

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 21/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de disposição cinética do ácido copálico e do ácido
caurenóico: permeabilidade intestinal, fração livre e
metabolismo in vitro em microsomas hepáticos**

Orientanda: Mariana Mauro

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Coorientador: Dr. Michel Leandro de Campos

Araraquara-SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de disposição cinética do ácido copálico e do ácido
caurenóico: permeabilidade intestinal, fração livre e
metabolismo in vitro em microsomas hepáticos**

Orientanda: Mariana Mauro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Coorientador: Dr. Michel Leandro de Campos

Araraquara-SP

2020

M457e Mauro, Mariana.
Estudo de disposição cinética do ácido copálico e do ácido caurenóico: permeabilidade intestinal, fração livre e metabolismo in vitro em microsomas hepáticos / Mariana Mauro. – Araraquara: [S.n.], 2020.
135 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Natália Valadares de Moraes.
Coorientador: Michel Leandro de Campos.

1. Ácido copálico. 2. Acido caurenóico. 3. Caco-2. 4. Metabolismo in vitro. 5. Microsomas hepáticos. 6. Permeabilidade intestinal. I. Moraes, Natália Valadares de, orient. II. Campos, Michel Leandro de, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

Dedicatória

*Dedico este trabalho a todos aos quais me espelho,
em especial aos meus pais
Marisa Aparecida Dellalibera Mauro e José Mauro
e aos meus irmãos
Junior, Renato e Fabiana
por todo o apoio, carinho, amor, confiança
e por estarem ao meu lado nesta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora **Prof. Dr. Natália Valadares de Moraes** por ter confiado no meu trabalho, pela orientação neste trabalho, pela dedicação e por todos os ensinamentos que foram fundamentais para minha formação.

Ao meu coorientador **Dr. Michel Leandro de Campos** por transmitir seu conhecimento e contribuição nesse trabalho.

Obrigada ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes** por fornecer os compostos e auxílio financeiro utilizados nesse trabalho.

Agradeço a **Prof. Dr. Rosângela Gonçalves Peccinini** por todo o apoio e ensinamentos.

Aos Professores **Dr. André Gonzaga dos Santos, Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, Dr. Leandro Augusto Calixto, Dr. Marlus Chorilli e Dr. Marcelo Tadeu Marin** pela contribuição durante o exame geral de qualificação e a defesa de tese.

Aos funcionários do laboratório de toxicologia **Maria, Marcos e Vinicius** por todo auxílio e amizade.

Aos **funcionários** da biblioteca e da seção técnica de pós-graduação pelo atendimento de cada solicitação.

A todos os **professores** que tive durante minha formação, pelos ensinamentos e pelo exemplo de docência.

Aos amigos do grupo e da vida **Jhohann e Priscila** pela dedicação e amizade. Ao meu namorado **Rafael** e minha amiga **Fabiane** por todo apoio. E a todos que participaram dessa conquista.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela oportunidade e apoio financeiro – Código de Financiamento 001 e a FAPESP (Processo: 14/50265-3) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradeço à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP** e ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** pela infraestrutura e suporte, fundamentais para a realização desse trabalho e a todos que participaram desta etapa da minha vida.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”*

*Antoine de Saint-Exupéry.
O Pequeno Príncipe*

*“A força não provém da capacidade física.
Provém de uma vontade indomável.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) são diterpenos majoritários da oleorresina extraída do tronco de árvores do gênero *Copaifera* - as copaíbas. A utilização da oleorresina de copaíba na medicina popular é decorrente da sua atividade anti-inflamatória e antisséptica, sendo empregada principalmente no tratamento de bronquite, sífilis, doenças de pele e úlceras. Embora o potencial terapêutico do AC e AK tenha sido bem explorado, as propriedades farmacocinéticas desses diterpenos não foram bem descritas até o presente momento para dar suporte ao seu uso tradicional. Este estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades cinéticas do AC e AK utilizando ensaios que minimizam o uso de animais em pesquisa. A estabilidade dos diterpenos foi avaliada em plasma humano e em sistemas que simulam o pH dos fluidos estomacal (1,2) e intestinal (7,4). O coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) do AC e AK foi determinado por método cromatográfico. A permeabilidade intestinal foi avaliada em células Caco-2 na presença e na ausência do inibidor de glicoproteína-P (P-gp) verapamil. Ensaios de cinética enzimática foram realizados para AC e AK usando microssomas hepáticos de ratos (RLM) e humanos (HLM). Foram realizados ensaios para a identificação dos principais metabólitos dos diterpenos AC e AK. A fração de AC e AK livre no plasma em meio microssomal hepático foi determinada por ultracentrifugação. Os dados observados *in vitro* para os ensaios de cinética foram usados para prever o clearance hepático *in vivo* usando o modelo do fígado com distribuição homogênea. Os métodos analíticos e bioanalíticos compatíveis com análise de AC e AK nos ensaios ADMET foram desenvolvidos e validados usando LC-MS. No pH estomacal (tampão Clark-Lubs 0,2 M, pH 1,2) foi observada rápida degradação do AC e AK e em pH intestinal (tampão fosfato 0,1M, pH 7,4), foi observada estabilidade por até 6 h e 24 h para o AK e AC, respectivamente. No plasma humano AC e AK foram estáveis por até 24 e 12 h, a 37 °C. O AC e AK apresentaram permeabilidade aparente (P_{app}) moderada de $4,67 (\pm 0,08) \times 10^{-6}$ cm/s e $4,66 (\pm 0,04) \times 10^{-6}$ cm/s em células Caco-2, respectivamente. A incubação com verapamil mostrou que a glicoproteína-P não desempenha um papel relevante na absorção oral de AC e AK. A análise das relações entre a velocidade inicial do metabolismo e a concentração do substrato revelou desvios da cinética michaeliana e sugeriu cooperatividade positiva, com coeficiente de Hill > 1 . A fração livre em plasma determinada por ultracentrifugação foi de 0,47 - 0,53 para o AC e de 0,82 - 0,98 para AK. A razão de extração hepática (E) do AC foi estimada em 0,97 e indica extenso metabolismo a cada passagem do fármaco pelo fígado e elevada eliminação pre-sistêmica. Para o AK, os parâmetros de cinética enzimática não foram caracterizados no intervalo de concentrações avaliado. Os resultados desta tese poderão ser amplamente utilizados em estudos de transposição qualitativos e quantitativos dos dados experimentais para prever os fenômenos *in vivo* inerentes ao uso terapêutico do AC, AK ou da oleorresina de copaíba.

Palavras-chave: ácido copálico, ácido caurenóico, Caco-2, metabolismo *in vitro*, microssomas hepáticos, permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

Copalic (CA) and caurenoic (KA) acids are the major diterpenes of oleoresin extracted from the trunk of trees of the *Copaifera* genus - the copaibas. The use of copaiba oleoresin in folk medicine derives from its anti-inflammatory and antiseptic activity, being used mainly in the treatment of bronchitis, syphilis, skin diseases and ulcers. Although the therapeutic potential of CA and KA have been well explored, the pharmacokinetic properties of these diterpenes have not been well described to date to support their traditional use. This study aimed to characterize the kinetic properties of CA and KA using assays that minimize the use of animals in research. The stability of diterpenes was evaluated in human plasma and in systems that simulate the pH of stomachal (1.2) and intestinal (7.4) fluids. The octanol-water partition coefficient (Log P) of CA and KA was determined by the chromatographic method. Intestinal permeability was assessed in Caco-2 cells in the presence and absence of the P-glycoprotein (P-gp) inhibitor verapamil. Enzymatic kinetic assays were performed for CA and KA using rat (RLM) and human (HLM) liver microsomes. Assays were carried out to identify the main metabolites of CA and KA diterpenes. The unbound fraction of CA and KA in plasma and in liver microsomes media was determined by ultracentrifugation. Observed in vitro data from kinetics assays were used to predict the hepatic clearance in vivo using the well-stirred liver model. Analytical and bioanalytical methods compatible with CA and KA analysis in ADMET assays were developed and validated using LC-MS. At stomachal pH (0.2 M Clark-Lubs buffer, pH 1.2) rapid degradation of CA and KA was observed and at intestinal pH (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4), the stability was observed for up to 6 hours and 24 hours for KA and CA, respectively. In human plasma CA and KA were stable for up to 24 and 12 hours at 37 °C. The CA and KA showed moderate apparent permeability (P_{app}) of $4.67 (\pm 0.08) \times 10^{-6}$ cm/s and $4.66 (\pm 0.04) \times 10^{-6}$ cm/s in Caco-2 cells, respectively. Incubation with verapamil showed that P-glycoprotein does not play a relevant role in oral absorption of CA and KA. The analysis of the relationships between basal metabolism rate and substrate concentration revealed deviations from the Michaelian kinetics and suggested positive cooperativity, with Hill coefficient > 1. The unbound fraction in plasma determined by ultracentrifugation was 0.47 - 0.53 for CA and 0.82 - 0.98 for KA. The hepatic extraction ratio (E) of the CA was estimated at 0.97 and indicates extensive metabolism with each passage of the drug through the liver and high pre-systemic elimination. For KA, the parameters of enzymatic kinetics were not characterized in the range of concentrations evaluated. The results of this project can be widely used in qualitative and quantitative transposition studies of experimental data to predict the in vivo phenomena related to the therapeutic use of CA, KA or copaiba oleoresin.

Keywords: copalic acid, cauroenoic acid, Caco-2, metabolism in vitro, hepatic microsomes, intestinal permeability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais diterpenos encontrados em oleorresina extraída das espécies do gênero *Copaifera* sp. **Fonte:** Próprio autor **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2.** Gráfico representativo da reação enzimática segundo o modelo de Michaelis-Menten. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Gráfico representativo do plote de V_0 versus $[S]$ no modelo de Hill. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.** Gráficos de Eadie-Hofstee para uma cinética típica e cinética atípica. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5.** Procedimento de extração líquido-líquido dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Placa de 12 poços com inserto (ThinCert TM) utilizada para o cultivo de células Caco-2 por um período de 21 dias. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7.** Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) por LC-MS. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8.** Estudo da linearidade para o método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) por LC-MS. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9.** Estabilidade do ácido copálico (○) e do ácido caurenóico (■) em pH 1,2 (A) e 7,4 (B) a 37 °C. * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10.** Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11.** Estudo da linearidade para o método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) por LC-MS. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12.** Estabilidade dos compostos ácido caurenóico (■) e ácido copálico (○) em plasma (1 μ M) a 37 °C. * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13.** Curva analítica do ensaio de determinação de Log P. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 14. Viabilidade celular dos ácidos caurenóico (A) e copálico (B) em células Caco-2 após incubação a 37 °C por 24 horas, utilizando resazurina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 15. Fotomicrografia das células Caco-2 (BCRJ n°0059) utilizadas para avaliar a viabilidade celular. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 16. Monitoramento da integridade das membranas através dos valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos aos 10, 15 e 21 dias de cultivo das células Caco-2 nos insertos, em meio DMEM, pH 7,4. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 17. Metabolismo dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK), ambos a 0,5 µM em diferentes concentrações de proteína microssomais de ratos a 37 °C, pH 7,4, na presença e na ausência de NADPH. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18. Metabolismo in vitro utilizando microssomas hepático de ratos do ácido copálico (AC), ácido caurenóico (AK) e do controle diclofenaco (dicl). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19. Representação gráfica das curvas de Michaelis-Menten para a cinética enzimática dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) utilizando microssomas hepático de (A) ratos e (B) humanos (n=3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20. Plote de Eadie-Hofstee para o metabolismo in vitro do ácido copálico (gráficos A e C) e ácido caurenóico (gráficos B e D) em microssomas hepáticos de ratos (A e B) e em microssomas hepáticos humano (C e D). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21. Plote do clearance ($V_0/[S]$) em função da concentração para o metabolismo in vitro do ácido copálico (gráficos A e C) e ácido caurenóico (gráficos B e D) em microssomas hepáticos de ratos (A e B) e em microssomas hepáticos humano (C e D). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22. Cromatograma representativo do metabolismo in vitro do ácido caurenóico (AK) em microssomas hepáticos de ratos (RLM). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23. Espectro de massas do produto de metabolismo do ácido caurenóico (AK) em microssomas de fígado de ratos. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24. Cromatograma representativo do metabolismo in vitro do ácido caurenóico (AK) em microssomas hepáticos humano (HLM). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25. Espectro de massas do produto de metabolismo do ácido caurenóico (AK) em microssomas de fígado humano.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 26. Proposta de metabolismo do ácido caurenóico com formação do produto de dihidroxilado 16,17-dihidroxi-caurenóico.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 27. Cromatogramas superpostos referente às análises de uma amostra de metabolismo in vitro do AC com microssomas hepáticos de rato, uma amostra controle e uma amostra branca, extraídas com acetato de etila.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 28. Comparação dos espectros de massas de alta resolução obtidos por MS-ESI-Q-TOF no modo negativo dos produtos de metabolismo (Produto 2) do ácido copálico in vitro usando microssomas de fígado de ratos (A) e microssomas de fígado humano (B).....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 29. Espectro de massas (A) do metabólito do ácido copálico (AC) em 7,7 minutos, m/z 327 e sua fragmentação (B) por LC-ESI-IT-MS, no modo ion negativo.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das atividades biológicas do ácido copálico (AC), ácido caurenóico (AK) e do óleo de copaíba descritas na literatura.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3. Substâncias utilizadas para a determinação do log P do AC e AK. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4. Figuras de mérito do método de análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em solução por LC-MS.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5. Efeito matriz na análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6. Figuras de mérito na validação do método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7. Estabilidade dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK)**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8. Estudo da permeabilidade do ácido copálico (AC) e caurenóico (AK) em células Caco-2 na presença e ausência do inibidor da glicoproteína-P, verapamil (50 μ M).....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9. Fração de AC e AK livre em plasma ($F_{u,p}$). Dados apresentados como média [coeficiente de variação (%), n=6]**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10. Parâmetros cinéticos do metabolismo in vitro do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) em microssomas hepáticos de rato (RLM) e humano (HLM) usando a equação de Hill. Dados apresentados como média (IC 95%), n=3. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11. Fração de AC e AK livre em meio microssomal ($F_{u,mic}$). Dados apresentados como média [coeficiente de variação (%), n=6]**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 12. Clearance hepático do ácido copálico (AC) obtido por extrapolação in vitro-in vivo e taxa de extração do fármaco pelo fígado em microssomas humano (HLM).**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido copálico
ACN	Acetonitrila
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte
AK	Ácido caurenóico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbonos
Caco-2	Adenocarcinoma de cólon humano
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Cromatografia gasosa
CL _H	Clearance hepático
CL _{max}	Clearance intrínseco máximo
CL _{int}	Clearance intrínseco
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CL _{u, int, H}	Clearance intrínseco escalonado a partir de dados in vitro
COX 2	Ciclooxigenase-2
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
CYP 450	Citocromo P450
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio padrão relativo
E	Razao de extração hepática
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Erro padrão relativo
ER	Taxa de efluxo (do inglês: <i>efflux rate</i>)
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês: <i>electrospray ionization</i>)
F _b	Fração ligada as proteínas
FMN	Fator matriz normalizado
F _u	Fração livre
F _{u,mic}	Fração livre em meio microsomal
F _{u,p}	Fração livre no plasma
H	Coeficiente de Hill
HLM	Microsomas de fígado humano
HMMC-PM	Microsomas hepáticos humano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração inibitória média (do inglês: <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
IVIVE	<i>in vitro-in vivo extrapolation</i>
k	Fator de capacidade
K _M	Constante de Michaelis-Menten
K _{prime}	Parâmetro relacionado ao K _m , expresso em unidades de concentração, e calculado como S ₅₀ ^h .
LADMET	Liberação, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte

LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas tandem com ionização por <i>electrospray</i> (do inglês: <i>Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectroscopy</i>)
LC-ESI-MS-IT	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador sequencial <i>ion trap</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês: <i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)
LIQ	Limite inferior de quantificação
Log k	Log do fator de capacidade
Log P	Coefficiente de partição
LSQ	Limite superior de quantificação
<i>m/z</i>	razão massa carga
MDCK	<i>Martin-Darby Canine Kidney</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MS	Espectrometria de Massas (do inglês: <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Análise por espectrometria de massas em <i>tandem</i>
MS-ESI-Q-TOF	Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador do tipo quadrupolo - tempo de voo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina
Na-TFA	Ácido trifluoroacético sodiado
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.I.	Padrão interno
PAMPA	Permeação em membrana artificial paralela
<i>P_{app}</i>	Permeabilidade aparente
PBPK	<i>Physiologically-based pharmacokinetics</i>

PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
P-gp	glicoproteína-P
PK/PD	Farmacocinética/farmacodinâmica
Q_H	Fluxo sanguíneo hepático
r	Coefficiente de correlação
r^2	Coefficiente de determinação
RE	Relação de efluxo
RET	Resistividade elétrica transepitelial
RLM	Microssomas de fígado de rato
RTMC-PL	Microssomas hepáticos de rato
S_{50}	Concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima
[S]	Concentração de substrato
SFB	Soro fetal bovino
SIM	Monitoramento de íon seletivo (do inglês: <i>selective ion monitoring</i>)
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
t_0	Tempo morto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
t_R	Tempo de retenção
TSI	Índice do transporte de substrato (do inglês: <i>transporter substrate index</i>)
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
UV	Ultravioleta
V_0	Velocidade da reação
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
v	Velocidade da reação enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.1. <i>COPAIFERA</i> SP., OLEORRESINA DE COPAÍBA E OS DITERPENOS ÁCIDO COPÁLICO E CAURENÓICO.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.2. ESTUDOS ADMET NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3. OBJETIVO GERAL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO AC E DO AK..	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2. MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DO AC E DO AK POR LC-MS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2.1. <i>Reagentes e solventes</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2.2. <i>Preparo das soluções padrão</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2.3. <i>Sistema cromatográfico</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2.4. <i>Validação</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.1. Seletividade	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.2. Linearidade.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.3. Precisão e Exatidão.....	Erro! Indicador não definido.
4.3. ENSAIO DE ESTABILIDADE QUÍMICA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO AC E AK EM PLASMA HUMANO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.4.1. <i>Reagentes e solventes</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.2. <i>Preparo das soluções</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.3. <i>Sistema cromatográfico</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.4. <i>Preparo de amostra</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.5. <i>Validação</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.5.1. Seletividade	Erro! Indicador não definido.
4.4.5.2. Efeito Residual	Erro! Indicador não definido.
4.4.5.3. Efeito Matriz.....	Erro! Indicador não definido.
4.4.5.4. Curva de calibração/linearidade	Erro! Indicador não definido.

- 4.4.5.5. Precisão e Exatidão.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.4.5.6. Estabilidade**Erro! Indicador não definido.**
- 4.5. ENSAIO DE ESTABILIDADE EM PLASMA HUMANO POR LC-MS**ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 4.6. DETERMINAÇÃO DO LOG P..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 4.7. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO AC E DO AK EM CÉLULAS CACO-2**ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 4.7.1. *Cultivo celular***Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.2. *Ensaio de viabilidade celular pelo teste da resazurina***Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.3. *Avaliação da permeabilidade in vitro usando células Caco-2* **Erro! Indicador não definido.**
- 4.8. ESTUDO DA FRAÇÃO LIVRE EM PLASMA E EM MEIO MICROSSOMAL**ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 4.9. METABOLISMO IN VITRO EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATO (RLM) E HUMANO (HLM)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 4.9.1. *Cinética enzimática*.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.1.1. Ensaio de depleção dos substratos AC e AK em RLM e HLM **Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.1.2. Análise de AC e AK por LC-MS.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.1.3. Análise dos dados**Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.2. *Extrapolção in vitro-in vivo (IVIVE)*.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.3. *Identificação dos metabólitos*.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.3.1 Análise por espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS)**Erro! Indicador não definido.**
- 4.9.3.2. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (MS-ESI-Q-TOF)**Erro! Indicador não definido.**
- 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO****ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 5.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO AC E AK POR LC-MS..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 5.2. ENSAIO DE ESTABILIDADE EM PH 1,2 E 7,4..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 5.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO AC E AK EM PLASMA HUMANO **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

5.4. ENSAIO DE ESTABILIDADE EM PLASMA HUMANO POR LC-MS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.5. ENSAIO DE LOG P POR MÉTODO CROMATOGRÁFICO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.6. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO AC E DO AK EM CÉLULAS CACO-2	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.7. LIGAÇÃO DE AC E AK AS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.8. ESTUDO DO METABOLISMO IN VITRO DO AC E AK EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.9. LIGAÇÃO DE AC E AK AS PROTEÍNAS MICROSSOMAIS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.10. EXTRAPOLAÇÃO IN VITRO-IN VIVO PARA CLEARANCE HEPÁTICO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.11. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DE AC E AK....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6. CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS.....	23
APÊNDICES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
ANEXOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1. INTRODUÇÃO

A resposta terapêutica e a toxicidade de candidatos a fármacos de origem sintética ou natural são dependentes fundamentalmente de sua disposição cinética no homem. Os estudos em farmacocinética podem ser categorizados principalmente nas seguintes abordagens: farmacocinética clássica por análise não compartimental ou compartimental, farmacocinética compartimental populacional, farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK) e estudos de liberação, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte (LADMET) em modelos *in vitro*. Em qualquer dessas abordagens, o foco dos estudos de disposição cinética é a compreensão do movimento do fármaco no organismo vivo. Uma investigação realizada em 1988 envolvendo 319 candidatos a fármacos revelou que apenas 49 desses alcançaram a fase de comercialização, sendo que a principal causa de falha foi decorrente de propriedades farmacocinéticas indesejáveis no homem, correspondendo a 40% dos casos (PRENTIS; LIS; WALKER, 1988; BRODNIEWICZ; GRYNKIEWICZ, 2010).

Estudos em farmacometria buscam quantificar o comportamento dos fármacos ou medicamentos através de modelos matemáticos visando dar suporte ao desenvolvimento mais eficiente e/ou decisões regulatórias. Dentre as técnicas de modelagem e simulação, a Farmacocinética baseada em Fisiologia (PBPK, sigla em inglês para *Physiologically-based pharmacokinetics*) baseia-se em modelos farmacocinéticos que representam mecanismos fisiológicos independentes observados em estudos *in vitro* de absorção, transporte, ligação às proteínas plasmáticas e metabolismo (GÓMEZ-LECHÓN; CASTELL; DONATO, 2007; ROSTAMI-HODJEGAN, 2012). A utilização de modelos PBPK cresce em virtude da possibilidade de prever a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção em humanos através de técnicas de extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE, sigla em inglês para *in vitro-in vivo extrapolation*) (ROSTAMI-HODJEGAN; TUCKER, 2007; ROSTAMI-HOGJEGAN, 2012) e integração em modelos estruturais multicompartimentais.

O uso de técnicas *in vitro* para caracterização de parâmetros *in vitro* relacionados a absorção, distribuição, metabolismo ou eliminação oferece vantagens como resultados rápidos, de custo financeiro mais baixo além de permitir a comparação dos resultados obtidos a partir de sistemas celulares ou enzimáticos animais com os humanos (JIA; LIU, 2007). Estes resultados podem na sequência

ser usados na construção de modelos PBPK para predição e simulações em indivíduos ou em populações virtuais. Dessa forma, a farmacometria é considerada hoje uma ciência emergente que tem aplicações em diversas etapas do desenvolvimento de fármacos e na personalização de doses para populações especiais.

No intuito de obter novos fármacos e desenvolver novos medicamentos, o uso de produtos naturais representa uma importante estratégia, uma vez que o uso de plantas para curar doenças é uma prática antiga. A utilização de plantas medicinais é considerada milenar por diferentes culturas (MEHTA et al., 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65-80% da população utilizavam desse recurso como forma de manter a saúde na década de 1990 em países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O consumo de produtos obtidos a partir de plantas é elevado em países desenvolvidos como Alemanha e Estados Unidos, sendo a Alemanha responsável por consumir metade dos extratos vegetais comercializados na Europa (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; GELMINI et al., 2013). Na indústria farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais podem ser usados para o isolamento de substâncias ativas, no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos ou ainda na obtenção de produtos utilizados na formulação de medicamentos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Os produtos naturais estão presentes em grandes descobertas de fármacos, como por exemplo a ivermectina e artemisinina que são baseadas em produtos naturais (CARY; PETERLIN, 2018).

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades do mundo, e, portanto, o território brasileiro representa uma imensa fonte de recursos naturais. Portanto, investimentos em pesquisa na área de produtos naturais e políticas públicas de preservação dos recursos naturais num país com tamanha biodiversidade são fundamentais para que o Brasil não se torne apenas um reprodutor de formulações fitoterápicas ou importador de matéria-prima de origem vegetal (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; BRASIL, 2012). Como exemplos de plantas medicinais importantes encontradas na biodiversidade brasileira destacamos a *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) e a *Copaifera* sp. (copaíba) (GURIB-FAKIM, 2006), sendo esta última o foco desta tese de doutorado.

Por apresentarem propriedades terapêuticas importantes, os diterpenos ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) obtidos da oleorresina da *Copaifera langsdorffii*, foram utilizados neste trabalho que visou investigar a permeabilidade oral e o metabolismo hepático in vitro.

2. CONCLUSÕES

Neste estudo foram desenvolvidos e validados métodos analítico e bioanalítico com detectabilidade, linearidade, precisão, exatidão e seletividade compatíveis com os estudos ADMET aqui realizados. O ensaio de estabilidade química mostrou que em pH estomacal (1,2) os diterpenos AC e AK sofrem rápida degradação. Portanto, a administração por via oral requer o uso de formulações de revestimento para liberação entérica. O AC e AK apresentaram estabilidade em plasma humano por 24 horas e 12 horas, respectivamente. O coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) foi determinado pelo método cromatográfico como $> 6,5$ para AC e AK, valor compatível com fármacos de elevada permeabilidade intestinal. Os diterpenos AC e AK apresentam permeabilidade intestinal moderada decorrente da difusão passiva como mecanismo principal de transporte. A atividade de glicoproteína-p, avaliada pelo uso do verapamil como fármaco inibidor, não regula a biodisponibilidade oral do AC e AK.

A cinética enzimática apresentou um comportamento sigmoidal com coeficiente de Hill maior que 1 sugerindo metabolismo por múltiplos sítios ativos e cooperatividade positiva para AC em RLM ou HLM e para AK em RLM. No intervalo de concentração do substrato avaliado, não foi possível caracterizar a cinética enzimática do AK em HLM. A extrapolação dos dados da cinética enzimática sugere que o AC é um fármaco de alta razão de extração hepática ($E = 0,97$). Esse resultado indica que a cada passagem pelo fígado uma grande fração da concentração arterial (97%) é metabolizada, e, portanto, trata-se de um fármaco de elevada eliminação pré-sistêmica.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.; COSTA, L. D. A.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; CASTRO, P. T.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G. Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 443, 21 dez. 2015.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v.22, n.5, p. 1304–1309, 2007.

ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; LEANDRO, L. F.; CASTRO, P. T.; PEREIRA, D. E.; CARNEIRO, L. J.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, n. April, p. 26–30, 2017.

ANDRADE, B. B.; MOREIRA, M. R.; AMBROSIO, S. R.; FURTADO, N.; CUNHA, W. R.; HELENO, V.; SILVA, A. N.; SIMAO, M. R.; DA ROCHA, E.; MARTINS, C. Evaluation of ent-kaurenoic acid derivatives for their anticariogenic activity. **Nat Prod Commun.**, v. 6, p. 777–780, 2011.

ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S. K.; SCHWANKE, R. C.; SIQUEIRA, J. M.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; CALIXTO, J. B. Non-clinical studies in the process of new drug development – Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, p. 1-19, 2016.

ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 27, de 17 de maio de 2012**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 10 de Junho de 2017.

ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Guia para validação de métodos analíticos. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.

ARRUDA, C.; ALDANA MEJÍA, J. A.; RIBEIRO, V. P.; GAMBETA BORGES, C. H.; MARTINS, C. H. G.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus-A review. **Biomed Pharmacother.**, v. 109, p. 1-20, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.030.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.160, p. 1699–1722, 2010.

AUGUSTIJNS, P.; MOLS, R. HPLC with programmed wavelength fluorescence detection for the simultaneous determination of marker compounds of integrity and P-gp functionality in the Caco-2 intestinal absorption model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 971-978, 2004.

AUSTIN, R. P.; BARTON, P.; MOHMED, S.; RILEY, R. J. The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. **Drug Metab Dispos.**, v. 33, p. 419-25, 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil composition, seasonality and diameter at breast height. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, p. 1823–1833,

2012.

BARDAJÍ, D. K. R.; DA SILVA, J. J. M.; BIANCHI, T. C.; EUGÊNIO, D. S.; DE OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANNI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G. Copaifera reticulata oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18-27, 2016.

BENJAMIN, L.; COTTE´, F. E.; PHILIPPE, C.; MERCIER, F.; BACHELOT, T.; VIDAL-TRECAN, G. Physicians' preferences for prescribing oral and intravenous anticancer drugs: A Discrete Choice Experiment. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 912–920, 2012.

BONETTI, J.; ZHOU, Y.; PARENT, M.; CLAROT, I.; YU, H.; FRIES-RAETH, I.; LEROY, P.; LARTAUD, I.; GAUCHER, C. Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 155, p. 21–31, 2018.

BONNIER, F.; KEATING, M.E.; WRÓBEL, T.P.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M.; GARCIA-MUNOZ, A.; BLANCO, A.; BYRNE, H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 124–131, 2015.

BRANDON, E. F. A.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENSA, J. H. M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, p. 233–246, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – RENISUS 06/03/2009. Agência Saúde, 2009. Disponível:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf> Acesso em 04 ago. 2019.

BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.** v. 1, n. 2, p. 175-185, 2005.

BRODNIEWICZ, T.; GRYNKIEWICZ, G. Preclinical Drug Development. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 6, p. 579-586, 2010.

CANO, B. L.; MOREIRA, M. R.; GOULART, M. O.; DOS SANTOS, N. G.; VENEZIANI, R. C.; BASTOS, J. K.; AMBRÓSIO, S. R.; DOS SANTOS, R. A. Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of kaurenoic acid and its semi-synthetic derivatives methoxy kaurenoic acid and kaurenol in CHO-K1 cells. **Food Chem Toxicol.**, v. 102, p. 102-108, 2017.

CARY, D. C.; PETERLIN, B. M. Natural Products and HIV/AIDS. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** v. 34, p. 31-38, 2018.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388–392, 2006.

CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; FURTADO, G. V.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CAMARA, C. A. G.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; RAO, V. S. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research**, v. 701, p. 153–163, 2010.

CHEN, L.; LU, X.; LIANG, X.; HONG, D.; GUAN, Z.; GUAN, Y.; ZHU, W. Mechanistic studies of the transport of peimine in the Caco-2 cell model. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, v. 6, n. 2, p. 125–131, 2016.

CHIBA, M.; ISHII, Y.; SUGIYAMA, Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. **AAPS J.**, v. 11, p. 262-76, 2009.

CHO, I. E. J.; CHOI, G. W.; YANG, S. J.; LEE, Y. B.; CHO, H. Y. Pharmacokinetic Profile of Kaurenoic Acid after Oral Administration of *Araliae Continentalis Radix* Extract Powder to Humans. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1-16, 2018.

COSTA, A. R. M.; FREITAS, L. A. P.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. **J. of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 86–96, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol.**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2821–2826, 2004.

CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth Muscle Relaxant Effect of Kaurenoic Acid, a Diterpene from *Copaifera langsdorffii* on Rat Uterus in vitro. **Phytother Res.**, v. 17, n. 4, p. 320-4, 2003.

DA VIOLANTE, G.; ZERROUK, N.; RICHARD, I.; PROVOT, G.; CHAUMEIL, J. C.; ARNAUD, P. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 12, p. 1600-1603, 2002.

DE CAMPOS, M. L.; OLIVEIRA, I. J.; DAVANÇO, M. G.; SANTOS, J. L.; PECCININI, R. G. UHPLC Quantitation Method and In vitro Studies of Two New Phthalimide Derivatives Planned to Treat Sickle Cell Disease. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 13, n. 4, p. 361-366, 2017.

DEITCHMAN, A. N.; SINGH, R. S. P.; DERENDORF, H. Nonlinear Protein Binding: Not What You Think. **J Pharm Sci.**, v. 107, n. 7, p. 754-1760, 2018.

DE MATOS, D. M.; VIANA, M. R.; ALVIM, M. C. O.; CARVALHO, L. S. A.; LEITE, L. H. R.; DA SILVA, A. A. F.; NASCIMENTO, J. W. L. Pharmacokinetic profile and oral bioavailability of Kaurenoic acid from *Copaifera* spp. in rats. **Fitoterapia**, v. 128, p. 142–147, 2018.

DENISOV, I. G.; BAAS, B. J.; GRINKOVA, Y. V.; SLIGAR, S. G. Cooperativity in cytochrome P450 3A4: linkages in substrate binding, spin state, uncoupling, and product formation. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 10, p. 7066-76, 2007.

DIAS, F. G. G.; CASEMIRO, L. A.; MARTINS, C. H. G.; DIAS, L. G. G.; PEREIRA, L. F.; NISHIMURA, L. T.; SOUZA, F. F.; HONSHO, C. S. Endodontics pastes formulated with copaiba oil: action on oral microbiota and dentin bridge formation in dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 1073-1078, jun, 2015.

EEK, D.; KROHE, M.; MAZAR, I.; HORSFIELD, A.; POMPILUS, F.; FRIEBE, R.; SHIELDS, A. L. Patient-reported preferences for oral versus intravenous administration for the treatment of cancer: a review of the literature. **Patient Preference and Adherence**, v. 10, p. 1609–1621, 2016.

ENGLUND, G.; RORSMAN, F.; RONNBLOM, A.; KARLBOM, U.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; KINDMARK, A.; ARTURSSON, P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 269–277, 2006.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, n. 87, p. 93–120, 2014.

FASINU, P.; PILLAY, V.; NDESENDO, V. M.; DU TOIT, L. C.; CHOONARA, Y. E. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. **Biopharm Drug Dispos.** v. 32, n. 4, p.185-209, 2011.

FASINU, P.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. Liver-Based In Vitro Technologies for Drug Biotransformation Studies – A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 215-224, 2012.

FERNANDES, M. B.; GONÇALVES, J. E.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, A. A.; TAVARES, L. C.; STORPIRTIS, S. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 535–540, 2012.

FERNANDES, E. F. A. Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenóico. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2013.

FERNANDES, M. B.; GONÇALVES, J. E.; TAVARES, L. C.; STORPIRTIS, S. Caco-2 cells permeability evaluation of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 41, n. 7, p. 1066-72, 2014.

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. **Chem Biol Interact.**, v. 25, n. 290, p. 37-43, 2018.

FONSECA, A. P.; ESTRELA, F. T.; MORAES, T. S.; CARNEIRO, L. J.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; AMBRÓSIO, S. R.; MARTINS, C. H.; VENEZIANI, R. C. In vitro antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. **Molecules**. v. 18, n. 7, p. 7865-72, 2013.

GASPARETTO, J. C.; PECCININI, R. G.; DE FRANCISCO, T. M.; CERQUEIRA, L. B.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1-22, 2015.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 170-178, 2013.

GERTZ, M.; KILFORD, P. J.; HOUSTON, J. B.; GALETIN, A. Drug lipophilicity and microsomal protein concentration as determinants in the prediction of the fraction unbound in microsomal incubations. **Drug Metab Dispos.**, v. 36, p. 535-42, 2008.

GOLICNIK, M. Evaluation of enzyme kinetic parameters using explicit analytic approximations to the solution of the Michaelis-Menten equation. *Biochemical Engineering Journal*. v. 53, p. 234-238, 2011.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. **Chemico-Biological Interactions**, v. 168, p. 30–50, 2007.

GOUVEA, D. R.; RIBEIRO, A. B. B.; THORMANN U.; LOPES, N. P.; BUTTERWECK, V. Evaluation of intestinal permeability of vicenin-2 and lychnopholic acid from *Lychnophora salicifolia* (Brazilian arnicão) using Caco-2 cells. **J Nat Prod.**, v. 77, n. 3, p. 464-71, 2014.

GRANDIS, R. A.; CAMARGO, M. S.; SILVA, M. M.; LOPES, E. O.; PADILHA, E. C.; RESENDE, F. A.; PECCININI, R. G.; PAVAN, F. R.; DESIDERI, A.; BATISTA, A. A.; VARANDA, E. A. Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application. **Biometals**, v. 30, p. 321–334, 2017.

GUIDANCE for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. FDA. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/waiver-vivo-bioavailability-and-bioequivalence-studies-immediate-release-solid-oral-dosage-forms>. Acesso em 28

jan. 2018.

GUIMARÃES, A. L.; CUNHA, E. A.; MATIAS, F. O.; GARCIA, P. G.; DANOPOULOS, P.; SWIKIDISA, R.; PINHEIRO, V. A.; NOGUEIRA, R. J. Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against *Staphylococcus Aureus*: Importance in Compounding for Wound Care. **Int J Pharm Compd.**, v. 20, n. 1, p. 58-62, 2016.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALLIFAX, D.; RAWDEN, H. C.; HAKOOZ, N.; HOUSTON, J. B. Prediction of metabolic clearance using cryopreserved human hepatocytes: kinetic characteristics for five benzodiazepines. **Drug Metab Dispos.** v. 33, n. 12, p. 1852-8, 2005.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Products Reports**, v.1, p. 93-106, 1998.

HEUBERGER, J.; SCHMIDT, S.; DERENDORF, H. When is protein binding important? **J Pharm Sci.**, v. 102, n. 9, p. 3458-67, 2013.

HIDALGO, I. J. Cultured intestinal epithelial cell models. In *Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism*; Borchardt, R. T., Smith, P. L., Wilson, G., Eds.; Plenum: New York, p. 35-50, 1996.

HOFFMANN, W.; GRADINARU, J.; FARCAL, L.; CAUL-FUTY, M.; HUANG, S.; WISZNIEWSKI, L.; PARISSIS, N.; MORATH, S.; FORTANER, S.; COLE, T.; REGINATO, E.; CARRUPT, P.; CONSTANT, S.; COECKE, S. Establishment of a Human 3D Tissue-Based Assay for Upper Respiratory Tract Absorption. **Applied in vitro Toxicology**, v. 20, n. 20, p. 1-10, 2018.

HOUSTON J. B. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. **Biochem Pharmacol.** v. 47, n. 9, p. 1469-79, 1994.

HOUSTON, J. B.; KENWORTHY, K. E. In vitro-in vivo Scaling of CYP Kinetic Data

Not Consistent with the Classical Michaelis-Menten Model. **Drug metabolism and disposition**, v. 28, n. 3, p. 246-254, 1999.

HUANG, W.; LIN, Y. S.; MCCONN, D. J.; CALAMIA, J. C.; TOTAH, R. A.; ISOHERRANEN, N.; GLODOWSKI, M.; THUMMEL, K. E. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. **Drug Metab Dispos.**, v. 32, p. 1434-45, 2004.

HUANG, Y.; CHEN, H.; HE, F.; ZHANG, Z-R.; ZHENG, L.; LIU, Y.; LAN, Y-Y.; LIAO, S-G.; LI, Y-J.; WANG, Y-L. Simultaneous determination of human plasma protein binding of bioactive flavonoids in *Polygonum orientale* by equilibrium dialysis combined with UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 3, n. 5, p. 376-381, 2013.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 9, p. 2111-9, 2007.

ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Testes for in vitro cytotoxicity, 3^a Ed, ISO, 2009.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F. JR.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **J Med Chem.**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

JIA, L.; LIU, X. The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. **Curr Drug Metab.**, v. 8, n. 8, p. 822–829, 2007.

JIANG, X.; SHEN, Y.; WANG, H.; WANG, C.; YE, X.; XIANG, Z. Determination of kaurenoic acid in rat plasma using UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 27–31, 2019.

JIN, H.; SONG, B.; KIM, S.; SHIM, W.; KIM, D.; CHONG, S.; CHUNG, S.; SHIM, C. Transport of gemifloxacin, a 4th generation quinolone antibiotic, in the Caco-2 and engineered MDCKII cells, and potential involvement of efflux transporters in the intestinal absorption of the drug. **Xenobiotica**, v. 43, n. 4, p. 355–367, 2013.

KANG, S. Chemistry and biological activity of the constituents from aralia species. **Ann. Rep. Nat. Prod.**v. 5, p. 1–26, 1997.

KERNS, E. H.; DI, L. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization, p. 56–167, 2008.

KRAMER, M. A.; TRACY, T. S. Enzyme Kinetics of Drug-Metabolizing Reactions and Drug–Drug Interactions. In: LYUBIMOV., A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. New York: Wiley, v.1, 2012. cap 3.

KRATZ, J. M.; TEIXEIRA, M. R.; KOESTER, L. S.; SIMÕES, C. M. O. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44, n. 6, p. 531-537, 2011.

KUETE, V.; MBAVENG, A. T.; SANDJO, L. P.; ZEINO, M. Efferth, T. Cytotoxicity and mode of action of a naturally occurring naphthoquinone, 2- acetyl-7-methoxynaphtho[2,3-b]furan-4,9-quinone towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 33, p. 62–68, 2017.

KUMAR, S.; SAMUEL, K.; SUBRAMANIAN, R.; BRAUN, M. P.; STEARNS, R. A.; CHIU, S. L.; EVANS, D. C.; BAILLIE, T. A. Extrapolation of Diclofenac Clearance from in Vitro Microsomal Metabolism Data: Role of Acyl Glucuronidation and Sequential Oxidative Metabolism of the Acyl Glucuronide. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 303, n. 3, p. 969-78, 2002.

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.

LEE, K.J.; MOWER, R.; HOLLENBECK, T.; CASTELO, J.; JOHNSON, N.; GORDON, P.; SINKO, P. J.; HOLME, K.; LEE, Y. H. Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies. **Pharm Res.**, v. 20, n. 7, p. 1015-21, 2003.

LIMA, S. R. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1048–1053, 2003.

LIMA SILVA, J. J.; GUIMARÃES, S. B.; SILVEIRA, E. R.; VASCONCELOS, P. R. L.; LIMA, G. G.; TORRES, S. M.; VASCONCELOS, R. C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesth Plast Surg.**, v. 33, p. 104–109, 2009.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacol. Rev.**, n. 49, p. 403–449, 1997.

LIN, H.; LI, H.; CHO, H. J.; BIAN, S.; ROH, H. J.; LEE, M. K.; KIM, J. S.; CHUNG, S. J.; SHIM, C. K.; KIM, D. D. Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an in vitro model for airway drug transport studies. **J Pharm Sci.**, v. 96, n. 2, p. 341-50, 2007.

LIN, X.; SKOLNIK, S.; CHEN, X.; WANG, J. Attenuation of Intestinal Absorption by Major Efflux Transporters: Quantitative Tools and Strategies Using a Caco-2 Model. **Drug Metab Dispos.**, v. 39, n. 2, p. 265-74, 2011.

LIU, Y.; NAIR, M. G. Labdane diterpenes in *Curcuma mangga* rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 124, p. 527–532, 2011.

LIZARTE NETO, F. S.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; OLIVEIRA, F. M.; NOVAIS, P. C.; PERIA, F. M.; OLIVEIRA, H. F.; CARLOTTI JUNIOR, C. G.; TIRAPELLI, L. F. Kaurene diterpene induces apoptosis in u87

human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 46, p. 71–80, 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Mediciniais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKOID, M. C.; VUCHETICH, P. J.; BANAKAR, U. V. Clearance. In: MAKOID, M. C.; VUCHETICH, P. J., et al (Ed). **Basic Pharmacokinetics**. 1^a ed. Indianapolis: Virtual University Pres, 1996. Cap. 9, p. 1-71.

MALTAROLLO, V. G.; GERTRUDES, J. C.; OLIVEIRA, P. R.; HONORIO, K. M. Applying machine learning techniques for ADME-Tox prediction: a review. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v. 11, n. 2, p. 259-71, 2015.

MARANGONI, A.G. Enzyme Kinetics- A modern Approach. 1^a edição. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., p. 48-90, 2003.

MASSON, D. S.; SALVADOR, S. L.; POLIZELLO, A. C. M.; FRADE, M. A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 4, p. 664-669, 2013.

MAURO, M.; DE GRANDIS, R. A.; CAMPOS, M. L.; BAUERMEISTER, A.; PECCININI, R. G.; PAVAN, F. R.; LOPES, N. P.; DE MORAES, N. V. Acid diterpenes from Copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): Chemical and plasma stability and intestinal permeability using Caco-2 cells. **J Ethnopharmacol.**, v. 235, p. 183-189, 2019.

MCMILLIAN, M. K.; LI, L.; PARKER, J. B.; PATEL, L.; ZHONG, Z.; GUNNETT, J. W.; POWERS, W. J.; JOHNSON, M. D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biol Toxicol.**, v. 18, n. 3, p. 157-73, 2002.

MEHTA, P.; SHAH, R.; LOHIDASANCK, S.; MAHADIKC, K. R. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants - A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. v. 5, n. 4, p. 207-227, 2015.

MINERS, J. O.; KNIGHTS, K. M.; HOUSTON, J. B.; MACKENZIE, P. I. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. **Biochem Pharmacol.**, v. 71, p. 1531-9, 2006.

MIYAZAKI, S.; KIMURA, H.; NATSUME, M.; ASAMI, T.; HAYASHI, K.; KAWAIDE, H.; NAKAJIMA, M. Analysis of ent-kaurenoic acid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 2, p. 103–107, 2015.

NAKAMORI, F.; NARITOMI, Y.; FURUTANI, M.; TAKAMURA, F.; MIURA, H.; MURAI, H.; TERASHITA, S.; TERAMURA, T. Correlation of intrinsic in vitro and in vivo clearance for drugs metabolized by hepatic UDP-glucuronosyltransferases in rats. **Drug Metab Pharmacokinet**. v. 26, p. 465– 473, 2011.

NAKAMURA, M. T.; ENDO, E. H.; DE SOUSA, J. P. B.; CALLEJON, D. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; DE FREITAS, O.; NAKAMURA, C. V.; LOPES, N. P. Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 28, n. 8, p. 1377-1383, 2017.

NATH, A.; ATKINS, W. M. A theoretical validation of the substrate depletion approach to determining kinetic parameters. **Drug Metab Dispos**. v. 34, n. 9, p.1433-5, 2006.

NEJDFORS, P.; EKELUND, M.; JEPPSSON, B.; WESTRÖM, B. R. Mucosal in vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: species- and region-related differences. **Scand J Gastroenterol.**, v. 35, n. 5, p. 501-7, 2000.

OBACH, R. S.; BAXTER, J. G.; LISTON, T. E.; SILBER, B. M.; JONES, B. C.; MACINTYRE, F.; RANCE, D. J.; WASTALL, P. The prediction of human

pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 283, n. 1, p. 46-58, 1997.

OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metab Dispos.**, v. 27, n. 11, p. 1350-9, 1999.

OGILVIE, B. W. et al. In vitro Approaches for Studying the Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes and Identifying the Drug-Metabolizing Enzymes Responsible for the Metabolism of Drugs (Reaction Phenotyping) with Emphasis on Cytochrome P450. In: RODRIGUES, A. D. Drug- Drug Interactions. 2^a. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2008.

OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfi* desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

OKOYE, T. C.; AKAH, P. A.; OMEJE, E. O.; OKOYE, F. B.; NWORU, C. S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 109, p. 38-43, 2013.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test N° 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1: Physical-Chemical properties. France: OECD Publishing, 1 online resource. p. 2004.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol.**, v. 39, n. 6, p. 303-7, 2003.

PARK, H. Y.; KUNITAKE, Y.; HIRASAKI, N.; TANAKA, M.; MATSUI, T. Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 79, n. 1, p. 130-7, 2015.

PELKONEN, O.; KALTIALA, E. H.; LARMI, T. K.; KÄRKI, N. T. Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. **Chem Biol Interact.**, v. 9, n. 3, p. 205-16, 1974.

PEREIRA, I.; LECHANTEUR, A.; SARMENTO, B. 3D Model Replicating the Intestinal Function to Evaluate Drug Permeability. **Methods Mol Biol.**, v. 1817, p. 107-113, 2018.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; MOREIRA, M. A.; Schneedorf, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz Dent J.**, v. 23, n. 1, p. 36-8, 2012.

POULIN, P.; KENNY, J. R.; HOP, C. E.; HADDAD, S. In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. **J Pharm Sci.**, v. 101, n. 2, p. 838-51, 2012.

PRENTIS, R. A.; LIS, Y.; WALKER, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). **Br J Clin Pharmacol.**, v. 25, n. 3, p. 387-96, 1988.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K et al. (eds) Assay guidance manual [online], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>. Bethesda, 2004. Atualizada em 2016.

RODRIGUES, T. M.; TEIXEIRA, S. P.; MACHADO, S. R. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). **Flora.** v. 206, n. 6, p. 585-594, 2011.

ROOS, C.; DAHLGREN, D.; SJÖGREN, E.; TANNERGREN, C.; ABRAHAMSSON, B.; LENNERNÄS, H. Regional Intestinal Permeability in Rats: A Comparison of Methods. **Mol Pharm.**, v. 14, n. 12, p. 4252-4261, 2017.

ROSTAMI-HODJEGAN, A.; TUCKER, G. T. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. **Nature**, v. 6, p. 140-148, 2007.

ROSTAMI-HODJEGAN, A. Physiologically based pharmacokinetics joined with in vitro-in vivo extrapolation of ADME: a marriage under the arch of systems pharmacology. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 92, n. 1, p. 50-61, 2012.

SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; DA VEIGA-JÚNIOR, V. F.; DE SOUZA LIMA, M. M.; NAKAMURA, C. V. Leishmania amazonensis: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Exp. Parasitol.** v. 129, n. 2, p. 145-51, 2011.

SARTORELLI, P.; CARVALHO, C. S.; REIMÃO, J. Q.; LORENZI, H.; TEMPONE, A. G. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from Aristolochia cymbifera. **Planta Med.**, v. 76, n. 13, p. 1454-6, 2010.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of Enzyme Kinetics In: NAGAR, S., ARGIKAR, U., TWEEDIE, D. (Ed.). **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism.** New York: Springer, 2014. p.9-22.

SEVIOR, D. K.; PELKONEN, O.; AHOKAS, J. T. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 44, n. 2, p. 257-61, 2012.

SILVA, R. M.; DE GAITANI, C. M.; MARQUES, L. M. M.; FRAIGE BARACO, K.; CAVALHEIRO, A. J.; DE MORAES L. A. B.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Characterization of Casearin X Metabolism by Rat and Human Liver Microsomes. **Planta Med.**, v. 85, n. 4, p. 282-291, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria

com a academia. **Revista NEXUS Ciência e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 24-27, 2002.

SIMÕES, C. A.; CONDE, N. C.; VENÂNCIO, G. N.; MILÉRIO, P. S.; BANDEIRA, M. F.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. **Open Dent J.**, v. 11, n. 10, p. 188-95, 2016.

SINZ, M. A. In vitro and in vivo models of drug metabolism. In: Lyubimov, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1^a ed. New York: John Wiley & sons, 2012. P. 1-31.

SKOLNIK, S.; LIN, X.; WANG, J.; CHEN, X. H.; HE, T.; ZHANG, B. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. **J Pharm Sci.**, v. 99, n. 7, p. 3246-65, 2010.

SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. S.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; DE SOUSA, J. P. B.; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO S. R. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. Against Cariogenic Bacteria. **Phytother. Res.**, v. 25, p. 215–220, 2011a.

SOUZA, A. B.; DE SOUZA, M. G.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, M. R.; FURTADO, N. A.; MARTINS, C. H.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; HELENO, V. C.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611-9, 2011b.

SOUZA, M. G. M.; LEANDRO, L. F.; MORAES, T. D. S.; ABRÃO, F.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G. ent-Copalic acid antibacterial and anti-biofilm properties against *Actinomyces naeslundii* and *Peptostreptococcus anaerobius*. **Anaerobe**. V. 52, p. 43-49, 2018.

SPARIDANS, R. W.; LAGAS, J. S.; SCHINKEL, A. H.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for diclofenac and three primary metabolites in mouse plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol**

Biomed Life Sci., v. 872, n. 1-2, p. 77-82, 2008.

SRIKANTH, C. H.; CHAIRA, T.; SAMPATHI, S. V. B. S.; BAMBAL, R. B. Correlation of in vitro and in vivo plasma protein binding using ultracentrifugation and UPLC-tandem mass spectrometry. **Analyst.**, v.138, n. 20, p. 6106-16, 2013.

SUBRAMANIAN, M.; TRACY, T. Methods for Determination of Enzyme Kinetics and Metabolic Rates. in: A.V. Lyubimov (Ed.), *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, first ed., John Wiley & Sons, New York, p. 1–22, 2012.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise Química Quantitativa para a Padronização do Óleo de Copaíba por Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução. **Quimica Nova**, v. 27,p. 236–240, 2004.

TINCUSI, B. M.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNANDEZ, B. V. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Med.**, v. 68, p. 808-812, 2002.

TINGLE, M. D.; HELSBY, N. A. Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 21, n.2, p. 184-90, 2006.

TOBOUTI, P. L.; DE ANDRADE MARTINS, T. C.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomed Pharmacother.**, v. 94, p. 93-99, 2017.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Input-Exposure Relationships. In: TOZER, T. N. e ROWLAND, M. (Ed.). **Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics : the quantitative basis of drug therapy**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. P. 15-26.

TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A

Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **Int J Mol Sci.**, v. 19, p. 1-33, 2018.

VARGAS, F. S.; DE ALMEIDA, P. D. O.; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. A.; NEWTON, P.; DE VASCONCELLOS, M. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-210, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA?. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. **J Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 248-54, 2007.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurene from brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, p. 693-696, 2000.

VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Human drug metabolism and cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 41, p. 1149-1179, 2001.

WAN, H.; BOLD, P.; LARSSON, L. O.; ULANDER, J.; PETERS, S.; LÖFBERG, B.; UNGELL, A. L.; NÅGÅRD, M.; LLINÀS, A. Impact of input parameters on the prediction of hepatic plasma clearance using the well-stirred model. **Curr Drug Metab.** v. 11, n. 7, p. 583-94, 2010.

WANG, J.; URBAN, L.; BOJANIC, D. Maximising use of in vitro ADMET tools to predict in vivo bioavailability and safety. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v. 3, n. 5, p. 641-65, 2007.

WIENKERS, L. C.; ROCK, B. Multienzyme kinetics and sequential metabolism. **Methods Mol Biol.**, v. 1113, p; 93-118, 2014.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.

XAVIER-JUNIOR, F. H.; MACIUK, A.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. D. N.; GARCIA, V. L.; DO EGITO, E. S. T.; VAUTHIER, C. Development of a Gas Chromatography Method for the Analysis of Copaiba Oil. **J Chromatogr Sci.**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017.

YANG, J.; JAMEI, M.; YEO, K. R.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; TUCKER, G. T. Misuse of the well-stirred model of hepatic drug clearance. **Drug Metab Dispos.**, v. 35, p. 501-2, 2007.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacol Ther.**, v. 138, n.1, p. 103-41, 2013.

ZHANG, Z.; KAMINSKY, L. S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics, in *Drug Metabolism in Drug Design and Development* (Zhang D, Zhu M, and Humphreys WG eds), John Wiley & Sons, Hoboken, p. 413–441, 2008.

ZIMMERMAM-FRANCO, D. C.; BOLUTARI, E. B.; POLONINI, H. C.; DO CARMO, A. M. R.; CHAVES, M. G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12561-70, 2013.