BIOintestil®

MANUTENÇÃO DA SAÚDE GASTROINTESTINAL

Foi reconhecido há algum tempo, que o corpo humano é colonizado dez vezes mais por bactérias do que por células, e que a maioria dessas bactérias vivem no trato gastrointestinal. Estima-se que aproximadamente 100 trilhões de bactérias ocupam o trato gastrointestinal do ser humano.
Esse complexo de bactérias que vivem no trato digestivo é denominado microbiota intestinal. As bactérias compartilham de uma relação benéfica de comensalismo com o hospedeiro; essa relação acontece quando uma espécie é beneficiada, enquanto a outra não é afetada. O principal benefício para o hospedeiro é a recuperação de energia a partir da fermentação de carboidratos não digeríveis (fibras) e subsequente absorção de ácidos graxos de cadeia curta (butirato, acetato e propionato). As bactérias intestinais, também desempenham um papel importante na síntese de vitaminas do complexo B e da vitamina K, bem como ácidos biliares, são responsáveis pelos movimentos peristálticos do intestino, pela defesa contra microrganismos patogênicos e integridade da mucosa intestinal, além de necessárias para o desenvolvimento adequado do sistema imunológico com formação do tecido linfoide e produção de imunoglobulinas A.
Com mais de três milhões de genes, as espécies mais abundantes pertencem aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, que representam até 90% de todas as bactérias do intestino. Um desequilíbrio na microbiota intestinal, com aumento ou diminuição de certa espécie, geralmente causado por uma dieta nutricionalmente desbalanceada, rica em gordura, açúcar, alimentos industrializados ou uso prolongado de antibióticos, pode levar à disbiose. A disbiose promove o aumento da permeabilidade intestinal, fazendo com que a barreira intestinal perca sua seletividade, permitindo a passagem de partículas indevidas para a corrente sanguínea, desencadeando dessa forma, diversas doenças inflamatórias do intestino, entre elas destacam-se câncer colorretal e Síndrome do Intestino Irritável, e doenças autoimunes como a doença de Cronh, além das enfermidades extra intestinais como esteatose hepática não alcoólica, e as do trato respiratório, que inclui alergias e asma brônquica, e mesmo desordens psiquiátricas, como a depressão.
A presença da disbiose também provoca a falta de absorção de vitaminas e inativação de enzimas digestivas, resultando em prejuízos à digestão e induzindo a fermentação com sintomas de inchaço, desconforto abdominal, sobrepeso, desnutrição e até doenças mais graves como Diabetes Melitus tipo II.

O intestino como seu segundo cérebro

Com meio bilhão de neurônios e mais de 30 neurotransmissores (incluindo 50% de toda dopamina e 90% da serotonina presentes no organismo) o nosso intestino já é chamado por alguns pesquisadores como "segundo cérebro".
Novas pesquisas indicam que os neurônios do intestino se comunicam diretamente com o nosso cérebro através do nervo vago, afetando o comportamento e as emoções.
Essa rede de neurônios digestivos forma o sistema nervoso entérico (SNE), que é uma rede de neurônios que percorre todo nosso abdômen, de 6 a 9 metros, começando no esôfago, passando pelo estômago, intestino e terminando no reto. Esses neurônios são responsáveis pela liberação de enzimas e sucos gástricos envolvidos no processo de digestão, além de comandarem o intestino para que ele empurre o bolo alimentar. O SNE é responsável também pelo comando da liberação do hormônio grelina, hormônio que sinaliza a fome para o cérebro quando o estômago está vazio.
Essas células nervosas que existem no intestino não controlam apenas a digestão dos alimentos, elas são responsáveis por sensações comuns como frio na barriga quando se sente inseguro, ou náuseas em situações de raiva e vontade de ir ao banheiro em situações

de estresse. Tanto as células nervosas do cérebro como as células nervosas do intestino produzem substâncias psicoativas que afetam o humor.
O impacto desses distúrbios entre o cérebro e o intestino motivou a Federação Brasileira de Gastroenterologia (FBG) a realizar o primeiro estudo sobre a saúde intestinal da mulher brasileira, onde dois terços das 3.029 entrevistadas declararam ter inchaço no ventre, flatulências e prisão de ventre. Quando questionadas de que maneira os incômodos influenciavam na qualidade de vida, 89% diziam ter variações de humor e 88% reclamavam de menor concentração nas tarefas cotidianas. Esses números mostram como os sintomas abdominais chegam a modificar o comportamento.
Condições como a síndrome do intestino irritável, marcada por diarreia ou constipação sem razão aparente, propiciam nervosismo e depressão – assim como a ansiedade e o baixo- astral desequilibram a flora e patrocinam as crises.

Síndrome do intestino irritável

A síndrome do intestino irritável, antigamente denominada colite nervosa, é um distúrbio crônico que afeta predominantemente o funcionamento do intestino grosso, a porção responsável por absorver água e sais minerais provenientes da digestão dos alimentos e por fazer movimentos coordenados, mais precisamente contrações e relaxamentos sucessivos, com o objetivo de eliminar o resíduo restante do processo digestivo pela evacuação.
Esses movimentos, porém, não ocorrem de forma coordenada na síndrome, desencadeando assim, um quadro de sintomas caracterizado sobretudo por desconforto abdominal, dores, enjoos e flatulências, interferindo no humor, na concentração e até mesmo nas relações sociais dos indivíduos.
No mundo, estima-se que cerca de 10 a 15% da população adulta tenha a síndrome do intestino irritável. No Brasil, como em outras partes do mundo, a doença é o principal diagnóstico no consultório dos gastroenterologistas. Entre as pessoas que procuram atendimento médico com essas queixas, as mulheres jovens são maioria.
Os sinais clínicos incluem dor e/ou desconforto abdominal, que geralmente começam após a alimentação e melhoram com a excreção das fezes, excesso de gases, distensão do abdômen e mudança nos hábitos intestinais – as pessoas apresentam crises de prisão de ventre alternadas com períodos de diarreia, sempre com alterações no formato das fezes, e têm uma sensação constante de evacuação incompleta. Esses sintomas são bastante frequentes na maioria dos portadores da síndrome.
Pode haver ainda outros sintomas menos específicos como náuseas, má digestão, dor de cabeça e sensação de empachamento.Vários fatores interferem na movimentação e na sensibilidade do intestino. Entre eles, figuram hábitos alimentares inadequados, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, uso cotidiano de determinados medicamentos e, sobretudo, alterações emocionais, aí incluindo o estresse, a ansiedade, as variações de humor e a depressão.

BIOintestil®

BIOintestil® é um produto natural e inovador para o bem estar da saúde gastrointestinal desenvolvido pelo Departamento de Medicina Clínica da Universidade de Bolonha, na Itália. Seus compostos demonstraram-se eficazes na redução de gases intestinais, náuseas, refluxo e constipação intestinal. Além disso, BIOintestil® possui atividade no controle da disbiose e da síndrome do intestino irritável.
BIOintestil® é formulado através de um processo tecnológico patenteado (Patente Européia, Application nº 16171535.4-1466) constituído por dois componentes: o óleo essencial extraído da *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats, padronizado em geraniol, e a fibra em pó obtida do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, padronizado em 6-gingerol, que permite a liberação simultânea das substâncias ativas direcionadas ao cólon.

Nesse processo tecnológico, o óleo essencial de *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats, padronizado em geraniol, é absorvido pela fibra do rizoma do *Zingiber officinale* Roscoe, através de uma mistura lenta capaz de distribuir homogeneamente o óleo essencial na fibra. A fibra liga-se às moléculas lipofílicas como colesterol e sais biliares, impedindo a absorção no estômago e no intestino delgado, concentrando a liberação dos ativos exclusivamente no cólon, região intestinal onde a fibra vai ser naturalmente degradada pela microbiota intestinal.

Dose

600mg/dia para uso contínuo.
600mg, três vezes ao dia, durante 4-6 semanas para tratamento. Pode-se repetir esse ciclo até 4 vezes no ano, com intervalo mínimo de 4 semanas entre um ciclo e outro.

Precauções

- Crianças;
- Mulheres grávidas;
- Pacientes portadores de insuficiência renal e/ou hepáticas;
- Pacientes com patologias relacionadas à coagulação;
- Concomitantemente com terapias anticoagulantes.

Reação de Herxheimer

A Reação de Herxheimer (ou Reação de *die-off*) é uma condição de curta duração (dias ou semanas) em que ocorre uma reação de desintoxicação no corpo. No processo de desintoxicação, é comum sentir sintomas como dor de cabeça, dores nos músculos e nas juntas, dores no corpo, dor de garganta, mal estar geral, sudorese, calafrios, náuseas, cólicas ou diarreia. Essa reação é normal – e até mesmo saudável – pois indica que os microrganismos patógenos estão sendo eliminados com eficiência.

A Reação de Hexheimer é uma resposta do sistema imunológico à toxinas que são liberadas em grandes quantidades quando patógenos estão sendo destruídos e o organismo não dá conta de eliminar as toxinas na mesma velocidade.

Os sintomas devem desaparecer entre 3 e 5 dias, sendo de extrema importância não interromper o tratamento que está causando a reação. Apesar de parecer negativa, a Reação de Herxheimer é um bom sinal, pois indica que o tratamento está sendo efetivo.

Farmacotécnica

Produto higroscópico. Recomenda-se a manipulação em ambiente com temperatura e umidade controladas, utilização de excipientes específicos, além da utilização de cápsulas gastrorresistentes.

Aplicações

- Aumento da motilidade intestinal;
- Estimula a digestão;
- Equilíbrio da microbiota intestinal;
- Alivio de sintomas como gases, náuseas e vômitos;
- Eliminação do inchaço e dores abdominais;
- Tratamento da síndrome do intestino irritável.

Vantagens

- Ação anti-inflamatória específica; redução dos efeitos adversos comparado aos anti-inflamatórios comuns;
- O efeito antimicrobiano não causa resistência bacteriana, efeito observado em antibióticos comuns;
- Potente efeito terapêutico na síndrome do intestino irritável devido a sua ação direta no cólon.
- Certificado: BSE-free.

Mecanismo de ação

Os componentes de BIOintestil® agem através de uma ação anti-inflamatória, antimicrobiana seletiva, carminativa e antiemética.
BIOintestil® demonstrou uma notável atividade benéfica na modulação da microbiota intestinal, regularizando o canal intestinal tanto em pacientes com Síndrome do Intestino Irritável do tipo diarreico, quanto em pacientes com Síndrome do Intestino Irritável do tipo mista e constipativa.
O óleo essencial extraído da *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats, padronizado em geraniol, e a fibra em pó obtida do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, padronizado em 6-gingerol, possuem propriedades benéficas na função digestiva.
O rizoma do gengibre possui uma ação antináusea, age regularizando a mobilidade gastrointestinal e eliminando os gases. O geraniol, atua como inibidor da COX-2, com consequente redução dos níveis de mediadores inflamatórios e atividade antimicrobiana.

Ação anti-inflamatória

Estudos demonstraram que o 6-gingerol age sobre a COX-2 e sobre a lipoxigenase, resultando na diminuição da liberação dos mediadores inflamatórios, como leucotrienos. Além disso, demonstrou-se que o extrato de gengibre é capaz de reduzir a síntese de prostaglandina 2, tromboxano B2 e de aumentar os níveis de prostaciclinas sem, contudo, aumentar os de prostaglandina E.
O geraniol também possui um papel essencial no mecanismo anti-inflamatório, pois é capaz de reduzir a expressão de COX-2 e NF-Kβ, com consequente diminuição de mediadores pró- inflamatórios como TNF-α e IL-17.

Ação antimicrobiana seletiva (*Não age como antibiótico)

O geraniol é um composto hidrofóbico capaz de se ligar a parede bacteriana modificando sua organização dinâmica, com consequente perda de íons e depleção de ATP.
As bactérias patogênicas são mais susceptíveis ao geraniol do que as espécies comensais benéficas. Estudos mostraram que o geraniol foi capaz de aumentar a abundância de Lactobacillae.

Capacidade de gerar MAMPs

Através da capacidade do BIOintestil® em se ligar às bactérias Gram-negativas e causar sua apoptose, o produto possui outra aplicação benéfica: a liberação de MAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Os MAMPs são componentes de microrganismos, sendo estes peptideoglicanos, glicanos ricos em manose ou LPS (lipopolissacarídeo), liberados no processo de morte celular. Quando ocorre um processo intenso de morte celular e grandes quantidades de MAMPs são liberados, o principal efeito é o estimulo do sistema imune, levando a um estado inflamatório, com aumento da secreção de citocinas pró- inflamatórias, estado febril, piroptose e ativação de inflamassomas. No entanto, quando ocorre a liberação controlada e local de MAMPs, como o que ocorre no trato gastrointestinal após a ingestão de BIOintestil®, os efeitos são benéficos.

Este efeito benéfico é observado dada a quantidade relativamente pequena de bactérias que sofrem apoptose, quando comparada a situações de sepse, por exemplo, em que há grandes concentrações e de maneira sistêmica de bactérias Gram-negativas e consequente liberação massiva de MAMPs.
O efeito benéfico é traduzido em produção moderada de citocinas por monócitos, macrófagos e células dendríticas, promovendo pequena inflamação local, aumento de temperatura corporal e ativação do sistema complemento. Além disso, outro efeito dessa pequena inflamação local é a diapedese, processo em que os neutrófilos e monócitos deixam os vasos sanguíneos e são direcionados aos tecidos conjuntivos sendo capazes de levarem patógenos invasores à morte celular. Evidências recentes procuram elucidar os mecanismos envolvidos nesse balanço de consequências positivas e negativas envolvendo os produtos da morte celular ou moléculas produzidas por bactérias comensais como agentes fundamentais na melhora da microbiota intestinal e no combate a agentes invasores.

Atividade carminativa

O 6-gingerol é capaz de aumentar a mobilidade intestinal e, portanto, estimular a digestão, ao mesmo tempo em que elimina a constipação e gases intestinais.

Atividade antiemética

O 6-gingerol atua no trato gastrointestinal aumentando a motilidade gástrica devido sua atividade agonista sobre os receptores colinérgicos M3 e atividade antagonista sobre os receptores de serotonina. Dessa forma, age na diminuição da secreção gástrica, reduzindo as contrações musculares da mucosa e diminuindo a sensação de náuseas e vômito devido ao aumento do esvaziamento gástrico.

Estudos de Eficácia

1. Ensaio clínico em pacientes com Síndrome do Intestino Irritável

Um ensaio clínico realizado no Departamento de Medicina Clínica de Bologna em 19 pacientes com Síndrome do Intestino Irritável, demostrou que BIOintestil® é capaz de combater eficazmente a disbiose, avaliada com análises metagenômicas em material fecal. Os pacientes passaram por coleta de sangue e amostra de fezes na visita 1, antes do inicio do tratamento, na visita 2, após 4 semanas de tratamento com BIOintestil® na dosagem de 600mg, administrado 3 vezes ao dia, e na visita 3, 4 semanas após a pausa do tratamento (Figura 1).



***Figura 1**. Esquema experimental do ensaio clínico.*

Do ponto de vista clínico, 63% dos pacientes obtiveram uma melhora significativa da sintomatologia logo após 2 semanas de administração do BIOintestil®, resultado que se manteve por toda a duração da terapia (4 semanas).
Em geral, o fator que foi mais influenciado pelo tratamento foi a estabilização da função intestinal que ocorreu em 81% dos pacientes.
O segundo fator foi a intensidade da dor, com uma melhora em 68% dos pacientes.
O escore da doença foi analisado com o teste de IBS-VAS (Escala Analógica Visual para a Síndrome do Intestino Irritável), amplamente validado em clínica. Os resultados mostrados na Figura 2 indicam uma redução significativa ($p<0,05$) do escore no tempo T2 (visita 2), e que em diversos pacientes ficaram mantidos também no tempo T3 (visita 3).

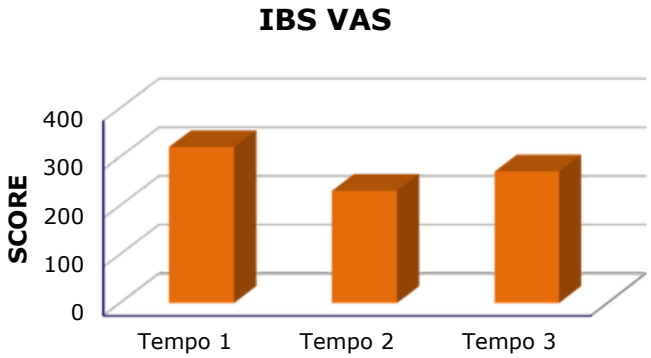


Figura 2. *Gravidade da doença avaliada com base nos escores obtidos com o teste IBS-VAS. Os escores na escala de 75-175 indicam uma sintomatologia leve; em uma escala de 176-300, indicam uma sintomatologia moderada; valores acima de 300 indicam sintomatologia grave. Os valores registrados no tempo T2 foram significativamente inferiores ($p<0,05$) em comparação com aqueles no tempo T1 (análise estatística ANOVA).*

Além disso, o tratamento com BIOintestil® reduziu significativamente a inflamação nestes pacientes, medida através da dosagem da quimiocina pró-inflamatória circulante MIP-1β. Não foram verificadas reações adversas de nenhum tipo relacionadas à administração do suplemento.
A evolução da doença, do ponto de vista do perfil inflamatório, foi avaliada no soro dos pacientes com a metodologia Luminex, e é representada na Figura 3.
Observa-se uma modificação do perfil inflamatório médio dos pacientes, com uma tendência de melhora do quadro inflamatório em T2 (visita 2), evidenciado por uma diminuição estatisticamente significativa da quimiocina MIP-1β, cuja evolução está associada com a gravidade da Síndrome do Intestino Irritável.

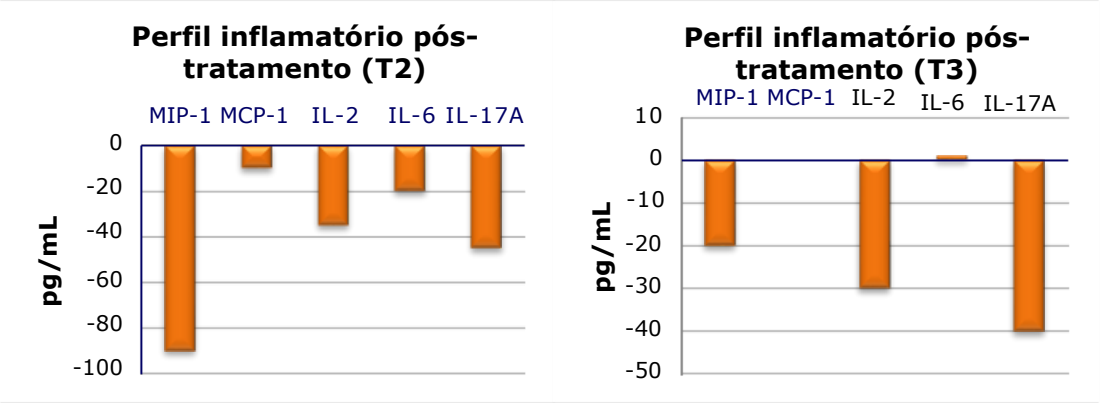


Figura 3. *Variações no perfil inflamatório sérico médio dos pacientes no tempo 2 (gráfico da esquerda) e do tempo 3 (gráfico de direita). O valor*

As modificações da microbiota intestinal induzidas por BIOintestil® são evidentes especialmente nos subgrupos da SII-D (Síndrome do Intestino Irritável diarreica) e da SII- M (Síndrome do Intestino Irritável mista) (Figura 4).

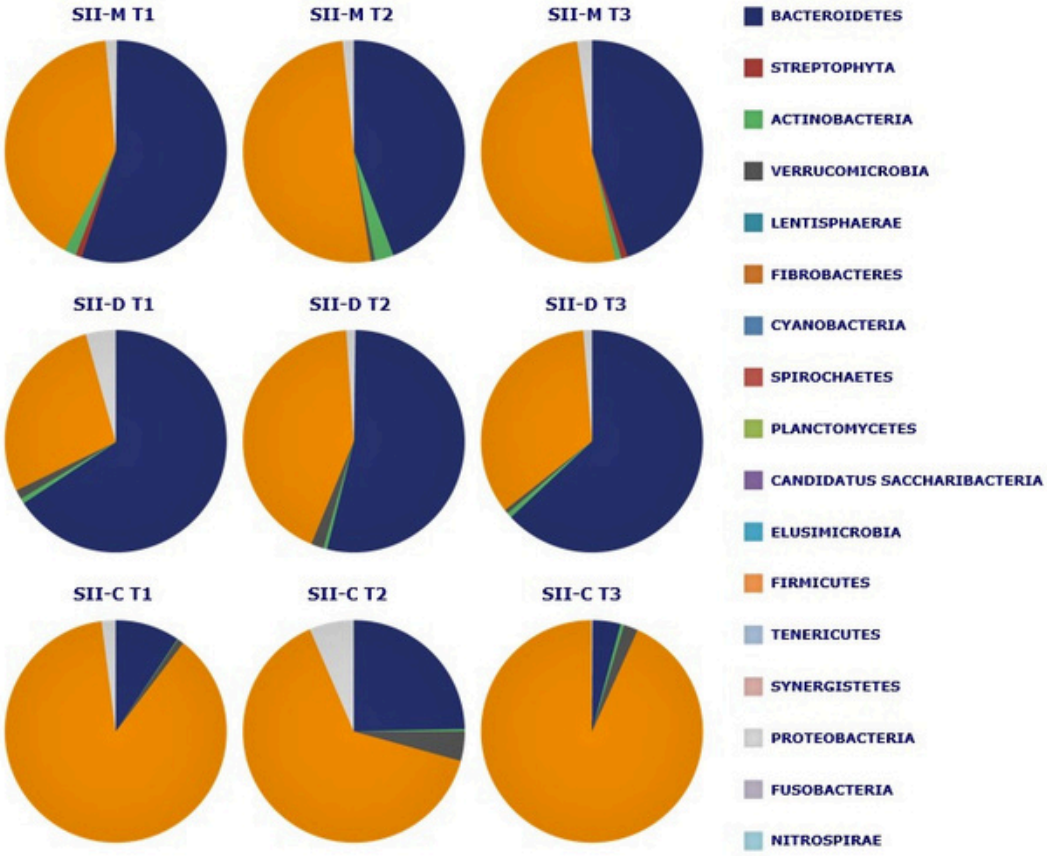


Figura 4. *Variações da microbiota intestinal média dos pacientes, analisadas no tempo T1, T2 e T3. De acordo com os critérios diagnósticos Roma III, os pacientes foram divididos de acordo com a sintomatologia em SII mistos (SII-M), SII diarreicos (SII-D) ou SII com prisão deventre (SII-C).*

O efeito observado após a administração de BIOintestil® em pacientes classificados com sintomatologia mista (SII-M) ou diarreica (SII-D) é de uma modificação da relação entre bacteroidetes e firmicutes (Figura 4). As alterações da microbiota em pacientes com SII têm sido analisadas em diversos estudos, com resultados contrastantes. Isso ocorre porque a microbiota é muito influenciada por fatores como dieta e tempo de trânsito intestinal, que são extremamente variáveis nos diferentes pacientes diagnosticados com SII.

Em pessoas saudáveis adultas, a proporção entre bacteroidetes e firmicutes deveria ser em torno de 1:1. Em pacientes analisados com SII-M e SII-D, no inicio do estudo, a microbiota intestinal apresentou-se, em média, caracterizada por bacteroidetes excessivas, particularmente acentuada no SII-D. O tratamento com BIOintestil®, reduziu significativamente o excesso de bacteroidetes no tempo T2, e essa redução é mantida também no tempo T3 em pacientes com diagnóstico de SII-M.

Além disso, o tratamento com BIOintestil® também ocasiona um aumento geral do filo Actinobactérias no tempo T2 em pacientes com diagnóstico SII-M e SII-D (Figura 4). Finalmente, mesmo que os dados se refiram a apenas um paciente, também no grupo SII- C o tratamento com BIOintestil® tem como efeito no tempo T2 um forte reequilíbrio da microbiota intestinal, seja em termos de biodiversidade quanto em termos de relação bacteroidetes-firmicutes.Estes dados dado são particularmente interessantes quando considerados outros estudos que têm demonstrado o fracasso dos tratamentos probióticos

como uma tentativa de reequilibrar a microbiota intestinal em pacientes com Síndrome do Intestino Irritável.

2. Farmacocinética e Biodisponibilidade

Foi realizado um estudo com o geraniol, para avaliar a sua biodisponibilidade e propriedades de permeação através das células intestinais, após diferentes formas de administração. Ratos *Sprague-Dawley* adultos receberam geraniol em dois tipos de formulação: na primeira, de liberação imediata, o geraniol foi emulsionado em 1mL de glicerol anidro; na segunda, de liberação retardada, o geraniol estava complexado em ibras vegetais

f(**BIOintestil®**)**.** Além disso, os ratos também receberam a dosagem equivalente de geraniol por via intravenosa. Após a administração oral, foram coletadas amostras de sangue e fluído cérebro-espinal. Ambas as formulações induziram um pico máximo de concentração (Cmax) na corrente sanguínea após 30 minutos, com diferentes valores.
O valor de Cmax para a fórmula emulsificada foi relativamente alta (276±15µg/mL), muito similar ao valor obtido no final da infusão intravenosa; já o valor de Cmax para **BIOintestil®** foi fortemente reduzida (69±4µ/mL). Esses dados demonstram diferentes modalidades de absorção do geraniol, demonstrados na figura 5.

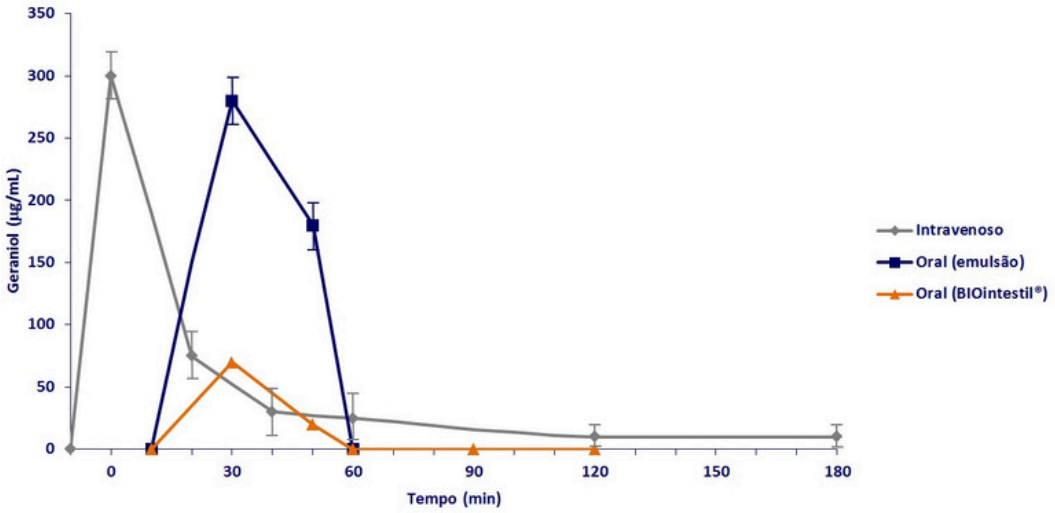


Figura 5. *Concentração sanguínea de geraniol (µ/mL), dentro de 180 minutos após infusão intravenosa, administração oral de emulsão de geraniol ou* ***BIOintestil®****. Resultados expressos em média ± SE de quatro experimentos independentes.*

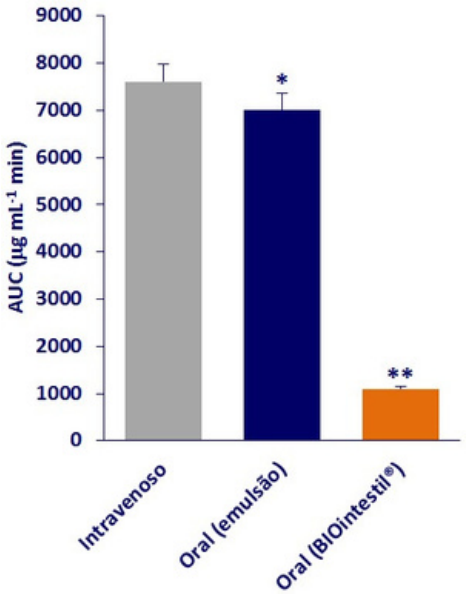


Figura 6. *Área sob a curva (AUC) dos valores de concentração sanguínea de geraniol, obtidas após infusão intravenosa, administração oral de emulsão de geraniol ou* ***BIOintestil®****. Resultados expressos em média ± SE de quatro experimentos independentes.*
*P >0,05 comparação intravenoso;**P<0,001 comparação intravenoso.

De acordo com os valores AUC reportados na figura 6, a biodisponibilidade absoluta das formulações de emulsão de geraniol (liberação imediata) e **BIOintestil®** (liberação retardada), foi de 92% e 16%, respectivamente.
Em conclusão, esses resultados demonstram que o geraniol é capaz de permear e ser rapidamente liberado na corrente sanguínea após sua administração via oral em forma de emulsão, atingindo altas concentrações. Já a administração de **BIOintestil®**, geraniol complexado em fibras, leva a uma retenção do ativo no intestino, o que justifica e aumenta a sua atividade no cólon, como antidisbiótico e anti-inflamatório.

3. Segurança

Estudos conduzidos em animais de laboratório e em humanos evidenciaram que os componentes de **BIOintestil®** são seguros.
O pó de gengibre (da raiz) é, de fato, tradicionalmente utilizado a nível alimentar sem evidenciar fenômenos particulares de toxicidade nas dosagens citadas. O geraniol, componente do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats., é classificado como complemento alimentar seguro por parte das agências internacionais FDA, EFSA e FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives* (JECFA). A dosagem sem reações adversas observáveis (NOAEL) é de 1000 mg/Kg dia, enquanto que a dosagem considerada ausente de reações adversas (DNEL, Derived No Effect Level) é de 13,75 mg/Kg dia (EFSA, *Joint submission* no. 203-377-1).
O geraniol contido no produto atinge o ponto máximo na dosagem sugerida, em uma pessoa de 70Kg de peso, a 32% do DNEL, enquanto que os outros componentes do óleo essencial de Citronela permanecem todos abaixo dos 13% do DNEL, indicando uma absoluta segurança na dosagem, pois resguarda a toxicidade hepática e renal.
Os estudos pré-clínicos também demonstraram que o geraniol não possui toxicidade hepática ou renal de nenhum tipo, nas dosagens utilizadas. De fato, as dosagens das enzimas desintoxicantes da fase I e II e antioxidantes, efetuadas tanto em nível hepático quanto renal, não evidenciaram nenhuma alteração significativa de suas atividades.
Em um estudo piloto realizado em pacientes com síndrome do intestino irritável (ISS) foi administrado geraniol por 4 semanas a uma dosagem de 10mg/kg dia e não foram registrados efeitos adversos de nenhum tipo.
Não havendo estudos específicos disponíveis, por precaução recomenda-se evitar a ingestão de **BIOintestil®** durante a gravidez e amamentação, bem como em idade pediátrica.
Dada a capacidade de 6-gingerol e geraniol de inibir a COX-2, e consequentemente a síntese do tromboxano, não se aconselha o uso de **BIOintestil®** por pacientes submetidos a terapias anticoagulantes ou com problemas de coagulação.
Por fim, não é aconselhável a ingestão em caso de insuficiência renal ou hepática sendo o metabolismo dos óleos essenciais e de seus derivados essencialmente realizado pelo fígado e pelo rim.

4. Geraniol administrado via oral ou via enema para redução da disbiose e inflamação sistêmica em ratos com colite induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS).

Tal como nos seres humanos, os dois filamentos bacterianos mais abundantes em ratos C57BL6 / J são os Firmicutes (60-80% das sequências) e os Bacteroidetes (20-40%).
As misturas de óleos essenciais têm demonstrado desempenhar um papel significativo na modulação da microbiota intestinal, mas seu mecanismo de ação permanece incompletamente compreendido. Os óleos essenciais (OE) são compostos complexos naturais
Voláteis, caracterizados por um forte odor e sintetizados por plantas aromáticas como metabólitos secundários. São misturas naturais altamente complexas que podem conter até 60 componentes em concentrações muito variadas.

Geraniol (Ge-OH) é um componente de monoterpeno naturalmente acíclico de OE extraído de citronela, palma rosa e outras plantas aromáticas. Vários estudos sobre as atividades biológicas de Ge-OH demonstraram ser um composto antimicrobiano altamente ativo, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.
Ge-OH é um composto hidrofóbico capaz de se ligar à parede bacteriana modificando sua organização dinâmica, com consequente perda de íons e depleção de ATP. Além da inibição do crescimento bacteriano, especialmente eficaz em bactérias Gram-positivas, Ge-OH também danifica as proteínas bacterianas e os lipídeos. É importante enfatizar que as bactérias patogênicas humanas são mais sensíveis ao Ge-OH do que as espécies comensais, mesmo que a natureza dessa seletividade permaneça inalterada.
O Ge-OH tem atividades antioxidantes em células eucarióticas. Ao reduzir o estresse oxidativo, o Ge-OH pode prevenir a disfunção mitocondrial induzida por fármacos em hepatócitos. In vivo, demonstrou ser capaz de aumentar a neuro regeneração num modelo de ratos da doença de Parkinson.
In vitro e *in vivo*, Ge-OH inibe a expressão de ciclooxigenase-2, enzima chave na inflamação. As propriedades anti-inflamatórias de Ge-OH foram avaliadas em diferentes modelos animais e neste contexto tem sido demonstrado que a sua meta molecular não é apenas COX-2, mas também NF-kB.
Considerando todas as suas atividades, o Ge-OH parece ser um excelente candidato para o tratamento de inflamações intestinais e sistêmicas e para o controle da disbiose intestinal. Para determinar se o Ge-OH poderia se tornar uma opção terapêutica em seres humanos, foi administrado Ge-OH em formulações orais ou via enema em ratos disbióticos e comparamos seus efeitos com uma terapia de hidrocortisona via enema, terapia padrão usada para controlar a inflamação intestinal em pacientes com IBD.

Materiais e métodos

A formulação oral de Ge-OH via oral foi feita utilizando uma cápsula de lecitina de soja. A formulação de Ge-OH para administração via enema foi preparada utilizando glicerina para aumentar a viscosidade da solução. A solução de enema Ge-OH foi preparada como se segue: foi adicionado Ge-OH natural (4% v / v) a uma solução contendo PBS e glicerol (30% v / v). Uma quantidade de solução correspondente a 120 mg/kg (-1) (peso corporal, matriz) foi preparada de fresco e administrada por enema durante a fase aguda da colite. Uma solução de controle, misturada como anteriormente descrito, mas sem Ge-OH foi também preparada e administrada ao grupo de controle de enema.
Para o tratamento de hidrocortisona foi preparada uma solução contendo glicerol e hidrocortisona, correspondente a 2,5 mg/kg (peso corporal) e administrada por enema durante a fase aguda da colite.
Foram utilizados 64 ratos C57BL / 6 alojados em gaiolas coletivas com ambiente controlado. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos experimentais: o primeiro grupo (I) denominado CTRL (n = 8) recebeu apenas água da torneira durante 37 dias (1-37). O Grupo II denominado SoySusp recebeu apenas água da torneira durante 37 dias (1-37) e foram tratados com suspensão oral sem Ge-OH durante 17 dias (dias 8-24) para analisar possíveis modificações da microbiota induzida pela lecitina de soja em ratos saudáveis. Os demais grupos (III-VIII) receberam água da torneira durante 16 dias (1-16), administração oral de 1,5% (p / v) de sulfato de dextrano sódico durante 7 dias em água da torneira (dias 17 -23), e água da torneira durante 14 dias (25-37).
Além do DSS, o grupo III, denominado DSS (n = 8), recebeu a suspensão oral de controle sem Ge-OH durante 17 dias (dias 8-24), enquanto o grupo IV, denominado DSS + Ger30 (n = 8) receberam Ge-OH oralmente [30 mg/kg (-1)] durante 17 dias (dias 8-24).

O grupo V, denominado DSS + Ger120 (n = 8), recebeu Ge-OH [120 mg/kg (-1)] durante 17dias (dias 8-24) e o grupo VI (n = 8) denominado DSS + Ger120, recebeu quatro administrações via enema de Ge-OH nos dias experimentais 19, 21, 23 e 25.

O grupo VII (n = 8), denominado enema DSS + Susp, recebeu quatro administrações de enema de suspensão de glicerol-PBS nos dias 19, 21 , 23 e 25.
Oúltimo grupo VIII, denominado DSS + enema de hidrocortisona, recebeu quatro administrações de enema de glicerol-PBS-hidrocortisona nos dias 19, 21, 23 e 25. Este grupo foiutilizado como um modelo para compreender como a colite é clinicamente modulada por umapoderosa droga. A hidrocortisona foi administrada por enema em doses de 2,5 mg/kg (-1)de peso corporal.
Odesenho experimental é esquematizado na Figura 7.

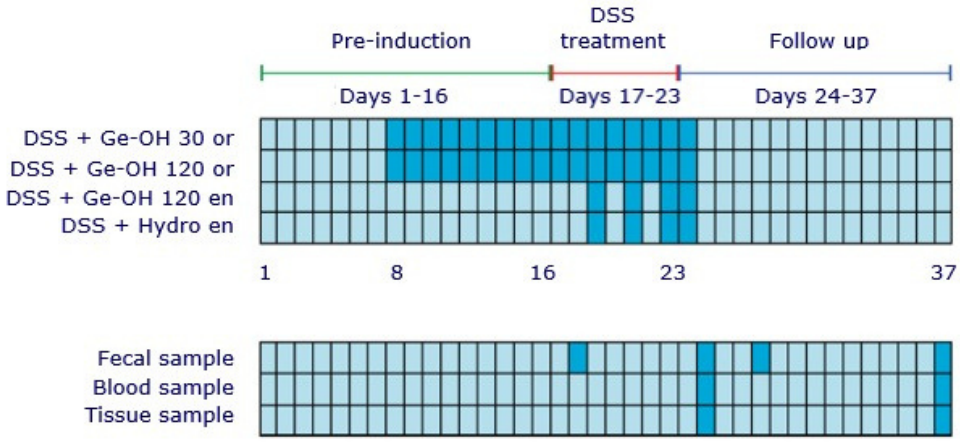


Figura 7. *Desenho experimental do estudo. O tratamento dos animais e a coleta das amostras de sangue e tecido estão indicados em azul escuro.*

Foram avaliados três principais parâmetros:

- Índice de atividade da doença (DAI): calculado pelo escore de perda de peso, consistência de fezes e sangramento.
- A avaliação histológica da colite: os ratos (n=2 para cada grupo) foram anestesiados e sacrificados por deslocação da cervical no dia 25 (2 dias após o final do tratamento com DSS, quando atingiu maior valor de DAI) e no dia 37, o cólon foi retirado e quatro cortes micrométricos foram corados com hematoxilina-eosina e observados para avaliação histológica de lesão epitelial por um patologista de forma cega.
- Determinação dos níveis plasmáticos de citocinas: Amostras de sangue (200 µl) foram retiradas da veia da cauda nos dias 25 e 37 e recolhidas em tubos Eppendorf. O sangue foi centrifugado, e o plasma foi recolhido e armazenado. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando um kit de imunoensaio de pé de rato multiplexado (Bio-Rad, CA, EUA). Os ensaios de seis plex (IL-1p, IL-6, IL-10, IL- 17A, IFNy, TNFa) foram realizados em placas de 96 poços seguindo as instruções do fabricante.

Resultados
Atividade de Colite Clínica
Todos os camundongos tratados com DSS começaram a apresentar sinais clínicos ligeiros da doença 2 dias antes do final do tratamento DSS a 1,5% (dia 21) devido ao aumento simultâneo do índice de consistência das fezes e do índice de sangramento (pontuação DAI máxima = 2,3). Os sinais clínicos mais evidentes de cada grupo foram registrados entre os dias 25 e 27 (Figura 8), com um escore máximo de DAI de 9,1 para o grupo DSS e com perda de peso severa que atingiu o pico entre os dias 25 e 28 (Figura 8A). Ge-OH a 30 mg/kg (-1) reduziu o escore DAI de colite durante a fase aguda, mas não afetou esse índice

durante a fase de recuperação (Figura 8B). Nesta dose de Ge-OH, a pontuação DAI manteve amesma tendência observada em ratos tratados com DSS. Na dose oral mais elevada, Ge-OH reduziu a pontuação de DAI durante quase toda a duração da colite e especialmente

durante a fase de recuperação. Estes efeitos Ge-OH positivos foram ainda melhorados quando os ratos colíticos foram tratados com Ge-OH administrado em enema, resultando numa perda de peso muito baixa e uma pontuação DAI fortemente reduzida para toda a duração da colite.

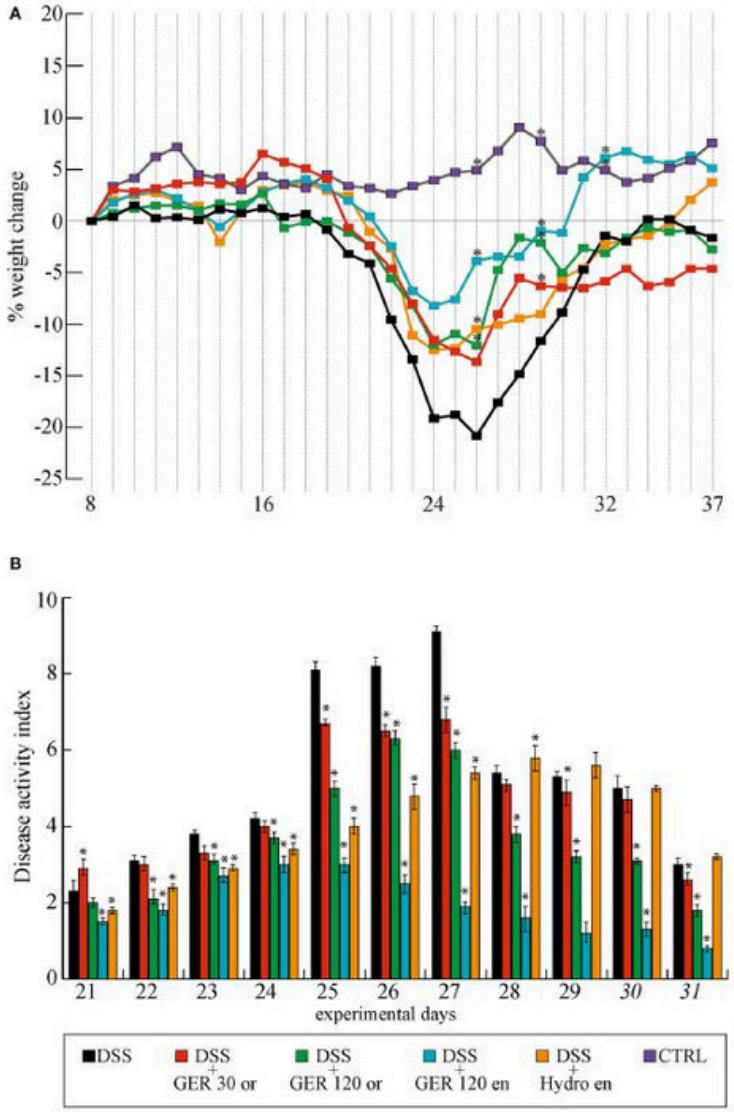


Figura 8. *Índice de variação de peso (A) e índice de atividade de doença (DAI). Pontuação máxima DAI foi atingida entre os dias 25 e 27. A perda máxima de peso (22%) foi registada entre os dias 22 e 27. Tempo de recuperação de peso final no final da semana 37 (p <0,05).*

Perfil de Citocina Inflamatória da Colite

Os níveis plasmáticos de IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, TNFα e IFNγ foram detectados em amostras de sangue de todos os ratos experimentais em dois momentos diferentes, um correspondente à fase aguda da colite (dia 25), e uma no final da fase de recuperação (dia 37). O tratamento com DSS aumentou significativamente (P<0,05) todas as citocinas medidas, tanto no dia 25 como no dia 37 (Figura 9).

No dia 25, a administração oral de Ge-OH na dose mais baixa de 30 mg/Kg (-1) não modificou o perfil inflamatório de ratinhos tratados com DSS. A administração oral da dose de Ge-OH mais elevada de 120 mg/kg (-1), e de administração de enema de Ge-OH 120 mg (-1) reduziu significativamente a IL-10, IL-17, TNFa e IFNy (P <0,05) mas não reduziu

IL-1β nem IL-6. No dia 37, quando a colite tendeu a tornar-se crônica, os ratos tratados com Ge-OH apresentaram um perfil inflamatório melhor do que os ratos tratados com DSS. Em particular, a menor dose de Ge-OH oral reduziu significativamente todas as citocinas medidas (P<0,05). A administração oral de doses mais elevadas de Ge-OH diminuiu significativamente a IL-1β, IL-17, IFNy e TNFα (P <0,05), mas não IL-6 nem IL-10.

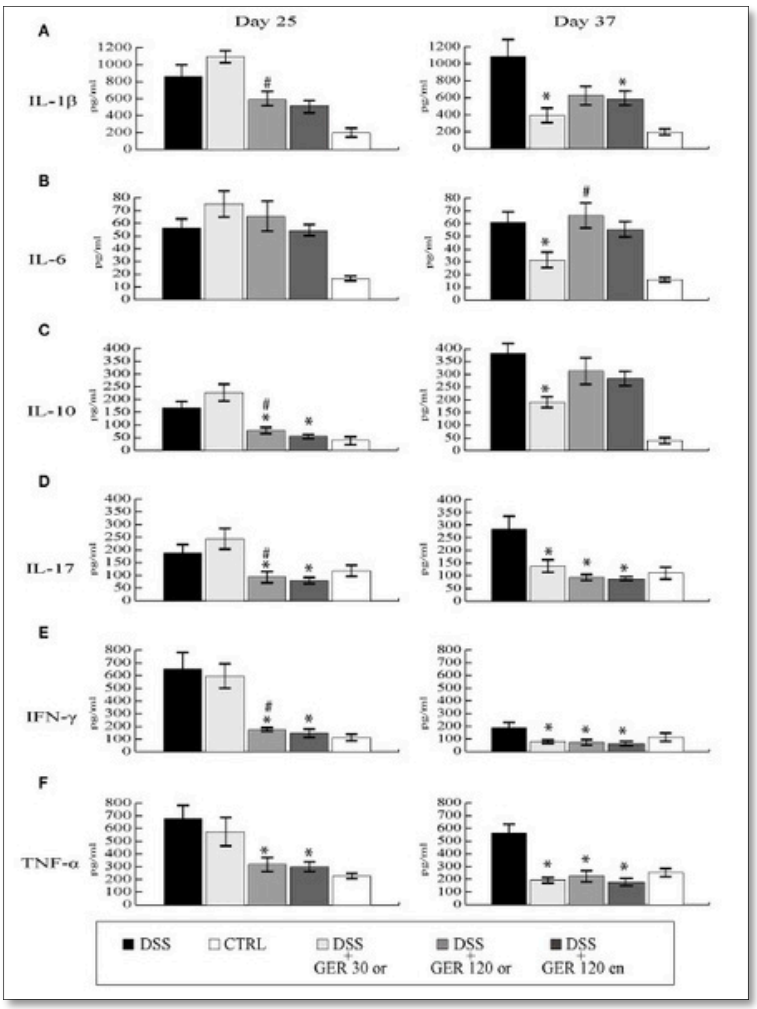


Figura 9. *Variações plasmáticas de citocinas durante a colite experimental avaliada nos dia 25 e 37 (p<0,05).*

Avaliação histológica da colite
Aavaliação histológica do cólon foi feita a partir da junção colocecal ao ânus. Em geral, a lesão do tecido tendeu a ser limitada às regiões terminais do cólon e do reto e pode ser classificada como colite moderada (Figura 10).
No dia 25 (Figuras 10A-C), a mucosa do cólon nos camundongos tratados com DSS mostrou uma perda difusa de células caliciformes, abscessos criptas focais, hiperemia difusa, infiltração celular moderada na mucosa e erosões epiteliais focais. Hiperemia difusa, leve perda de células caliciformes, infiltração celular leve, mas sem abscessos de cripta, ou erosões epiteliais também estavam presentes na mucosa de camundongos tratados com Ge-OH oral em ambas as doses administradas. O cólon dos ratos tratados com enema Ge-

OH foi caracterizado por uma menor distorção da mucosa (alongamento) e mostrou uma perda moderada de epitélio e baixas infiltrações de leucócitos.

Após a recuperação do peso (dia 37), a mucosa do cólon nos camundongos tratados com DSS mostrou uma perda difusa de células de cálice, abscessos de cripta focais, hiperemia difusa e infiltração celular leve (Figura 10D), enquanto a mucosa de ratos tratados com Ge- OH apresentaram hiperemia difusa, mas uma perda mais suave de células caliciformes, uma infiltração celular mais suave e sem abscessos de cripta com a dose administrada (Figuras 10E, F).
A mucosa do cólon nos camundongos tratados com enema de Ge-OH mostrou uma arquitetura normal semelhante à mucoso do cólon controle (saudáveis). Em conclusão, as melhorias histológicas e clínicas foram evidentes nos ratos tratados com Ge-OH e particularmente nos animais tratados com enema.

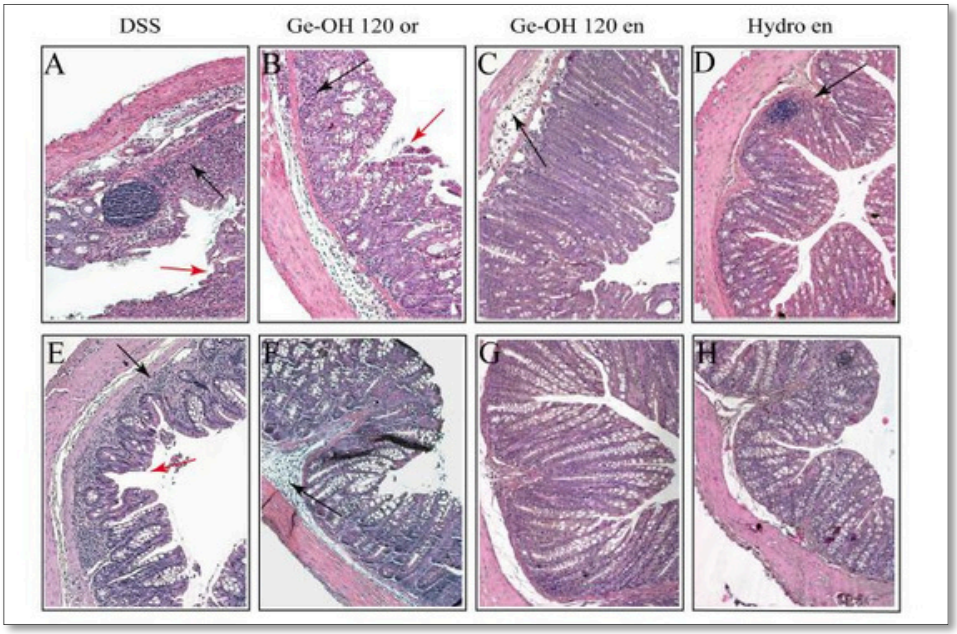


Figura 10. *Diferenças na arquitetura histológica induzidas por Ge-OH 120mg/kg (-1) e hidrocortisona 2,5mg/kg (-1) durante a coliteexperimental. Os espécimes de cólon foram recolhidos de murganhos nosdias 25 (A-D)e37 (E-H).*

Modificações da Microbiota Induzidas por Ge-OH

Embora a suspensão livre de Ge-OH não tenha causado alterações na microbiota, foi investigado o efeito do tratamento com Ge-OH na disbiose induzida por DSS em ratos. As fezes foram coletadas nos dias 18, 25, 29 e 37. A ***Figura 11*** ilustra a estrutura filogenética da microbiota intestinal caracterizada por meio da plataforma universal HTF-Microbi.Array.
O tratamento com DSS provocou mudanças profundas, progressivas e transitórias na composição da microbiota dos camundongos, em comparação com os controles de colite negativa (grupo I), definindo uma trajetória peculiar da microbiota durante a colite induzida.

- No dia 18, após um dia de tratamento com DSS, a estrutura microbiana global dos ratos DSS ainda era semelhante à dos ratos do grupo controle.
- No dia 25, após sete dias de DSS, observou-se uma reestruturação temporária global da composição da microbiota intestinal.
- No dia 29, foi registrada uma redução transitória de Bacteroidetes, acompanhada por um aumento em Firmicutes.
- No entanto, no dia 37, os ratos tratados com DSS recuperaram uma estrutura de microbiota semelhante à dos controles saudáveis.

Enquanto o tratamento oral com Ge-OH a 30 mg/kg (-1) exerceu apenas um leve impacto na dinâmica temporal da disbiose microbiana induzida pelo DSS, o tratamento oral e de enema com uma dose de 120 mg/kg (-1) resultou em considerável proteção contra a redução transitória dependente de DSS de Bacteroidetes, favorecendo uma recuperação mais rápida de um perfil de comunidade semelhante ao de controles saudáveis. Em particular, no dia 25, Ge-OH a 120 mg/Kg (-1) (tanto enema como administrado por via oral) desencadeou um aumento de Lactobacillaceae que atingiu uma abundância relativa de 11,2% e 9,7% respectivamente, notavelmente superior ao valor correspondente em ratos do grupo controle. Esta abundância relativa de Lactobacillaceae dependente de Ge-OH foi mantida até o dia 29, após os ratos tratados com Ge-OH recuperarem-se permanentemente da redução de Bacteroidetes induzida por DDS, 8 dias antes em relação aos ratos tratados somente com DSS.

Diferentemente do observado em ratos tratados com DSS, em ratos saudáveis, o tratamento com Ge-OH, mesmo na dose de 120 mg/kg (-1) (administrado oralmente), não produziu as mesmas alterações marcadas na microbiota. De fato, a composição microbiana de camundongos tratados com Ge-OH 120 mg/kg (-1) mostrou um ligeiro aumento nas famílias de Lactobacillaceae, Bacillaceae e Bacteroidetes (ver Figura 2).

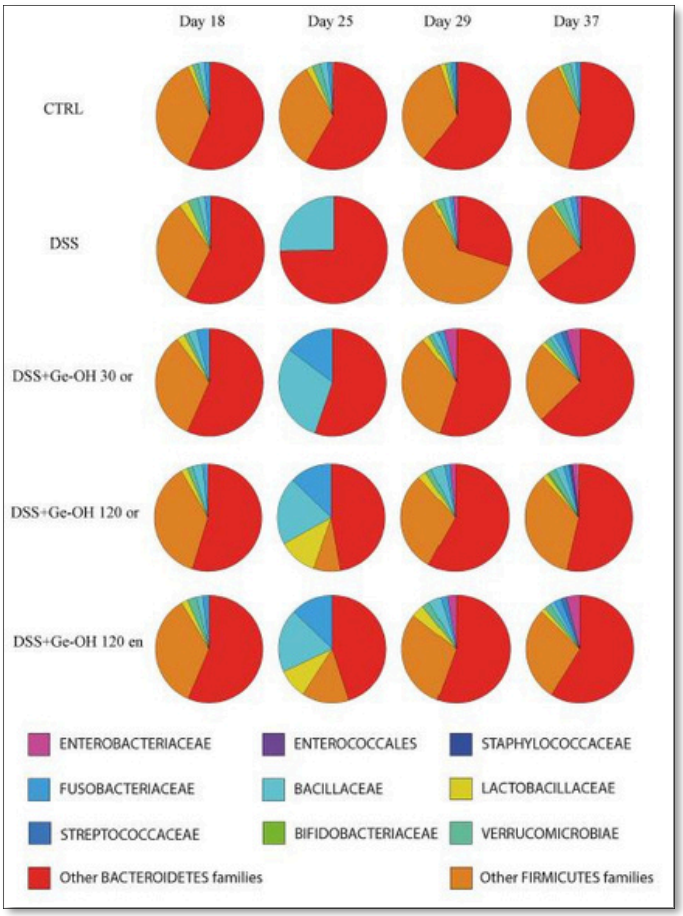


***Figura 11**. Dinâmica temporal a nível familiar da comunidade microbiana fecal de ratos tratados com dextrano sulfato de sódio (DSS). A composição microbiana de camundongos saudáveis (CTRL), camundongos colíticos (DSS), camundongos colíticos tratados com geraniol oralmente [Ge-OH 30 mg/kg (-1), 120 mg/kg (-1)] e camundongos colíticos tratados com geraniol enema [120 mg/kg (-1)]. Outras famílias de Bacteriodetes e Firmicutes que não são listadas separadamente foram combinadas em um único grupo. A composição da microbiota do grupo de ratos tratados com suspensão oral livre de Ge-OH ou suspensão de enema livre de Ge-OH não mostrou diferenças relativas ao grupo de ratos saudáveis.*

Down-Regulação de COX-2 através de tratamento com Ge-OH
Uma vez que a COX-2 desempenha um papel crucial na produção de muitos mediadores lipídicos envolvidos na inflamação intestinal, e é um dos principais alvos da terapia farmacológica IBD, analisamos a expressão de RNAm de COX-2 nos tecidos do cólon durante colite induzida por DSS (Figura 12) .
Os dados suportam a descoberta previamente relatada de que o RNAm de COX-2 aumenta significativamente na parede do intestino de camundongos tratados com DSS. No dia 25, observou-se um aumento significativo (1,8 vezes, P<0,05) na expressão de COX-2 na parede do intestino de ratos tratados com DSS. Ge-OH diminuiu a expressão de COX-2 em ratos tratados com DSS, com valores comparáveis ao controle.

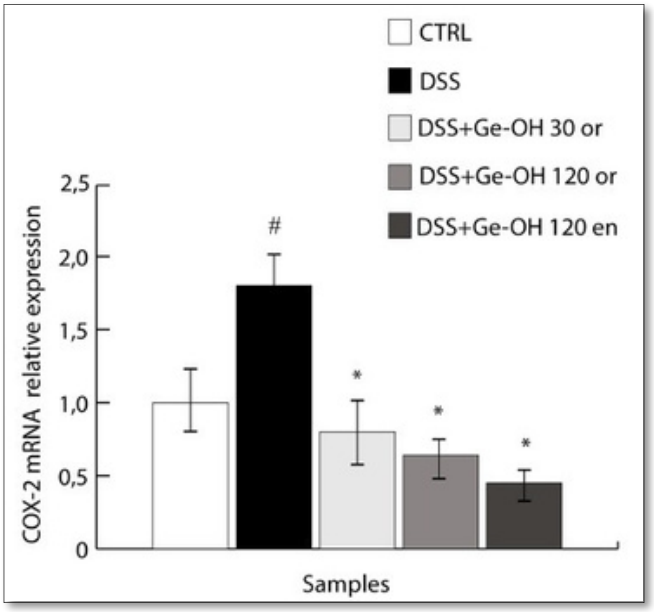


***Figura 12**. Geraniol (Ge-OH) modula a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) in vivo de cólon durante a fase aguda (dia 25). A expressão de RNAm de COX-2 foi avaliada por PCR em tempo real (p<0.05).*

5. Propriedades fitoquímicas,farmacológicasetoxicológicas do gengibre (Zingiber officinale Roscoe):Umarevisãodepesquisa recente.

Gengibre (Zingiber officinale Roscoe) é uma planta medicinal amplamente utilizada em todo o mundo, desde a antiguidade, para uma variedade de doenças como artrite, reumatismo, dor de garganta, constipação, indigestão, vômito e hipertensão. As principais ações farmacológicas do gengibre e seus compostos isolados incluem ação imunomoduladora e anti-inflamatória. O principal constituinte químico do gengibre é o 6-gingerol. Foi demonstrado que o gengibre possui propriedades farmacológicas semelhantes aos agentes anti-inflamatórios não esteroidais de dupla ação (AINEs) in vitro em leucócitos humanos. Sabe-se que tais inibidores têm menos efeitos secundários e são mais eficazes do que os AINEs. Além disso, foi demonstrado que os gingeróis são muito ativos na inibição de prostaglandinas e leucotrienos em células RBL-1. Mais recentemente, foi demonstrado que o gingerol é eficaz contra citocinas sintetizadas e segregadas em locais de inflamação.

Referência Bibliográfica

1. Stewart JJ, Wood MJ, Wood CD, Mims ME. Effects of ginger on motion sickness susceptibility and gastric function Pharmacology. 1991; 42:111–20.
2. Banerjee S, Mullick HI, Banerjee J. Zingiber officinale: A natural gold. Int J Pharm Biol Sci. 2011; 2:283–94.
3. De Fazio L, Spisni E, Cavazza E, Strillacci A, Candela M, Centanni M, Ricci C, Rizzello F, Campieri M, Valerii MC. Dietary
4. Geraniol by Oral or Enema Administration Strongly Reduces Dysbiosis and Systemic Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. Front Pharmacol. 2016; 7:38-46.
5. Rizzello F, Ricci C, Valerii MC, Spisni E. et al. Dietary Geraniol by Oral Administration Strongly Reduces Dysbiosis and Systemic Inflammation in irritable bowel syndrome patients. Manuscript Submitted.
6. Maccaferri S, Candela M, Turroni S, Centanni M, Severgnini M, Consolandi C, Cavina P, Brigidi P. IBS-associated phylogenetic unbalances of the intestinal microbiota are not reverted by probiotic supplementation. Gut Microbes. 2012; 3(5):406-13.
7. Kirby RW, Anderson JW, Sieling B, Rees ED, Chen WJ, Miller RE, Kay RM. Oat-bran intake selectively lowers sérum low-density lipoprotein cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men. Am J Clin Nutr. 1981; 34(5):824-9.
8. Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. Br J Nutr. 2005; 93 Suppl 1:S13-25.
9. Medicinal and Aromatic Plant Series, No. 9 LEMONGRASS - NSF DL Home - National Science Foundation. dl.nsf.ac.lk/bitstream/1/5336/1/NA-249.pdf
10. Ahmad ST, Arjumand W, Seth A, Nafees S, Rashid S, Ali N, et al. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. Toxicology . 2011; 290: 69–81.
11. Thapa D, Losa R, Zweifel B, Wallace R J. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. Microbiology 2012; 158: 2870– 2877.
12. Khan AQ, Khan R, Qamar W, Lateef A, Rehman MU, Tahir M, et al. Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: possible role of p38 MAP Kinase and NF- κB. Exp. Mol. Pathol. 2013; 94: 419–429.
13. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) Community herbal monograph on Zingiber officinale Roscoe, rhizome. EMA/HMPC/749154/2010. 27 March 2012.
14. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids Chem Pharm Bull (Tokyo). 1992; 40(2):387-91
15. Lete I, Allué J. The Effectiveness of Ginger in the Prevention of Nausea and Vomiting during Pregnancy and Chemotherapy. Integr Med Insights. 2016 Mar 31;11:11-7.
16. El-Sharaky AS, Newairy AA, Kamel MA, Eweda SM. Protective effect of ginger extract against bromobenzeneinduced hepatotoxicity in male rats. Food Chem Toxicol 2009, 47: 1584-1590.
17. Thomson M, Al-Qattan KK, Al-Sawan SM, Alnaqeeb MA, Khan I, Ali M. The use of ginger (Zingiber officinale Rosc.) as a potential anti-inflammatory agent and antithrombotic agent. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002, 67:475-478.
18. Flynn DL, Rafferty MF, Boctor AM. Inhibition of human neutrophil 5-lipoxygenase activity by gingerdione, shogaol, capsaicin and related pungent compounds. Prostaglandins Leukot Med 1986, 24: 195-98.
19. Srivas KC, Effects of aqueous extracts of onion, garlic and ginger on platelet aggregation and metabolism of arachidonic acid in the blood vascular system: in vitro study - Prostaglandins Leukot Med. 1984; 13:227-35.
20. Katsukawa M, Nakata R, Takizawa Y, Hori K, Takahashi S. and Inoue, H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPARα and γ and suppresses COX-2 expression. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 2010; 1801: 1214-1220.
21. Chaudhary SC, Siddiqui MS, Athar M, Alam MS. Geraniol inhibits murine skin tumorigenesis by modulating COX-2 expression, Ras-ERK1/2 signaling pathway and apoptosis. J Appl Toxicol. 2013 Aug;33(8):828-37.
22. Marcuzzi A, Crovella S, Pontillo A. Geraniol rescues inflammation in cellular and animal models of mevalonate kinase deficiency. In Vivo 2011; 25: 87–92.

Última atualização: 31/05/2017 BP.
17/04/2019 BM.