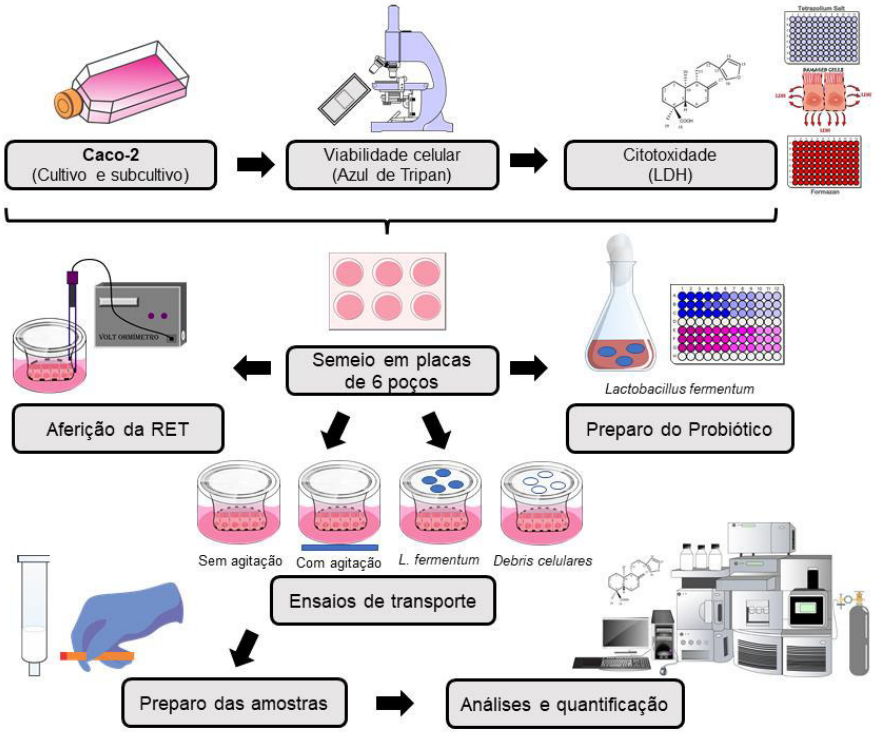

Figura 4. Representação esquemática da parte experimental**.**

3.1 Obtenção do diterpeno

O AP foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), e isolado a partir da oleorresina de *C. duckei* utilizando um protocolo já estabelecido pelo grupo da Profª. Drª. Niege Furtado (BORGES et al., 2016; SOUSA et al., 2020). A identificação foi confirmada por análise de ressonância magnética nuclear (RMN) (Figura 5).

A autorização de acesso ao patrimônio genético para pesquisa científica foi concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e pelo Ministério do Meio Ambiente MMA-SISBIO-ICMBio-IBAMA (autorizações 010225/2014-5 e 35143-3) respectivamente. O cadastro foi também efetuado no SisGen e recebeu o número AF8E585.

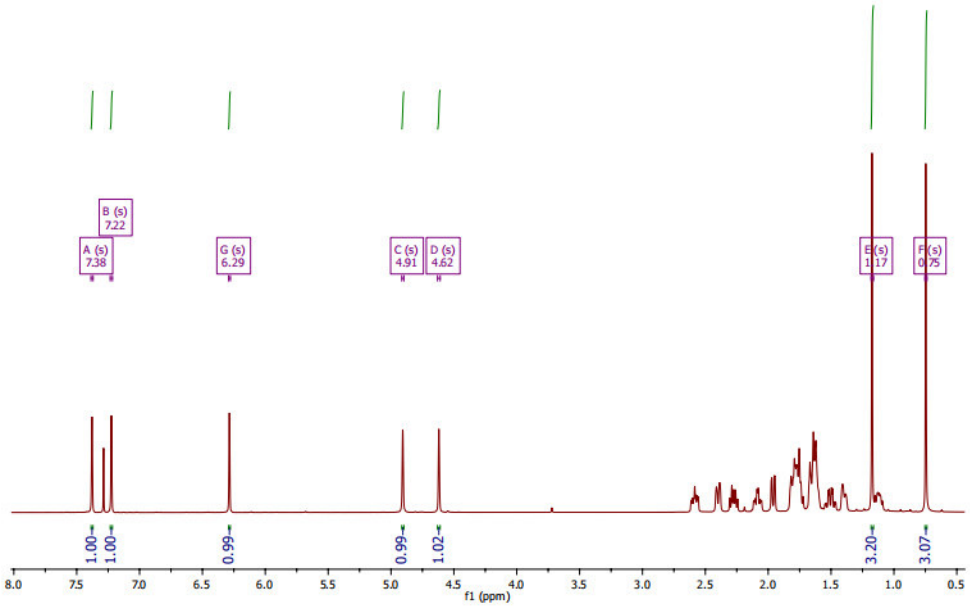

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H do AP ($CDCl_3$, 400 MHz).

3.2 Cultivo Celular

As células Caco-2 (do inglês *Human Colon Epithelial Cancer Cell Line*) clone tipo C2BBe1 (ATCC® CRL-2102™) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, e incubadas a 37º C em atmosfera com 10 % de CO_2 (incubadora de CO_2 Panasonic® MCO-17AICUVL) no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP. O nível de CO_2 do ambiente foi monitorado diariamente antes e após os experimentos por meio do medidor de CO_2 com termo-higrômetro (AKSO® REF AK786). As garrafas foram cultivadas rotineiramente em meio eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's modified eagle medium*) (Gibco®, REF 10566-016) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, do inglês *fetal bovine serum*) (Gibco®, REF 12657-029), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich® REF P4333-100ML), além de 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich® REF M7145-100ML). A troca de meio de cultura foi realizada três vezes por semana, por meio da aspiração e reposição de meio novo (adaptado de BEISL et al., 2021).

No momento em que a cultura atingiu confluência em torno de 80%, as células

foram submetidas ao processo de “subcultivação”, também denominado “passagem” (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Esse procedimento consistiu na renovação de células de uma garrafa para duas outras, a fim de promover a expansão celular numérica. Para tanto, foram submetidas ao tratamento enzimático (por se tratarem de células aderentes) com uso da enzima tripsina 0,25% (Gibco®, REF 15090-046). Essa enzima proteolítica hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, fazendo com que as células rearranjem seu citoesqueleto (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010). Nesse processo, a garrafa foi previamente lavada com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich® REF P3813-10PAK) para a remoção de proteínas do SBF que possam neutralizar a ação da enzima. Em seguida, o mesmo foi aspirado e a enzima foi adicionada à garrafa, que permaneceu em estufa a 37 ºC (10 % de CO_2) por 5 minutos para promover o desprendimento celular da superfície. O tempo é limitado para que não ocorra lise celular devido à inespecificidade da enzima (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010). Após os 5 minutos, foi acrescentado meio de cultura DMEM, e o conteúdo celular final, transferido para tubos Falcon para posterior centrifugação a 800 g durante 5 minutos. Assim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (células decantadas) ressuspendido em volume conhecido de meio DMEM para adição nas novas garrafas. Os experimentos foram realizados com as células nas passagens 63-65.

3.3 Viabilidade Celular

3.3.1 Método de exclusão com azul de Tripan

Após realização do processo de tripsinização (descrito no item “cultivo celular”), a viabilidade foi verificada em hemacitômetro (câmara de Neubauer), utilizando-se 80 µL do corante azul de Tripan 0,4% (Gibco® REF 15250-061), em 20 µL de suspensão de células. A solução de azul de Tripan penetra nas células não viáveis, deixando-as

coradas de azul. Assim, fez-se a contagem nos 4 quadrantes laterais do hemacitômetro em microscópio óptico, diferenciando-se as formas viáveis, que permaneciam translúcidas, das formas mortas (coradas). (adaptado de GRUBE; WOLFRUM; LANGGUTH, 2008) Para o cálculo de viabilidade celular utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Nº de Células Viáveis x 100}}{\text{Total de Células (soma de células vivas + células mortas)}} \qquad (1,0)$$

3.3.2 Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

O teste de citotoxidade foi realizado de duas maneiras: após o processo de tripsinização, 100 µL da suspensão de células com $1,0 \times 10^5$ células/cm^2 foram distribuídas em cada poço de duas microplacas de 96 poços. Uma microplaca foi utilizada imediatamente para o ensaio, e a outra foi cultivada por 20 dias com a troca de meio realizada 3 vezes semanais. A realização dessas duas formas teve como objetivo determinar se há diferença significativa entre a citotoxidade das substâncias sobre as células em suspensão e diferenciadas em monocamadas (cultivadas pelo mesmo tempo necessário para o ensaio de permeabilidade intestinal).

As soluções da substância-teste, AP, foram preparadas em solução salina balanceada de Hanks (HBSS, do inglês *Hanks' balanced salt solution*) (Sigma-Aldrich® REF H8264-500ML) acrescida de 10 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES) monohidratado (Sigma-Aldrich® REF M2933-100G) pH 6,0 e 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich® REF D2650-5X10ML) nas concentrações: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µM. Foram adicionados 100 µL dessas soluções e dos compostos utilizados no ensaio de permeabilidade: 10 µM de atenolol (AT) (Sigma-Aldrich® REF 74827) e 5 µM de cloridrato de propranolol (PROP) (Sigma-Aldrich® REF 40543-100MG), sendo que o meio HBSS + MES + DMSO foi utilizado como controle negativo, e 2% de triton X-100 (Sigma-Aldrich® REF T9284-100ML) como controle positivo. Todas as soluções foram adicionadas em triplicata.

Após a adição das substâncias, as placas foram incubadas por 4 h (tempo de incubação que será usado no ensaio de permeabilidade) a 37 °C em atmosfera com 10 % de CO_2 (incubadora de CO_2 Panasonic® MCO-17AICUVL). Para a determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), após o período de incubação, as amostras foram retiradas, e colocou-se 5 µL (1/20 vol.) em outra microplaca sem células, completando-se o volume com meio HBSS (95 µL). Na sequência, foram adicionados 100 µL da mistura reacional (Kit Roche® REF 11644793001) e realizada a leitura em uma leitora de microplacas (Biochrom® EZ read 2000) a 490 nm a cada 2 min durante 30 min para encontrar o melhor tempo da reação sem saturação. Foi preparada uma microplaca sem células e realizado o controle da enzima [50 µL de HBSS + 50 µL da enzima LDH a 0.05 U/Ml (Sigma-Aldrich® REF 1012723001) + 100 µL de mistura reacional], assim como o controle da substância/enzima (50 µL do AP a 200 µM + 50 µL da enzima LDH a 0.05 U/mL + 100 µL de HBSS) (adaptado de LI et al., 2020). A porcentagem de citotoxidade foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Citotoxidade (\%)} = \frac{\text{AbsA} - \text{AbsB} \times 100}{\text{AbsCP} - \text{AbsB}} \qquad (2,0)$$

Em que:
AbsA = Absorvância da amostra;
AbsB = Absorvância do branco;
AbsCP = Absorvância do controle positivo.

3.4 Preparo do probiótico para o estudo de permeabilidade intestinal

Foi utilizada a linhagem de *Lactobacillus fermentum* (ATCC® 11976), isolada do intestino de criança, a qual foi cultivada no caldo De Man Rogosa e Sharpe (MRS) (KASVI® REF K25-610025), acrescido de 33 % de glicose *m/m* (Synth REF 61008.01.AH) e 2 % de inulina *m/m* (fornecida pela Farmácia Fitoterápica Oficina de Ervas Req. 288662), e incubada a 37 °C em atmosfera com 10 % de CO_2 (incubadora de CO_2

Panasonic® MCO-17AICUVL).

A cultura do probiótico foi inicialmente ativada no meio de cultura mencionado acima (pH 6,7), sendo que o inóculo inicial foi preparado de modo que a densidade óptica (D.O.) da suspensão a 625 nm fosse de 1,4. Foram realizadas três incubações sucessivas por um período de 72 h utilizando-se 2 % *v/v* da suspensão da cultura como inóculo de transferência. Posteriormente, a cultura foi incubada nas mesmas condições por 16 h para atingir a fase exponencial e a D.O. da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,9 a 600 nm para adição de 500 µL nas células Caco-2 no 19º dia de cultivo para que todos os experimentos fossem realizados no 20º dia de cultivo. Essa espécie foi utilizada baseando-se em dados da literatura que reportam importantes propriedades probióticas (KAHOULI et al., 2015; PANICKER et al., 2018). Após cada retirada da alíquota equivalente a 2 %, diariamente, o pH do meio foi verificado. Antes da realização do cocultivo, foram realizados dois experimentos: seleção do meio de cultivo ideal para as células bacterianas e intestinais, e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do AP sobre *L. fermentum*.

3.4.1 Seleção do meio de cultivo

A determinação do meio mais adequado para o cocultivo foi realizado em garrafas de cultivo celular com área de crescimento igual a 25 cm^2. Em triplicata, foram adicionados 3750 µL de suspensão de células Caco-2, considerando-se uma densidade celular de $1,0 \times 10^5$ células por cm^2, em HBSS acrescido de 10 mM de MES (pH 6,0) ou em DMEM sem antibióticos e sem SBF. Foram adicionados também 1250 µL de suspensão de células bacterianas de modo que a D.O. a 600 nm fosse de 0,9. Como controle dessa etapa, uma suspensão de células bacterianas foi ajustada com a mesma D.O. e centrifugada (1000 x g por 15 minutos a 4 °C). Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspendido em água destilada para ser submetido ao processo de esterilização em autoclave (121 °C por 20 minutos) antes da adição ao compartimento apical. Sendo assim, os debris celulares foram adicionados (1250 µL) também em garrafas com células Caco-2. Além disso, outros controles foram preparados nos mesmos meios de cultura supracitados: garrafas somente com as células Caco-2;

garrafas somente com o inóculo bacteriano; e garrafas somente com os debris celulares. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As garrafas foram incubadas por 24 h e, posteriormente, foi realizada a verificação do pH e a análise da viabilidade celular.

3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após o cultivo por 16 h, descrito no item 3.4, a D.O. da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,9 a 600 nm no meio de cultivo selecionado no experimento anterior e a cultura foi incubada por 24 h a 37 °C em atmosfera com 10 % de CO_2. Após isso, foi submetida a centrifugação a 1000 x g por 15 minutos a 4°C, e o *pellet* ressuspendido em meio HBSS com 10 mM de MES, pH 6,0 (meio que será utilizado no compartimento apical durante o ensaio de permeabilidade). Após "homogeneização" dessa suspensão em agitador vórtex, foram adicionados 20 µL em cada poço determinado em uma placa de 96 poços. Previamente à adição da suspensão, as soluções da substância-teste foram preparadas nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de citotoxidade (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µM) e foram adicionados 80 µL de cada uma. Como controles foram preparados AT a 10 µM e PROP a 5 µM. Todas as soluções foram preparadas em meio HBSS acrescido de 10 mM de MES e 1 % de DMSO, e adicionadas em triplicata. Como controle negativo, foi utilizado esse meio de preparo das soluções das substâncias. Como controle positivo, foi utilizado penicilina G (Sigma-Aldrich® REF 1538-09-6) nas concentrações: 11,73; 5,865; 2,9325; 1,4663; 0,7331; 0,3666; 0,1833; 0,0916; 0,0458; 0,0229 (µM). Além disso, foram preparados: o controle de esterilidade do meio de cultura (100 µL), que não deve apresentar crescimento bacteriano; o controle da cultura, o qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano (80 µL do meio e 20 µL do inóculo); o controle do meio utilizado na solubilização das substâncias e inoculado, que deve apresentar crescimento bacteriano (80 µL e 20 µL do inóculo); e o controle de esterilidade do meio utilizado na solubilização das amostras, que não deve apresentar crescimento bacteriano (100 µL). Após o preenchimento de todos os poços, a microplaca foi incubada a 37 °C por 4 h em atmosfera de 10 % de CO_2. Posteriormente, foram adicionados em cada poço 20 µL de solução aquosa de resazurina

a 0,02 % (Sigma-Aldrich® REF R7017-56). Antes da revelação da microplaca, alíquotas de todos os poços foram transferidas para placas de Petri contendo MRS Ágar (KASVI® REF K25-610024) com 33 % de glicose *m/m* e 2 % de inulina *m/m*, e incubadas em estufa a 37 ºC por 24 h em atmosfera de 10 % de CO_2. Após esse período, foi observado se houve crescimento microbiano (adaptado de *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) (NCCLS, 2015).

3.5 Estudo de permeabilidade intestinal

As células foram semeadas em insertos de membrana de tereftalato de polietileno (Corning Transwell™ REF 353102) (tamanho do poro de 1 µm, de acordo com a recomendação do fabricante para ensaios de permeabilidade) sobre placas de 6 poços (densidade celular de 1 x 10^5 células/cm^2) e mantidas a 37 ºC em atmosfera com 10 % de CO_2 por 20 dias (ZHOU et al., 2005) para promover o crescimento da monocamada de células diferenciadas com formação de junções oclusivas e de forma a obter a polaridade celular e as funções do epitélio intestinal expressando enzimas e proteínas de transporte. A integridade da monocamada foi determinada pela resistência elétrica transepitelial (RET) (Voltímetro Millicell® ER-S-2 REF MERS00002), que foi avaliada, em triplicata, antes da troca do meio de cultivo (3 vezes semanais), e antes e após o ensaio de permeabilidade intestinal. Os valores (Ω . cm²) foram determinados a partir da fórmula 3,0. Como controle, foi aferida a resistência apenas do inserto Transwell™ com meio de cultivo (sem células) (SRINIVASAN et al., 2015).

$$RET = (R^a - R^c) \times A^m \qquad (3,0)$$

Em que:

R^a = resistência da amostra, ou seja, poço com células (Ω);

R^c = resistência do controle (Ω);

A^m = área efetiva da membrana (cm^2).

Soluções do diterpeno AP na concentração definida com base nos resultados

obtidos nos experimentos de citotoxicidade e CIM, e soluções dos padrões AT e PROP foram adicionadas ao compartimento apical do inserto, que representa o lúmen intestinal, com meio HBSS contendo 10 mM de MES, pH 6,0. Esta etapa foi denominada de "ensaio de A → B", e o compartimento basolateral foi preenchido somente com meio HBSS acrescido de 4 % de SBF e 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanosulfônico (HEPES), pH 7,4 (Sigma-Aldrich® REF H4034-100G). O "ensaio de B → A" consistiu nos experimentos de transporte secretório que foram realizados a partir do compartimento basolateral, que representa a circulação sistêmica, ou seja, o AP foi adicionado nesse compartimento, e o compartimento apical foi preenchido somente com o meio HBSS contendo 10 mM de MES, pH 6,0. Os controles AT (baixa permeabilidade) e PROP (alta permeabilidade) foram adicionados, repectivamente, nas concentrações de 10 µM e a 5 µM. Em cada poço que continha alguma substância, foram adicionados 1 % de DMSO para auxiliar na solubilidade dos compostos no meio de cultivo. Após a adição das substâncias, as placas foram incubadas por 4 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O valor de permeabilidade aparente (P_{app}) (LEONARD et al., 2021) foi determinado conforme a equação 4,0:

$$P_{app} = (\Delta C / \Delta t) \times (1 / (A \times C_0)) \qquad (4,0)$$

Em que:

P_{app} = permeabilidade aparente (cm/s);

$\Delta C/\Delta t$ = Velocidade de difusão através da barreira intestinal (µg/s);

A = área da membrana (cm^2);

C_0 = concentração inicial da substância no compartimento apical ($\mu g/cm^3$).

3.5.1 Variação das condições de cultivo

a) O ensaio de permeabilidade intestinal (4 h) foi realizado com as placas incubadas sem agitação;

b) Foi incluída agitação constante (60 rpm) durante o ensaio de permeabilidade intestinal, ou seja, durante as 4 h de incubação (incubadora shaker de CO_2 Eppendorf® New Brunswick™ S41i);
c) As células Caco-2 (no 19º dia de cultivo) foram cocultivadas por 24 h com o probiótico *L. fermentum* (item 3.4) antes do ensaio de permeabilidade intestinal (4 h);
d) As células Caco-2 (no 19º dia de cultivo) foram cocultivadas por 24 h com os debris celulares de *L. fermentum* (item 3.4.1) antes do ensaio de permeabilidade intestinal (4 h).

3.5.2 Processamento das amostras e quantificação

Após o ensaio de permeabilidade intestinal, o diterpeno AP e os padrões AT e PROP foram extraídos dos compartimentos apical e basolateral. Os conteúdos coletados foram submetidos ao processo de extração em fase sólida (do inglês *solid-phase extraction*, SPE) (Figura 6), os quais foram eluídos em cartuchos contendo sílica C-18 (Discovery® DSC-18 3 mL, 500 mg, REF 52603-U) acoplados em sistema de coletores para extração por SPE a vácuo (Visiprep™ SPE Vaccum Manifold REF 57030-U). Os cartuchos foram previamente condicionados sequencialmente com: 3 mL de metanol para cromatografia líquida (LiChrosolv® Supelco REF 1.06007.4000), 3 mL de água Mili-Q neutra e 3 mL de água Mili-Q acidificada (pH entre 2 e 3 para o diterperno AP) ou 3 mL de água Mili-Q basificada (pH entre 10 e 11 para os controles AT e PROP). Após isso, as amostras dos compartimentos apical (2 mL - HBSS; MES; com e sem 1% DMSO) e basolateral (3 mL - HBSS; HEPES; 4% SBF; com e sem 1% DMSO) foram eluídas. Previamente, o pH dessas amostras foi ajustado de acordo com o pKa das substâncias contidas, ou seja, pH entre 2 e 3 para o diterperno AP ou pH entre 10 e 11 para os controles AT e PROP (pKa = 4,6 para o AP; 9,6 para o AT e 9,42 para o PROP). Após a eluição das amostras, os cartuchos foram percolados novamente com 3 mL de água acidificada ou basificada, e, por último, 6 mL de metanol. Após isso, as amostras foram evaporadas e ressuspendidas em volume menor de metanol para serem analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência e Espectrometria de Massas (CLUE-MS/MS).

Antes da extração em SPE, foi adicionado ácido *ent*-diidroagático como padrão

interno (P.I.) na concentração de 5 µM para as amostras que continham o diterpeno como analito. O AT (5 µM) foi usado como P.I. para as soluções de PROP, e o PROP (5 µM) para as soluções de AT.

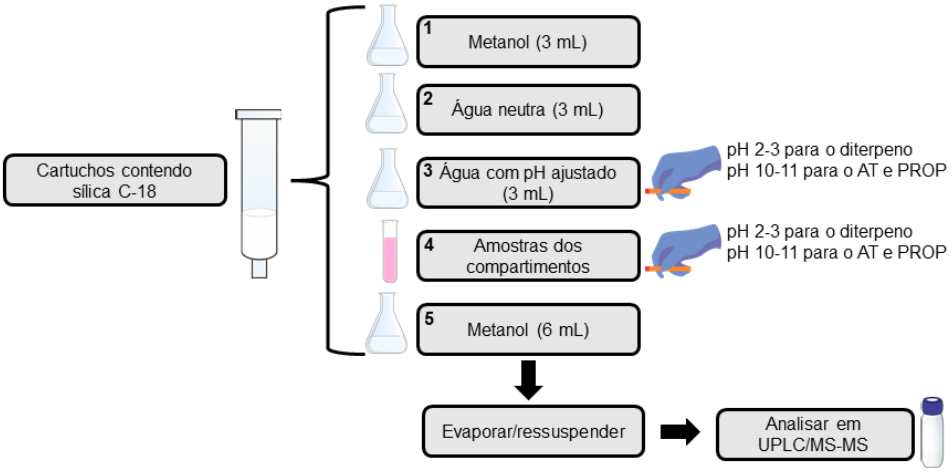

Figura 6. Esquema do processo de SPE das amostras retiradas dos compartimentos apical e basolateral.

Para a extração do conteúdo do compartimento celular (Figura 7), as membranas de polietileno foram cortadas com o auxílio de um bisturi e tranferidas para microtubos do tipo Eppendorfs. Foram adicionados, então, 1 mL de metanol: acetona (1:1), *glass beads* de 1.0 mm (Sigma-Aldrich® REF Z250473) e os P.I.s supracitados. Os Eppendorfs foram levados ao banho de ultrassônico por 20 min, e centrifugados por 15 minutos (5000 X g, 4°C). Após isso, o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes, e os conteúdos coletados evaporados e ressuspendidos em volume menor de metanol para serem analisados por CLUE-MS/MS (adaptado de MAITI et al., 2010).

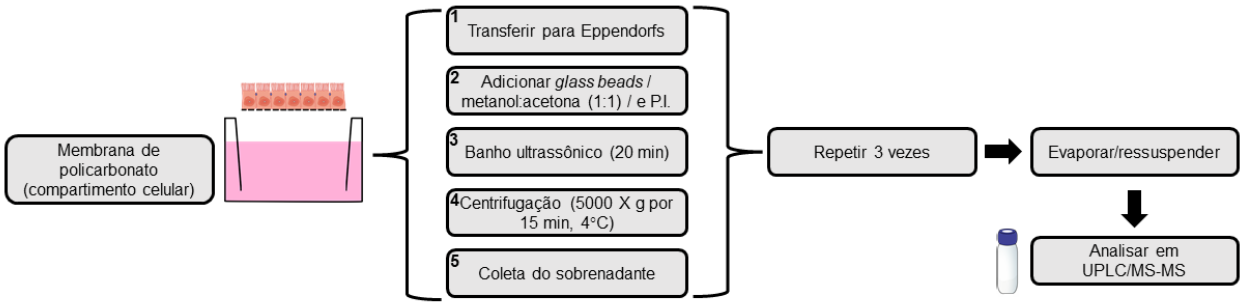

Figura 7. Esquema do processo de extração do conteúdo do compartimento celular.

As análises do diterpeno foram realizadas por método analítico previamente validado pelo grupo de pesquisa (DA SILVA et al., 2017), desenvolvido em CLUE-MS/MS de acordo com a RDC Nº 166/17 da ANVISA, a qual dispõe sobre a validação de métodos analíticos.

O AP foi analisado utilizando espectrômetro de massas *tandem* triplo quadrupolo Xevo® TQ-S operado com sistema Acquity CLUE da marca Waters (Milford, MS, USA). Foi utilizado *electrospray* (ESI) em modo negativo como fonte de ionização. Além disso, foram ajustados os seguintes parâmetros: vazão do gás de dessolvatação = 600 $L.h^{-1}$, temperatura da fonte ESI: 150 ºC, voltagem do capilar = - 2,5 kV e temperatura de dessolvatação do gás N_2 = 350 ºC, operados pelo software MassLynx (versão 4.1). A separação cromatográfica foi realizada em coluna analítica (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) Ascentis® Express da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA) acoplada a pré-coluna (5 x 4,6 mm, 2,7 µm). As respostas analíticas foram obtidas em modo de *multiple reaction monitoring* (MRM) por dissociação induzida por colisão. Foi utilizado modo de eluição em gradiente (Tabela 4), com vazão de 0,5 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 10 µL, temperatura de 40 ºC e tempo total de análise de 12 min., mais 6 min de recondicionamento. A fase móvel consistiu em: água com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (solução A), metanol com 0,1 % (v/v) NH_4OH (Solução B) e acetonitrila com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (solução C).

Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado nas análises cromatográficas do AP, expresso em porcentagem de acordo com o tempo.

Tempo (min)	Solução A	Solução B	Solução C
0:00	40	55	5
5:00	5	92	3
12:00	5	92	3
13:00	40	55	5
18:00	40	55	5

Em relação ao AT e PROP, as análises também foram feitas utilizando espectrômetro de massas tandem triplo quadrupolo Xevo® TQ-S operado com sistema Acquity CLUE da marca Waters (Milford, MS, USA). Entretanto, foi utilizado *electrospray* (ESI) em modo positivo como fonte de ionização, ajustando-se os seguintes parâmetros: vazão do gás de dessolvatação = 650 $L.h^{-1}$, temperatura da fonte ESI: 150 ºC, voltagem do capilar = 3,2 kV, temperatura de dessolvatação do gás N_2 = 300 ºC, vazão de 0,350 $mL.min^{-1}$, temperatura de 35 ºC, volume de injeção de 10 µL e tempo total de análise de 10 min., mais 4 min. de recondicionamento. A separação cromatográfica também foi realizada em coluna analítica (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) Ascentis® Express da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA) acoplada a pré-coluna (5 x 4,6 mm, 2,7 µm). As respostas analíticas também foram obtidas em modo de MRM por dissociação induzida por colisão, e os dados foram operados pelo software MassLynx (versão 4.1). Foi utilizado modo de eluição em gradiente (Tabela 5), com a mesma fase móvel: água com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (solução A), metanol com 0,1 % (v/v) NH_4OH (Solução B) e acetonitrila com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (solução C).

Para proceder a quantificação, foram preparadas soluções contendo o diterpeno e as substâncias controles em diferentes concentrações. Esse procedimento foi realizado para obter as curvas de calibração e, para isso, a concentração de cada ponto foi correlacionada com sua respectiva resposta analítica visando a obtenção da equação linear ($y = ax + b$) onde y é a resposta analítica, a é o coeficiente angular, x é a concentração analisada e b o coeficiente linear de intersecção da reta. As análises foram feitas em triplicata, objetivando um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99.

Tabela 5 - Gradiente da fase móvel utilizado nas análises cromatográficas do AT e PROP, expresso em porcentagem de acordo com o tempo.

Tempo (min)	Solução A	Solução B	Solução C
0:00	40	55	5
5:00	5	92	3
6:00	5	92	3
6:10	40	55	5
10:00	40	55	5

3.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos estudos de permeabilidade intestinal serão analisados utilizando-se o teste *one-way* ou *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade Celular

As células Caco-2 utilizadas nos experimentos apresentaram viabilidade celular superior a 65,6 % pelo ensaio de exclusão ao corante azul de Tripan. Trata-se de um método rápido para avaliar a proliferação e viabilidade celular, pois células danificadas (inviáveis) possuem uma membrana suscetível à permeação do corante. Desse modo, a análise da quantidade de células coradas fornece informações diretas sobre a porcentagem de células danificadas (CERVANTES et al., 2016).

Apesar da aplicabilidade do teste de exclusão ao corante azul de Tripan, podem ocorrer resultados falsos positivos, já que as células viáveis podem sofrer morte celular durante a execução do ensaio. Além disso, outra desvantagem diz respeito à limitação de uso, já que não é possível que um grande número de análises sejam realizadas de modo otimizado, isso porque o método é executado por meio de um hemacitômetro com

apenas duas câmaras. Contudo, é a opção mais barata e comum para fornecer dados preliminares sobre a viabilidade celular (ÇELIK UZUNER, 2018), fator muito importante, sendo um pré-requisito para dar continuidade às demais etapas que envolvem experimentos com cultivo celular. Por este motivo, foi realizada a avaliação da exclusão ao corante azul de Tripan antes de avançar para as demais fases do estudo, e em seguida, foi utilizado o método que avalia a viabilidade por meio da determinação da atividade da enzima LDH para que a inocuidade das substâncias e suas respectivas concentrações pudessem ser definidas.

LDH é uma enzima citosólica estável liberada apenas por meio do extravazamento da membrana celular quando as células estão danificadas, tornando possível a quantificação no meio de cultivo. A desvantagem desse método é que o SBF e alguns outros compostos têm atividade de LDH inerente, limitando a realização do teste com meios de cultivo clássicos. Nesse trabalho, isso não é um problema porque os experimentos devem ser realizados justamente com o meio HBSS, o qual entra em contato com as células durante o os ensaios de permeabildiade intestinal. Nesse caso, é um método mais vantajoso em relação a outros muito utilizados, como o ensaio que determina a função mitocondrial das células por meio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio), que pode apresentar resultados falso-positivos ou falso-negativos (ASLANTÜRK, 2018).

A avaliação da citotoxidade das substâncias sobre às células Caco-2 é indispensável para assegurar a confiabilidade dos resultados, por isso, unanimamente, os estudos de permeabildiade intestinal utilizam algum método para verificar a viabilidade celular, pois não seria possível afirmar se a fração quantificada foi permeada ou apenas ultrapassou uma membrana danificada pelo efeito citotóxico, seja da própria substância ou do solvente utilizado para solubilização.

Foi observado que os estudos realizam comumente a avaliação da citotoxidade com a adição da suspensão celular diretamente em placas após o processo de tripsinização, por isso, no presente trabalho, as substâncias e respectivos controles foram adicionados também sobre as células diferenciadas em monocamadas após o cultivo pelo mesmo tempo necessário para o ensaio de permeabilidade intestinal. Com isso, foi possível assegurar que as células utilizadas estavam nas mesmas

condições.

O ensaio de citotoxidade das células incubadas com o AP, AT e PROP estão representados em porcentagem de citotoxidade comparados ao controle positivo (triton X-100 a 2 %) e negativo (HBSS + 10 mM de MES + 1 % de DMSO). As percentagens citotóxicas dos compostos determinadas pela atividade da enzima LDH estão dispostas nas Figuras 8 e 9 com as células em suspensão e após 20 dias de cultivo, respectivamente.

O AP, incubado na faixa de 3,125 a 200 µM, apresentou diferença significativa em relação ao controle positivo nas concentrações de 100, 50 e 25 µM sobre as células em suspensão, e nas concentrações de 50 e 25 µM sobre as células cultivadas por 20 dias, mas, ainda assim, essas concentrações não podem ser consideradas seguras para a manutenção da integridade da monocamada de células Caco-2 durante a realização do ensaio de permeabilidade intestinal. Desse modo, a concentração mínima que não apresentou citotoxidade foi 12 µM, sendo esta, portanto, selecionada para o ensaio de permeabilidade. Isso se repetiu para os ensaios com as células em suspensão, e com as células diferenciadas em monocamadas após os 20 dias de cultivo. Os controles de baixa e alta permeabilidade celular, AT (10 µM) e PROP (5 µM), respectivamente, não foram citotóxicos para as células Caco-2 nas concentrações utilizadas. Do mesmo modo, os controles substância/enzima e somente enzima agiram conforme o esperado, demonstrando a funcionalidade do teste.

Considerando que depois que as células são semeadas, ou seja, logo após o processo de tripsinização, demora um tempo (aproxidamente 12 a 24 h) para que se reestabeleçam totalmente (isto é, reconstruir seu citoesqueleto, secretar matriz para auxiliar na fixação e espalhar-se no substrato), o que proporciona que reentrem no ciclo celular e, posteriormente, as células entram em sua fase proliferativa, sendo interrompida com a ocupação de toda a superfície de crescimento ou com o esgotamento do meio de cultivo (CERVANTES et al., 2016; FRESHNEY, 2006), esperava-se encontrar resultados distintos entre as duas formas avaliadas, mas é interessante comprovar que não há diferença significativa entre os dados observados para as células diferenciadas e em suspensão, demonstrando que o ensaio de citotoxidade pode ser realizado sem a necessidade de cultivo prévio em placas de 96

poços.

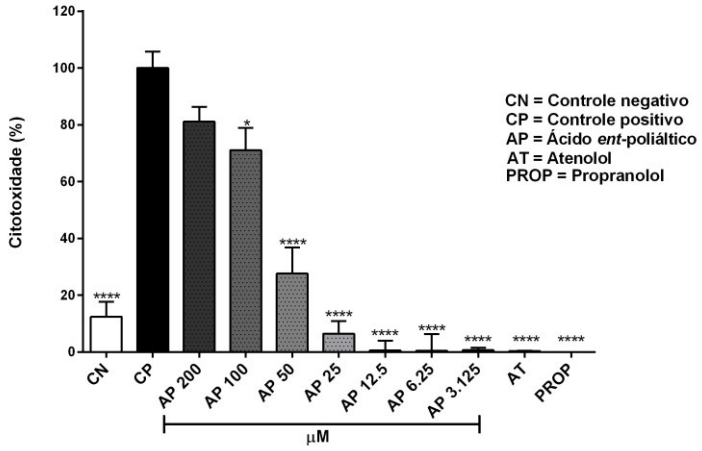

Figura 8. Citotoxidade em células Caco-2 em suspensão. Ensaio determinado por liberação de LDH frente ao diterpeno AP e aos controles AT e PROP. Os valores em porcentagem representam a média de três experimentos independentes. Os dados foram tratados com Anova de uma via seguidos do pós-teste de Tukey. Os valores apresentam significância estatística quando * $p < 0.05$ e **** $p < 0.0001$ comparado ao controle positivo triton X-100 2 % (CP). Como controle negativo (CN) foi utilizado HBSS com 1 % de DMSO.

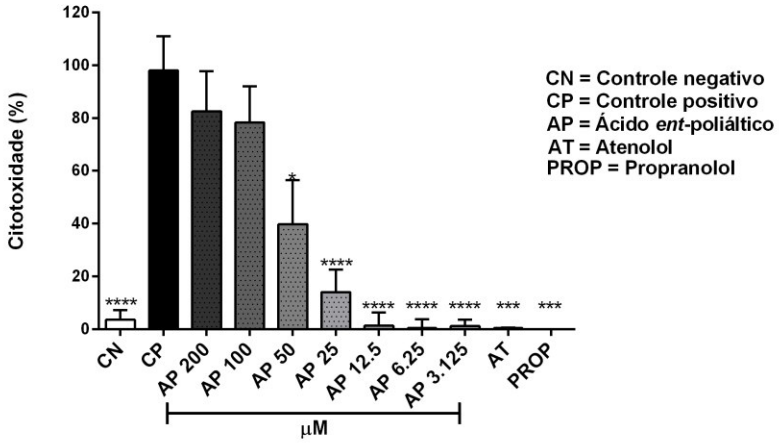

Figura 9. Citotoxidade em células Caco-2 cultivadas por 20 dias. Ensaio determinado por liberação de LDH frente ao diterpeno AP e aos controles AT e PROP. Os valores em porcentagem representam a média de três experimentos independentes. Os dados foram tratados com Anova de uma via seguidos do pós-teste de Tukey. Os valores apresentam significância estatística quando * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ comparado ao controle positivo triton X-100 2 % (CP). Como controle negativo (CN) foi utilizado HBSS com 1 % de DMSO.

4.2 Preparo do probiótico para o estudo de permeabilidade intestinal

Este é o primeiro estudo com células Caco-2 sob cocultivo bacteriano para ensaios de permeabilidade inestinal, por isso, foi necessário estabelecer várias etapas de preparo e padronização do cultivo do probiótico para adição nas células. Foram realizadas três incubações sucessivas de *L. fermentum* por um período de 72 h utilizando-se 2 % v/v da suspensão da cultura como inóculo de transferência, e por 16 h para atingir a fase exponencial. Após a retirada da alíquota equivalente a 2 %, o pH do meio foi verificado. Durante o cultivo, o pH do meio MRS contendo *L. fermentum* manteve-se em média em 4,20 ± 0,08, e o pH somente do meio MRS foi de 5,85 ± 0,10 (Tabela 6), o que demonstra que houve crescimento bacteriano nessas condições, pois bactérias láticas como *L. fermentum*, produzem o ácido orgânico ácido-2-hidroxipropiônico por meio da fermentação de carboidratos, diminuindo o pH do meio de cultivo (LOPES, 2008). Além disso, era possível observar a diferença do aspecto dos meios, pois o meio MRS contendo *L. Fermentum* apresentava-se turvo.

Tabela 6 - Valores de pH do meio MRS *e* nas condições de cultivo *de L. fermentum*.

Amostras	**Período de incubação (horas)**				**Média**
	24	**48**	**72**	**88**	
Somente o meio MRS	6.0	5.8	5.8	5.8	5,85 ± 0,10
Meio MRS contendo *L. Fermentum*	4.1	4.2	4.2	4.3	4,20 ± 0,08

*Cada resultado representa a média ± desvio padrão.

4.2.1 Seleção do meio de cultivo

Outra etapa importante da padronização foi a seleção do meio de cultura para a permanência das células Caco-2 sob cocultivo com o probiótico por 24 h. Foram avaliados os meios DMEM sem antibióticos e sem SBF e HBSS acrescido de 10 mM de MES (pH 6,0). Foi observado (Tabela 7) que as garrafas que continham células Caco-2

e bacterianas cultivadas no meio HBSS acrescido de 10 mM de MES apresentaram um pH muito baixo (pH 4,23) quando comparado ao controle (pH 5,83), por isso, o meio selecionado foi o DMEM sem antibióticos e sem SBF (pH 7,06), visando garantir as condições de cultivo ideais preconizadas tanto para as células Caco-2, quanto para as células bacterianas. Mesmo que a alteração do pH tenha sido mínima comparada ao controle (pH 7,23), na Figura 10 é possível observar a diferença de coloração entre as garrafas contendo as células bacterianas e os demais controles, devido a presença de vermelho fenol, um indicador de pH, na composição do meio DMEM.

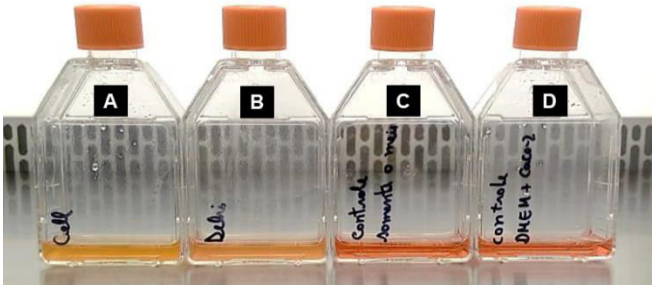

Figura 10. Garrafas contendo as células bacterianas cocultivadas com células Caco-2, e demais controles em meio de cultura DMEM sem antibióticos e sem SBF. Onde A: *L. fermentum* e células Caco-2; B: debris celulares de *L. fermentum* e células Caco-2; C: somente o meio DMEM; e D: meio DMEM e células Caco-2.

Tabela 7 - Valores de pH dos meios de cultura utilizados para *a padronização d*o cocultivo com *L. fermentum*.

Meios de cultura		**pH***
DMEM sem antibióticos e sem SBF	Cocultivo com *L. fermentum*	7,06 ± 0,06
	Cocultivo com debris celulares	7,30 ± 0,00
	Apenas células Caco-2	7,23 ± 0,06
	Apenas o meio de cultivo	7,20 ± 0,00
HBSS acrescido de 10 mM de MES	Cocultivo com *L. fermentum*	4,23 ± 0,06
	Cocultivo com debris celulares	5,90 ± 0,00
	Apenas células Caco-2	5,83 ± 0,06
	Apenas o meio de cultivo	5,80 ± 0,10

*Cada resultado representa a média ± desvio padrão.

Vale ressaltar que o meio HBSS contém sais inorgânicos que também estão presentes no meio MRS, como por exemplo, sulfato de magnésio heptahidratado e fosfato de sódio, além disso, possui glicose em sua composição (1 g/L), tornando o ambiente favorável para o crescimento da bactéria, além do mais, a adição de 10 mM do tampão MES (pH 6,0) deixou o meio com o pH mais próximo do valor indicado para o crescimento desse microrganismo nas instruções contidas na ATCC (6,5 +/- 0,2).

Já o meio DMEM, apesar de apresentar em sua composição 4,5 g/L de glicose, o CO_2 dissolvido em equilíbrio com íons bicarbonato gerou um sistema de tamponamento no meio que deve ter proporcionado a manutenção da faixa de pH ótima para o crescimento de células humanas (7,0 - 7,6). Vale ressaltar que alíquotas do meio DMEM foram semeadas em placas de Petri contendo MRS Ágar com 33 % de glicose *m/m* e 2 % de inulina *m/m*, comprovando o cresciemnto bacteriano.

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O objetivo da determinação da CIM foi o de estabelecer uma concentração tolerável pelas células bacterianas e intestinais nas mesmas condições de exposição durante o ensaio de permeabilidade. Sabe-se que a concentração do diterpeno determinada como segura para a manutenção da integridade da monocamada de células Caco-2 pelo teste de citotoxidade com a enzima LDH foi de 12,5 µM. O ensaio de determinação da CIM demonstrou que essa concentração também é segura para a bactéria *L. fermentum* em uma exposição de 4 h de incubação, nas condições de cultivo estabelecidas para o ensaio de permeabilidade, sendo que a CIM, dentro da faixa de concentração avaliada, foi de 200 µM, apresentando um efeito bacteriostático. Outros estudos já tinham demonstrado a atividade antibacteriana desse diterpeno (ABRÃO et al., 2018; ÇIÇEK et al., 2020; TINCUSI et al., 2002).

4.3 Estudo de permeabilidade intestinal

Após a definição da concentração do diterpeno AP que poderia ser utilizada tanto nos experimentos com Caco-2 quanto com cocultivo bacteriano, os ensaios de permeabilidade foram realizados. Sabe-se que diferentes linhagens celulares são utilizadas nos experimentos interlaboratoriais que avaliam a permeabilidade intestinal e há bastante diferenças entre elas. No presente trabalho foram utilizadas células Caco-2 tipo clone C2BBe1 (ATCC® CRL-2102™), pois formam uma monocamada polarizada com uma borda em escova apical morfologicamente comparável à do cólon humano, apresentando homogeneidade morfológica e localização apical exclusiva das vilosidades, de acordo com as informações cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), local onde a linhagem de células foi obtida.

Uma das diferenças notáveis, além da linhagem, é a densidade celular (D.C.) utilizada para os experimentos de permeabilidade. Nesse estudo foi utilizada uma D.C. de 1×10^5 células/cm^2, corroborando com outros trabalhos realizados com a mesma linhagem celular (LECHANTEUR; ALMEIDA; SARMENTO, 2017; SILVA et al., 2018), além disso, foi encontrado um trabalho que fez uso de uma D.C. de $4{,}5 \times 10^5$ células/cm^2 (SILVA et al., 2017). No estudo de Behrens e Kissel (2003), foi recomendado uma D.C. média de semeio de 6×10^4 células/cm^2, porém, outra linhagem celular (HD, DKFZ, *German Cancer Research Center*) foi utilizada. Os autores afirmaram que D.C. mais baixas levaram a monocamadas finas com junções apertadas alteradas e D.C. mais altas para a formação de multicamadas.

Outro parâmetro importante é a RET, pois os valores são indicadores da integridade das monocamadas celulares e, por isso, foram monitorados em vários momentos dos experimentos. A integridade da barreira celular é considerada adequada para a realização dos experimentos de permeabilidade quando os valores da RET permanecem acima de 300 $\Omega \cdot cm^2$ (UDE et al., 2017; OHASHI et al., 2009).

Além da integridade da monocamada, a aferição da RET é indispensável para determinar qual o intervalo de tempo de cultivo celular mais adequado para a realização dos experimentos de permeabilidade, ou seja, quando os valores de RET não apresentassem diferença estatística significativa. Desse modo, a monocamada em

formação foi submetida ao acompanhamento por 3 vezes semanais para a aferição da RET durante os 20 dias de cultivo (Figura 11). Pode-se observar que a fase de crescimento exponencial perdurou até o 10º dia, no qual apresentou o maior valor de RET (700 Ω . cm^2). Após isso, no 12º dia, as células atingiram a fase de crescimento estacionário, onde a RET decaiu e se manteve estável até o 20º dia. Apesar da variação proeminente registrada entre o 6º e 10º dia, algo que é inerente à fase de crescimento celular, não houve diferença significativa entre os valores observados a partir do 8° dia. Considerando a estabilidade no crescimento celular e a integridade da monocamada formada, esses resultados demonstram que os ensaios de permeabilidade poderiam ser realizados entres os dias 12° e 20° de cultivo celular, sendo assim, foram executados considerando este intervalo de tempo.

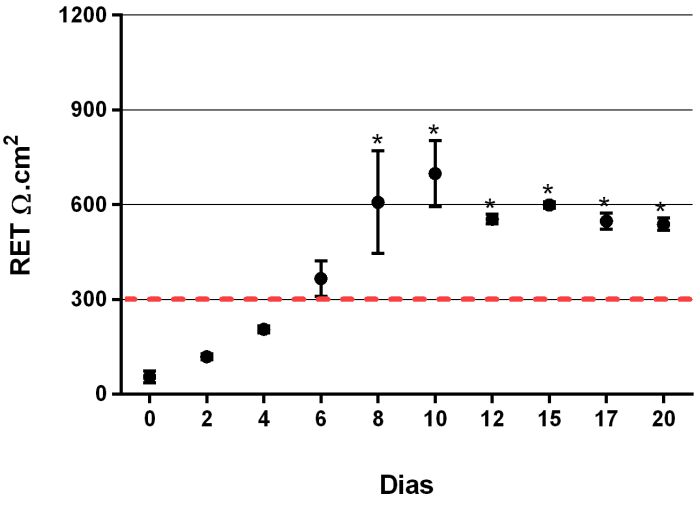

Figura 11. RET de células Caco-2 cultivadas em suportes permeáveis Transwell™ por 20 dias. Cada resultado representa a média ± desvio padrão. Os dados foram tratados com Anova de uma via seguidos do pós-teste de Tukey. Os valores com * indicam que as diferenças entre esses valores não são estatisticamente significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A monocamada das células Caco-2 estava íntegra no início de cada experimento, e os valores das RETs iniciais não foram significativamente diferentes, ou seja, antes da adição do diterpeno e demais controles. Na Figura 12 constam as RETs dessa fase inicial,

considerando os grupos experimentais com variações no modo de cultivo. Todos os experimentos foram realizados com a membrana de tereftalato de polietileno com tamanho do poro de 1 µm, onde o pH do meio do compartimento basolateral foi ajustado para 7,4 e adicionado SBF, já o pH do meio apical foi 6,0. Variou-se a inclusão ou não de agitação, e a adição de células bacterianas (*L. Fermentum*) ou debris celulares. Os grupos com cocultivo apresentaram diferença significativa entre os valores inciais de RET, mas deve-se levar em consideração o fato de as RETs iniciais destes grupos, em especial, serem medidas após 24 h de cocultivo.

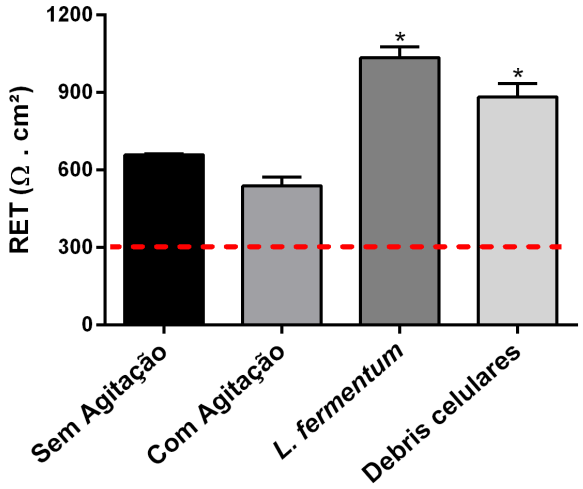

Figura 12. RET de células Caco-2 antes dos ensaios de permeabilidade intestinal. As células foram submetidas às diferentes condições de cultivo (sem e com agitação, e cocultivo com *L. Fermentum* e debris celulares). Cada resultado representa a média ± desvio padrão. Os dados foram tratados com Anova de uma via seguidos do pós-teste de Tukey. Os valores com * indicam que as diferenças entre esses valores são estatisticamente significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A RET também foi registrada após os ensaios de permeabilidade. Os resultados podem ser vistos na Figura 13. Após 4 h de incubação, não foi observada nenhuma diminuição significativa das RETs.

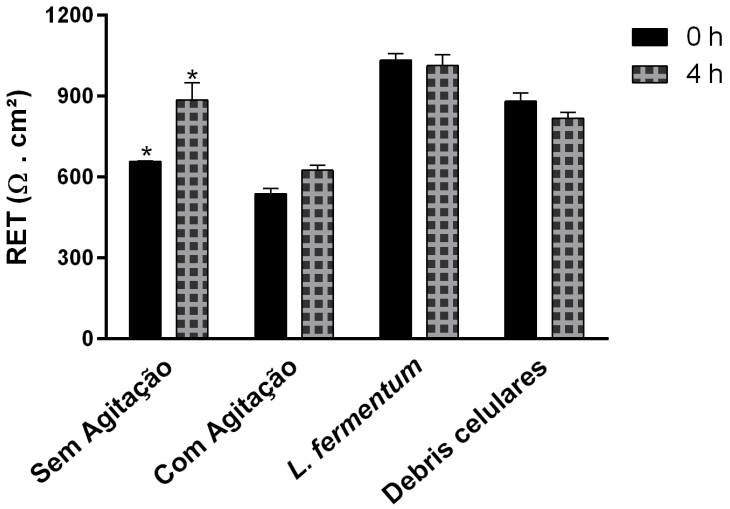

Figura 13. RET de células Caco-2 antes e após os ensaios de permeabilidade intestinal com as células submetidas às diferentes condições de cultivo (sem e com agitação, e cocultivo com *L. Fermentum* e debris celulares). Cada resultado representa a média ± desvio padrão. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguidos do pós-teste de Tukey. Os valores com * indicam que houve diferenças estatisticamente significativas entre esses valores de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Como foi possível observar nos resultados apresentados, todos os experimentos foram realizados com o valor de RET acima de 300 Ω . cm^2, sendo possível afirmar que a monocamada estava íntegra, mantendo-se, inclusive, após a realização dos experimentos.

Quando as células Caco-2 foram submetidas ao cocultivo com *L. fermentum* por 24 h, houve um aumento da RET, e esse aumento foi estatisticamente significativo em relação ao valor registrado antes da adição das células bacterianas, ou seja, em 0 h, diferentemente do controle com debris celulares (Figura 14).

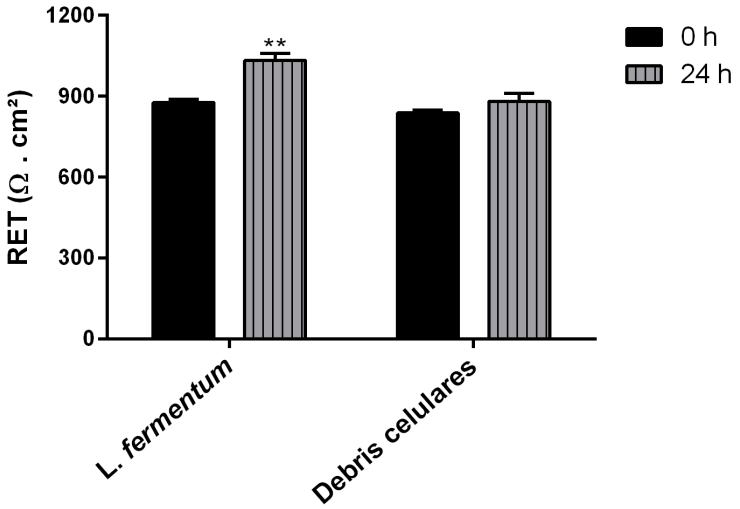

Figura 14. RET de células Caco-2 antes e após a realização do cocultivo por 24 h com células bacterianas e debris celulares de *L. fermentum*. Cada resultado representa a média ± desvio padrão. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguidos do pós-teste de Tukey. Os valores com ** indicam que houve diferenças estatisticamente significativas entre o valor registrado em 0 h e 24 h para um mesmo grupo de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

De fato, com estes valores de RET, foi corroborado que os probióticos podem apresentar influência sobre a barreira intestinal, como mostra o estudo realizado por Mokkala, Laitinen e Röytiö (2016), o qual constatou que *Bifidobacterium lactis* 420 aumentou significativamente a integridade da barreira epitelial intestinal em um modelo de células Caco-2.

Em um modelo experimental de inflamação *in vitro*, a combinação fixa de probióticos (*Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus acidophilus*) e extrato de *Chamomilla recutita* L. em azeite extra virgem exerceu um papel protetor contra a disfunção da barreira intestinal ao aumentar a RET e diminuir a permeabilidade paracelular de células Caco-2, esta, por sua vez, foi avaliada a partir da determinação do fluxo de isotiocianato de fluoresceína (COCETTA et al., 2019).

Os probióticos exercem efeito citoprotetor para o epitélio intestinal, atenuando inflamação e reduzindo a permeabilidade do intestino. *L. acidophilus* e *Bifidobacterium infantis* também protegeram a função da barreira epitelial intestinal de Caco-2 em condições inflamatórias (GUO et al., 2017).

Bifidobacterium adolescentis, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *L. acidophilus* inibiram a perda de integridade da barreira epitelial induzida por estresse de retículo endoplasmático em células Caco-2, sendo que as linhagens de *B. Adolescentis* e *B. Bifidum* foram as mais potentes, restabelecendo em 50 % e 55 % o valor de RET original (AKIYAMA; OISHI; WULLAERT, 2016).

Como pode ser observado, a maioria dos estudos que utilizam células intestinais e bactérias em um mesmo modelo experimental, o fazem para a verificação das propriedades probióticas dos microorganismos (VASIEE et al., 2020). Desse modo, na literatura, há muitas informações sobre o aumento da RET em células Caco-2 expostas ao cocultivo. Há estudos que usam métodos de fluorescência para verificar a permeabilidade paracelular a partir da determinação da intensidade fluorescente de marcadores que são utilizados como indicadores da integridade da membrana (COCETTA et al., 2019).

4.3.1 Permeabilidade aparente (P_{app})

A quantificação foi realizada através das curvas de calibração obtidas e a equação linear (y = ax + b) onde “y” é a resposta analítica, “a” é o coeficiente angular, “x” é a concentração analisada e “b”, o coeficiente linear de intersecção da reta. As equações lineares e os coeficientes de correlação (R^2) obtidos podem ser vistos nas figuras abaixo contendo as curvas de calibração (Figuras 15 a 19).

Foi necessário preparar soluções contendo o AP em diferentes concentrações para a obtenção de curvas de calibração lineares, pois a resposta analítica para esse composto variou para as mesmas soluções analisadas em dias diferentes. Isso deve ter ocorrido devido variações inerentes ao equipamento, por isso, há 3 equações (Figuras 15 a 17) lineares (y = ax + b) para o AP. Cada equação foi usada para quantificar os dados analisados em período concomitante à curva de calibração.

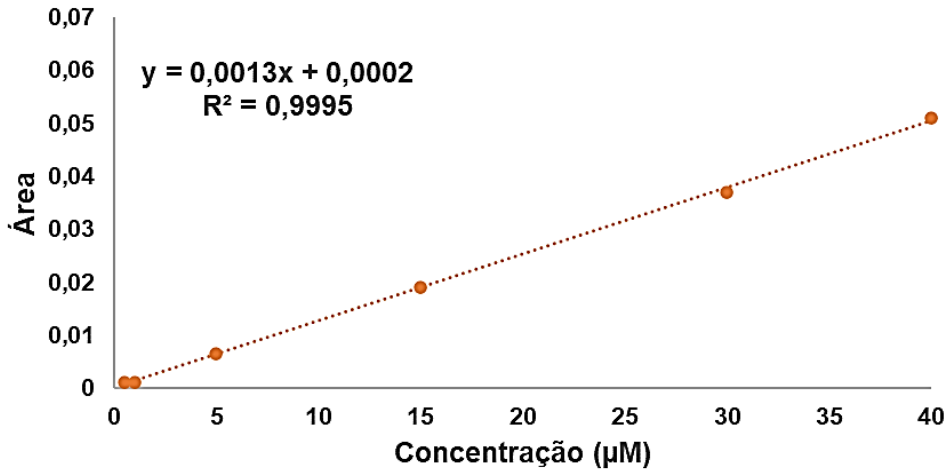

Figura 15. Curva de calibração 1 referente ao método para quantificação do AP em soluções provenientes dos ensaios de permeabilidade utilizando-se UPLC-MS/MS.

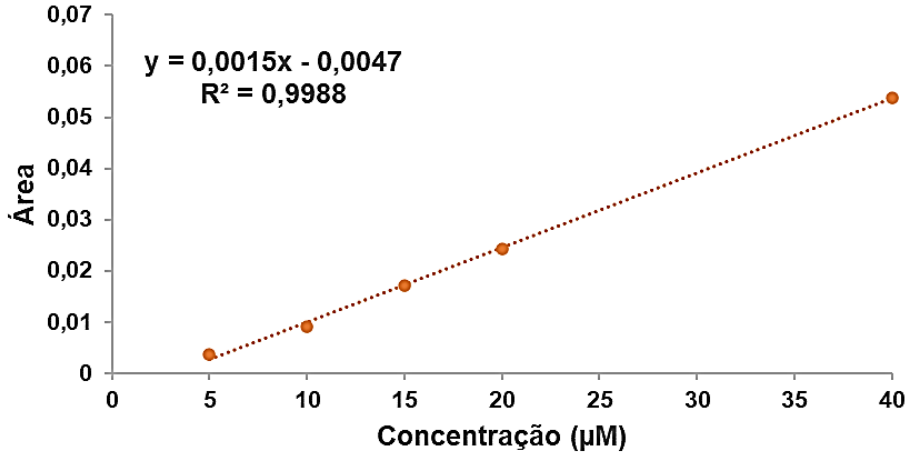

Figura 16. Curva de calibração 2 referente ao método para quantificação do AP em soluções provenientes dos ensaios de permeabilidade utilizando-se UPLC-MS/MS.

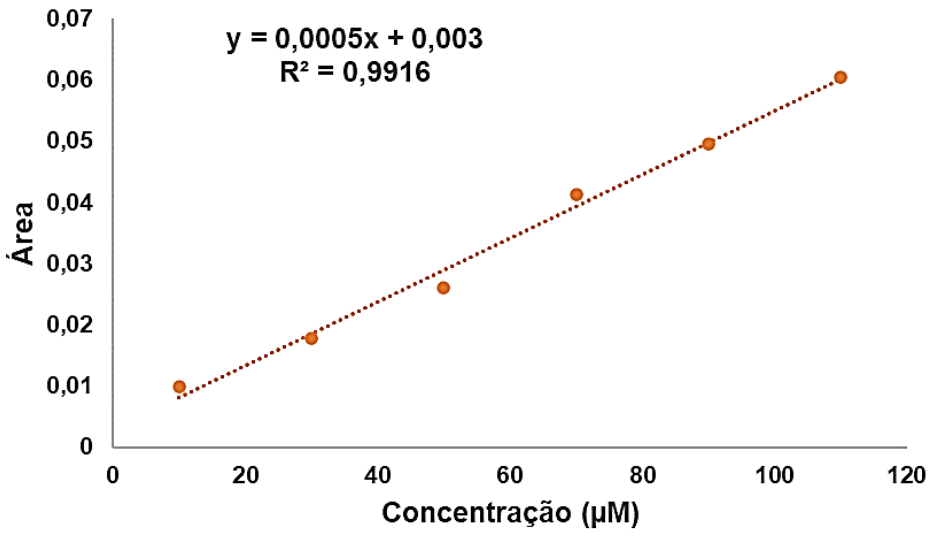

Figura 17. Curva de calibração 3 referente ao método para quantificação do AP em soluções provenientes dos ensaios de permeabilidade utilizando-se UPLC-MS/MS.

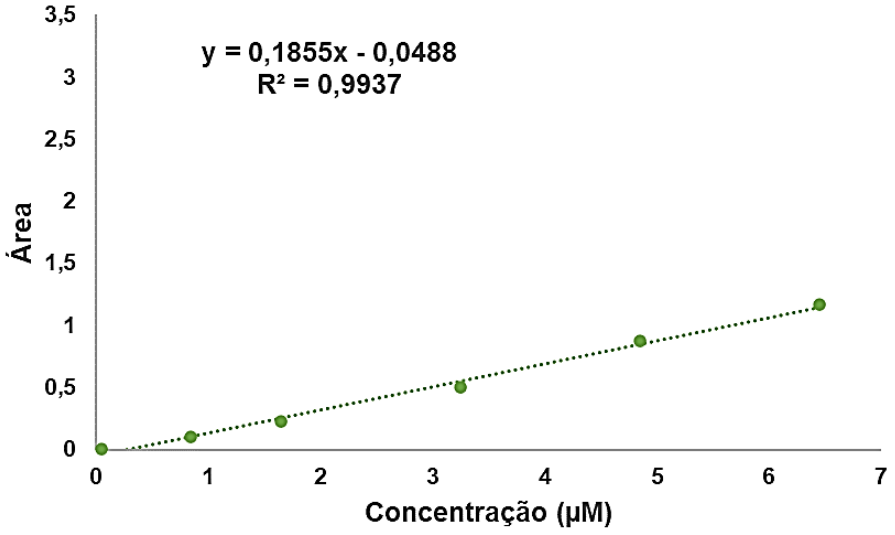

Figura 18. Curva de calibração referente ao método para quantificação do PROP em soluções provenientes dos ensaios de permeabilidade utilizando-se UPLC-MS/MS.

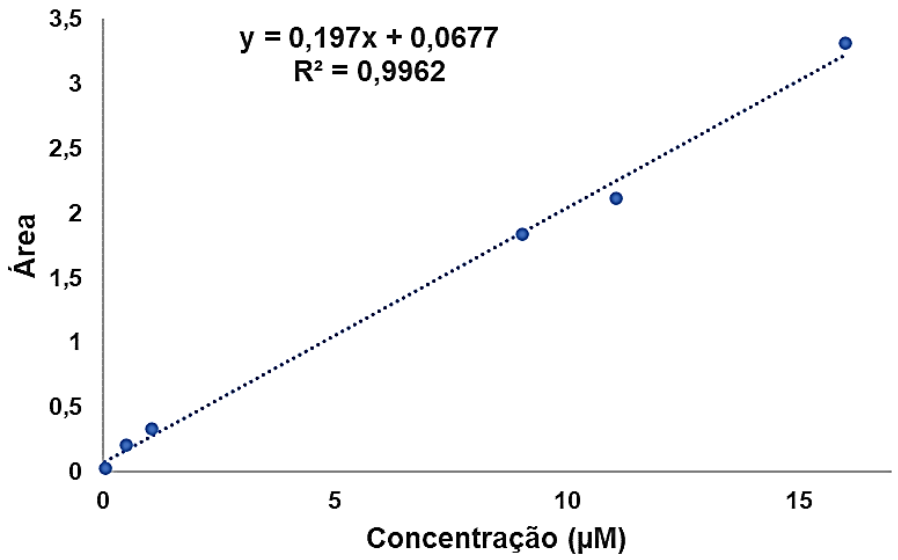

Figura 19. Curva de calibração referente ao método para quantificação do AT em soluções provenientes dos ensaios de permeabilidade utilizando-se UPLC-MS/MS.

Um R^2 maior que 0,99 é desejável, pois representa a evidência de um ajuste ideal dos dados, isto é, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais. Esse coeficiente corresponde a um importante parâmetro: a linearidade, que demonstra que o método é capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em teste, dentro de uma pré-determinada faixa de aplicação (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

O conteúdo dos compartimentos apical/basolateral e membranas de polietileno, após o tempo de exposição dos experimentos, foram coletadas e submetidas ao seus respectivos preparos das amostras para prosseguir a quantificação do diterpeno e substâncias controles, utilizando-se as equações da reta supracitadas. Para os ensaios de permeabilidade, o tempo de exposição do diterpeno frente às células foi definido em 4 h, já que o tempo de trânsito no intestino delgado varia de 2 a 5 h (KARARLI, 1995; LOZOYA-AGULLO et al., 2015), bem como pelo fato de que fármacos administrados por via oral permanecerem no intestino delgado por 4 h (PANDIT, 2007).

Os valores de permeabilidade aparente (P_{app}) obtidos estão descritos nas Tabelas 8 e 9. P_{app} menor do que 2×10^{-6} cm/s indica pobre absorção (exemplo P_{app} AT, fármaco

controle de baixa permeabilidade = 0,25 x 10^{-6} cm/s), valores de P_{app} entre 2 e 10 x 10^{-6} cm/s indicam absorção moderada e valores maiores de 10 x 10^{-6} cm/s (exemplo P_{app} PROP, fármaco controle de alta permeabilidade = 1,0 x 10^{-5} cm/s) indicam a ocorrência de alta absorção através dos enterócitos (FLYNN; VOHRA, 2018; JEONG et al., 2007).

Considerando essa classificação, o AP apresentou permeabilidade moderada através dos enterócitos em todas as condições de cultivo avaliadas, não ocorrendo transporte reverso. P_{app} do AP no experimento sob agitação (2,83 ± 0,58 x 10^{-6} cm/s) apresentou diferença significativa em relação ao experimento sem agitação, já os valores obtidos nos experimentos de cocultivo não foram estatisticamente significativos em relação ao experimento sem agitação (Figura 20).

PROP, fármaco controle de alta permeabilidade, apresentou P_{app} condizente com a classificação no ensaio sem agitação, indicando a ocorrência de alta taxa de permeabilidade e transporte reverso moderado, como pode ser observado na Tabela 7. Porém, quando exposto sob agitação, a P_{app} diminuiu para permeabilidade moderada (4,49 ± 0,24 x 10^{-6} cm/s), mantendo-se o transporte reverso moderado. Em relação ao modelo de cocultivo, essa molécula altamente permeável teve o transporte intestinal diminuído, passando a ser classificada como moderadamente permeável (P_{app} – cocultivo com *L. fermentum* 2,42 ± 0,07 x 10^{-6}) e (P_{app} – cocultivo com debris celulares 5,14 ± 2,85 x 10^{-6}).

Foi reportado na literatura uma relação inversa entre a RET e a permeabilidade intestinal. Por exemplo, no estudo de Behrens et al. (2004), a diminuição na P_{app} do FD-4, um composto amplamente utilizado como marcador de permeabilidade paracelular, foi associada ao aumento da RET em células do tipo clone da ATCC. Isso pode explicar a ocorrência da diminuição da permeabilidade intestinal no modelo de cocultivo, já que probióticos como *L. fermentum* aumentam significativamente a integridade da barreira epitelial intestinal, promovendo um aumento da RET como demonstrado nos dados supracitados (Figura 14).

Curiosamente, em se tratando do transporte secretório do PROP (Figura 21), os valores de P_{app} aumentaram nos ensaios utilizando o cocultivo bacteriano (P_{app} – cocultivo com *L. fermentum* 1,30 ± 0,17 x 10^{-5}) e (P_{app} – cocultivo com debris celulares

3,31 ± 1,51 x 10^{-5}) (Tabela 8). Investigações futuras devem ser realizadas para entender molecularmente qual a influência do cocultivo no transporte secretório.

Tabela 8 - P_{app} em cm/s do diterpeno e substâncias controles nos experimentos com e sem agitação que avaliam a permeabilidade das amostras para o compartimento basolateral, ou seja, no sentido de A-B, e o transporte reverso para o compartimento apical, ou seja, no sentido de B-A.

Substâncias	*Permeabilidade Aparente (cm/s)			
	sem agitação		sob agitação	
	A-B	B-A	A-B	B-A
AP	9,11 ± 1,24 (x 10^{-6})	-	2,83 ± 0,58 (x 10^{-6})	-
PROP	1,19 ± 0,15 (x 10^{-5})	9,45 ± 1,16 (x 10^{-6})	4,49 ± 0,60 (x 10^{-6})	9,51 ± 0,62 (x 10^{-6})
AT	-	-	-	-

- não foi possível calcular; *cada resultado representa a média ± desvio padrão.

Tabela 9 - P_{app} em cm/s do diterpeno e substâncias controles nos experimentos de cocultivo que avaliam a permeabilidade das amostras para o compartimento basolateral, ou seja, no sentido de A-B, e o transporte reverso para o compartimento apical, ou seja, no sentido de B-A.

Substâncias	*Permeabilidade Aparente (cm/s)			
	com *L. fermentum*		com debris celulares	
	A-B	B-A	A-B	B-A
AP	7,74 ± 0,92 (x 10^{-6})	-	9,20 ± 0,85 (x 10^{-6})	-
PROP	2,42 ± 0,07 (x 10^{-6})	1,30 ± 0,17 (x 10^{-5})	5,14 ± 2,85 (x 10^{-6})	3,31 ± 1,51 (x 10^{-5})
AT	-	-	-	-

- não foi possível calcular; *Cada resultado representa a média ± desvio padrão.

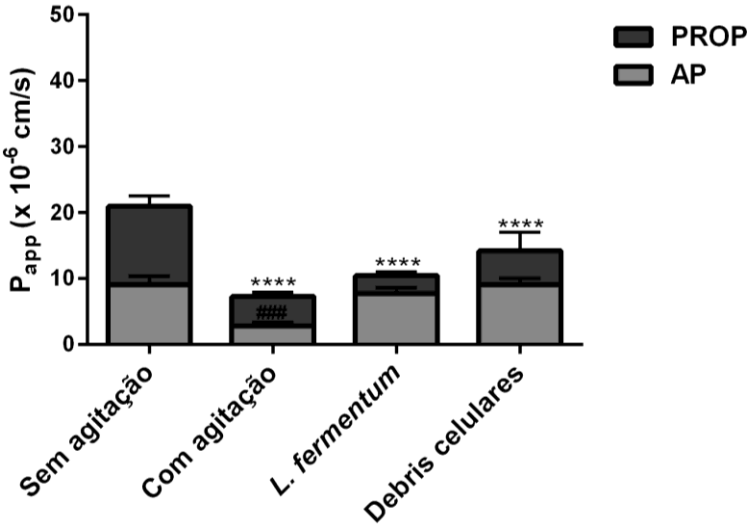

Figura 20. P_{app} do diterpeno e PROP nos experimentos que avaliam a permeabilidade das amostras para o compartimento basolateral, ou seja, no sentido de A-B. Cada resultado representa a média ± desvio padrão de uma triplicata. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. Os valores com * ou # indicam que as P_{app} tendem a ser significativamente menores do que a P_{app} do experimento sem agitação, onde **** e #### ($p < 0,0001$).

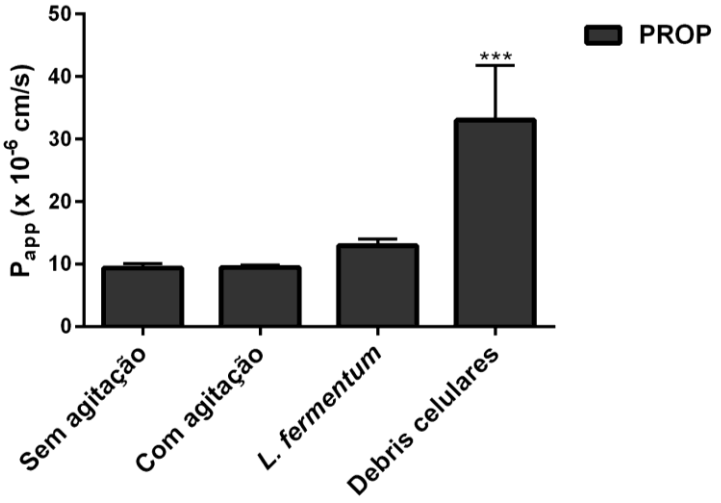

Figura 21. P_{app} do fármaco controle PROP nos experimentos que avaliam o transporte reverso para o compartimento apical, ou seja, no sentido de B-A. Cada resultado representa a média ± desvio padrão de uma triplicata. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. O valor com * indica a P_{app} tende a ser significativamente maior do que a P_{app} do experimento sem agitação, onde *** ($p < 0,001$).

Foi reportado um aumento da P_{app} do PROP com o aumento da taxa de agitação: 5,88 ± 1,7 x 10^{-5} cm/s a 135 rpm, e 9,01 ± 5,9 x 10^{-5} cm/s a 1090 rpm (KARLSSON; ARTURSSON, 1991). Outros experimentos realizados com outras moléculas demonstraram a mesma tendência de aumento da permeabilidade sob agitação, como por exemplo, no trabalho realizado com a imipramina e clorpromazina, fármacos altamente lipofílicos, que foram encontrados no compartimento celular de células Caco-2 em quantidade 1,5 vezes maior sob agitação mecânica (KONO; KONISHI; FUJITA, 2019). Kono et al. (2016) também realizaram experimentos de permeabilidade usando Transwells™, demonstrando que a agitação mecânica aumentou a captação de complexos catiônicos de lipossoma/pDNA pelas células Caco-2, no entanto, não houve transporte desses complexos através da monocamada de células, algo que já era esperado, pois seria necessário modificar as propriedades físico-químicas dos lipossomas. Vale ressaltar que esses estudos citados foram realizados com técnicas de agitação diferentes desse trabalho.

Em geral, considera-se que o incremento de agitação no sistema experimental reduz a camada de água não agitada, aumentando o transporte intestinal de substâncias altamente permeáveis, lipofílicas e/ou transportadas ativamente por transportadores, as quais podem ser afetadas pela presença dessa camada (NARUHASHI et al., 2003).

No entanto, no estudo de Ogihara e Tsuji (1998), ao comparar duas substâncias que possuem formas diferentes de transporte, constatou que o comportamento sob agitação também pode ser diferente, pois o transporte passivo de antipirina através das células Caco-2 aumentou com o aumento da taxa de agitação, já o transporte de ácido L-láctico, que segue um mecanismo de transporte mediado por carreador, diminuiu com o aumento da taxa de agitação.

Hoje sabe-se que o transporte passivo é resultante da combinação de difusão através da monocamada e da camada de água não agitada em ambos os lados da membrana (VOLPE, 2008). A dissolução e permeação do fármaco (ou candidato à fármaco) são dois estágios fundamentais para a molécula atingir a circulação sistêmica; consequentemente, a solubilidade e a permeabilidade intestinal são propriedades biofarmacêuticas determinantes na fase de desenvolvimento de medicamentos (MANGAS-SANJUAN et al., 2014), sendo que, a exposição sistêmica da molécula

depende de muitos fatores diferentes, entre eles, as propriedades físico-químicas são extremamente importantes e determinantes da permeabilidade e solubilidade (BALIMANE, CHONG, MORRISON; 2000).

Essas propriedades foram elencadas, de maneira pioneira, em um estudo com um conjunto de dados de 2245 fármacos coletados do *World Drug*, no qual foi proposto que candidatos a fármacos apresentariam absorção e permeabilidade baixas se infringissem duas das seguintes propriedades: peso molecular (MW) > 500 Da; número de doadores de hidrogênio (HBD) > 5; número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) > 10; e coeficiente de partição octanol/água (LogP) > 5 (LIPINSKI et al., 2001). Além disso, essas regras foram reforçadas por pesquisadores que descreveram outros parâmetros que também são importantes, como o número de ligações rotacionáveis (NROTB), que deve ser menor ou igual a 10, pois a flexibilidade da molécula é importante para a passagem através das membranas. Outra importante inclusão foi o reconhecimento de que a área de superfície polar (TPSA) também é determinante e pode ser utilizada para filtrar compostos mal absorvidos no estágio inicial do processo de descoberta de novos fármacos. O valor considerado ideal é TPSA ≤ 140 Å² (VEBER et al., 2002).

De acordo com valores obtidos a partir do programa Molinspiration, que oferece serviços online gratuitos para o cálculo dessas propriedades moleculares, o AP e os compostos utilizados como controles do ensaio de permeabilidade intestinal se encaixam dentro de todos os parâmetros físico-químicos considerados ideais para apresentar uma boa permeabilidade (Tabela 10).

Tabela 10 - Propriedades moleculares obtidas através do programa Molinspiration.

Substâncias	**Propriedades moleculares**						**Infringiu as regras?**
	MW	HBD	HBA	LogP	NROTB	TPSA	
AP	316,44	1	3	4,69	4	50,44	Não
PROP	259,35	2	3	2,97	6	41.49	Não
AT	266.34	4	5	0.72	8	84.58	Não

MW: peso molecular; HBD: número de doadores de H (incluem grupos OH e NH); HBA: número de aceptores de ligação de H (incluem átomos de O e N); Log P: é baseado no coeficiente de partição octanol-água; NROTB: número de ligações rotacionáveis e TPSA: área de superfície polar.

Com relação ao controle de baixa permeabilidade, AT, não foi possível calcular a P_{app} devido à baixa porcentagem de recuperação, o que sugere que não houve permeação dessa substância através dos enterócitos. Já as porcentagens de recuperação do AP e do PROP corroboram com os dados apresentados, indicando moderada permeabilidade do AP, e ausência de transporte reverso (Figuras 22 a 25).

Embora os parâmetros físico-químicos sejam utilizados para predizer a permeabilidade de substâncias, eles são frequentemente limitados por não levar em consideração as interações com a membrana ou outros fatores fisiológicos que podem substituir completamente as propriedades físico-químicas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000). Isso fica bastante evidente com os dados acerca das três substâncias envolvidas neste estudo, pois, ambas, não infringem a regra dos 5, mas possuem permeabilidades completamente distintas.

Moléculas hidrofílicas, contendo muitas frações doadoras ou aceitadoras de ligações de hidrogênio, presença de uma fração carregada ou grande área de superfície polar, podem não permear as membranas celulares lipofílicas, sendo transportadas, geralmente, através da via paracelular, apresentando baixos valores de permeabilidade devido às limitações como a área de superfície relativamente baixa e passagem restrita através das junções estreitas (TIPPIN; THAKKER, 2008). Essas informações corroboram com os dados fisico-químicos do AT, que apesar de não infrigir a regra dos 5, é um fármaco hidrofílico.

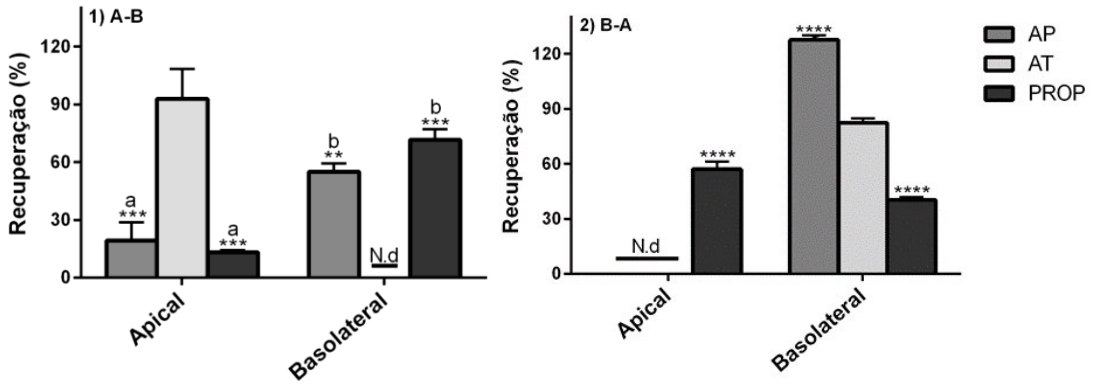

Figura 22. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade

intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas **sem agitação**. Os valores representam o que foi recuperado após adição do AP (12,5 µM), do PROP (5 µM) e AT (10 µM) no 1) compartimento apical (ensaio no sentido A-B), e 2) adição no compartimento basolateral (ensaio no sentido B-A). Cada resultado representa a média ± desvio padrão de uma triplicata. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. (N.d) corresponde a substância não detectada. As letras iguais indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens. Os valores com * indicam valores significativamente diferentes do que o controle de baixa permeabilidade AT, onde **** ($p < 0,0001$), *** ($p < 0,001$) e ** ($p < 0,05$).

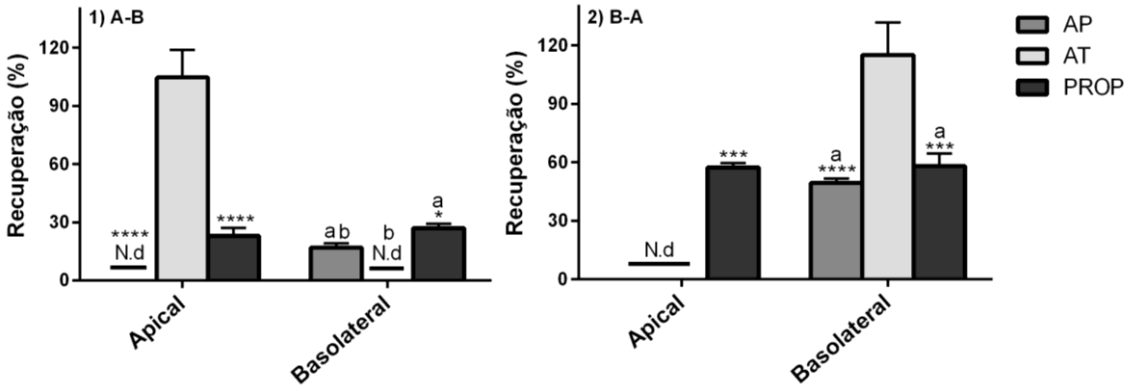

Figura 23. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas **com agitação**. Os valores representam o que foi recuperado após adição do AP (12,5 µM), do PROP (5 µM) e AT (10 µM) no 1) compartimento apical (ensaio no sentido A-B), e 2) adição no compartimento basolateral (ensaio no sentido B-A). Cada resultado representa a média ± desvio padrão de uma triplicata. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. (N.d) corresponde a substância não detectada. As letras iguais indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens. Os valores com * indicam valores significativamente diferentes do que o controle de baixa permeabilidade AT, onde **** ($p < 0,0001$), *** ($p < 0,001$), ** e * ($p < 0,05$).

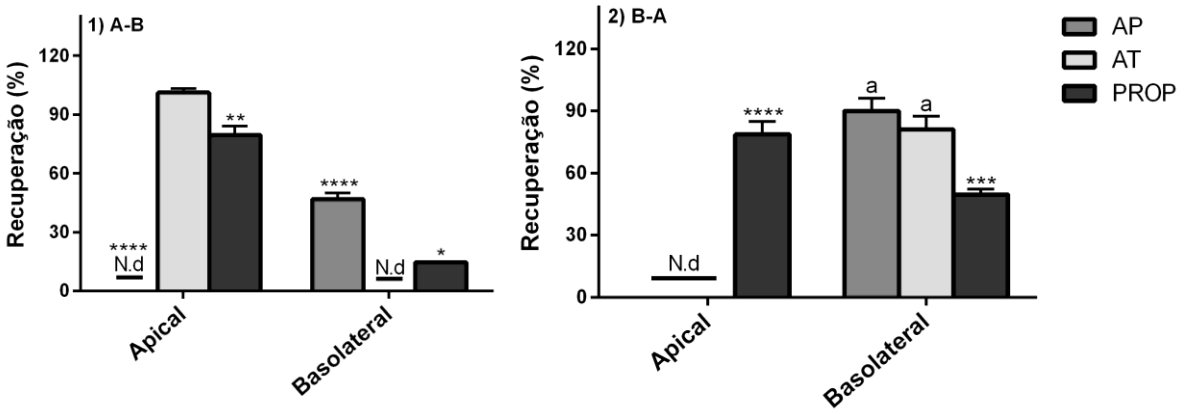

Figura 24. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas **com células bacterianas de *L. fermentum***. Os valores representam o que foi recuperado após adição do AP (12,5 µM), do PROP (5 µM) e AT (10 µM) no 1) compartimento apical (ensaio no sentido A-B), e 2) adição no compartimento basolateral (ensaio no sentido B-A). Cada resultado representa a média ± desvio padrão de uma triplicata. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. (N.d) corresponde a substância não detectada. As letras iguais indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens. Os valores com * indicam valores significativamente diferentes do que o controle de baixa permeabilidade AT, onde **** ($p < 0,0001$), *** ($p < 0,001$), ** e * ($p < 0,05$).

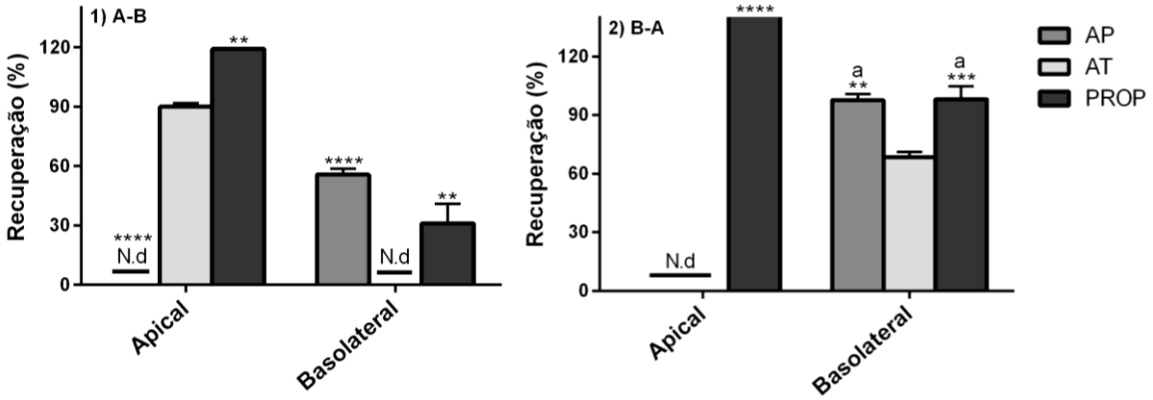

Figura 25. Porcentagens do diterpeno AP e dos controles (AT e PROP) recuperados nos compartimentos apical e basolateral após o experimento de permeabilidade intestinal em células Caco-2 organizadas em monocamadas **com debris celulares de *L. fermentum***. Os valores representam o que foi recuperado após adição do AP (12,5 µM), do PROP (5 µM) e AT (10 µM) no 1) compartimento apical (ensaio no sentido A-B), e 2) adição no compartimento basolateral (ensaio no sentido B-A).

Cada resultado representa a média ± desvio padrão de uma triplicata. Os dados foram tratados com Anova de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. (N.d) corresponde a substância não detectada. As letras iguais indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens. Os valores com * indicam valores significativamente diferentes do que o controle de baixa permeabilidade AT, onde **** ($p < 0,0001$), *** ($p < 0,001$), ** e * ($p < 0,05$).

Em relação ao compartimento celular, curiosamente, não foi possível quantificar nenhum dos compostos avaliados, e isso se deve a baixa taxa de recuperação. Considerando que os valores de recuperação de aguns experimentos, quando somados não resultam em 100 %, pode-se inferir que possa estar ocorrendo a metabolização das substâncias. Essa hipótese é sustentada pela detecção de um pico adicional (tempo de retenção de 5,49 min) nos cromatogramas obtidos dos compartimentos celulares (Figura 26), que pode se tratar de um metabólito.

Os cromatogramas das amostras do compartimento apical provenientes do ensaio com células bacterianas também apresentaram esse pico. Nos cromatogramas obtidos dos compartimentos apical e basolateral dos demais ensaios de permeabilidade (Figura 27) há somente o pico referente ao AP (tempo de retenção de 7,87 min). Estudos futuros devem ser realizados para confirmar essa hipótese e, possivelmente, elucidar a estrutura química, pois as células diferenciadas expressam enzimas digestivas e proteínas de transporte presentes no intestino delgado humano, possibilitando que o metabolismo seja investigado (HOCHMAN et al., 2000; MEUNIER et al., 1995; STOCKDALE et al., 2019).

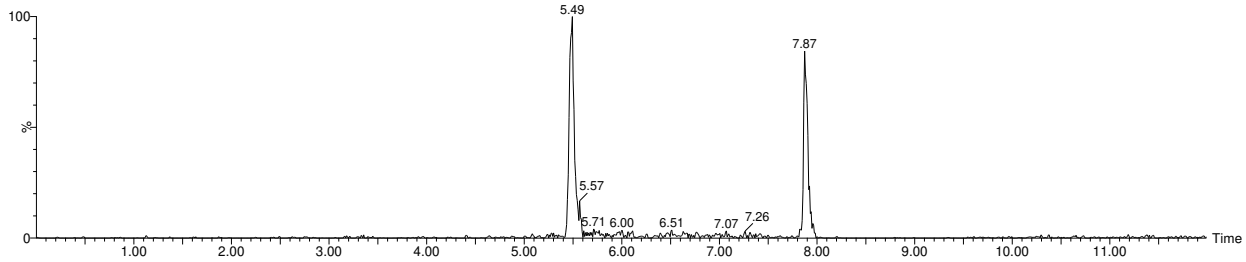

Figura 26. Cromatograma obtido por CLUE-MS/MS para AP proveniente de amostra do compartimento celular, tempo de retenção de 7,87 min. MRM ES-; 315,2 > 205,2.

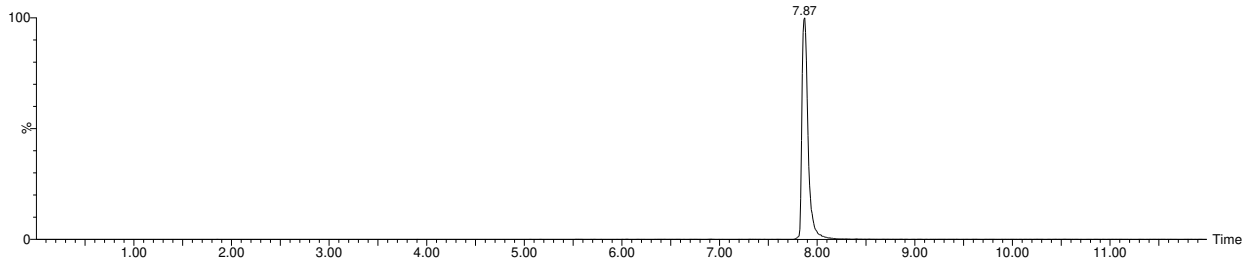

Figura 27. Cromatograma obtido por CLUE-MS/MS para AP proveniente de amostra do compartimento basolateral, tempo de retenção de 7,87 min. MRM ES-; 315,2 > 205,2.

5. CONCLUSÕES

A concentração do diterpeno AP selecionada para a realização dos ensaios de permeabilidade intestinal foi 12,5 µM, pois não foi citotóxica para as células Caco-2 no ensaio de liberação da enzima LDH.

A monocamada de células Caco-2 manteve-se íntegra durante a realização dos experimentos, apresentado valores de RET acima de 300 Ω . cm^2.

O AP apresentou permeabilidade moderada através dos enterócitos nas condições de cultivo com e sem agitação do sistema. P_{app} do AP no experimento sob agitação (2,83 ± 0,58 x 10^{-6} cm/s) apresentou diferença significativa em relação ao experimento sem agitação. Não ocorreu transporte reverso.

Em relação à padronização do cocultivo entre as células Caco-2 e a bactéria probiótica *L. fermentum*, o meio HBSS acrescido de 10 mM de MES apresentou um pH muito baixo, já o meio DMEM sem antibióticos e sem SBF manteve-se em um pH aceitável para a manutenção das células Caco-2 e células bacterianas, sendo esse, portanto, selecionado para o cocultivo.

A concentração 12,5 µM de AP não afetou o crescimento da bactéria *L. fermentum* no ensaio de determinação da concentração inibitória mínima realizado pelo método de microdiluição em caldo.

Quando as células Caco-2 foram submetidas ao cocultivo com *L. fermentum* por 24 h, houve um aumento da RET, e esse aumento foi estatisticamente significativo em

relação ao valor registrado antes da adição das células bacterianas, demostrando que a presença do probiótico fortalece as propriedades da monocamada celular.

Considerando essa influência sobre a membrana, achava-se que a permeabilidade do AP sob cocultivo diminuiria bastante em relação às demais variações de cultivo, mas não houve diferença significativa entre elas, exceto para o experimento com agitação. O PROP, composto altamente permeável, apresentou diminuição do transporte intestinal, sendo classificado como moderadamente permeável sob o cocultivo com *L. fermentum,* e também com a adição de agitação ao sistema. Entretanto, o transporte secretório do PROP aumentou com a presença da bactéria no modelo experiental de cocultivo.

Esses achados permitem classificar o AP como um composto moderadamente permeável, e demonstram que as condições de cultivo podem influenciar as propriedades de barreira da monocamada Caco-2, bem como a permeabilidade do AP.

6. REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. et al. Antibacterial effect of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

AKIYAMA, T.; OISHI, K.; WULLAERT, A. *Bifidobacteria* Prevent Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Subsequent Barrier Disruption in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Monolayers. **Plos One**, v. 11, p. 1–14, 2016.

ARRUDA, C. et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus - A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1–20, 2019.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predicitions in drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 280-289, 2012.

ASLANTÜRK, Ö. S. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. **Intech**, p. 1–19, 2018.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and**

Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BARBOSA, A.L.P. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94–100, 2019.

BEHRENS, I. et al. Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 7, p. 1743–1754, 2004.

BEHRENS, I.; KISSEL, T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 5, p. 433–442, 2003.

BEISL, J. et al. Assessing Mixture Effects of Cereulide and Deoxynivalenol on Intestinal Barrier Integrity and Uptake in Differentiated Human Caco-2 Cells. **Toxins**, v. 13, n. 3, 2021.

BHATHENA, J. et al. Effect of Orally Administered Microencapsulated FA-Producing *L. fermentum* on Markers of Metabolic Syndrome: An *In vivo* Analysis. **Journal of Diabetes and Metabolism**, p. 1–9, 2012.

BORGES, C. H. G. et al. *Copaifera duckei* oleoresin and its main non volatile terpenes: *in vitro* schistosomicidal properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 10, p. 1348–1356, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS** – RENISUS. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf > Acesso em 21 set. 2020.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BUUR, A.; MARK, N. **Metabolism of Testosterone During in Vitro Transport Across CACO-2 Cell Monolayers**: Evidence for β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Differentiated CACO-2 Cells, 1992.

CARNEIRO, L. J. et al. Development and Validation of a Rapid and Reliable RP-HPLC-PDA Method for the Quantification of Six Diterpenes in *Copaifera duckei*, *Copaifera reticulata* and *Copaifera multijuga* Oleoresins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 729–737, 2018.

CARVALHO, J. C. T. **Composição farmacêutica a base de óleo de copaíba padronizado (Copaifera ssp) para tratamento de afecções ginecológicas**. Farmácia e Laboratório Homeopático Almeida Prado LTDA. Procurador: Francisco Celso Nogueira Rodrigues. BR nº PI 1004276-8 A2. Depósito: 15 jul. 2010. Concessão: 10 abr. 2012. Disponível em: < https://www.escavador.com/patentes/259863/composicao-

farmaceutica-a-base-de-oleo-de-copaiba-padronizado-copaifera>. Acesso em: 24 abr. 2020.

ÇELIK UZUNER, S. Development of a Direct Trypan Blue Exclusion Method to Detect Cell Viability of Adherent Cells into ELISA Plates. **Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, v. 14, n. 1, p. 99–104, 2018.

CERVANTES, B. et al. Cytotoxicity evaluation of anatase and rutile TiO2 thin films on CHO-K1 cells *in vitro*. **Materials**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 2016.

CHEN, X.; SINGH, A.; KITTS, D. D. *In-vitro* bioaccessibility and bioavailability of heavy metals in mineral clay complex used in natural health products. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

CHIBAS, L. C. et al. Polyalthic Acid in Polymeric Nanoparticles Causes Selective Growth Inhibition and Genotoxicity in MCF-7 Cells. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 4, 2019.

ÇIÇEK, S. S. et al. Biological Activities of Two Major Copaiba Diterpenoids and Their Semi-synthetic Derivatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 1, p. 18–27, 2020.

COCETTA, V. et al. A Fixed Combination of Probiotics and Herbal Extracts Attenuates Intestinal Barrier Dysfunction from Inflammatory Stress in an. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 10, p. 62–69, 2019.

DA SILVA, J. J. M. et al. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 81–90, 2017.

ĐANIĆ, M. et al. PAMPA model of gliclazide permeability: The impact of probiotic bacteria and bile acids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 158, 2021.

FLYNN, T.J.; VOHRA, S.N. Simultaneous determination of intestinal permeability and potential drug interactions of complex mixtures using Caco-2 cells and high-resolution mass spectrometry: Studies with *Rauwolfia serpentina* extract. **Chemico-Biological Interactions**, v. 290, p.37-43, 2018.

FRESHNEY, R.I. Capítulo 1: **Princípios Básicos de cultura de células**. Em cultura de células para engenharia de tecidos; Vunjak-Novakovic, G., Freshney, RI, Eds; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, EUA, 2006; pp. 3-22.

GARCÍA-TAPIA, M. et al. Effects of polyalthic acid from *Croton reflexifolius* on viability of cancerous cells. **International Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 286–291, 2017.

GRUBE, S.; WOLFRUM, U.; LANGGUTH, P. Characterization of the epithelial permeation enhancing effect of basic butylated methacrylate copolymer - *In vitro* studies. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 5, p. 1398–1405, 2008.

GUO, S. et al. Secretions of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* Protect Intestinal Epithelial Barrier Function. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 64, p. 404–412, 2017.

HAGESAETHER, E. et al. Mucus can change the permeation rank order of drug candidates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, n. 1–2, p. 276–282, 2013.

HOCHMAN, J. H. et al. Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, n. 1, p. 310–318, 2000.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E.G.E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers, **Nature Protocols**, v. 2, p. 2111–2119, 2007.

JAHANGIRI, L.; ESTEBAN, M. A. Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: a review. **Fishes**, v. 3, p. 1–13, 2018.

JEONG, D.W. et al. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 28, p. 51-57, 2007.

KAHOULI, I. et al. Identification of *Lactobacillus fermentum* Strains with Potential against Colorectal Cancer by Characterizing Short Chain Fatty Acids Production, Anti-Proliferative Activity and Survival in an Intestinal Fluid: *in vitro* analysis. **Bioanalysis & Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 104–115, 2015.

KARARLI, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 16, p. 351–380, 1995.

KARLSSON, J.; ARTURSSON, P. A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 71, n. 1–2, p. 55–64, 1991.

KIM, J.-K. et al. Effect of probiotics on pharmacokinetics of orally administered acetaminophen in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 46, n. 2, p. 122–130, 2017.

KONO, Y. et al. Effect of mechanical agitation on cationic liposome transport across an unstirred water layer in Caco-2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 8, p. 1293–1299, 2016.

KONO, Y.; KONISHI, S.; FUJITA, T. An openable artificial intestinal tract system enables the evaluation of drug absorption in Caco-2 cells through the reduction in thickness of the unstirred water layer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 5, p. 840–844, 2019.

KORJAMO, T. et al. The Asymmetry of the Unstirred Water Layer in Permeability Experiments. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1714–1722, 2008.

KUHFELD, M. T.; STRATFORD, R. E. *In vitro* measurement of drug transport using a new diffusion chamber compatible with Millicell® culture supports: Performance with caco-2 monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 133, n. 1–2, p. 47–58, 1996.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866–3889, 2012.

LECHANTEUR, A.; ALMEIDA, A.; SARMENTO, B. Elucidation of the impact of cell culture conditions of Caco-2 cell monolayer on barrier integrity and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 137–141, 2017.

LEONARD, W. et al. Enhanced Lignanamide Absorption and Antioxidative Effect of Extruded Hempseed (*Cannabis sativa* L.) Hull in Caco-2 Intestinal Cell Culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 69, p. 11259−11271, 2021.

LI, F. et al. Polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. alleviates nonylphenol induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in human Caco-2 cell line. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2134–2140, 2020a.

LI, X. et al. Gut microbiota as an “invisible organ” that modulates the function of drugs. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 121, 2020b.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LIU, J. Y. et al. Intestinal absorption and bioavailability of traditional Chinese medicines: a review of recent experimental progress and implication for quality control. **Journal of Pharmacy And Pharmacology**, v. 65, p. 621–633, 2013.

LOPES, A. R. **Produção de ácido lático em diferentes meios de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

LOZOYA-AGULLO, I. et al. *In Situ* Perfusion Model in Rat Colon for Drug Absorption Studies: Comparison with Small Intestine and Caco-2 Cell Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 3136-3145, 2015.

MAITI, K. et al. Enhancing bioavailability and hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata*, a well-known medicinal food, through its herbosome. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 1, p. 43–51, 2010.

MANGAS-SANJUAN, V. et al. Modified nonsink equation for permeability estimation in

cell monolayers: Comparison with standard methods. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 1403–1414, 2014.

MATUSKOVA, Z. et al. Effect of *Lactobacillus casei* on the Pharmacokinetics of Amiodarone in Male Wistar Rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 29–36, 2016.

MEUNIER, V. et al. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 11, n. 3–4, p. 187–194, 1995.

MIYAZAWA, M. et al. Antimutagenic Activity of (+)-Polyalthic Acid from *Vitex rotundiforia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 3012–3015, 1995.

MIZUNO, C. S. et al. Synthesis and biological evaluation of polyalthic acid derivatives for the treatment of neglected diseases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 23, p. 5529–5531, 2015.

MOKKALA, K.; LAITINEN, K.; RÖYTIÖ, H. *Bifidobacterium lactis* 420 and fish oil enhance intestinal epithelial integrity in Caco-2 cells. **Nutrition Research**, v. 36, p. 246–252, 2016.

MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA|, M.R.R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2010.

Molinspiration Cheminformatics free web services, https://www.molinspiration.com, Slovensky Grob, Eslováquia. Disponível em: https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties. Acesso em: 15 jan. 2021.

NARUHASHI, K. et al. Experimental demonstration of the unstirred water layer effect on drug transport in Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 7, p. 1502–1508, 2003.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. NCCLS document M7-A10. Approved Standard— Tenth Edition, which describes standard broth dilution (macrodilution and microdilution) and agar dilution techniques for measuring the *in vitro* susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, 2015.

OGIHARA, T.; TSUJI, T. Application of fractal kinetics for carrier-mediated transport of drugs across intestinal epithelial membrane. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 620–625, 1998.

OHASHI, A. et al. Transcellular relocation of tetrahydrobiopterin across Caco-2 cells: a model study of tetrahydrobiopterin absorption through epithelial cells of intestinal mucosa. **Journal of Inherited Metabolic Dissease**, v. 32, p. 73–78, 2009.

PANDIT, N.K. **Introduction to the Pharmaceutical Sciences**, Lippincott Williams &

Wilkins, 2007.

PANICKER, A. S. et al. Evaluation of some *in vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* Strains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 2812–2818, 2018.

PETERS, R. J. Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 11, p. 1521–1530, 2010.

PINTO, M. et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p. 323–330, 1983.

PLEUVRY, B.J. Factors affecting drug absorption and distribution. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 6, p. 135-138, 2005.

REYES-TREJO, B. et al. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 7, p. 931–936, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRÍGUEZ-SILVERIO, J. et al. Evaluation of the antinociceptive, antiallodynic, antihyperalgesic and anti-inflammatory effect of polyalthic acid. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 1–15, 2021.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E. et al. Polyalthic acid isolated from *Croton reflexifolius* has relaxing effect in Guinea pig tracheal smooth muscle. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 10–11, p. 800–807, 2008.

SENEDESE, J. M. et al. Chemopreventive role of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in colon carcinogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 331–337, 2019.

SETTA, M. C.; MATEMU, A.; MBEGA, E. R. Potential of probiotics from fermented cereal-based beverages in improving health of poor people in Africa. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 11, p. 3935–3946, 2020.

SILVA, D. S. et al. N-(2-hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium, o-mysristoyl chitosan enhances the solubility and intestinal permeability of anticancer curcumin. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2018.

SILVA, D. S. et al. Self-aggregates of 3,6-O,O'-dimyristoylchitosan derivative are effective in enhancing the solubility and intestinal permeability of camptothecin. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, n. August, p. 178–186, 2017.

SOUSA, I. P. DE et al. New antifungal *ent*-labdane diterpenes against *Candida glabrata* produced by microbial transformation of *ent*-polyalthic acid. **Bioorganic Chemistry**, v. 95, n. 103560, 2020.

SRINIVASAN, B. et al. TEER Measurement Techniques for *In Vitro* Barrier Model Systems. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 2, p. 107–126, 2015.

STOCKDALE, T. P. et al. Caco-2 Monolayer Permeability and Stability of *Chamaelirium luteum* (False Unicorn) Open-Chain Steroidal Saponins. **ACS Omega**, v. 4, n. 4, p. 7658–7666, 2019.

TAMAI, I.; NAKANISHI, T. OATP transporter-mediated drug absorption and interaction. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 859-863, 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cell Culture Basics Handbook**, 2016.

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry**: an introduction. 2nd edition. John Wiley & Sons, 2007.

TINCUSI, B. M. et al. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera* 808. **Plant Medicine**, v. 68, p. 808–812, 2002.

TIPPIN, T. K.; THAKKER, D. R. Biorelevant Refinement of the Caco-2 Cell Culture Model to Assess Efficacy of Paracellular Permeability Enhancers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 5, p. 1977–1992, 2008.

TRAN, Q. T. N.; WONG, W. S. F.; CHAI, C. L. L. Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 124, p. 43–63, 2017.

TRINDADE, R.; SILVA, J. K. DA; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: a review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1–33, 2018.

TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 62–75, 2019.

UDE, V. C. et al. Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 14, p. 1-16, 2017.

VASIEE, A. et al. Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 5, p. 471–479, 2020.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2615-2623, 2002.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. The *Copaifera* L. genus. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VOLPE, D. A. Variability in Caco-2 and MDCK Cell-Based Intestinal Permeability Assays. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 2, p. 712–725, 2008.

WANG, M. et al. Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. **Food Chemistry**, v. 285, p. 260–265, 2019.

WANG, X. Semi-active adaptive optimal control of vehicle suspension with a magnetorheological damper based on policy iteration. Journal of Intelligent Material **Systems and Structures**, v. 29, p. 255–264, 2017.

WIERZBICKA, A. et al. Role of probiotics in modulating human gut microbiota populations and activities in patients with colorectal cancer - a systematic review of clinical trials. **Nutrients**, v. 13, n. 4, 2021.

WILS, P. et al. High Lipophilicity Decreases Drug Transport Across Intestinal Epithelial Cells. **The journal of pharmacology and Experimental therapeutics**, v. 269, n. 2, p. 654–658, 1994.

ZHANG, Y. et al. Study on the application of intestinal absorption *in vitro* coupled with bioactivity assessment in *Yuanhu zhitong* preparation. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 1941–1947, 2012.

ZHOU, S. et al. Transport of the investigational anti-cancer drug 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid and its acyl glucuronide by human intestinal Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 513-524, 2005.