

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FUNCIONAL FERMENTADA E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO ORGANISMO
MODELO *Caenorhabditis elegans***

CAROLINNE REGONINI CARVALHO

**VILA VELHA
2023**

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FUNCIONAL FERMENTADA E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO ORGANISMO
MODELO *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Vegetal
para obtenção do título de Mestra em
Biotecnologia Vegetal.

CAROLINNE REGONINI CARVALHO

VILA VELHA

2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C331d Carvalho, Carolinne Regonini
Desenvolvimento de bebida funcional fermentada e
avaliação da atividade antioxidante no organismo modelo
caenohabididis elegans. / Carolinne Regonini Carvalho. – 2023.

73 f. : il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade
Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal) -
Universidade Vila Velha, 2023.
Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Alimentos funcionais.
3. Probiótico. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Universidade
Vila Velha. III. Título.

CDD 660.603

CAROLINNE REGONINI CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FUNCIONAL FERMENTADA E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO ORGANISMO
MODELO *Caenorhabditis elegans*.**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Vegetal
para a obtenção do grau de Mestra
em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 31 de janeiro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof. (a). Dr. (a). Girlandia Alexandre Brasil Amorim (UVV)

Prof. Dr. Nazaré Souza Bisoli (UFES)

**Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade (UVV)
Orientador (a)**

SUMÁRIO

Capítulo I	6
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	8
1.2 PREBIOTICOS.....	10
1.3 AVEIA	11
1.3.1. FARELO	12
1.3.2 BETA GLUCANA	13
1.4. PROBIÓTICOS	16
1.4.1. Características do probiótico	16
1.4.2. Efeitos benéficos à saúde	18
1.4.3. Mecanismo de ação dos probióticos.....	18
1.5. SIMBIOTICO	22
1.6 BEBIDA VEGETAL FUNCIONAL SIMBIÓTICA	24
OBJETIVO GERAL	27
Objetivos específicos	27
CAPITULO II	37
Artigo	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAIS E METODOS.....	43
3. RESULTADOS.....	49
4 DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

CARVALHO, CAROLINNE REGONINI, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, janeiro de 2023. **Desenvolvimento de bebida funcional fermentada e avaliação da atividade antioxidante no organismo modelo *Caenorhabditis elegans***. Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

O aumento da conscientização do consumidor sobre saúde tem promovido uma alta demanda por alimentos e bebidas que possam, além de alimentar, suprir esta demanda nutricional e terapêutica em benefício à saúde. O consumo de bebidas fermentadas é amplamente conhecido e consolidado em diversas culturas como veículo promotor do bem-estar, e a utilização de matriz vegetal não láctea, têm atraído o interesse particular dos consumidores por apresentarem benefícios da composição probiótica e nutricional. Os cereais, fazem parte desses alimentos que servem de matriz vegetal para a fermentação láctea. Em adição, são repletos de fitoquímicos bioativos, apresentando grande potencial para processamento em bebidas funcionais, e a fermentação parece melhorar a biodisponibilidade desses antioxidantes. Assim, o presente estudo tem como objetivo desenvolver uma bebida funcional simbiótica fermentada à base de cultura probiótica e farelo de aveia, e avaliar o efeito antioxidante no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Duas formulações foram desenvolvidas, AF5 e AF15 contendo cultura probiótica e concentrações de 5% e 15% de farelo de aveia (v/v) respectivamente, o controle (PRO) com cultura probiótica e EA (estrato hidrossolúvel de aveia não fermentada). Foi avaliada a viabilidade microbiológica e caracterização das bebidas no período após fermentação e durante armazenamento de 30 dias. Para as análises seguintes, foi selecionada a bebida fermentada de farelo de aveia que continha a melhor viabilidade microbiológica e foram determinados o teor de compostos fenólicos, de antioxidantes e avaliação dos efeitos do tratamento com bebida de aveia no organismo modelo *C. elegans*. Os dados foram avaliados por ANOVA ou foram ajustados com fatorial e comparados com post-hoc de Tukey. Para comparação de duas médias, foi realizado o teste t de Student não pareado. A análise de sobrevivência do *C. elegans* foi realizada usando o método de Kaplan-Meier, e a significância estatística foi analisada por um teste de log-rank. Os resultados indicaram que a bebida AF15 favoreceu o aumento de cepas probióticas em período de armazenamento à frio (6°C) em comparação com as outras bebidas fermentadas. Além disso, a bebida fermentada AF15 apresentou aumento do teor de composição fenólica e na capacidade antioxidante e, relação a bebida EA. Enquanto isso, as bebidas com farelo de aveia diminuíram os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) basal e aumentaram a taxa de sobrevivência de vermes, quando submetidos ao estresse. Essas descobertas revelaram que a bebida de farelo de aveia fermentado, além de possuir característica simbiótica por conter naturalmente beta-glucana, considerada prebiótica, têm potenciais efeitos antienvhecimento ao prolongar a vida útil e aumentar a resistência ao estresse em modelo animal.

Palavras-chave: Alimento funcional, beta-glucana, probiótico, prebiótico, bebida fermentada.

ABSTRACT

CARVALHO, CAROLINNE REGONINI, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, janeiro de 2023. **Development of a fermented functional beverage and evaluation of antioxidant activity in the model organism *Caenorhabditis elegans*.** Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

The increase in consumer health awareness has promoted a high demand for food and beverages that can, in addition to feeding, supply this nutritional and therapeutic demand for the benefit of health. The consumption of fermented beverages is widely known and consolidated in different cultures as a vehicle to promote well-being, and the use of non-dairy vegetable matrix has attracted the particular interest of consumers because of the benefits of probiotic and nutritional composition. Cereals are part of these foods that serve as a vegetable matrix for lactic fermentation. In addition, they are full of bioactive phytochemicals, showing great potential for processing into functional beverages, and fermentation seems to improve the bioavailability of these antioxidants. Thus, the present study aims to develop a fermented symbiotic functional drink based on probiotic culture and oat bran, and to evaluate the antioxidant effect in the model organism *Caenorhabditis elegans*. Two formulations were developed, AF5 and AF15 containing probiotic culture and concentrations of 5% and 15% oat bran (v/v) respectively, the control (PRO) with probiotic culture and EA (water soluble extract of unfermented oat). The microbiological viability and characterization of the beverages were evaluated in the period after fermentation and during 30-day storage. For the following analyses, the fermented oat bran beverage that had the best microbiological viability was selected and the content of phenolic compounds, antioxidants and evaluation of the effects of treatment with oat beverage on the model organism *C. elegans* were determined. Data were evaluated by ANOVA or adjusted with factorial and compared with Tukey's post-hoc. To compare two means, the unpaired Student's t test was performed. *C. elegans* survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method, and statistical significance was analyzed by a log-rank test. The results indicated that the AF15 beverage favored the increase of probiotic strains during cold storage (6°C) compared to the other fermented beverages. In addition, the AF15 fermented beverage showed an increase in the phenolic composition and antioxidant capacity in relation to the EA beverage. Meanwhile, oat bran beverages decreased basal intracellular reactive oxygen species (ROS) levels and increased the survival rate of worms when subjected to stress. These findings revealed that the fermented oat bran drink, in addition to having a symbiotic characteristic by naturally containing beta-glucan, considered prebiotic, has potential anti-aging effects by extending lifespan and increasing resistance to stress in an animal model.

Keywords: Functional food, beta-glucan, probiotic, prebiotic, fermented beverage.

Capítulo I

Revisão da literatura

1. 1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O aumento da conscientização do consumidor sobre saúde e bem-estar tem promovido uma alta demanda por alimentos e bebidas não apenas considerada um meio de saciedade, mas também um meio de prevenção e controle de doenças; gerando maior interesse no mercado de produtos funcionais (TOPOLSKA et al, 2021, SHARMA et al., 2021; SINGH et al 2017).

Em síntese, são muitas as ações positivas relacionadas à saúde oferecidas por esse tipo de alimento, incluindo o potencial de estimular o sistema imunológico, reduzir o risco de problemas cardiovasculares, obesidade e condição física (LI et al, 2021, SHARMA et al, 2021). Esses compostos, com propriedades funcionais, devem estar presentes em quantidades suficientes e adequadas para produzir o efeito fisiológico esperado. Outra consideração é que a alimentação saudável como medida de promoção da saúde não pode ser dissociada da adoção de hábitos de vida saudáveis (TOPOLSKA et al, 2021).

Portanto, para ser considerado um alimento funcional, este deve ser;

1. um alimento natural, como a aveia e a cevada que contém beta-glucana;
2. um alimento para ao qual um componente foi adicionado, aumentando a concentração de um componente naturalmente presente na comida a um ponto em que irá induzir efeitos previstos;
3. um alimento do qual um componente foi removido, geralmente um macronutriente (por exemplo, gorduras);
4. um alimento onde um ou mais componentes foram modificados, componente esse que normalmente não está presente na maioria dos alimentos como por exemplo, antioxidantes não vitamínicos ou frutanos prebióticos;
5. um alimento no qual a biodisponibilidade foi modificada ou;

6. qualquer combinação destes (HENRY, 2010).

Atualmente, as substâncias com alegações de propriedades funcionais aprovadas de acordo com os dados revisados e atualizados pela ANVISA em julho de 2019 estão descritas:

- Beta-glucana e fitoesteróis, quitosana, *Psyllium*: redução da absorção de gordura, ácidos graxos: eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA), proteína de soja, frutooligossacarídeos e inulina (prebióticos), dextrina resistente, goma guar parcialmente hidrolisada, polidextrose e lactulose, licopeno, luteína e zeaxantina, manitol, xilitol e sorbitol e probióticos.

Dentre os alimentos citados, dois desses estão recebendo muita atenção da academia e da indústria; os probióticos e os prebióticos. Esse interesse se justifica pelos diversos benefícios à saúde do consumidor, isso porque um dos locais de atuação desses alimentos, a microbiota intestinal, está submetida a variações e desequilíbrios constantemente, devido a fatores como idade, hábitos de vida, alimentação, uso de antibióticos, dentre outros (NIGAM, 2018).

Alimentos e bebidas à base de probióticos são contabilizados como alimentos funcionais em potencial, visto que são populares e têm uma aceitação mais ampla pelos clientes entre os novos alimentos funcionais no mercado (SHI et al, 2016). Quando consumidos em quantidade suficiente, os probióticos têm diferentes efeitos no organismo, melhorando a saúde do hospedeiro e proporcionando benefícios nutricionais. Bebidas probióticas com bases lácteas, são sem dúvida as mais comuns no mercado hoje. Entretanto, atualmente, as bebidas fermentadas à base de plantas são um dos segmentos mais importantes dentro do setor de alimentos funcionais com a premissa da inclusão de um público restrito ao consumo de produtos de origem animal (CORBO et al, 2014; GRANATO et al 2020).

Tem sido amplamente demonstrado que a fermentação melhora as características sensoriais, qualidade nutricional, textura e segurança de vegetais contendo amido, incluindo cereais. Fortes evidências científicas suportam os efeitos benéficos da fermentação de bactérias lácticas em matrizes de cereais,

aumentando o conteúdo e a biodisponibilidade de compostos fenólicos e atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias (APARICIO-GARCIA et al, 2021, CHEN L, 2020, AGELOV et al, 2018, GAO et al, 2015).

Uma série de investigações recentes evidenciaram que os cereais são bons substratos fermentáveis para bactérias ácido-láticas (BAL) que podem ser usados como matéria-prima para o desenvolvimento de bebidas probióticas com propriedades nutricionais aprimoradas (APARICIO-GARCÍA et al 2021). Dentre estes cereais, por exemplo, a aveia é reconhecida por auxiliar na redução de colesterol e na manutenção dos níveis de glicose através de sua fibra solúvel, a β -glucana (TIWARI & CUMMINS, 2011). Além disso, outros importantes benefícios reconhecidos desse cereal incluem a capacidade antioxidante, por meio de componentes como ácido fítico, ácido fenólico e avenantramidas (PETERSON, 2001). Todas essas características são promissoras para a formulação de um produto potencialmente simbiótico, com características funcionais.

1.2 PREBIOTICOS

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de espécies bacterianas no intestino, assim, exercem influência positiva na saúde do organismo hospedeiro (LEFRANC-MILLOT et al, 2012).

Para que um produto ou alimento seja considerado prebiótico, ele deve atender a algumas condições, como: (GIBSON, 2017)

- Estimular o crescimento e a atividade de cepas bacterianas que têm efeito benéfico na saúde.
- Diminuir o pH do conteúdo intestinal.
- Ser resistente à hidrólise e à ação de enzimas gastrointestinais.
- Não ser absorvido no trato gastrointestinal superior.

Existem diversos tipos de ingredientes alimentares reconhecidos como prebióticos, dentre eles, as fibras alimentares compostas por carboidratos (polímeros de mono-açúcares). As fibras alimentares resistem basicamente à hidrólise das enzimas digestivas humanas no intestino delgado, podendo ser

metabolizados pela microbiota comensal, especialmente por cepas de bifidobactérias e lactobacilos (KAREB & AİDER, 2019).

Dentre essas fibras, o amido resistente (polissacarídeos não amiláceos (celuloses, hemiceluloses, pectinas, gomas e mucilagens), inulina e oligossacarídeos como frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos e xilooligossacarídeos são as mais enfatizadas e destacadas como prebióticas. (TSAI, et al, 2019).

Os prebióticos atuam como protetores contra a colonização intestinal de microrganismos indesejáveis, pois impedem a adesão dos mesmos a células da parede intestinal e estimulam as cepas de *Lactobacillus* e *Lactococcus* a produzirem bacteriocinas e outros metabólitos, como por exemplo os ácidos graxos de cadeia curta AGCC (KAREB & AİDER, 2019; VERSPREET ET al., 2016).

Os AGCCs são compostos principalmente de acetato, propionato e butirato, e muitos outros metabólitos e gases são produzidos após a fermentação de prebióticos por bactérias da microbiota (RIOS, 2016). Além da função de fonte de energia, os AGCC levam a diminuição do pH luminal, inibindo o crescimento e a translocação de bactérias patogênicas e influenciando a motilidade intestinal (VERSPREET et al., 2016). Além disso, os AGCCs também atuam como moléculas sinalizadoras reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. (CORREA-OLIVEIRA, et al. 2016).

Por consequência, a aveia, mais precisamente a fração solúvel da fibra, é um cereal que demonstra um potencial prebiótico que preenche os requisitos descritos acima.

1.3 AVEIA

A aveia (*Avena sativa* L.) é tradicionalmente considerada um cereal de excelente valor nutricional, que se destaca por seu teor e qualidade proteica, por sua maior porcentagem de lipídios, com predominância de ácidos graxos insaturados, além de esteróis, minerais e é caracterizada pela presença de uma variedade de compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, como os tocoferóis. O conteúdo de carboidratos na aveia pode chegar a 75-80% do

peso seco, sendo o amido o componente principal. Contém ainda altas proporções de polissacarídeos não amiláceos, principais constituintes das fibras alimentares. Dentre estas, destacam-se as (1-3)(1-4) beta -D-glucanas, que fazem parte da fração solúvel da fibra alimentar. (DE SA, et al, 2000, SHVACHKO et al, 2021).

A aveia é um cereal relativamente semelhante aos demais, porém que apresenta algumas peculiaridades significativas que afetam diretamente o seu processo. Dentro da casca protetora, a cariopse de aveia pode ser dividida em três principais componentes: o farelo, o germe, e o endosperma amiláceo.

1.3.1. FARELO

Circundando a semente está a camada mais externa, isto é, o farelo, que contém a maior quantidade de minerais (PETERSON et al, 1997); vitaminas, fitatos (FULCHER et al, 1981) e atividade antioxidante (PETERSON et al, 2001) que qualquer outra parte do grão.

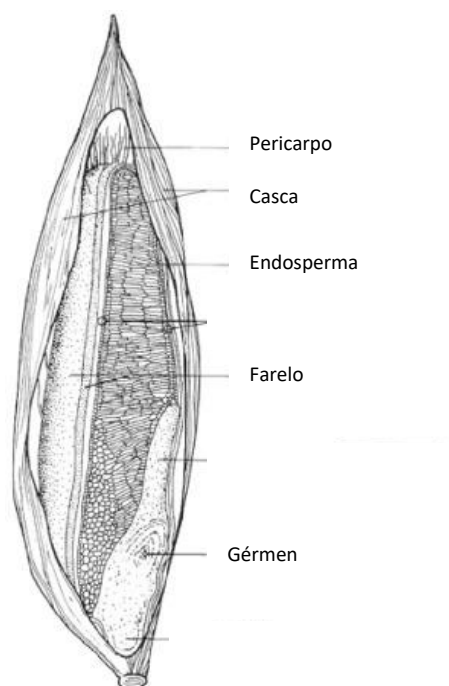


Figura 1: estrutura e composição do grão de aveia. Fonte: Zwer, 2017.

O farelo de aveia tipicamente é composto por pericarpo, tegumento, núcleo, camada de aleurona e uma grande porção do sub-aleurona do

endosperma amiláceo. O pericarpo, o tegumento, e o núcleo são principalmente compostas por polissacarídeos insolúveis, provavelmente com abundância de compostos fenólicos (MILLER & FULCHER, 2011). Imediatamente abaixo do nucelo está a camada de aleurona, a parede celular da camada de aleurona contam (1→3)-(1→4)- β -D-glucana, β -glucana fibra solúvel que tem mostrado efeitos benéficos na dieta humana (WOOD & FULCHER, 1978).

1.3.2 BETA GLUCANA

A beta-glucana é uma fibra solúvel, portanto apresenta alta capacidade de retenção de água e possui a propriedade de formar géis em solução aquosa e de alterar a viscosidade de produtos alimentares. No trato gastrointestinal, as fibras solúveis aumentam a viscosidade do bolo alimentar, diminuindo a atividade de certas enzimas digestivas, influenciando diretamente no tempo de digestão e, logo, na absorção de nutrientes. Essa característica da beta-glucana influencia diretamente no controle da glicemia pós prandial e resposta insulínica, redução do colesterol e regulação do apetite (MAHAN, 2017).

De Sá (1998), que avaliou a concentração de beta-glucanas no cultivar da aveia e produtos derivados, verificou que havia alterações dos teores de fibra durante o beneficiamento do cereal. Os resultados demonstraram teor mais elevado de beta-glucanas no farelo de aveia, com média de 9,5%, contra 3,74% na farinha de aveia. Corroborando com esses dados, em estudo com objetivo de avaliar a composição centesimal e o teor de beta-glucanas em cereais e derivados, Fujita e Figueroa (2003) demonstraram que os grãos de aveia e cevada são os que apresentam teor mais elevado de beta-glucanas e que, dentre produtos comerciais, o maior teor de fibra foi encontrado no farelo de aveia, contendo 9,68% de beta-glucanas, seguido dos flocos de aveia com 7,03%.

A β -glucana da aveia tem sido relacionada a diversos benefícios para a saúde, e para que os benefícios sejam alcançados, é necessário o consumo de 3 gramas de β -glucana diariamente (ANVISA, 2008). Estudos clínicos e pré-clínicos dentre as propriedades beta-glucanos, destacam-se três efeitos importantes:

1.3.2.1. Efeito Hipoglicemiante

O efeito benéfico no metabolismo da glicose é atribuído à alta capacidade de ligação da beta-glucana (fibra não digerível) de água e formação de géis no trato gastrointestinal, o que resulta em atraso esvaziamento gástrico, desacelerando a degradação enzimática de amido, dificultando a absorção intestinal de carboidratos digestíveis. Este mecanismo promove a redução da glicose pós-prandial, bem como a secreção de insulina (KRISTEK, 2019).

Wolever et al. (2020) avaliou o efeito da viscosidade de beta-glucana de aveia em uma refeição de café da manhã no esvaziamento gástrico, apetite subjetivo e respostas de glicose, insulina, grelina e peptídeo tirosina. Os resultados demonstram que a viscosidade da beta-glucana de aveia determinou o efeito na glicose pós-prandial, insulina e esvaziamento gástrico. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Mäkeläinen et al. (2007), onde eles avaliaram o efeito de quatro produtos contendo diferentes concentrações de beta-glucana (2, 4 e 6g) no índice glicêmico e insulina submetidos ao teste tolerância à glicose (50 g de glicose em 300 ml de água). As respostas glicêmicas mediante ao consumo dos produtos de aveia com quantidades crescentes de β -glucana tiveram valores de pico mais baixos do que a carga de glicose de referência.

1.3.2.2. Efeito hipocolesterolêmico

A capacidade de a fibra aumentar a viscosidade do conteúdo alimentar no intestino delgado afeta a formação de micelas e sua composição. Ou seja, o aumento da viscosidade do lúmen intestinal reduz a absorção de gordura, de colesterol e a ligação de ácido biliar, aumentando sua excreção nas fezes (CIECIERSKA, et al, 2019).

Reduzindo-se a quantidade de ácidos biliares, ocorre uma maior utilização de colesterol intrínseco para a produção do ácido biliar no fígado. Essa redução de colesterol circulante e, conseqüentemente, da redução de níveis de LDL-colesterol circulante, podem contribuir para a redução do risco de doenças cardiovasculares (RGIA,2011).

Estudo cruzado, randomizado e controlado com participantes com hipercolesterolemia leve, realizado por Wang et al. (2016a) observou-se o consumo de β -glucano de cevada reduz o colesterol, afetando a absorção do colesterol, a síntese do colesterol ou a síntese do ácido biliar. Os participantes receberam café da manhã contendo 3 g de beta-glucana de cevada por 5 semanas. O consumo de beta-glucana diminuiu os níveis de colesterol total e aumentou a síntese de ácidos biliares. E um dos possíveis mecanismos responsáveis pela redução do colesterol plasmático, relatado pelo autor é o aumento da síntese de ácido biliar, em vez da inibição da absorção ou síntese do colesterol.

1.3.2.3 Efeito Prebiótico

Estudos indicam o potencial prebiótico da fibra dietética solúvel β -glucana, estimulando o crescimento de alguns gêneros bacterianos que promovem a saúde dentro do cólon. A pesquisa até o momento atribui esses efeitos principalmente ao conteúdo de fibra; entretanto, a aveia também é uma fonte alimentar rica em polifenóis, que podem contribuir para a modulação positiva da microbiota intestinal (KRISTEK, 2019). Sendo observado que houve um aumento da produção de acetato e butirato a nível intestinal, promovendo seletivamente o crescimento de Bacteroidetes, Lactobacillus, Enterococcus e Coprobacillus spp; e diminuição da abundância de Firmicutes (WANG, 2016b).

Corroborando com esses dados, analise *in vitro* que verificou efeitos benéficos das fibras dietéticas prebióticas, incluindo sua capacidade de influenciar o crescimento de populações bacterianas e formar AGCCs durante 24h de fermentação, constatou que em 12 h de fermentação, as amostras de farelo de aveia comercial e beta-glucana pura apresentaram concentrações significativamente maiores de propionato, e a maior concentração média às 24 h, em comparação com as outras fibras dietéticas prebióticas inulina e xilooligossacarídeos analisadas. (CARLSON, et al., 2017)

Em outro estudo realizado em humanos, foi verificado que uma massa de cevada de grão integral contendo β -glucano foi considerada eficaz na modulação

da composição e do metabolismo da microbiota intestinal em 26 indivíduos saudáveis (DE ANGELIS et al., 2015). E esse resultado positivo incentiva a busca por produtos derivados desta fibra, que possam replicar ou extrapolar tais benefícios.

1.4. PROBIÓTICOS

A palavra probiótico (do latim *pro* e do grego *βίος* que significa literalmente “para a vida”) foi introduzida pelo cientista alemão Werner Kollath em 1953 para designar “substâncias ativas essenciais para um desenvolvimento saudável da vida” (GASBARRINI, 2016). Após algumas décadas, em 2001, o termo probióticos passou a ser designado pela “Food and Agriculture Organization” & “World Health Organization” (FAO/WHO) como “*microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro*”.

Os probióticos são utilizados para melhorar a saúde de humanos por meio da modulação da microbiota intestinal. A maioria dos microrganismos que habitam os humanos reside no intestino e é influenciada por vários fatores, como a forma de nascimento (parto normal ou cesárea), alimentação, estilo de vida, medicamentos, genética do hospedeiro e o tempo de trânsito intestinal. (FAN, 2021) e o desequilíbrio da microbiota, desencadeado por esses fatores, pode afetar a fisiologia, o metabolismo e o processo patológico do hospedeiro. (NIGAM, 2018).

O consumo de probióticos, portanto, vem demonstrando um equilíbrio da microbiota de adultos saudáveis, sendo capaz de melhorar a saúde do consumidor, modulando sua flora intestinal (FERRARIO et al., 2014; GARGARI et al, 2016). Por essa razão, o potencial que os microrganismos probióticos representam tem impulsionado pesquisas para a produção de alimentos probióticos e a promoção do seu consumo.

1.4.1. Características do probiótico

Para que haja um maior fundamento que explique os mecanismos de ação e plausibilidade biológica do efeito do probiótico, um aspecto que deve ser considerado é se o uso dos probióticos exercem ou não efeito sobre a função da

microbiota (SANDERS, 2016). É também desejável que ele possua determinadas características: o microrganismo deve apresentar resistência à acidez gástrica e aos ácidos biliares; deve ser capaz de aderir bem à mucosa intestinal a fim de colonizá-la; tolerância à temperatura corporal, quando não for isolado da microbiota de mamíferos (STANTON et al., 2003, ANVISA, 2021).

Além disso, segundo consta na regulamentação técnica da ANVISA de 2018, para comprovação da segurança e eficácia do produto probióticos, devem ser apresentadas uma série de informações como: caracterização do microrganismo, identificação do gênero, da espécie e da cepa estando a nomenclatura de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, origem e forma de obtenção, estudos disponíveis na literatura que descrevam efeitos adversos observados com a cepa em questão, demonstração de eficácia e no caso de produtos com mais de um micro-organismo ou de produtos que misturem fibras prebióticas com micro-organismos, a comprovação do efeito probiótico deve ser feita para a combinação, devendo ser apresentado laudo de análise que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo para exercer a propriedade funcional no final do prazo de validade.

A recomendação de acordo com a ANVISA (2019), é baseada na ingestão diária de 6 log a 10 log Unidades formadoras de colônia (UFC)/dia de microrganismos viáveis. Essa variação de ingestão é referente ao uso em diferentes doenças e tratamentos. Vasiljevic & Shah (2008) explica que essa grande quantidade UFC sugerida, de tem como objetivo compensar a possibilidade de redução da concentração dos probióticos durante o processamento, estocagem e, ainda, durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

Um dos fatores mais relevantes que afetam a estabilidade e sobrevivência do probiótico durante a estocagem é a umidade e/ou atividade de água presente no produto alimentar (TRIPATHI & GIRI, 2014). Mani-López et al. (2014) observou que iogurtes contendo culturas probióticas e leites fermentados com cultura probióticas, reduziram de 1,5 a 1 log de UFC durante o período de armazenamento em 35 dias. Corroborando com esses dados, foi possível observar uma redução de 0.89 log. UFC num período de armazenamento de 28

dias de uma bebida simbiótica à base de castanha-do-Brasil, inulina, pectina e *Lactobacillus casei* (CUNHA et al., 2020).

1.4.2. Efeitos benéficos à saúde

Estudos recentes têm mostrado efeitos promissores do consumo de probiótico na prevenção e tratamento de distúrbios gastrointestinais, na prevenção de infecções sistêmicas, na modulação do sistema imunológico, prevenção e tratamento de alergias e efeitos moderados no controle da depressão e no efeito anti-carcinogênico (SHARIFI-RAD et al, 2020, SHARIFI et al, 2017, MARKOWIAK et al, 2017).

Yilmaz et al (2019) investigou os efeitos do consumo de cepas probióticas isoladas do kefir na microflora fecal e os sintomas de pacientes com doença inflamatória intestinal, observando uma diminuição significativa na taxa de hemossedimentação e proteína C-reativa dos participantes. Além disso, em alguns pacientes em uso de kefir, houve uma melhora estatisticamente significativa na dor abdominal, distensão abdominal e qualidade de vida.

O efeito da terapia probiótica sobre as variáveis cardiometabólicas e a função autonômica em mulheres com diagnóstico médico de hipertensão arterial foi analisado por Romão da Silva et al. (2020) por 8 semanas. Os pacientes que receberam tratamento diário com probiotico contendo *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium lactis* HN019 (109 UFC de cada cepa) reduziram significativamente a glicose em jejum e os níveis de colesterol observando-se também um aumento do colesterol HDL. A suplementação de probióticostambém reduziu, embora sem significância estatística, a pressão arterial sistólica em cerca de 5 mmHg e a pressão arterial diastólica em cerca de 2 mmHg em mulheres hipertensas.

1.4.3. Mecanismo de ação dos probióticos

Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa, interagindo com microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos, gerando produtos metabólicos finais, como ácidos graxos de cadeia curta, e se comunicando com as células do hospedeiro. Esses

mecanismos podem conduzir a redução de patógenos, ao fortalecimento da barreira intestinal, à redução da inflamação e à melhora da resposta imune (GUARNER et al., 2017).

Hill et al. (2014) sugere mecanismos em três diferentes níveis:

1. Competição

Alguns mecanismos parecem ser comuns entre a diversidade de cepas, sendo observado de forma generalizada a modulação da microbiota intestinal por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, favorecendo a competição por nutrientes e competição por sítios de adesão com o microrganismo patogênico (HILL et al, 2014).

Um importante composto que favorece a eubiose são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são os principais metabólitos produzidos pela fermentação bacteriana da fibra alimentar no trato gastrointestinal. Eles têm um papel fundamental na do equilíbrio da microbiota no intestino. Os AGCCs também afetam a produção de muco no trato gastrointestinal. O muco atua como um lubrificante biológico, diminuindo a interação entre as células epiteliais e microrganismos luminiais e agentes tóxicos, protegendo essas células da acidez durante a digestão (DALILE et al, 2019)

A concentração de AGCCs depende da composição e do tamanho da população de microrganismos intestinais, de fatores genéticos, de fatores ambientais e do condicionamento da dieta ao acesso a substratos adequados. O desequilíbrio do microbioma intestinal e uma diminuição no número de bactérias que produzem metabólitos, como SCFAs são frequentemente diagnosticados em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII), síndrome do intestino irritável (SII), diabetes tipo, obesidade, infecções bacterianas, doenças autoimunes e pacientes com câncer (MARKOWIAK-KOPEĆ, 2020).

Recentemente, Hou et al. (2020a) determinaram mudanças benéficas na microbiota intestinal de adultos saudáveis após o consumo de *Lactobacillus casei* Zhang. Dentre os efeitos relacionados ao consumo do probiótico,

observou-se que as bactérias intestinais produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, como *F. prausnitzii*, *E. hallii* e *B. obeum*, estimularam a microbiota intestinal a permanecer estável após o consumo do probiótico. Dessa forma o aumento na concentração de microrganismos benéficos, inibiu o crescimento de microrganismos patogênicos, melhorando diretamente as funções metabólicas benéficas da microbiota intestinal.

Outro papel dos AGCC é sua importância em proporcionar a manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal e prevenir a translocação de moléculas pró-inflamatórias bacterianas através da parede intestinal, principalmente através da manutenção do equilíbrio das proteínas de Junção comunicante (Gap junction), responsáveis pela permeabilidade celular e o transporte de soluto através dos canais entre as células intestinais. (CHAMBERS et al. 2018)

2. Atividade enzimática

Os mecanismos podem ser frequentemente observados entre a maioria das cepas de uma espécie probiótica, conferindo alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou da diminuição da atividade enzimática (HILL et al, 2014).

As bactérias probióticas têm a capacidade de realizar várias atividades metabólicas devido à produção de enzimas como lipases, esterases e amilases (MARKOWIAK & SLIZEWSKA 2017). Os seres humanos sem a enzima lactase, por exemplo, desenvolvem intolerância aos níveis de lactose. Algumas das espécies de bactérias lácticas diminuem a intolerância à lactose por meio de sua enzima β -galactosidase (MONTALTO et al. 2006), que auxilia na digestão da lactose e a converte em glicose e galactose.

Um exemplo disso são as bifidobactérias que metabolizam uma grande diversidade de carboidratos, proveniente da dieta ou da mucosa intestinal do hospedeiro e produzem lactase no intestino, aumentando a digestibilidade da lactose, por exemplo (EGAN et al., 2014). Vitellio et al. (2019) e Masoumi et al. (2021) observaram melhoras de sintomas gastrointestinais funcionais comuns

da intolerância à lactose, como dor abdominal, distensão abdominal e flatulência, em pacientes tratados com um probiótico específico contendo *B. longum* BB536 e *L. rhamnosus* HN001 e *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp., respectivamente.

3. Interação com o sistema imunológico

O terceiro mecanismo sugerido é mais específico, presente em apenas algumas cepas de uma determinada espécie, que é a possibilidade de apresentar um estímulo sistêmico como a melhor adaptação do sistema imunológico (HILL et al, 2014).

As bactérias probióticas interagem com as células epiteliais intestinais e iniciam uma resposta imune do hospedeiro pela produção de moléculas imunomoduladoras, regulando a produção de anticorpos, interleucinas, citocinas e linfócitos (NAGPAL et al. 2012, HARDY et al. 2013). Assim, a imunomodulação por meio de probióticos pode ser uma opção de tratamento alternativo para algumas doenças.

A microbiota intestinal também foi associada com a liberação de substâncias que possuem propriedades antimicrobianas e a liberação de mucinas (consideradas como barreira fisiológica intestinal), que inibem a fixação de patógenos à mucosa, sendo considerado, portanto, um aspecto importante do sistema imune nato (HASNAIN et al., 2012).

Em estudo realizado por Wang et al. (2016b), procuraram elucidar os efeitos e mecanismos do probiótico *Lactobacillus casei* Zhang (*L. casei* Zhang) na produção de citocinas pró-inflamatórias e na resposta inflamatória hepática induzido por Lipopolissacarídeo (LPS) em um modelo de rato. Após a intervenção constataram que o pré-tratamento com *L. casei* Zhang não apenas reduziu as alterações da resposta pro-inflamatória, mas também atenuou a inflamação hepática e redução da expressão de IL-1 β e óxido nítrico sintase induzível no fígado e a composição de microbiota intestinal.

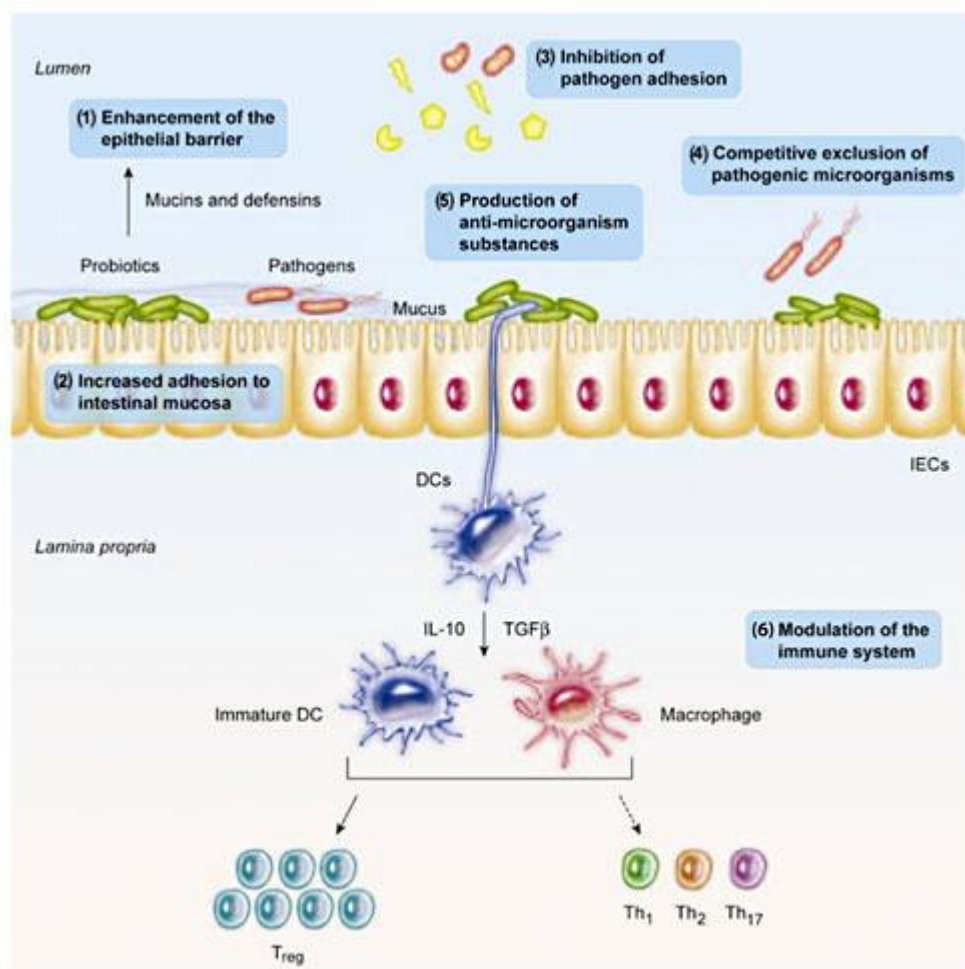


Figura 1: Mecanismo de ação de probióticos. 1 Modulação da barreira epitelial. 2 Aumento da adesão intestinal da mucosa, 3 Inibição de adesão de patógenos, 4 Competição adesão entre bactérias patogênicas, 5 Produção de substancias anti-microbiana, 6 Modulação do sistema imune (BERMUDEZ-BRITO, 2012).

1.5. SIMBIOTICO

A definição desse termo foi atualizada recentemente em maio de 2019 por meio da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP), que definiu simbióticos como “uma mistura composta de microrganismos vivos e substrato(s) utilizado(s) seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde do

hospedeiro”. De acordo com o ISAPP, os simbióticos são usados como suplementos nutricionais e terapêuticos, pois os efeitos sinérgicos dos simbióticos consistem na seletividade dos prebióticos em relação ao metabolismo probiótico, garantindo assim sua sobrevivência e desenvolvimento no trato GI (SWANSON et al., 2020).

Segundo Kolida e Gibson (2011), e Swanson et al. (2020), são descritas duas maneiras gerais pelas quais os simbióticos podem melhorar os efeitos de seus constituintes: complementares e sinérgicos. Um simbiótico complementar consiste em um probiótico e um prebiótico que juntos conferem um ou mais benefícios à saúde, mas não requerem funções co-dependentes, ou seja; são escolhidos independentemente, sendo cada um responsável pelo seu efeito particular, caso em que o prebiótico não é necessariamente metabolizado preferencialmente pela estirpe probiótica e pode ser fermentado pela microbiota do hospedeiro. Em contrapartida, um simbiótico sinérgico contém um substrato que é utilizado seletivamente pelo microorganismos coadministrados, assim de forma sinérgica, o selecionado como substrato para as cepas probióticas favorecem seu crescimento (SIMON et al, 2021).

Existem relatos sugerindo que os alimentos simbióticos estimulam positivamente a saúde e a nutrição do ser humano. Observou-se que os simbióticos não só aumentaram o número de bactérias probióticas, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na amostra fecal com redução de coliformes (YANG et al. 2005), mas também aumentaram o nível de enzimas digestivas como lactase, lipase, sacarase e isomaltase no grupo de teste. Recentemente, foi relatado que o uso de simbióticos diminuiu significativamente vários fatores de risco cardiovascular, prevalência de síndrome metabólica e marcadores de resistência à insulina em pacientes idosos (CICERO et al., 2021).

Dessa forma, os simbióticos alimentares elaborados a partir de uma matriz alimentar de origem vegetal, composta por elementos prebióticos, fermentada por microrganismos probióticos podem ser considerados uma

alternativa para garantir que os efeitos probióticos e prebióticos sejam alcançados da melhor forma (SWANSON, 2020).

1.6 BEBIDA VEGETAL FUNCIONAL SIMBIÓTICA

O intestino está em crescente evidência quando se trata de associação a diversos mecanismos de doenças crônicas e metabólicas. Um dos fatores principais que se destaca no desenvolvimento dessas doenças é o aumento de elementos pró-inflamatórios produzidos pela microbiota intestinal em disbiose (SINGH et al., 2017).

Diante disto, existem algumas maneiras de reconstruir e reestabelecer a eubiose intestinal, favorecendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta, protegendo a barreira da mucosa intestinal e beneficiando o hospedeiro com processos anti-inflamatórios, imuno e cardioprotetores.

Uma dessas maneiras é através de uma alimentação saudável, com consumo de alimentos *in natura* ou minimamente processados com propriedades funcionais e seus fitoquímicos, ou seja, que favoreça a saúde intestinal restaurando a flora bacteriana, promovendo a renovação epitelial intestinal e a função de barreira, inibindo a inflamação intestinal, e exercendo efeitos protetores da saúde (SINGH et al., 2017, ALMEIDA et al., 2009).

Além desses fatores, o mercado atual de probióticos é dominado por produtos lácteos, e os produtos não lácteos têm algumas características e vantagens exclusivas que incluem atender às necessidades de veganos e vegetarianos, de intolerantes ou alérgicos a produtos lácteos, aumento do valor nutricional de alimentos não lácteos (MIN et al, 2019).

A biotransformação de cereais, como sua fermentação, é uma estratégia reconhecida para melhorar as propriedades nutricionais e biológicas desses substratos (FIORDA et al., 2017, MIN et al, 2019). Além disso, o total conhecimento e controle sobre as variedades e quantidade das cepas a serem utilizadas para a fabricação do produto, promove ainda uma alta escalabilidade para a produção industrial controlada.

Além da vantagem funcional e nutricional potencialmente conferida por esse produto, a utilização da aveia como ingrediente funcional melhora as características sensoriais, como sabor e textura, e aumenta a estabilidade de espumas, emulsões e sensação na boca, podendo conferir melhor aceitação de mercado.

Portanto, o desenvolvimento de novo produto funcional simbiótica, elaborado a partir da fermentação do farelo de aveia com bactérias láticas, pode ser considerada uma opção que agrega valor nutricional e, ao mesmo tempo, traz benefícios à saúde do consumidor, podendo ser uma alternativa aos derivados lácteos.

1.7 MODELO EXPERIMENTAL *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um nematóide de vida livre que se alimenta de bactérias e é considerado um forte modelo experimental devido à sua facilidade de cultivo, seu curto ciclo de vida e reprodutibilidade e capacidade de reproduzir populações isogênicas sincronizadas. Além disso, estima-se que 60-80% dos genes de *C. elegans* tenham um ortólogo humano (BAUMEISTER et al., 2002). Devido à essas características, esse nematóide tem sido utilizado para estudar o processo de envelhecimento e como ele é afetado por diferentes substâncias e condições ambientais (KATO et al., 2017; AYUDA-DURAN et al., 2019; WANG et al., 2020). Os ensaios de sobrevivência do *C. elegans* têm sido ferramentas essenciais para o estudo de processos fisiológicos, incluindo envelhecimento e resistência ao estresse, fornecendo informações importantes sobre a interação entre estresses e processos biológicos, como a homeostase celular (PARK et al., 2017).

Nesse sentido, inúmeras linhas de evidência sugerem que os compostos bioativos da dieta e a alimentação com bactérias ácido-láticas têm a capacidade de diminuir os danos celulares associados ao estresse oxidativo, prolongando a vida do animal (IKEDA et al. 2007; ZAMBERLAN et al. 2016; GRAF et al., 2017). Portanto, essas características fazem de *C. elegans* um modelo muito adequado para conduzir análises preliminares do efeito de novos

alimentos com características funcionais e, assim, fornecer dados valiosos e relevantes para apoiar estudos subsequentes.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma bebida funcional simbiótica fermentada à base de cultura probiótica e farelo de aveia, e avaliar do efeito antioxidante no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos específicos

- Desenvolver o produto simbiótico funcional em duas concentrações de farelo de aveia (5% e 15%).

- Definir melhor percentual de aveia a ser utilizado para o produto a partir da curva de crescimento microbiológico.

- Avaliar a viabilidade dos microrganismos durante 30 dias do armazenamento dos produtos desenvolvidos.

- Caracterização in vitro do produto de melhor perfil em relação à:

- pH;
- Determinação do teor de compostos fenólicos totais;
- Avaliação da atividade antioxidante in vitro (ABTS)

- Avaliar os efeitos do tratamento com bebida de aveia no organismo modelo *C. elegans*:

- Geração espontânea de espécies reativas de oxigênio;
- Estresse térmico;
- Estresse químico.

REFERÊNCIAS

1. Almeida LB, Marinho CB, Souza C.daS, Cheib VBP. *Disbiose intestinal*. Ver Bras de Nutri Clin. 2009; 24(1): 58-65.
2. ANVISA. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos, 2021.
3. Aparicio-García N, Martínez-Villaluenga C, Frias J, Peñas E. Production and Characterization of a Novel Gluten-Free Fermented Beverage Based on Sprouted Oat Flour. *Foods*. 2021; 10(1): 1-15.
4. Ayuda-Durán B, González-Manzano S, Gil-Sánchez I, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B, Sanz-Buenhombre M, Guadarrama A, Santos-Buelga C, González-Paramás AM. Antioxidant Characterization and Biological Effects of Grape Pomace Extracts Supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods*. 2019; 8(2):75
5. Baumeister, R.; Ge, L.M. The worm in us-*Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. *Trends Biotechnol*. 2002, 20, 147–148.
6. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Annals of nutrition & metabolism*. 2012; 61(2): 160–174.
7. Carlson, J. L., Erickson, J. M., Hess, J. M., Gould, T. J., & Slavin, J. L. (2017). Prebiotic dietary fiber and gut health: comparing the in vitro fermentations of beta-glucan, inulin and xylooligosaccharide. *Nutrients*, 9(12), 1361.
8. Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Current nutrition reports*. 2018; 7(4): 198–206.
9. Cicero, A. F., Fogacci, F., Bove, M., Giovannini, M., & Borghi, C. (2021). Impact of a short-term synbiotic supplementation on metabolic syndrome and systemic inflammation in elderly patients: A randomized placebo-controlled clinical trial. *European journal of nutrition*, 60(2), 655-663.
10. Ciecierska A, Drywien M, Hamulka J, Sadkowski T. Nutraceutical functions of beta-glucans in human nutrition. *Rocz Państw Zakł Hig*. 2019; 70(4): 315-324.

11. Corbo MR, Bevilacqua A, Petruzzi L, et al. Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014; 13(6):1192–1206.
12. Correa-Oliveira R, et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology*. 2016; 5(4): 73-81.
13. Cunha PCD, Oliveira LDS, Gouvêa LDP, Alcantara MD, Rosenthal A, Ferreira EH. Symbiotic drink based on Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* HBK): production, characterization, probiotic viability and sensory acceptance. *Ciência Rural*. 2020; 51(2): 1-14.
14. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16(8): 461–478.
15. De Angelis M, Montemurno E, Vannini L, et al. Effect of Whole-Grain Barley on the Human Fecal Microbiota and Metabolome. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(22):7945-7956.
16. De Sá RM, de Francisco A, Ogliari PJ, et al. Variação no conteúdo de beta-glucanas em cultivares brasileiros de aveia. *Food Sci Technol*. 2000; 20(1) 99-102.
17. Egan M, Motherway MO, Kilcoyne M, Kane M, Joshi L, Ventura M, Van Sinderen D. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL in a mucin-based medium. *BMC microbiology*. 2014; 14(1): 282-96.
18. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19(1): 55–71.
19. Fao. Food and agriculture organization of the united nations, world health organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Probiot*. 2001; 1-34.
20. Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, et al. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic

- intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr.* 2014; 44(11): 1787–96.
21. Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK., Pagnoncelli MGB, Vandenberghe LPdeS, Soccol CR. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microb.* 2017; 66(1): 86–95.
22. Fujita AH, Figueroa MOR. Composição centesimal e teor de beta-glucanas em cereais e derivados. *Food Sci and Tech.* 2003; 23(2): 116-120.
23. Gargari G, Taverniti V, Balzaretto S, Ferrario C, Gardana C, Simonetti P, Guglielmetti S. Consumption of a *Bifidobacterium bifidum* Strain for 4 Weeks Modulates Dominant Intestinal Bacterial Taxa and Fecal Butyrate in Healthy Adults. *Applied and environmental microbiology.* 2016 ; 82(19): 5850–9.
24. Gasbarrini GMD, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics History, *J of Clin Gastroenter.* 2016; 50(12): 116-119.
25. Gibson GR, Hutkins R., Sanders ME, Prescott SE, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K., Stanton C., Swanson KS, Cani PD, et al. Documento de consenso de especialistas: Declaração de consenso da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) sobre a definição e o escopo dos prebióticos. *Nat Rev Gastroent. Hepatol.* 2017; 14(8): 491-502.
26. Graf, B. L., Kamat, S., Cheong, K. Y., Komarnytsky, S., Driscoll, M., & Di, R. Phytoecdysteroid-enriched quinoa seed leachate enhances healthspan and mitochondrial metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods.* 2017; 37: 1–7.
27. Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, et al. Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2020; 11(3): 93–118.
28. Guarner F. et al. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Probióticos e prebióticos. *W Gastroent Org*, 2017.
29. Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., & Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, 5(6), 1869-1912.

30. Hasnain SZ, Gallagher AL, Grecnis RK, Thornton DJ. A new role for mucins in immunity: insights from gastrointestinal nematode infection. *Inter J biochem & cell biol.* 2013; 45(2): 364–374.
31. Henry C. Functional foods. *Eur J Clin Nutr.* 64, 657–659. GOLDBERG, I. (ED.) Functional foods – designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. 2010; 64(7): 657–9.
32. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11(6): 506–514.
33. Hou Q, Zhao F, Liu W, Lv R, Khine W, Han J, Sun Z, Lee YK, Zhang H. Probiotic-directed modulation of gut microbiota is basal microbiome dependent. *Gut microbes.* 2020; 12(1): 1-21.^a
34. Ikeda, T., Yasui, C., Hoshino, K., Arikawa, K., & Nishikawa, Y. (2007). Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against salmonella enterica serovar enteritidis. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6404–6409.
35. Kareb, O., & Aider, M. (2019). Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: a critical review. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 348-369.
36. Kato, M., Hamazaki, Y., Sun, S., Nishikawa, Y., & Kage-Nakadai, E. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 Increases the Lifespan and Multiple-Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients*, 2018. 10(12), 1921.
37. Kolida S, Gibson GR. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011;2:373-393.
38. Kristek A, Wiese M, Heuer P, Kosik O, Schär MY, Soycan G, Spencer JPE. Oat bran, but not its isolated bioactive β -glucans or polyphenols, have a bifidogenic effect in an in vitro fermentation model of the gut microbiota. *Br J Nutr.* 2019; 121(5): 549-559.

39. Lefranc-Millot C, Guérin-Deremaux L, Wils D, Neut C, Miller LE, Saniez-Degrave MH. Impact of a resistant dextrin on intestinal ecology: how altering the digestive ecosystem with NUTRIOSE®, a soluble fibre with prebiotic properties, may be beneficial for health. *J Int Med Res.* 2012; 40(1): 211-24.
40. Li HY, Zhou DD, Gan RY, Huang SY, Zhao CN, Shang A, Xu XY, Li HB. Effects and Mechanisms of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics on Metabolic Diseases Targeting Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients.* 2021; 13(9): 1-22.
41. Mahan LK, Raymond JL, Krause. Elsevier Health Sciences Spain-T. 2017.
42. Mäkeläinen H, Anttila H, Sihvonen J, et al. The effect of β -glucan on the glycemic and insulin index. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61(12): 779–785.
43. Mani-López E, Palou E, López-Malo A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science.* 2014; 97(5) : 2578–90.
44. Markowiak P, Slizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 2017; 9(9): 1021-51.
45. Markowiak-Kopeć P, Ślizewska K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients.* 2020; 12(4): 1107-30.
46. Masoumi SJ, Mehrabani D, Saberifiroozi M, Fattahi MR, Moradi F, Najafi M. The effect of yogurt fortified with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. probiotic in patients with lactose intolerance. *Food science & nutrition.* 2021; 9(3): 1704–1711.
47. Miller, S. S., & Fulcher, R. G. (2011). Microstructure and chemistry of the oat kernel. *Oats: Chemistry and technology*, (Ed. 2), 77-94.
48. Min M, Bunt CR, Mason SL, Hussain MA. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(16), 2626-2641. 2019.
49. Ministério da Saúde. Resolução da diretoria colegiada rdc nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da

- segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
50. Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(2): 187–91.
 51. Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
 52. Nigam D. Probiotics as functional foods in enhancing gut immunity. In: *Functional Food and Human Health*. Springer. 2018; 59-82.
 53. Nyanzi R, Jooste PJ (2012) Cereal-based functional foods. In: Rigobelo EC (ed) *Probiotics InTech*, pp 161–196
 54. Park, H. H., Jung, Y., & Lee, S. V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and cels.*, (2017); 40(2), 90–99.
 55. Peterson, D. M. (2001). Oat antioxidants. *Journal of cereal science*, 33(2), 115-129.
 56. Peterson, D. M., & Wood, D. F. (1997). Composition and structure of high-oil oat. *Journal of Cereal Science*, 26(1), 121-128.
 57. Rgia A Othman, Mohammed H Moghadasian, Peter Jh Jones. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. *Nutr Rev*. 2011; 69(6): 299-309.
 58. Rios-Covian D, Ruas-madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and Human health. *Front Microbiol*. 2016; 17(7): 185-194.
 59. Romão da Silva LF, de Oliveira Y, de Souza EL, de Luna Freire MO, Braga VA., Magnani M, de Brito Alves JL. Effects of probiotic therapy on cardio-metabolic parameters and autonomic modulation in hypertensive women: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. *Food & function*. 2020; 11(8): 7152–63.
 60. Sanders ME. Probiotics and microbiota composition. *BMC medicine*. 2016; 14(1): 82-4.
 61. Sharifi M, Moridnia A, Mortazavi D, Salehi M, Bagheri M, Sheikhi A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Med Oncol*. 2017; 34(11): 183-7.

62. Sharifi-Rad J, Rodrigues CF, Stojanović-Radić Z, Dimitrijević M, Aleksić A, Neffe-Skocińska K, Zielińska D, et.al. Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Med (Kaunas)*. 2020; 56(9): 433-63.
63. Sharma S, Singh A. Functional foods as a formulation ingredients in beverages: technological advancements and constraints. *Bioengineered*. 2021;12(2):11055-11075.
64. Sharma S, Singh A. Functional foods as a formulation ingredients in beverages: technological advancements and constraints. *Bioengineered*. 2021;12(2):11055-11075.
65. Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, et al. Beneficial properties of probiotics. *Trop Life Sci Res*. 2016; 27(2): 73-90.
66. Shvachko NA, Loskutov IG, Semilet TV, Popov VS, Kovaleva ON, Konarev AV. Bioactive Components in Oat and Barley Grain as a Promising Breeding Trend for Functional Food Production. *Molec*. 2021; 26(8): 2260-76.
67. Simon E, Călinoiu LF, Mitrea L, Vodnar DC. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Implications and Beneficial Effects against Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients*. 2021; 13(6): 2112-39.
68. Singh RK, Chang HW, Yan D, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017; 15(1): 73-90.
69. Stanton C, Desmond C, Coakley M, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. *Handbook of fermented functional foods*. 2003.
70. Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, Reimer RA, Reid G, Verbeke K, et.al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17(11) 687–701.
71. Tiwari, U., & Cummins, E. Meta-analysis of the effect of β -glucan intake on blood cholesterol and glucose levels. *Nutrition* 2011, 27(10), 1008-1016.
72. Topolska, K., Florkiewicz, A., & Filipiak-Florkiewicz, A. Functional Food-Consumer Motivations and Expectations. *International journal of environmental research and public health*, 2021 ; 18(10), 5327.

73. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Func Foods*. 2014; 9(7): 225–41.
74. Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, Wu TR, Lai WF, Lu C, et.al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *J Biomed Sci*. 2019; 26(1): 3-11.
75. Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J*. 2008; 18(7): 714-728.
76. Verspreet, J., Damen, B., Broekaert, W. F., Verbeke, K., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept. *Annual review of food science and technology*, 2016 7, 167-190.
77. Vitellio P, Celano G, Bonfrate L, Gobbetti M, Portincasa P, De Angelis M. Effects of bifidobacterium longum and lactobacillus rhamnosus on gut microbiota in patients with lactose intolerance and persisting functional gastrointestinal symptoms: A randomized, double-blind, Crossover Study. *Nutrients*. 2019; 11(4): 886-901.
78. Wang Y, Ames NP, Tun HM, Tosh SM, Jones PJ, Khafipour E. High molecular weight barley β -glucan alters gut microbiota toward reduced cardiovascular disease risk. *Front Microbiol*. 2016; 7(2): 129-44b.
79. Wang Y, Harding SV, Thandapilly SJ, Tosh SM, Jones P, Ames NP. Barley β -glucan reduces blood cholesterol levels via interrupting bile acid metabolism. *Br J Nutr*. 2017; 118(10): 822–829a .
80. Wang Y, Xie J, Li Y, Dong S, Liu H, Chen J, et.al. Probiotic lactobacillus casei zhang reduces pro-inflammatory cytokine production and hepatic inflammation in a rat model of acute liver failure. *Eur J Nutr*. 2016; 55(2): 821–31c.
81. Wolever, T. M., Tosh, S. M., Gibbs, A. L., Brand-Miller, J., Duncan, A. M., Hart, V., ... & Wood, P. J. Physicochemical properties of oat β -glucan influence its ability to reduce serum LDL cholesterol in humans: a randomized clinical trial. *The American journal of clinical nutrition*, 2010. 92(4), 723-732.
82. Wood, P. J., & Fulcher, R. G. Specific interaction of aniline blue with (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan. *Carbohydrate polymers*, 1984 4(1), 49-72.

83. Yılmaz, İ., Dolar, M. E., & Özpınar, H. (2019). Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(3), 242.
84. Zamberlan, D. C., Amaral, G. P., Arantes, L. P., Machado, M. L., Mizdal, C. R., Campos, M. M. A., & Soares, F. A. A. Rosmarinus officinalis L. increases Caenorhabditis elegans stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2016. 49.
85. Zwer, P. Oats: grain-quality characteristics and management of quality requirements. In *Cereal grains* Woodhead Publishing 2017. 235-256.

Capítulo II

Artigo

Desenvolvimento de bebida funcional fermentada e avaliação da atividade antioxidante no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

A procura por uma alimentação que promova um maior benefício à saúde vem aumentando nos últimos anos com interesse crescente pelas bebidas fermentadas de matriz vegetal e dentre os alimentos utilizados, os cereais como se destacam pelo perfil de nutrientes ser favorável para a fermentação com bactérias ácido lácticas. O farelo de aveia, neste contexto, se destaca por, além de conter maior quantidade de minerais, vitaminas e atividade antioxidante que qualquer outra parte do grão, apresentar maior concentração beta-glucanas, fibra solúvel com características funcionais e com grande potencial prebiótico, favorecendo a fermentação, podendo potencializar a biodisponibilidade desses nutrientes e por consequência os benefícios à saúde do consumidor. O objetivo deste estudo é desenvolver bebida funcional simbiótica fermentada à base de cultura probiótica e farelo de aveia, e avaliar o efeito antioxidante e de resistência ao estresse no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Duas formulações foram desenvolvidas, AF5 e AF15 contendo cultura probiótica e concentrações de 5% e 15% de farelo de aveia (v/v) respectivamente, o controle (PRO) com cultura probiótica e EA (estrato hidrossolúvel de aveia não fermentada). Após a realização de viabilidade bacteriana por 30 dias, foram avaliadas a capacidade antioxidante e a composição fenólica das bebidas. Em seguida foram realizadas as análises *in vivo* de espécies reativas de oxigênio e da capacidade de sobrevivência ao estresse térmico e químico. Os resultados indicam que a bebida AF15 favoreceu o aumento de cepas probióticas em período de armazenamento à frio (6°C) em comparação com as outras bebidas fermentadas. Além disso, a bebida fermentada AF15 apresentou aumento do teor de composição fenólica e na capacidade antioxidante e, relação a bebida EA. Enquanto isso, as bebidas com farelo de aveia diminuíram os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) basal e aumentaram a taxa de sobrevivência de vermes, quando submetidos ao estresse. Essas descobertas revelaram que a bebida de farelo de aveia fermentado, além de possuir característica simbiótica, têm potenciais efeitos antienvelhecimento ao prolongar a vida útil e aumentar a resistência ao estresse em modelo animal.

Palavras-chave: Alimento funcional, beta-glucana, probiótico, prebiótico, bebida fermentada.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da conscientização do consumidor sobre saúde e bem-estar tem promovido uma alta demanda por alimentos e bebidas não apenas considerada um meio de saciedade, mas também um meio de prevenção e controle de doenças; gerando maior interesse no mercado de produtos funcionais (TOPOLSKA et al, 2021, SHARMA et al., 2021; SINGH et al 2017). Alimentos e bebidas à base de probióticos são considerados como um dos potenciais alimentos funcionais que são bastante populares e têm uma aceitação mais ampla pelos clientes entre os novos alimentos funcionais no mercado (SHI et al, 2016).

Tem sido amplamente demonstrado que a fermentação com bactérias lácticas melhora as características sensoriais, qualidade nutricional, textura e segurança de vegetais contendo amido, incluindo cereais. Fortes evidências científicas suportam os efeitos benéficos da fermentação de bactérias lácticas em matrizes de cereais, aumentando o conteúdo e a biodisponibilidade de compostos fenólicos e atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias além de fornecerem todos os benefícios da suplementação de probióticos (APARICIO-GARCIA et al, 2021).

Para que o consumo de probiótico exerça função na melhora da saúde do consumidor, é recomendado a ingestão diária de 6 log a 10 log Unidades formadoras de colônia (UFC)/dia de microrganismos viáveis. VASILJEVIC & SHAH (2008) explica que essa grande quantidade UFC sugerida, de tem como objetivo compensar a possibilidade de redução da concentração dos probióticos durante o processamento, estocagem e, ainda, durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa, regulando a produção de anticorpos, interleucinas, citocinas e linfócitos; interagindo com microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos e se comunicando com as células do hospedeiro. Esses mecanismos podem conduzir a redução de patógenos, ao fortalecimento

da barreira intestinal, à redução da inflamação e à melhora da resposta imune (GUARNER, 2017, NAGPAL et al. 2012, HARDY et al. 2013).

Um dos mecanismos envolvidos neste processo é através do estímulo de produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC são produzidos após a fermentação de prebióticos por bactérias da laticas da microbiota intestinal. Além da função de fonte de energia, os AGCC diminuem do pH lumial, inibindo o crescimento e a translocação de bactérias patogênicas e influenciando a motilidade intestinal (VERSPREET et al., 2016). Além disso, os AGCC s também atuam como moléculas sinalizadoras reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatorias. (CORREA-OLIVEIRA R, et al. 2016).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de espécies bacterianas no intestino, assim, exercem influência positiva na saúde do organismo hospedeiro (LEFRANC-MILLOT, et al, 2012). Por consequência, a aveia é um cereal que demonstra um potencial probiótico que preenche os requisitos descritos anteriormente.

A aveia (*Avena sativa* L.) é tradicionalmente considerada um cereal de excelente valor nutricional e é caracterizada pela presença de uma variedade de compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, como os tocoferóis (DE SA, et al, 2000, SHVACHKO, 2021). Dentre os produtos derivados desse cereal, o farelo da aveia é caracterizado por conter a maior quantidade de minerais (PETERSON et al, 1975); vitaminas (FULCHER et al, 1981) e atividade antioxidante (PETERSON et al, 2001) que qualquer outra parte do grão, destacando-se também as (1-3)(1-4) beta -D-glucanas, que fazem parte da fração solúvel da fibra alimentar contidas em maior volume no farelo de aveia.

A beta-D-glucana é uma fibra solúvel, portanto apresenta alta capacidade de retenção de água e possui a propriedade de formar géis em solução aquosa e de alterar a viscosidade de produtos alimentares. Esses atributos proporcionam ao consumidor alguns benefícios provocados pelo aumento da viscosidade do bolo alimentar: diminuição na atividade de certas enzimas digestivas, influenciando diretamente no tempo de digestão e, logo, na absorção

de nutrientes. Essa característica da beta-glucana influencia diretamente no controle da glicemia pós-prandial, na resposta insulínica, redução do colesterol e regulação do apetite (MAHAN et al., 2017).

Estudos indicam o potencial prebiótico da fibra dietética solúvel β -glucana, estimulando o crescimento de alguns gêneros bacterianos que promovem a saúde dentro do cólon (KRISTEK, 2019), ainda aumentando níveis de AGCC a nível intestinal, promovendo seletivamente o crescimento de Bacteroidetes, Lactobacillus, Enterococcus e Coprobacillus spp; e diminuição da abundância de Firmicutes (WANG, 2016b).

Além disso, uma análise *in vitro* verificou efeitos benéficos das fibras dietéticas prebióticas, incluindo sua capacidade de influenciar o crescimento de populações bacterianas e formar AGCCs constatou que as amostras de farelo de aveia apresentaram concentrações significativamente maiores de propionato (AGCC) em comparação com as outras fibras dietéticas prebióticas inulina e xilooligossacarídeos (CARLSON, 2017). E esse resultado positivo incentiva a busca por produtos derivados desta fibra, que possam replicar ou extrapolar tais benefícios.

A Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP), definiu simbióticos como “uma mistura composta de microrganismos vivos e substrato(s) utilizado(s) seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde do hospedeiro”. Dessa forma, os simbióticos alimentares elaborados a partir de uma matriz alimentar de origem vegetal composta por elementos prebióticos, fermentada por microrganismos probióticos podem ser considerados uma alternativa para garantir que os efeitos probióticos e prebióticos sejam alcançados da melhor forma e, ao mesmo tempo, trazer benefícios à saúde do consumidor, podendo ainda ser uma alternativa aos derivados lácteos. (SWANSON, 2020).

Caenorhabditis elegans é um nematóide de vida livre que se alimenta de bactérias e é considerado um forte modelo experimental devido à sua facilidade de cultivo, seu curto ciclo de vida e reprodutibilidade e capacidade de reproduzir populações isogênicas sincronizadas. Além disso, estima-se que 60-80% dos genes de *Caenorhabditis elegans* tenham um ortólogo humano (Baumeister,

2002). Devido à essas características, esse nematóide tem sido utilizado para estudar o processo de envelhecimento e como ele é afetado por diferentes substâncias e condições ambientais (KATO et al., 2017; AYUDA-DURAN et al., 2019; WANG et al., 2020d). Os ensaios de sobrevivência do *Caenorhabditis elegans* têm sido ferramentas essenciais para o estudo de processos fisiológicos, incluindo envelhecimento e resistência ao estresse, fornecendo informações importantes sobre a interação entre estresses e processos biológicos, como a homeostase celular (PARK et al., 2017).

Nesse sentido, inúmeras linhas de evidência sugerem que os compostos bioativos da dieta e a alimentação com bactérias ácido-láticas têm a capacidade de diminuir os danos celulares associados ao estresse oxidativo, prolongando a vida do animal (IKEDA et al. 2007; ZAMBERLAN et al. 2016; GRAF et al. 2017). Portanto, essas características fazem de *C. elegans* um modelo muito adequado para conduzir análises preliminares do efeito de novos alimentos com características funcionais e, assim, fornecer dados valiosos e relevantes para apoiar estudos subsequentes.

A fim de melhorar nosso conhecimento sobre a bebida de farelo de aveia fermentada com bactérias ácido-láticas, o objetivo do presente trabalho é desenvolver bebida funcional simbiótica fermentada à base de cultura probiótica e farelo de aveia, e avaliar do efeito antioxidante e de resistência ao estresse no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1 Ativação da cultura probiotica liofilizada

Cultura probiótica liofilizada contendo *Lactobacillus plantarum*, *Lantobacillus casei*, *Lactobacillus acidófilos* e *bifidobacteria lactis* foi utilizado como cultura inicial neste estudo devido ao seu metabolismo versátil e capacidade de crescimento em diferentes materiais vegetais e também devido às suas características probióticas.

A cultura inicial foi ativada por incubação durante 24h em caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS; Sigma-Aldrich) em anaerobiose.

2.2 Preparo do extrato hidrossolúvel de aveia e Preparo do produto vegetal fermentado

Para preparar a bebida vegetal, o farelo de aveia Quaker® foi incorporado à água deslilada aquecida à 70°, durante 15 minutos seguido de trituração em mixer doméstico por 60 segundos. O valor nutricional do farelo aveia Quaquer®, contém em sua composição, a cada 10g, 34 kcal, 1,8 g de proteína, 1,1 g de gorduras totais, 4,2 g de carboidratos, 1,5 g de fibra alimentar e 0,8g de Beta-glucana.

Duas formulações de bebidas vegetal contendo farelo de aveia (AF5 e AF15) foram preparadas. A formulação AF5 continha 5% de concentração de farelo de aveia Quaker® (v/v) e a formulação AF15 continha 15% de concentração de farelo de aveia. Para controle positivo, foi utilizada a formulação (PRO), composto preparado com uma solução de açúcar mascavo em água destilada (6% m/v) para fermentação das cepas probióticas.

Em todas as formulações, visando uma concentração inicial de ~ 7,0 Log UFC.ml⁻¹.

Após o preparo, foram expostas termicamente a 37°C, durante 24h durante o período de fermentação. Após o período de fermentação as bebidas fermentadas foram armazenadas em temperatura de refrigeração (6°C ± 0,5°C) por 30 dias.

2.3 Contagem microbiológica

A contagem de lactobacillus nas bebidas fermentadas AC, AF5 e AF15 foi enumerada seguindo o método padrão de contagem em placas conforme técnica descrita por Silva (2007). Primeiramente, uma fração de cada amostra foi suspensa em solução salina e diluída em série. Alíquotas das diluições foram inoculadas em placas estéreis com meio de cultura seletivo MRS Agar, Vegitone. As placas inoculadas foram incubadas a 37 °C por 72h em frascos anaeróbicos de acordo com metodologia padrão.

Após o período de incubação, foram feitas contagens das unidades formadoras de colônias (UFC), estabelecendo a concentração de microorganismos por meio do número em UFC/g multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição ($\text{UFC/g} = \text{N}^\circ \text{ de colônias/diluição}$) (PEREIRA et al. 2007). A contagem de bactérias foi realizada em três momentos: 1 dia após os processos de fermentação (D1) e nos intervalos de 15 e 30 dias durante o período de armazenamento (D15 e D30 respectivamente). Os dados são expressos como o logaritmo de unidades formadoras de colônias por mL ($\text{Log } 10 \text{ CFU mL}^{-1}$).

2.4 Determinação do pH

O valor do pH de cada uma das bebidas foi medido por meio de pHmetro digital (KASVI, K39-1014B), devidamente calibrado. O eletrodo foi imerso diretamente na amostra e a leitura foi realizada após a estabilização do valor aferido (Association of Official Agricultural Chemists - AOAC, 2000). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

2.5 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com Luo et al. (2018). Foram pipetados 20 µl de cada extrato em microplaca e 80 µl de Folin Ciocalteu 10% (Sigma®). Após 4 minutos, adicionou-se 100 µl de Carbonato de Sódio 7,5% (Sigma®). Após 2 horas, a absorbância foi lida a 765 nm em espectrofotômetro SpectraMax ® 190. A análise do branco foi realizada com água deionizada no lugar do extrato. Uma curva analítica de ácido gálico

Dinâmica Ltda ®, nas concentrações de 10 a 100% foi elaborada, gerando a equação de regressão ($y = 0,221x + 0,0406$; $R^2=0,9937$) para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra

2.6 Determinação da capacidade antioxidante

Trinta microlitros (30 µl) de cada bebida foram pipetados em uma microplaca e adicionados de 270 µl do radical ABTS. Após 6 minutos, a absorbância foi lida a 734 nm em espectrofotômetro SpectraMax® 190. A análise do branco foi realizada com água deionizada. Uma curva analítica de ácido gálico foi preparada a partir das concentrações de 0,00002 a 0,00250 µg, gerando a equação de regressão ($y = -364,62x + 0,7521$; $R^2 = 0,9854$) para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. Os resultados também foram expressos por meio da atividade de eliminação do radical (I), utilizando a equação: $I (\%) = [(Abs \text{ branco} - Abs \text{ amostra}) \times 100] / Abs \text{ Branco}$ (RE et al. 1999).

2.7 Avaliação *in vivo* utilizando o organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

2.7.1 Cepas de *Caenorhabditis elegans*, manutenção e sincronização

Os ensaios *in vivo* foram realizados em cepas de *Caenorhabditis elegans* N2, do tipo selvagem, cedidas gentilmente pelo Laboratório de Toxicologia (LATOX), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

A manutenção das cepas foi realizada em placas de meio de crescimento para nematoides (NGM), semeadas com *Escherichia coli* OP50 e encubadas à 20°C (Brenner, 1974).

A sincronização para obtenção dos *Caenorhabditis elegans* no primeiro estágio larval (L1) foi realizada a partir da liberação dos ovos dos nematoides grávidos (AUGUSTI et al., 2017; RANGSINTH et al., 2019). Para isso, os nematoides foram coletados em tubos, aos quais foi adicionada a solução de lise contendo NaOCl (Neon, SP, Brasil) 1% e NaOH (Neon, SP, Brasil) 0,25 M. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 6 minutos e em seguida foram levados à centrifugação por 6 minutos a 3600rpm. Em seguida, o sobrenadante

foi removido e o sedimento foi lavado com água estéril e centrifugado por 6 minutos a 3600rpm.

Após descartar a água, os ovos sedimentados foram ressuspensos em solução tampão M9, 0,02 M KH₂PO₄, 0,04 M de Na₂HPO₄, 0,08 M NaCl, (Neon, SP, Brasil) e 0,001 M de MgSO₄(Neon, SP, Brasil) (RANGSINTH et al., 2019), colocados em placas contendo o meio NGM sem adição de bactérias e levados para incubação durante o período de 16 horas para eclosão dos ovos e liberação das larvas (CHARÃO et al., 2015; AUGUSTI et al., 2017).

2.7.1.1 Tratamento

1000 vermes previamente sincronizados foram tratados com a bebida de aveia fermentada com lactobacillus (AF15), bebida probiótica fermentada com açúcar mascavo (PRO) e água destilada autoclavada, usada como grupo controle negativo, e em seguida, foram transferidos para placas NGM, inoculada com a bactéria *E. coli* OP50 para os ensaios posteriores (AUGUSTI et al., 2017) durante 48 horas até que atingissem estágio larval L4.

2.7.2 Medição de Espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular em *Caenorhabditis elegans*

A sonda fluorescente não polar diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H 2 DCFDA) foi empregada para determinar EROs citoplasmáticos in vivo em vermes de em estágio larval L4 após tratamento prévio nas bebidas AF15, AE, PRO e controle (sem tratamento), conforme descrito por Yoon et al (2018). Os vermes de cada um dos tratamentos foram transferidos para uma placa de 96 poços (~20 vermes por poço) contendo 50 µM DCFH-DA. A intensidade da fluorescência foi posteriormente medida usando o espectrofotômetro SpectraMax® 190 (Excitation-485, Emission-535).

As leituras de fluorescência foram realizadas nos períodos de 0h, 30 min, 1h, 2h, 4h e 6h. O registro da intensidade de fluorescência do DCF em vermes foi usado como um índice dos níveis intracelulares de ROS. Os resultados foram expressos em emissão de fluorescência.

2.7.3 Ensaios para estresse

2.7.3.1 Estresse térmico

Cerca de 60 animais de cada grupo foram transferidos para três novas placas contendo 20 animais em cada e mantidos a 37 °C em estufa. A sobrevivência foi verificada em 30 minutos, 2h, 4h, 6h e 8 horas, usando microscópio. Os animais foram considerados mortos se não realizassem mais batimento faríngeo. A análise de sobrevivência foi calculada como a porcentagem de animais sobreviventes na população. Um total de 20 vermes foi observado para cada tratamento (adaptado de Bonomo et al, 2014 e Feng et al, 2015).

2.7.3.2 Ensaio para estresse químico

Para testar se o tratamento com Bebida de aveia fermentada com probióticos promove um aumento na resistência ao estresse oxidativo, os animais tratados ou não com a bebida foram transferidos para uma solução de tampão M9 contendo 7,5mM de tert-butil Hidroperóxido (t-BOOH), um análogo do peróxido de hidrogênio mais estável em meio líquido.

Cada experimento foi realizado em placas de 96 poços, onde 30 animais por grupo foram colocados em 3 poços com uma média de 10 animais por poço. A viabilidade dos animais foi analisada após 30 minutos, 2, 4, 6 horas usando microscópio óptico (Nikon, Japão) para contar o número de animais vivos e mortos (adaptado de BONOMO et al, 2014). Os animais foram considerados mortos se não realizassem mais batimento faríngeo. A análise de sobrevivência foi calculada como a porcentagem de animais sobreviventes na população. Um total de 20 vermes foi observado para cada tratamento.

2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos três vezes para avaliação estatística dos dados.

Para avaliar a viabilidade das bactérias lácticas após fermentação (Dia 1) e após armazenamento em temperatura controlada (Dia 15 e Dia 30) de cada amostra, foi utilizado um delineamento fatorial considerando dois fatores:

- Dia: dividido em três níveis, dia de criação (Dia 1), após 15 dias (Dia 15) e após 30 dias (Dia 30)
- Produto: também dividido em três níveis para cada uma das concentrações de aveia, produto controle (PRO), produto AF5 e produto AF15.

Para normalizar os resultados obtidos, uma transformação de variáveis “log-Transformation” foi realizada, aplicando o logaritmo natural da variável resposta como novo valor. A significância da diferença entre as médias foi determinada por teste post-hoc de Tukey utilizando software R.

As análises de pH foram realizadas com realização de média. A significância da diferença entre as médias foi determinada por teste post-hoc de Tukey.

Para comparação de duas médias, no caso dos teores de polifenóis e ABTS, foi realizado o teste t de Student não pareado.

A análise de sobrevivência do *C. elegans* foi realizada usando o método de Kaplan-Meier, e a significância estatística foi analisada por um teste de log-rank (Mantel-Cox). Para avaliar a intensidade de fluorescência provocada pelas EROs foi realizado ANOVA com teste de comparação de médias post-hoc Bonferroni.

Todas as análises foram realizadas em triplicada. Os dados dos ensaios de pH, teor de polifenol, ABTS e análises *in vivo* foram analisados usando Excel e software GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS

3.1 Farelo de aveia otimizou crescimento de lactobacillus em período de armazenamento.

O perfil de crescimento, conforme mostrado na Figura 1, demonstrou que houve um aumento significativo na contagem de bactérias viáveis durante os primeiros 15 dias de armazenamento das bebidas PRO (1.10^7 UFC.ml⁻¹), AF5 (1.10^9 UFC.ml⁻¹) e AF15 (7.10^9 UFC.ml⁻¹), em comparação com o dia 1: PRO (7.10^6 UFC.ml⁻¹), AF5 (4.10^7 UFC.ml⁻¹), AF15 (1.10^8 UFC.ml⁻¹), com uma ligeira diminuição após 30 dias de armazenamento em temperatura controlada PRO (2.10^7 UFC.ml⁻¹), AF5 (2.10^8 UFC.ml⁻¹) e AF15 (6.10^8 UFC.ml⁻¹). Este aumento no crescimento celular foi acompanhado por uma diminuição significativa nos valores de pH de 6,25 para 3,69 após 1 dia de fermentação e para 3,45 após 15 dias para AF5, e de 6,67 para 3,79 após 24 h de fermentação, e para 3,5 após 15 dias de armazenamento para AF15 (Figura 3). Curiosamente, apesar de não apresentar diferença de crescimento bacteriano entre os dias 1 e 15 ($p>0,05$) o controle PRO manteve uma redução significativa de pH do dia 1 para o dia 15 ($p<0,05$). O farelo de aveia acelerou o crescimento, refletido na contagem de células e na manutenção de bactérias lácticas viáveis e no nível de pH durante período de armazenamento de 30 dias.

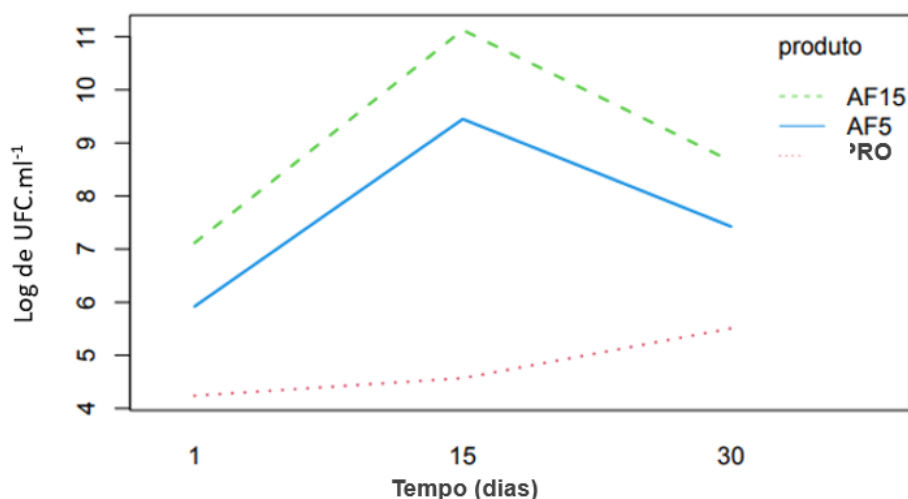


Figura 3: Viabilidade de cepas probióticas durante a fermentação (média $\pm$ DP) nas bebidas: PRO bebida probiótica açucarada a 6% (v/v) durante a fermentação de *Lactobacillus*; -AF5, bebida com 5% de farelo de aveia durante a fermentação

de *Lactobacilos*; AF15, bebida com 15% de farelo de aveia durante a fermentação de *Lactobacilos*; nos períodos de 1, 15 e 30 dias após armazenamento.

Ao analisarmos os resultados da entre os tratamentos, notamos que há diferença nos níveis do fator Dia, no fator Produto e nas interações entre eles (Tabela 1). As diferenças, observando o p-value, nos revelam melhor interferência dos tratamentos A15 e A5 no 15º dia de armazenamento à 6°C, o mesmo não se dá para o produto controle PRO.

É possível observar que as culturas iniciadoras utilizadas no experimento permaneceram viáveis em todas as bebida analisadas, durante o período de armazenamento avaliado (contagens acima de 7 log de células viáveis por mL), porém a bebida contendo 15% de farelo de aveia (AF15) se destacou apresentando maior crescimento de bactérias viáveis no período de armazenamento de 15 dias ($p < 0,0001$), o que leva a acreditar que o percentual de beta-glucana da bebida atuou como substrato para crescimento das cepas de *Lactobacilos*.

Tabela 1: Comparação de médias de UFC.^{ml-1} entre produtos e dias de armazenamento.

Comparação Dia/Amostra	p value
1:AC-15:PRO	0,93
15:AC-30PRO	0,042
1:AF5-15:AF5	>0,0001
15:AF5-30:AF5	0,0005
1:AF15-15:AF15	>0,0001
15:AF15-30:AF15	>0,0001
1:PRO-1:AF5	0,0001

1:PRO-1:AF15	>0,0001
1:AF5-1:AF15	0,005
15:PRO-15:AF5	>0,0001
15:PRO-15:AF15	>0,0001
15:AF5-15:AF15	0,0001
30:PRO-30:AF5	>0,0001
30:PRO-30:AF15	>0,0001
30:AF5-30:AF15	0,042

PRO: bebida probiotica açucarada a 6% (v/v) durante a fermentação de *lactobacilos*; AF5, bebida fermentada com 5% de farelo de aveia; AF15, bebida fermentada com 15% de farelo de aveia.

Após o inóculo das bactérias ativadas, pode-se observar que as diferentes bebidas apresentavam diferença significativa de pH ($p < 0,05$). 24h após o período de fermentação à 37°C, observou-se diferença significativa apenas entre as bebidas PRO-AF5 e AC-AF15 ($P < 0,05$) não havendo diferença entre as bebidas fermentadas com aveia AF5 e AF15 ($p > 0,05$). Ainda é possível observar uma diminuição no pH das bebidas PRO, AF5 e AF15 ($p < 0,05$) após 15 dias de armazenamento em baixa temperatura (6°C) o que corrobora com a atividade bacteriana, observada no crescimento de UFC (Figura 1; $p < 0,05$).

Tabela 2: Controle de pH das bebidas desenvolvidas antes e após fermentação e durante armazenamento em baixa temperatura;

Dias	PRO	AF5	AF15
0			
(Antes da fermentação)	6,45 ± 0,04 ^{a,A}	6,25 ± 0,04 ^{b,A}	6,67 ± 0,04 ^{c,A}

1	2,84 ± 0,14 ^{a,B}	3,69 ± 0,03 ^{b,B}	3,79 ± 0,06 ^{b,B}
15	2,54 ± 0,15 ^{a,C}	3,45 ± 0,11 ^{b,C}	3,5 ± 0,11 ^{b,C}

PRO: bebida probiótica açucarada fermentação; AF5: bebida com 5% de farelo de aveia; AF15: bebida com 15% de farelo de aveia. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. A diferença estatística foi calculada com teste de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $p < 0,05$. ^{a-c}Linhas que compartilham letras diferentes são significativamente diferentes. ^{A-C} Colunas que compartilham letras diferentes são significativamente diferentes.

3.2 Fermentação de bactérias ácido-láticas aumentou compostos bioativos de farelo de aveia.

O teor de compostos fenólicos totais e as atividades antioxidantes foram investigados nas bebidas AF15 extrato hidrossolúvel de farelo aveia a 15% (v/v) fermentado e a bebida controle extrato hidrossolúvel de farelo aveia a 15% sem fermentação (EA). Os resultados observados neste estudo demonstram que os níveis de compostos bioativos e as capacidades antioxidantes aumentam após fermentação por bactéria láctea (Tabela 3).

Tabela 3. Capacidade antioxidante (ABTS) e compostos fenólicos totais (Eq Ác Gálico/ml) da bebida fermentada de aveia 15% (AF15) e não fermentado (EA).

Bebida	ABTS (IR50)	Polifenóis totais (mg.ml ⁻¹)
AF15	7856 ± 237,8 ^b	1290 ± 20,82 ^b
EA	10978 ± 163,7 ^a	943 ± 24,25 ^a

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. A diferença estatística foi calculado com teste de T de Student. ^{a,b} Colunas que não compartilham letras semelhantes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). AF15, bebida fermentada com 15% de farelo de aveia. EA bebida de farelo de aveia não fermentada.

3.3 Análises *In vivo*

3.3.1 Tratamento com farelo de aveia e farelo de aveia fermentado com BAL reduziu níveis de EROs Basal em *C. elegans*

O verme *C. elegans* foi utilizado para avaliar o potencial antioxidante da bebida fermentada de farelo de aveia *in vivo*. Na figura 4A, observamos que os vermes tratados com AF15 e EA tiveram uma produção basal de EROs significativamente menor do que os vermes tratados com a bebida CONTROLE ($p < 0,001$) e que ao grupo tratado apenas com probiótico (PRO) ($p < 0,001$). Nesse período não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados AF15 e EA ou entre os grupos EA e PRO. Além disso, o tratamento com PRO não

demonstrou efeito antioxidante durante os 6 momentos de análise (tempo 0h ao tempo 6h), não apresentando diferença quando comparado ao grupo controle, não tratado ($p>0,05$).

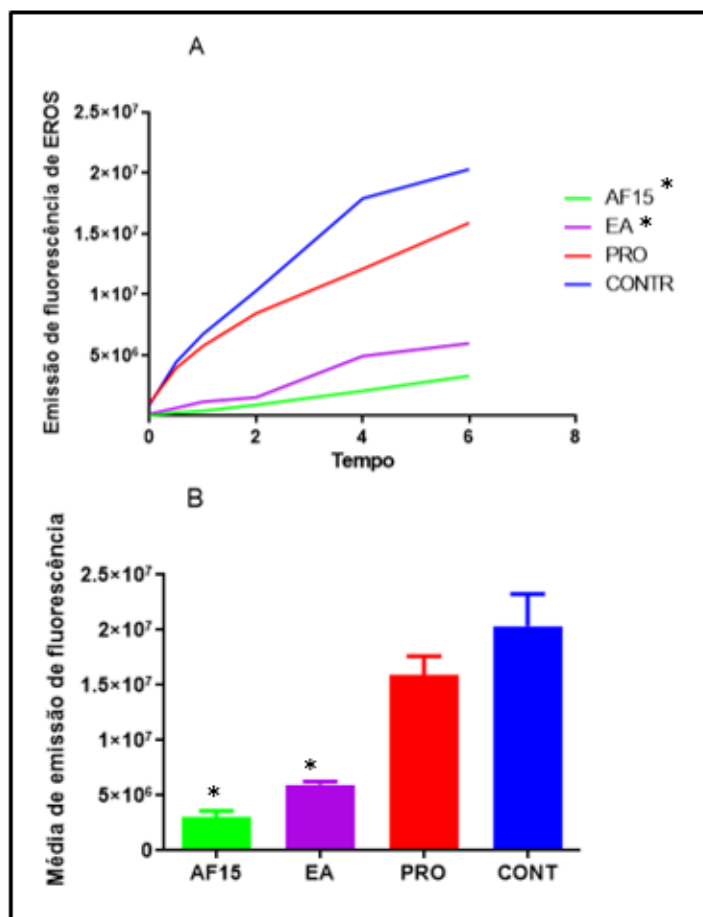


Figura 2: A: Curva de regressão linear de emissão de fluorescência por produção de EROS nos tempos 0, 0,5h, 2h, 4h e 6h. * $p < 0,001$ quando comparados ao grupo PRO e CONT. **B:** Acumulo de emissão de fluorescência entre os tratamentos. * $p < 0,001$. quando comparados ao grupo PRO e CONT. AF15: bebida fermentada de aveia, EA: extrato hidrossolúvel de aveia, PRO: bebida probiotica fermentada com açúcar mascavo, CONT: sem tratamento. Os resultados são expressos como porcentagem de fluorescência em relação aos controles nos tempos 0, 0,5h, 1h, 2h, 4h e 6h. Os resultados são apresentados como valores médios $\pm$ DP. A significância estatística foi calculada usando a análise de variância ANOVA para comparação de médias, teste post-hoc de TuKey.

Apesar de não apresentar significância entre as médias de emissão de fluorescência entre os tratamentos AF15 e EA, houve uma diminuição de 53,7% na intensidade da média de fluorescência provocada por EROs nos vermes alimentados com AF15 em comparação com os alimentados com EA (Figura 2B).

3.3.2 Ensaio de resistência ao estresse

A extensão do tempo de vida é frequentemente associada com maior resistência ao estresse em *C. elegans* (FENG et al, 2018).

3.3.2.1 Estresse Térmico

Em primeiro lugar, medimos o tempo médio de vida de *C. elegans* em condições de estresse térmico a 37 °C para investigar a influência da tolerância ao calor mediada pela bebida de aveia fermentada probiótica (AF15), pela bebida de aveia sem fermentação (EA), bebida probiótica açucarada (PRO) e sem tratamento (Figura 5). O percentual de sobrevivência dos vermes ao final das 8h de análise foi de 0% para bebida CONT, 2,7% para bebida PRO, 13% para bebida EA e 15,7% para bebida AF15. Após análise dos resultados com teste Log-rank, os resultados revelaram que a suplementação com a bebida de aveia fermentada mitigou o estresse térmico e aumentou as taxas de sobrevivência dos vermes quando comparada com os tratamentos PRO e CONT ($p < 0,01$) (Figura 5B, 5C). No entanto não foi observada diferença estatística entre o percentual de sobrevivência das bebidas de farelo de aveia AF15-AE (Figura 5A) e entre as bebidas EA-PRO (Figura 5E).

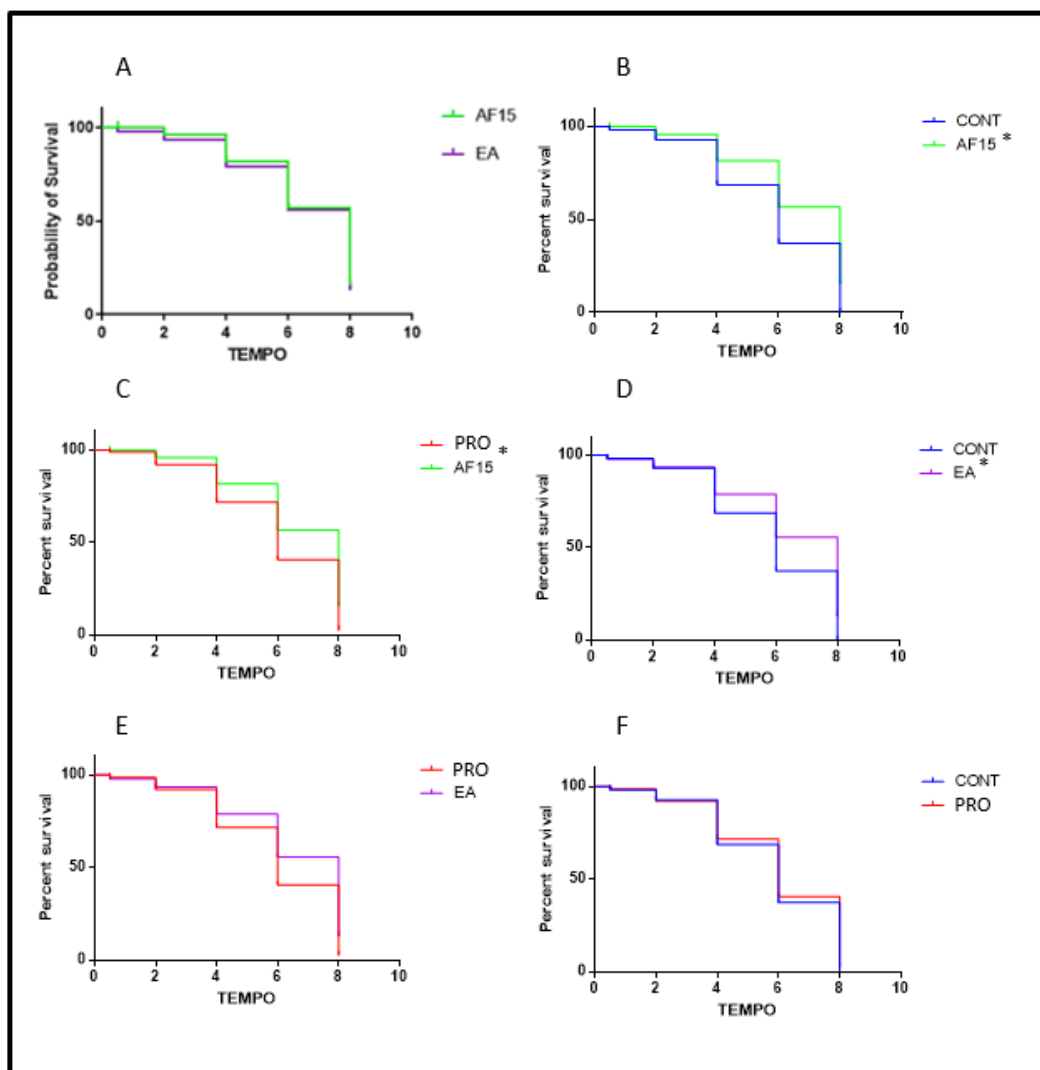


Figura 5: Efeito das diferentes bebidas no aumento da resistência ao estresse térmico em *Caenorhabditis elegans*. * $p < 0,01$. A significância estatística da sobrevivência foi analisada por um teste de log-rank AF15: bebida fermentada de aveia, EA: extrato hidrossolúvel de aveia, PRO: bebida probiótica fermentada com açúcar mascavo, CONT: sem tratamento.

3.3.2.2 Ensaio para estresse químico

Na sequência, foi avaliado se o tratamento com AF15 aumentou a sobrevivência de *C. elegans* em condições de estresse oxidativo induzido por t-BOOH. O percentual de sobrevivência dos vermes ao final das 6h de análise foi de 4% para bebida CONT, 44,3% para bebida PRO, 56% para bebida EA e 63,6% para bebida AF15.

A probabilidade de sobrevivência de vermes tratados com AF15, EA e PRO não mudou significativamente (Figura 6B, 6D, 6F). Esses resultados indicam que com a concentração de T-BOOH usada neste estudo, tanto o

consumo de probiótico (PRO), o consumo de bebida de farelo de aveia (EA) ou a combinação dos dois (AF15) podem prolongar a vida útil de maneira semelhante $p>0,05$.

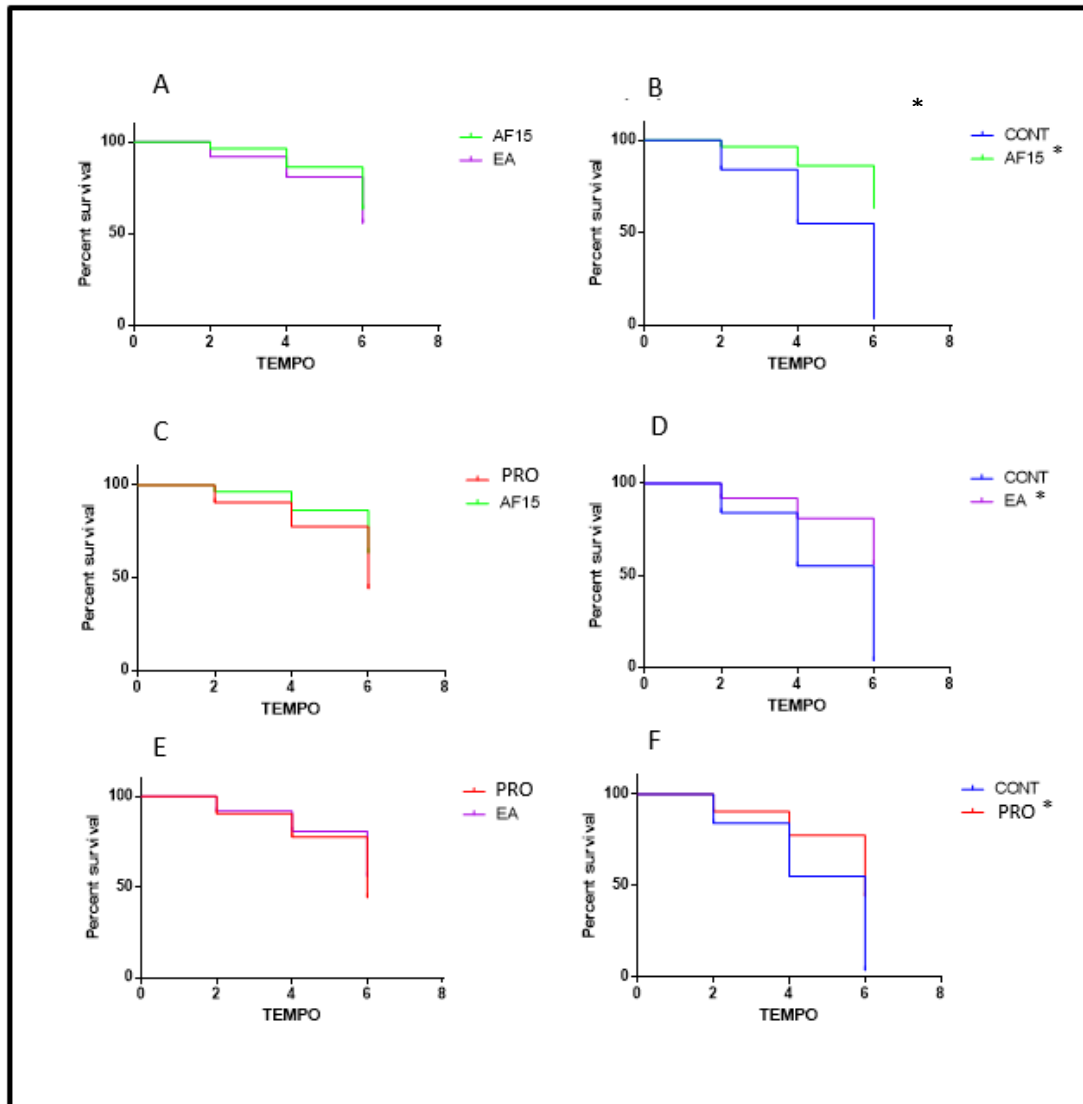


Figura 6: Análise de sobrevivência de nematoides submetidos ao estresse químico com t-BOOH. * $p < 0,01$. A significância estatística da sobrevivência foi analisada por um teste de log-rank AF15: bebida fermentada de aveia, EA: extrato hidrossolúvel de aveia, PRO: bebida probiotica fermentada com açúcar mascavo, CONT: sem tratamento.

4 DISCUSSÃO

O principal achado deste trabalho foi validar a característica probiótica conferida ao farelo de aveia, que aumentou a atividade bacteriana durante fermentação controlada a 37°C e ainda durante período de armazenamento em baixa temperatura (6°C), conferindo à bebida desenvolvida uma característica simbiótica sinérgica, pois este demonstrou que além de substrato para crescimento das bactérias ácido lácticas, ainda confere benefícios específicos ao hospedeiro. É importante ainda endossar que, para garantir o efeito probiótico de um alimento, um dos critérios estabelecidos é que deve haver no mínimo 6 Log UFC.mL⁻¹ no produto, para assegurar que um número suficiente de células seja ingerido para permanecer viável durante o trânsito gastrointestinal e ter efeito no hospedeiro (KLAJN et al 2021).

No caso da bebida elaborada AF15, a combinação de farelo de aveia com as cepas probióticas promoveu aumento do número de UFC viáveis durante o período de armazenamento de 30 dias em temperatura controlada a 6°C, onde a menor concentração de bactérias probióticas foi de 1.10⁸ ufc/ml 24h após fermentação e a maior concentração de 7.10⁹ UFC/ml após 15 dias de armazenamento, estando o produto próprio para uso de seus benefícios em até 30 dias de armazenamento (Figura 3).

Outros autores analisaram o comportamento de BAL após fermentação de cereais. Em um estudo em que a farinha de aveia integral e mel foram fermentados com *Lactobacillus fermentum*, a contagem de UFCs viáveis permaneceu relativamente estável durante o armazenamento a 4°C por 10 dias (7,40 log UFC/ml) e 14 dias (7,32 log UFC/ml) (Chen L, 2020). Da mesma forma, o probiótico *L. casei* fermentado com diferentes substratos de aveia (aveia simples, aveia germinada e aveia maltada) com variadas porcentagens de aveia (3%, 5% e 7% p/v), após 24h de fermentação à 37°C, teve um crescimento celular final de 6,3 a 7,12 log UFC/ml, observando que na bebida de aveia simples, o maior crescimento celular foi observado no meio 7% p/v (7.12 ± 0.07 Log 10 UFC ml⁻¹). Na aveia germinada, assim como no substrato aveia maltada, os maiores crescimentos celulares foram observados no meio 3% p/v com 6.90

± 0.18 e 7.12 ± 0.07 Log 10.UFC ml⁻¹, respectivamente (HERRERA-PONCE et al., 2014).

Em contrapartida, Gupta et al. (2010) mostraram que em um extrato de aveia e açúcar, houve um alto crescimento de 10,4 log UFC/ml *L. plantarum* ATCC 8014; no entanto, ocorreu uma redução de viabilidade de cerca de 0,5 log UFC/ml aos 14 dias e 0,9 log UFC/ml aos 21 dias durante o armazenamento a 4°C. Em estudo semelhante, foi analisada a capacidade de sobrevivência dos probióticos após fermentação em bebidas de cereais durante o armazenamento por 28 dias em uma condição refrigerada. Ambas as cepas probióticas utilizadas *L. casei* e *L. plantarum* reduziram durante armazenamento (MOHAMMADI et al, 2021).

Para o desenvolvimento de alimentos funcionais, não apenas a alta viabilidade celular alcançada durante a fermentação é suficiente para manter a função do probiótico e o nível desejado de produção de ácido, mas a estabilidade de células viáveis durante o armazenamento também é importante para manter a qualidade dos produtos. Nossos resultados demonstraram que este produto fermentado com farelo de aveia tem um grande potencial para a entrega de células viáveis de *Lactobacillus*.

A característica principal da fermentação com BAL é produzir rapidamente ácido láctico, favorecendo a diminuição do pH. Outra característica da fermentação de cereais com BAL é a produção de bacteriocina, uma substância antimicrobiana produzida por algumas cepas de *Lactobacillus* que têm a capacidade de impedir o crescimento de patógenos (NYANZI & JOOSTE, 2012). Dessa forma, atua como bioconservante, desempenha um papel importante na durabilidade microbiológica do produto (MÄKINEN et al. 2015 ; ANGELOV et al 2018).

No presente estudo, foi possível observar uma redução significativa do pH de todas as bebidas formuladas PRO, AF15 e AF5 após 24 horas de fermentação sob temperatura de 37°C. Após 15 dias de armazenamento em temperatura de refrigeração controlada a 6°C, houve uma redução significativa de pH das bebidas PRO (2,48 para 2,54), AF5 (3,69 para 3,45) e AF15 (3,79 para 3,5). Há evidência que em bebidas com base de extrato de cereais

fermentados com bactéria ácido lácticas há uma leve atividade fermentativa mesmo em baixa temperatura em armazenamento indicado pela redução de pH (MOHAMMADI et al 2021).

Chen e colaboradores (2020) também observaram uma diminuição significativa do pH de 6,26 para 4,12 após 24 h de fermentação, e uma nova queda para 3,93 em 72 h na bebida de farinha de aveia integral fermentada com *L. fermentum* PC1 e mel. O pH do produto fermentado, contrapondo nossos achados, manteve-se constante durante o armazenamento a 4°C.

No estudo de Dąbrowski et al. (2022), nas bebidas controle de aveia o pH foi próximo do neutro (bebida de aveia com pH 7,05) e o pH final das bebidas produzidas após fermentação o pH determinado variou de 2,80 a 2,90. Os autores ainda afirmam que a acidificação para pH abaixo de 4,5 é um sintoma típico de fermentação LAB e obtenção de uma densidade final de bactérias lácticas superior a 8 log CFU/g.

Segundo Cai et al. (2014), a fermentação de cereais como trigo, arroz integral, aveia e milho com bactérias do ácido láctico, apresentaram aumento nos teores de compostos fenólicos e propriedades antioxidantes melhorando significativamente valor nutricional em comparação aos produtos não fermentados. Isso resulta das atividades metabólicas destes microrganismos envolvidos na fermentação, que produzem enzimas e outros compostos bioativos como ácidos graxos de cadeia curta, bacteriocinas e exopolissacarídeos e flavonoides, e por tornar os antioxidantes e microelementos mais acessíveis, diminui os níveis de antinutrientes, como fitatos (ANGELOV et al 2018; ALHARBI, et al., 2022).

Antioxidantes na aveia como tocoferóis, tocotrienóis, ácido L-ascórbico, tióis, aminoácidos fenólicos e outros compostos fenólicos atuam como protetores naturais do grão (KEYING et al. 2009). Eles previnem os danos dos radicais livres aos lipídios, proteínas, DNA, RNA e organelas celulares (HITAYEZUA et al. 2015). Os principais antioxidantes da aveia são os compostos polifenólicos. Os compostos polifenólicos da aveia representam 5,7% e incluem ácidos fenólicos, flavonóides e um grupo exclusivo do grão de aveia, as avenantramidas, compostos solúveis de baixo peso molecular, estando em

maior percentual retidos na casca do cereal (JIMÉNEZ-PULIDO et al. 2022 ; ANGELOV A et al., 2018).

A partir de nossas análises *in vitro*, também foi possível observar que o potencial antioxidante da bebida formulada AF15, medido através da inibição de radicais ABTS e a concentração de polifenóis totais foi superior quando comparado à bebida sem fermentação, apontando a melhora das propriedades funcionais do farelo de aveia após fermentação da bebida.

Em um estudo realizado com base em aveia fermentada com probióticos e mel, foi observado que a atividade antioxidante aumentou significativamente no produto fermentado após 24 h ($63,8 \pm 2,76$ nmol TE/mg) e 48 h ($76,4 \pm 4,51$ nmol TE/mg), em comparação com a medida em 0 h ($57,9 \pm 3,52$ nmol TE/mg). Curiosamente, houve um aumento significativo na atividade antioxidante durante o armazenamento a 4°C, atingindo $95,7 \pm 8,07$ nmol TE/mg após 14 dias de armazenamento, o que apóia ainda mais a sugestão de que a cepa probiótica foi metabolicamente ativa durante o período de armazenamento (CHEN et al, 2020).

Resultado semelhante foi observado no estudo de Hole et al (2012), onde puderam verificar uma melhor biodisponibilidade de ácidos fenólicos em cevada e aveia durante a fermentação com oito cepas que aumentaram em até 25 vezes quando comparado ao produto bruto.

As avenantramidas são polifenóis fermentáveis exclusivos da aveia que também resistem à digestão e proporcionam benefícios à saúde. Juntamente com uma alta concentração de β – glucana, esses ingredientes aumentam a viscosidade no trato gastrointestinal, retardam a absorção de nutrientes, diminuem o índice glicêmico, atuam no controle do colesterol, e há relatos que também atuam na redução de deposição de gordura intestinal e aumentam a imunidade em *C. elegans* (TSONI & BROWN 2008; GAO et al, 2015).

A realização de ensaio *in vivo* no modelo *C. elegans* é fundamental para avaliar se a capacidade antioxidante do produto pode extrapolar para modelos animais, reduzindo o envelhecimento celular, como na redução de produção de EROS, aumentando a proteção contra estresses e aumentando sua expectativa

de vida. Em nosso estudo, foi possível observar uma ação conjunta do probiótico e do farelo de aveia, potencializando a ação antioxidante da bebida aumentando a resistência e a sobrevivência dos vermes e reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio basal (Figura 4A,4B).

Corroborando com nossos achados, estudo demonstrou que os fitoquímicos de um cereal aumentaram a expectativa de vida média de *C. elegans*, desempenho locomotor e taxa de respiração e reduziu significativamente o acúmulo de ROS em comparação com o controle, tendo como hipótese de que os efeitos benéficos foram gerados através do aumento da respiração mitocondrial (GRAF et al, 2017).

Outro estudo que sustenta a premissa da ação antioxidante na proteção contra o dano celular oxidativo em *C. elegans* foi o de Zamberlan et al (2016). Os vermes foram tratados com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e foi possível observar que houve uma ação antioxidante protetora após submeter os vermes ao estresse térmico, quando comparados ao tratamento controle. Além disso, os vermes tratados com extrato de alecrim tiveram uma produção basal de ROS significativamente menor do que os vermes não tratados, o que também impediu um aumento nos níveis de ROS após submetê-los ao estresse.

Outra questão importante nesse estudo é avaliar a relação de cepas probióticas na expectativa de vida dos nematoides. É sabido que as células intestinais de *C. elegans* são semelhantes em estrutura às dos humanos e são as principais células envolvidas nos mecanismos de defesa do hospedeiro, funcionando como células imunes e barreira de defesa da mucosa (GAO et al, 2015; PARK et al, 2018). Portanto, a adesão do probiótico às células epiteliais intestinais e a colonização do trato intestinal são os fatores mais importantes porque afetam a capacidade da espécie bacteriana de funcionar como probiótico ativando os mecanismos de defesa no hospedeiro.

Em encontro a esse dado, em nosso estudo foi possível observar que houve ação protetora semelhante entre as bebidas de farelo de aveia fermentada (AF15) e bebida probiótica (PRO) após submeter os vermes ao estresse químico. PARK et al (2018), ao avaliar a capacidade de *Lactobacillus* de se ligar ao trato intestinal de *C. elegans*, observaram uma alta capacidade de colonização, o que

refletiu no aumento da expectativa de vida dos vermes, quando comparados ao controle *E. coli* OP50. Resultados semelhantes também foram obtidos por Ikeda *et al.* (2007), que demonstraram que *C. elegans* alimentados com lactobacilos selecionados têm uma expectativa de vida média aumentada.

Concluindo, o farelo de aveia obteve resultados satisfatórios ao promover o crescimento bacteriano na bebida em armazenamento, o que evidencia as características prebióticas do cereal e confere qualidade simbiótica ao produto desenvolvido, ainda garantindo uma quantidade final de probióticos satisfatória para que possa exercer suas funções benéficas ao consumidor. O processo de fermentação com BAL também aumentou os níveis de antioxidantes e polifenóis do farelo de aveia, resultando na redução da produção de espécies reativas de oxigênio e subsequente na proteção contra estresse oxidativo e térmico do modelo experimental *C. elegans*.

Contudo, mais estudos são necessários para elucidar quais mecanismos estão envolvidos nesses processos de proteção do nematoide e para verificar quais outros benefícios da bebida desenvolvida se estendem aos humanos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A longevidade alcançada nas últimas décadas traz consigo um apelo pela melhora do bem estar e de saúde. Um dos fatores de forte interferência na qualidade de vida é a saúde intestinal, mais precisamente a microbiota intestinal, que pode ter sua composição, diversidade e função afetada por fatores como hábitos de vida e alimentares. Consequência dessas alterações são descritas como disbiose; condição que está relacionada à progressão de doenças e a diminuição da imunocompetência.

Para reduzir esses aspectos negativos, as intervenções dietéticas direcionadas à microbiota intestinal como a inclusão de alimentos que exerçam função recuperativa da composição bacteriana humana pode ser a chave para o alcance de uma vida saudável.

Em nossas buscas, identificamos que a fermentação láctica com farelo de aveia aumentou as características antioxidantes do farelo e conferiu um aumento do teor de compostos fenólicos. Mais que isso, foi possível observar que o farelo de aveia se comportou como uma ótima fonte prebiótica, aumentando o número de bactérias viáveis durante período de fermentação e armazenamento e mantendo um valor probiótico necessário para que o produto final pudesse exercer funções simbióticas, benéficas à saúde do consumidor.

Por fim, o produto final foi testado em modelo animal e demonstrado que gerou efeito positivo na redução da produção de espécies reativas de oxigênio basal, importante na preservação celular, e ainda promoveu a proteção em situação de estresse em comparação a animais não tratados, prolongando sua expectativa de vida.

É importante ressaltar que este estudo, até onde sabemos, é pioneiro no desenvolvimento de bebida fermentada apenas à base de farelo de aveia. Portanto uma maior elucidação sobre os componentes e as vias metabólicas envolvidas no processo e se esses benefícios são extrapolados para a população humana são necessários.

REFERÊNCIAS

1. Alharbi HF, Algonaiman R, Barakat H. Ameliorative and Antioxidative Potential of *Lactobacillus plantarum*-Fermented Oat (*Avena sativa*) and Fermented Oat Supplemented with Sidr Honey against Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. *Antioxidants*. 2002; 11(6): 1106-1122.
2. Angelov A, Yaneva-Marinova T, Gotcheva V. Oats as a matrix of choice for developing fermented functional beverages. *J Food Sci Technol*. 2018; 55(7): 2351-2360.
3. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 17th ed. Virginia. 2000.
4. AUGUSTI PR, BRASIL AVS, SOUTO C. et al. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food Chemistry of Toxicology*, v. 109, p. 60–7, 2017.
5. Ayuda-Durán B, González-Manzano S, Gil-Sánchez I, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B, Sanz-Buenhombre M, Guadarrama A, Santos-Buelga C, González-Paramás AM. Antioxidant Characterization and Biological Effects of Grape Pomace Extracts Supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods*. 2019; 8(2):75
6. Bonomo L de F, Silva DN, Boasquivis PF et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS One.*, 9 (3), 2014.
7. Cai S, Gao F, Zhang X, et al. Evaluation of γ -aminobutyric acid, phytate and antioxidant activity of tempeh-like fermented oats (*Avena sativa* L.) prepared with different filamentous fungi. *J Food Sci Technol*. 2014;51:2544–2551.
8. Carlson, J. L., Erickson, J. M., Hess, J. M., Gould, T. J., & Slavin, J. L. (2017). Prebiotic dietary fiber and gut health: comparing the in vitro fermentations of beta-glucan, inulin and xylooligosaccharide. *Nutrients*, 9(12), 1361.

9. CHARÃO MF, SOUTO C, BRUCKER N et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 5093–106, 2015.
10. Chen L, Wu D, Schlundt J, Conway PL. Development of a Dairy-Free Fermented Oat-Based Beverage With Enhanced Probiotic and Bioactive Properties. *Front Microbiol.* 2020; 11(3): 1-11.
11. Chen Y, Huang B, He J, Han L, Zhan Y, Wang Y. In vitro and in vivo antioxidant effects of the ethanolic extract of *Swertia chirayita*. *J of Ethnopharma.* 2011; 136(2): 309-315.
12. Correa-Oliveira R, et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology.* 2016; 5(4): 73-81.
13. Dąbrowski G, Paulauskienė A, Baltušnikienė A, Kłębukowska L, Czaplicki S, Konopka I. Changes in Selected Quality Indices in Microbially Fermented Commercial Almond and Oat Drinks. *Applied Sciences.* 2022; 12(19): 1018.
14. De Sá RM, de Francisco A, Ogliari PJ, et al. Variação no conteúdo de beta-glucanas em cultivares brasileiros de aveia. *Food Sci Technol.* 2000; 20(1) 99-102.
15. Feng S, Cheng H, Xu Z et al. Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, V 81, 188-194, 2015.
16. Feng, S.; Cheng, H.; Xu, Z.; Yuan, M.; Huang, Y.; Lião, J.; Yang, R.; Zhou, L.; Ding, polissacarídeo C. *Panax notoginseng* aumenta a resistência ao estresse e prolonga a vida útil em *Caenorhabditis elegans* . *J. Função. Alimentos* 2018 , 45 , 15–23.
17. Gao, C., Gao, Z., Greenway, F. L., Burton, J. H., Johnson, W. D., Keenan, M. J., Enright, F. M., Martin, R. J., Chu, Y., & Zheng, J. Oat consumption reduced intestinal fat deposition and improved health span in *Caenorhabditis elegans* model. *Nutrition research.* 2015; 35(9), 834–843.
18. Graf, B. L., Kamat, S., Cheong, K. Y., Komarnytsky, S., Driscoll, M., & Di, R. Phytoecdysteroid-enriched quinoa seed leachate enhances healthspan and mitochondrial metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods.* 2017; 37: 1–7.

19. Guarner F. et al. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Probióticos e prebióticos. W Gastroent Org, 2017.
20. Gupta, S., Cox, S., & Abu-Ghannam, N. (2010). Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochemical Engineering Journal*, 52(2-3), 199-204.
21. Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., & Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, 5(6), 1869-1912.
22. health. *Nutrients*. 2017; 9(9): 1021-51.
23. Herrera-Ponce, A., Nevárez-Morillón, G., Ortega-Rivas, E., Pérez-Vega, S., & Salmerón, I. (2014). Fermentation adaptability of three probiotic *Lactobacillus* strains to oat, germinated oat and malted oat substrates. *Letters in applied microbiology*, 59(4), 449–456.
24. Hitayezua R, Baakdaha MM, Kinninb J, Hendersonc K, Tsopmoa A. Antioxidant activity, avenanthramide and phenolic acid contents of oat milling fractions. *J Cer Sci*. 2015;63:35–40.
25. Hole A. S., Rud I., Grimmer S., Sigl S., Narvhus J., Sahlstrøm S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem*.
26. Ikeda, T., Yasui, C., Hoshino, K., Arikawa, K., & Nishikawa, Y. (2007). Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against salmonella enterica serovar enteritidis. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6404–6409.
27. Jiménez-Pulido IJ, Rico D, Martínez-Villaluenga C, Pérez-Jiménez J, Luis D, Martín-Diana AB. Sprouting and Hydrolysis as Biotechnological Tools for Development of Nutraceutical Ingredients from Oat Grain and Hull. *Foods*. 2022; 11(18): 1-25.
28. Kato, M., Hamazaki, Y., Sun, S., Nishikawa, Y., & Kage-Nakadai, E. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 Increases the Lifespan and Multiple-Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients*, 2018. 10(12), 1921.

29. Keying Q, Changzhong R, Zaigui L. An investigation on pretreatments for inactivation of lipase in naked oat kernels using microwave heating. *J Food Eng.* 2009;95:280–284.
30. Klajn VM, Ames CW, da Cunha KF, Lorini A, Hackbart HCDS, Filho PJS, Cruxen CEDS, Fiorentini ÂM. Probiotic fermented oat dairy beverage: viability of *Lactobacillus casei*, fatty acid profile, phenolic compound content and acceptability. *J Food Sci Technol.* 2021; 58(9): 3444-52.
31. Kristek A, Wiese M, Heuer P, Kosik O, Schär MY, Soycan G, Spencer JPE. Oat bran, but not its isolated bioactive β -glucans or polyphenols, have a bifidogenic effect in an in vitro fermentation model of the gut microbiota. *Br J Nutr.* 2019; 121(5): 549-559.
32. Lefranc-Millot C, Guérin-Deremaux L, Wils D, Neut C, Miller LE, Saniez-Degrave MH. Impact of a resistant dextrin on intestinal ecology: how altering the digestive ecosystem with NUTRIOSE®, a soluble fibre with prebiotic properties, may be beneficial for health. *J Int Med Res.* 2012; 40(1): 211-24.
33. Mahan LK, Raymond JL, Krause. Elsevier Health Sciences Spain-T. 2017.
34. Mäkinen OE, Wanhalinna V, Zannini E, Arendt EK. Foods for special dietary needs: non-dairy plant based milk substitutes and fermented dairy type products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015
35. Mohammadi M, Nouri L, Mortazavian AM. Development of a functional synbiotic beverage fortified with different cereal sprouts and prebiotics. *J Food Sci Technol.* 2021; 58(11): 4185-93.
36. Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
37. Nyanzi R, Jooste PJ (2012) Cereal-based functional foods. In: Rigobelo EC (ed) *Probiotics InTech*, pp 161–196
38. Park, H. H., Jung, Y., & Lee, S. V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and cels.*, (2017); 40(2), 90–99.

39. Park, M. R., Ryu, S., Maburutse, B. E., Oh, N. S., Kim, S. H., Oh, S., Jeong, S. Y., Jeong, D. Y., Oh, S., & Kim, Y. Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. *Scientific reports*. 2018; 8(1), 7441.
40. Pereira AM, Almeida MD, Sauer E. Avaliação da concentração de bactérias lácticas viáveis em iogurtes com polpa de frutas. *Série Ciênc Tecnol Alim: Desenv Tecnol Alim*. 2007; 13(7): 83-6.
41. Peterson, D. M. (2001). Oat antioxidants. *Journal of cereal science*, 33(2), 115-129.
42. Peterson, D. M., & Wood, D. F. (1997). Composition and structure of high-oil oat. *Journal of Cereal Science*, 26(1), 121-128.
43. Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(9) 1231-7.
44. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman FA. Selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J bact*. 1951; 62(1): 132–133.
45. Sharma S, Singh A. Functional foods as a formulation ingredients in beverages: technological advancements and constraints. *Bioengineered*. 2021;12(2):11055-11075.
46. Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, et al. Beneficial properties of probiotics. *Trop Life Sci Res*. 2016; 27(2): 73-90.
47. Shvachko NA, Loskutov IG, Semilet TV, Popov VS, Kovaleva ON, Konarev AV. Bioactive Components in Oat and Barley Grain as a Promising Breeding Trend for Functional Food Production. *Molec*. 2021; 26(8): 2260-76.
48. Silva, N. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2007; 1-536.
49. Singh RK, Chang HW, Yan D, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017; 15(1): 73-90.
50. Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, Reimer RA, Reid G, Verbeke K, et.al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17(11) 687–701.

51. Topolska, K., Florkiewicz, A., & Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food-Consumer Motivations and Expectations. *International journal of environmental research and public health*, 18(10), 5327.
52. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Func Foods*. 2014; 9(7): 225–41.
53. Tsoni, S. V., Brown, G. D. β -Glucans and Dectin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008 ; 1143(1), 45-60.
54. Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. *Int Dair J*. 2008; 18(7): 714-728.
55. Verspreet, J., Damen, B., Broekaert, W. F., Verbeke, K., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2016). A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept. *Annual review of food science and technology*, 7, 167-190.
56. Wang J, Deng N, Wang H, Li T, Chen L, Zheng B, Liu RH. Effects of Orange Extracts on Longevity, Healthspan, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*. 2020; 25(2):351
57. Wang J, Deng N, Wang H, Li T, Chen L, Zheng B, Liu RH. Effects of Orange Extracts on Longevity, Healthspan, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*. 2020; 25(2):351d
58. Wang Y, Ames NP, Tun HM, Tosh SM, Jones PJ, Khafipour E. High molecular weight barley β -glucan alters gut microbiota toward reduced cardiovascular disease risk. *Front Microbiol*. 2016; 7(2): 129-44.
59. Wang Y, Harding SV, Thandapilly SJ, Tosh SM, Jones P, Ames NP. Barley β -glucan reduces blood cholesterol levels via interrupting bile acid metabolism. *Br J Nutr*. 2017; 118(10): 822–829.
60. Wang Y, Xie J, Li Y, Dong S, Liu H, Chen J, et.al. Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang reduces pro-inflammatory cytokine production and hepatic inflammation in a rat model of acute liver failure. *Eur J Nutr*. 2016; 55(2): 821–31.
61. Wolever T, Tosh SM, Spruill SE, Jenkins AL, Ezatagha A, Duss R, et.al. Increasing oat β -glucan viscosity in a breakfast meal slows gastric emptying and reduces glycemic and insulinemic responses but has no effect on appetite, food intake, or plasma ghrelin and PYY responses in

- healthy humans: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Clin Nutr.* 2020; 111(2): 319–328.
62. Xiong Y, Zhang P, Warner RD, Shen S, Fang Z. Cereal grain-based functional beverages: from cereal grain bioactive phytochemicals to beverage processing technologies, health benefits and product features. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022; 62(9): 2404-2431.
63. Yadav MK, Kumari I, Singh B, Sharma KK, Tiwari SK. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022; 106(2): 505-521.
64. Yılmaz İ, Dolar ME, Özpinar H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *Turk J Gastroenterol.* 2019; 30(3): 242–253.
65. Yoon DS, Lee MH, Cha DS. Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. *Bio Protoc.* 2018; 8(6): 2774-82.
66. Zamberlan, D. C., Amaral, G. P., Arantes, L. P., Machado, M. L., Mizdal, C. R., Campos, M. M. A., & Soares, F. A. A. *Rosmarinus officinalis* L. increases *Caenorhabditis elegans* stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2016; 49.
67. Zwer P. Oats: grain-quality characteristics and management of quality requirements. *Cereal grains.* 2017; 13(1): 235-256.