

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE BEBIDA SIMBIÓTICA À BASE DE AVEIA NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS ATRAVÉS DE CULTURA CELULAR (CACO-2)

Palavras-Chave: AVEIA, PROBIÓTICOS, INFLAMAÇÃO INTESTINAL

Autoras:

RAFAELA NUNES SANCHES, FCA, UNICAMP

BÁRBARA GECIANA TOMAZ DOS SANTOS, FCA, UNICAMP

Prof.(a) Dr.(a) ADRIANE ELISABETE ANTUNES MORAES (orientadora) FCA, UNICAMP

1.INTRODUÇÃO:

Para garantir a homeostase intestinal é necessário que haja equilíbrio entre a microbiota, sistema imunológico do hospedeiro e principalmente do epitélio intestinal, este por sua vez composto por proteínas *tight junctions* que auxiliam na permeabilidade seletiva de água, nutrientes e proteção contra a entrada de patógenos (Vincenzo *et al.*, 2024). A disbiose é caracterizada pelo desequilíbrio entre os filos das bactérias presentes no lúmen intestinal, com aumento da população de bactérias patogênicas em relação às bactérias benéficas (Cuppari, 2019, p.414). Padrões de vida sedentários, dieta rica em gordura saturada e pobre em fibras, podem resultar em problemas na integridade da barreira intestinal, uma vez que na ausência de fibras disponíveis para a microbiota fermentar há início do processo de proteólise, já que as bactérias utilizam as proteínas do próprio epitélio intestinal como substrato para a fermentação, o que causa rupturas na integridade da barreira (Fan, 2021). Além disso, no quadro de disbiose há aumento da produção de sulfeto de hidrogênio, gás carbônico e amônia, o que culmina em aumento do pH e aumento da permeabilidade intestinal, tornando a barreira muito mais suscetível a passagem de produtos do metabolismo de bactérias patogênicas, os quais ao adentrarem a corrente sanguínea induzem inflamação sistêmica de baixo grau através do aumento na expressão de marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-8 (Cani *et al.*, 2007). Ao longo do tempo, este quadro inflamatório pode desencadear doenças, como diabetes e obesidade (Fan, 2021).

À vista disso, uma dieta equilibrada e rica em fibras pode auxiliar na modulação de uma boa saúde intestinal. A aveia (*Avena sativa* L) é fonte de fibras solúveis e insolúveis, com destaque para a β -glucana, um polissacarídeo que pode atuar como prebiótico no intestino (Fabiano, Shinn, Antunes, 2023). Seu conteúdo de fibras está associado ao aumento da viscosidade do conteúdo intestinal, promoção de saciedade, favorecimento do peristaltismo intestinal e diminuição do colesterol sérico (Massod *et al.*, 2008 e Joyce, *et al.*, 2019). Em virtude dessas propriedades, a *US Food and Drug Administration* (FDA) autorizou o uso de alegações de saúde em produtos contendo aveia, atribuindo o consumo de 3 gramas de β -glucana ao dia à redução do risco de doenças cardiovasculares (*Federal Register*, 1997). Desta forma, a aveia constitui uma boa matriz para a elaboração de produtos alimentícios, especialmente as bebidas vegetais.

No contexto do desenvolvimento de bebida vegetal a base de aveia, o uso de bactérias ácido-láticas como agentes responsáveis pela fermentação caracteriza-se como uma estratégia biotecnológica natural para prolongar a vida útil do alimento, melhorar a digestibilidade de proteínas, otimizar características sensoriais e formar ácidos orgânicos que favorecem a biodisponibilidade de minerais essenciais, como ferro e zinco (Silva *et al.*, 2020 e Aydar *et al.*, 2020). Em estudo envolvendo 145 gestantes durante as quatro semanas finais da gestação, a suplementação com *Limosilactobacillus reuteri* LR92 resultou em menor incidência e intensidade de cólicas nos lactentes durante os cinco primeiros meses de vida (Pourmirzaiee *et al.*, 2020). Além disso, Banik, *et al.* (2023) demonstrou que diferentes linhagens de *L. reuteri* são resistentes aos sais biliares e pH baixos, o que favorece a sobrevivência no trato gastrointestinal, adicionalmente possuem efeitos imunomoduladores ao reduzirem a expressão de TNF- α , auxiliam na constipação crônica ao aumentar as contrações colônicas e diminuem as crises de regurgitação em bebês. Já a cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 atenua os sintomas clínicos associados à periodontite, como revelado em estudo conduzido com 28 adultos diagnosticados com a doença que, após intervenção não cirúrgica (raspagem e alisamento radicular) seguida da suplementação com esta cepa por três meses, apresentaram redução significativa de perda de inserção, sangramento gengival e acúmulo de placa (Morales *et al.*, 2016).

A linhagem de células CaCo-2 vem sendo amplamente utilizado no âmbito da pesquisa para estudos envolvendo permeabilidade intestinal devido sua capacidade de formar monocamadas confluentes com características morfológicas e funcionais semelhantes aos enterócitos humanos, além de formarem borda apical em escova (Floor, *et al.*, 2024). Desta maneira, sua aplicação no estudo com bebida simbiótica à base de aveia pode fornecer dados de como as cepas de *Limosilactobacillus reuteri* LR92 e *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1, seus metabólitos e os compostos bioativos presentes na aveia agem sobre a modulação do processo inflamatório intestinal e na integridade da função de barreira.

2.METODOLOGIA:

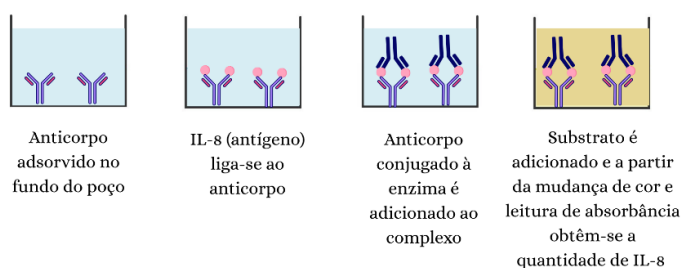
2.1 Bebida simbiótica à base de aveia: Preparada com aveia em flocos regulares e água filtrada em uma proporção de 1:20, 7% de sacarose e 3% de inulina. Após a homogeneização, o extrato de aveia foi autoclavado a 115°C por 18 minutos e individualmente inoculado com *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 e *Limosilactobacillus reuteri* LR92 (Gupta, Cox, Abu-Ghannam, 2010; Russo et al., 2016). Ambas as cepas foram inoculadas (0,1%), de forma asséptica ao extrato de aveia e foram incubadas a 37°C em B.O.D. para fermentarem até alcançarem o pH 4,5±0,1.

2.2 Viabilidade de *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 e *Limosilactobacillus reuteri* LR92 nas bebidas de aveia fermentada durante a digestão simulada *in vitro*: As bebidas passaram pelo processo de digestão simulada *in vitro* seguindo o protocolo INFOGEST 2.0, dividido em fases oral, gástrica e intestinal (Brodkorb et al., 2019). Ao final de cada uma das fases, amostras das bebidas digeridas foram coletadas e utilizadas no método *pour plate* de contagem em placas, sendo mantidas em aerobiose a 37°C por 72h, após esse período foi realizada a contagem de colônias para obter-se o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de bebida.

2.3 Cultivo celular CaCo-2: Foi seguido protocolo descrito por Lea (2015), usando Dulbecco Meio Eagle modificado (DMEM) com soro fetal a 10% e adição de 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA), 50 µM de tioglicerol, 25 mg/ml gentamicina (meio completo). As células foram mantidas a 37°C em ambiente umidificado com 5% de CO₂ na atmosfera e o meio foi trocado a cada 72 horas. A propagação das células ocorreu em frascos de cultura com concentração de 10⁵ células/cm². Após as células alcançarem 80% de confluência (cerca de 4 a 5 dias), realizou-se a passagem nos frascos de cultura na proporção 1:10 e a tripsinização, iniciando pela lavagem com PBS (phosphate-buffered saline) seguida da lavagem com solução de tripsina/EDTA. Para interromper a tripsinização adicionou-se meio de cultura completo contendo soro de bezerro, em seguida as células foram transferidas para tubos de ensaio para verificar a viabilidade celular (máximo de 5% de células mortas).

2.4 Ensaio inflamatório das amostras: Após a determinação das concentrações das amostras de bebida através do teste MTT, as células foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com as diferentes concentrações das duas bebidas simbióticas, após 4 horas de tratamento o sobrenadante foi descartado e as células foram estimuladas por interleucina 1β (IL-1β) por 4 horas. As células foram divididas em grupos, sendo eles: Grupos controle: CaCo-2, bebida de aveia pura, bebida inoculada com *L. rhamnosus* SP1, bebida inoculada com *L. reuteri* LR92 e Grupos desafiados com IL-1β (1ng/ml): bebida de aveia pura, bebida inoculada com *L. rhamnosus* SP1, bebida inoculada com *L. reuteri* LR92. Após o tratamento dos 4 grupos realizou-se a quantificação de IL-8 utilizando o kit ELISA, com a leitura de absorbância em 450 nm e 570 nm para correção.

ELISA MÉTODO SANDUÍCHE PARA QUANTIFICAR IL-8



Fonte: própria autora utilizando a plataforma Canva

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para garantir o controle das amostras utilizadas, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro dos inóculos utilizados, sendo que *L. rhamnosus* SP1 obteve $10,31 \pm 0,09$ e *L. reuteri* LR92 $10,70 \pm 0,23$ (Figura 1 A). Após o preparo da bebida vegetal à base de aveia (*Avena sativa* L.), esta foi inoculada separadamente com as cepas *Lactobacillus rhamnosus* SP1 e *Lactobacillus reuteri* LR92, sendo posteriormente submetida à fermentação até atingir um pH de $4,5 \pm 0,1$. A viabilidade das cepas após a fermentação foi avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da bebida. A amostra inoculada com *L. rhamnosus* SP1 atingiu o pH estipulado em aproximadamente 3 horas, apresentando contagem de $7,63 \pm 0,13$ já a inoculada com *L. reuteri* LR92 atingiu o pH desejado após cerca de 8 horas e obteve contagem de $7,82 \pm 0,06$ (Figura 1 B). Ambas as bebidas foram submetidas a digestão simulada *in vitro* seguindo o protocolo INFOGEST 2.0, seguida pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de fração digerida da bebida durante as fases gástrica e intestinal. A bebida contendo *L. rhamnosus* SP1 apresentou a contagem de $8,23 \pm 0,11$ após a fase gástrica e $6,57 \pm 0,77$ após a fase intestinal (Figura 1 C). Já a bebida contendo *L. reuteri* LR92 apresentou $8,23 \pm 0,06$ após a fase gástrica e $6,44 \pm 0,41$ após a fase intestinal (Figura 1 C).

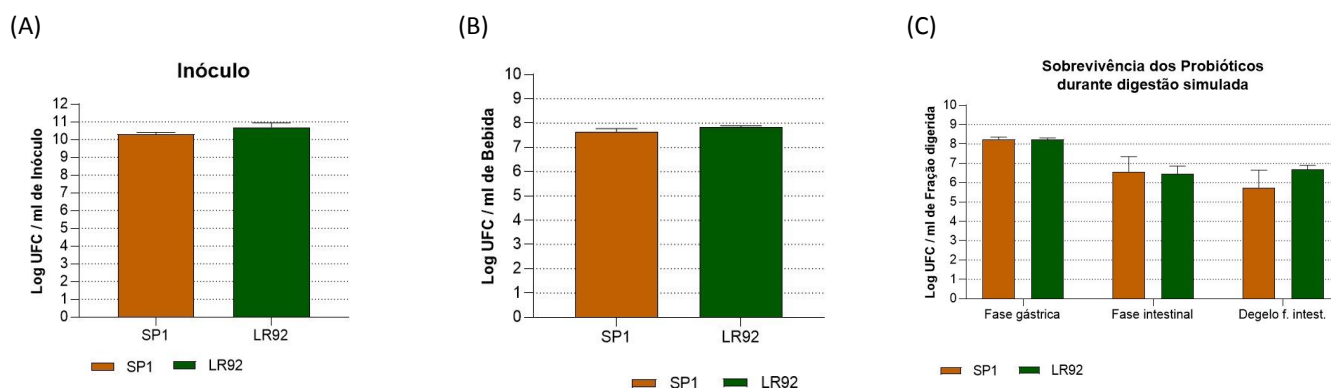


Figura 1. (A) log UFC/mL de inóculo ; (B) log UFC/mL de bebida simbiótica e (C) log UFC/mL de fração digerida durante a digestão simulada *in vitro*

A partir do exposto, pode-se notar que ambas as cepas sobreviveram adequadamente a digestão simulada apresentando taxas de sobrevivência de 87,61% para *L. rhamnosus* SP1 e 61,34% para *L. reuteri* LR92 (Figura 3). Desta maneira, pode-se dizer que a bebida simbiótica à base de aveia apresentou potencial positivo como matriz para os probióticos, assim como observado por Gupta, Cox e Abu-Ghannam (2010).

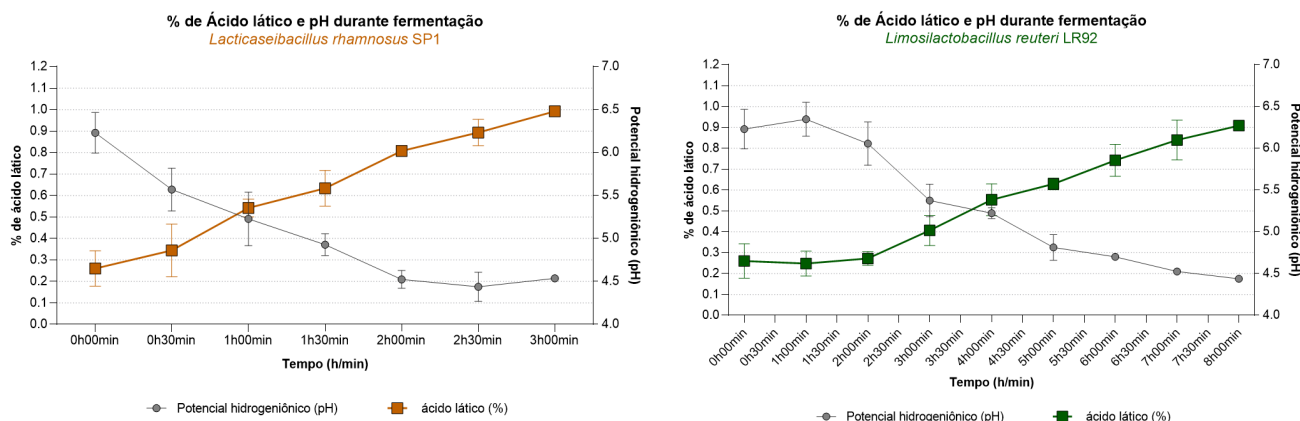


Figura 2. % de Ácido láctico e pH durante fermentação

Já em relação a acidez titulável (Figura 2) pode-se notar que quanto maior o percentual de ácido láctico, menor é o pH da amostra, este é um comportamento esperado para o tipo de amostra (Angelov *et al*, 2006). Gupta, Cox e Abu-Ghannam (2010) e Angelov *et al* (2006) consideraram o pH=4,5 como ideal para bebidas à base de aveia e observaram que os aumentos na acidez titulável ao longo do armazenamento e fermentação eram influenciados principalmente pelo teor de sacarose presente nas amostras.

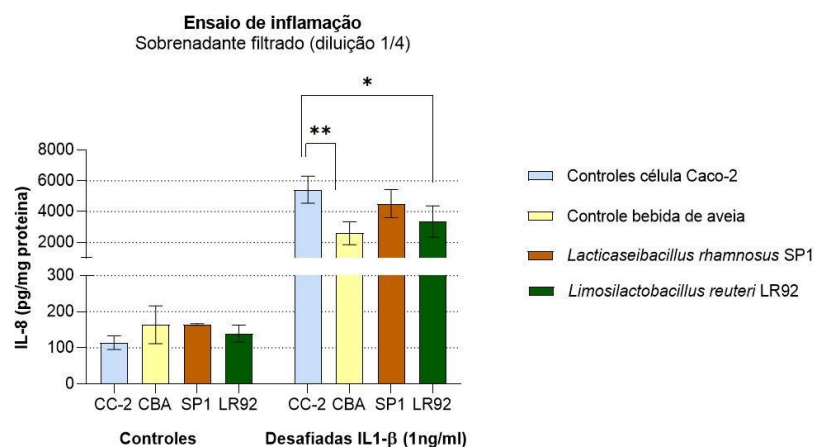


Figura 3. Ensaio de Inflamação com sobrenadante filtrado das amostras

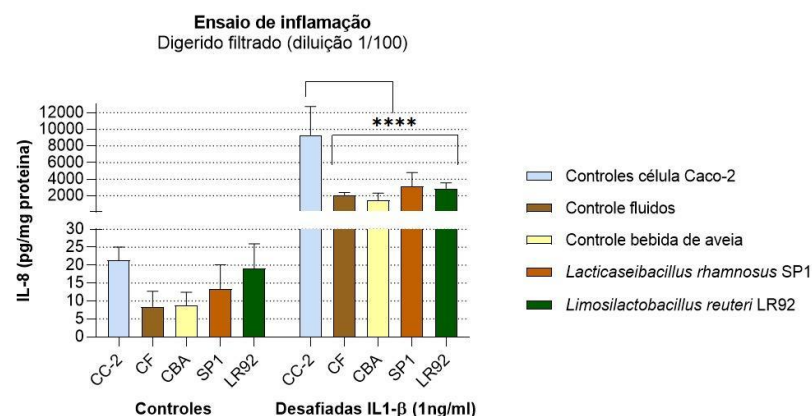


Figura 4. Ensaio de Inflamação com sobrenadante digerido e filtrado das amostras

As diluições selecionadas do MTT estavam com viabilidade celular acima de 80%, indicando ser uma concentração segura para os ensaios. Foram realizados os ensaios inflamatórios seguidos de quantificação da citocina inflamatória IL-8 utilizando-se kit ELISA (Figura 3 e 4). Inicialmente os testes foram realizados com as amostras de bebida filtrada e sem digerir na diluição de 1/4 (Figura 3) e observou-se que houve diferença estatística no grupo com bebida de aveia pura e no grupo contendo bebida de aveia inoculada com LR92. Depois fez-se o mesmo ensaio utilizando as amostras digeridas e filtradas na diluição 1/100 (Figura 4), nesse cenário todas as amostras obtiveram diferença estatística, tal fato acontece devido os compostos bioativos presentes nas amostras estarem mais biodisponíveis após a digestão, o que facilita seu efeito protetor e nutritivo às células. Este achado difere do encontrado por Putt *et al*. (2017) que utilizou iogurte liofilizado para tratar culturas de CaCo-2 e na presença de estímulo inflamatório o iogurte aumentou a expressão do mRNA de proteínas associadas à integridade de barreira (occludina, ZO-1 e claudina-1), no entanto após submeter a amostra de iogurte naquele trabalho, à digestão simulada *in vitro* os efeitos protetores sobre a barreira intestinal deixaram de ser significativos. É importante destacar que a digestão simulada *in vitro* seguiu o protocolo proposto por Brodkorb (2019), a única alteração realizada foi a exclusão da bile, pois sua presença estava sendo tóxica às células durante ensaios preliminares e a bebida já é naturalmente pobre em lipídios, portanto para garantir a viabilidade das amostras de CaCo-2 optou-se pela exclusão da bile. Tal alteração tem respaldo no proposto por Kondrashina *et al* (2024).

CONCLUSÕES:

Os achados corroboram para observar que a bebida simbiótica à base de aveia apresentou potencial positivo como matriz para veiculação de probióticos, uma vez ambas as cepas sobreviveram satisfatoriamente a digestão simulada. Além disso, ao utilizar as amostras digeridas e filtradas para o ensaio inflamatório as duas cepas apresentaram um efeito protetor contra o processo inflamatório intestinal. Mais estudos são necessários para melhor compreender de que maneira bebida simbiótica à base de aveia pode auxiliar na modulação do processo inflamatório intestinal.

BIBLIOGRAFIA:

AYDAR, Elif; TUTUNCU, Sena; OZCELIK, Beraat. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. **Journal of Functional Foods**, v. 70, 2020.

BANIK, Sukhamoy Kangsha, et al. Efficacy of *Lactobacillus Reuteri* in Improving Gut Barrier Function & Management of Infantile Colic. **American Journal of Pediatrics**, v.9, n.3, p.140-149, 2023.

CANI, Patrice D., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v.56, n. 7, p.1761–1772, 2007.

CUPPARI, Lilian. **Nutrição clínica no adulto 4a ed.** 4. ed. Barueri: Manole, 2019. *E-book*. p.414. ISBN 9788520464106. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788520464106/>. Acesso em: 22 jun. 2025.

FABIANO, Giovanna Alexandre; SHINN, Leila Marie; ANTUNES, Adriane Elisabete Costa. Relationship between Oat Consumption, Gut Microbiota Modulation, and Short-Chain Fatty Acid Synthesis: An Integrative Review. **Nutrients**, 2023.

FAN, Yong; Pedersen, Oluf. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 55-71, 2021

FLOOR, E, et al. Development of a Caco-2-based intestinal mucosal model to study intestinal barrier properties and bacteria–mucus interactions. **Gut Microbes**, v.17, 2024.

Food Labeling: Health Claims; Oats and Coronary Heart Disease. **Federal Register**, v. 62, n. 15, 1997. Disponível em: [Federal Register :Food Labeling: Health Claims: Oats and Coronary Heart Disease](#) . Acesso em: 27 de jun. 2025.

JOYCE, Susan A, et al. The Cholesterol-Lowering Effect of Oats and Oat Beta Glucan: Modes of Action and Potential Role of Bile Acids and the Microbiome. **Frontiers in nutrition**, v.6, n.171, 2019.

MASSOD, Sadiq Butt, et al. Oat: unique among the cereals. **European Journal of Nutrition**, v: 47, p.68-79, 2008.

MORALES, Alicia; et. al. Clinical Effects of *Lactobacillus rhamnosus* in Non-Surgical Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Trial With 1-Year Follow-Up. **Journal of Periodontology**, v. 87, art. 8, p. 944-952, 2016.

POURMIRZAEIE, Mohammad Ali et. al. The efficacy of the prenatal administration of *Lactobacillus reuteri* LR92 DSM 26866 on the prevention of infantile colic: a randomized control trial. **European Journal of Pediatrics**, v. 179, p. 1619-1626, 2020.

SILVA, Aline. R. A.; SILVA, Marselle. M. N.; RIBEIRO, Bernardo. D. Ribeiro. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. **Food Research International**, v. 131, 2020.

VINCENZO, Federica; et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. **Intern Emerg Med**, v. 2 p. 275-293, 2024.

RUSSO, Pasquale et al. *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 288–294, 2016.

GUPTA, Shilpi; COX, Sabrina; ABU- GHANNAM, Nisreen Process Optimization for the Development of a Functional Beverage Based on Lactic Acid Fermentation of Oats. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2-3, p. 199-204, 2010.

LEA, Tor. Caco-2 cell line. The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models, p. 103-111, 2015

BRODKORB, André et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.

ANGELOV, Angel et al. Development of a new oat-based probiotic drink. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, n.1, p.75-80, 2006.

KONDRASHINA, Alina et al. Coupling *in vitro* food digestion with *in vitro* epithelial absorption; recommendations for biocompatibility. **Critical reviews in food science and nutrition**, vol. 64, n.26, p.9618-9636, 2024.