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. **11**
Figura 1. Estrutura química do AP. **12**
Figura 3. Representação esquemática das células Caco-2 em modelo experimental *in vitro*. **14**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades biológicas do ácido poliáltico. **10**
Tabela 2 - Propriedades moleculares do AP. **12**
Tabela 3 - Artigos elencados e seus respectivos métodos utilizados para a agitação **15**

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 9
1.1 Oleorresina de Copaíba 9
1.2 Ácido *ent*-poliáltico 10
1.3 Permeabilidade intestinal – células Caco-2 12
1.4 Probióticos 16
2. CONCLUSÕES 18
3. REFERÊNCIAS 19

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).

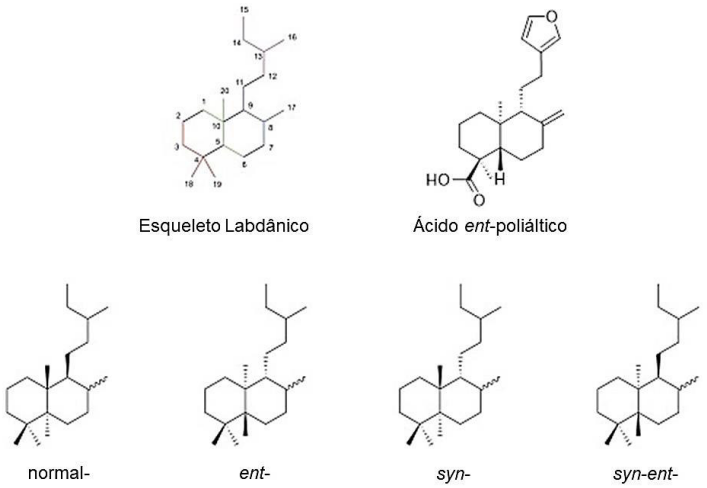

Figura 1. Variações na estereoquímica dos diterpenoides labdanos.
(Adaptado de Tran; Wong; Chai, 2017)

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.

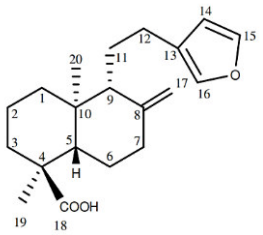

Figura 1. Estrutura química do AP.

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).

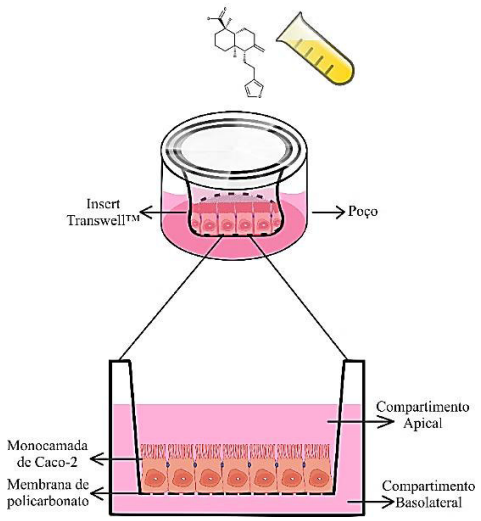

Figura 3. Representação esquemática das células Caco-2 em modelo experimental *in vitro*.

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. 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.

3. 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.