

EFEITO HIPOCOLESTEROLEMIANTE DO IOGURTE: degradação biológica do colesterol pelos microorganismos existentes no iogurte

DAOIZ MENDOZA-AMARAL*
JOICE J. MICHALSKI**
MUSA H. MUSA**
DANIELA ALANIS***

SUMÁRIO

Os autores, baseados no conhecimento do efeito hipocolesterolêmico do iogurte, demonstram em experiências *in vitro* que os componentes bacterianos existentes no iogurte têm a propriedade de degradar o colesterol, com os quais se acrescentaria um novo elemento em apoio ao efeito hipocolesterolêmico do iogurte na profilaxia da aterosclerose. A fim de comprovar essa hipótese, os autores realizam o estudo dos valores do colesterol dissolvido em uma amostra de iogurte natural, da qual faz-se uma análise seqüencial do conteúdo do colesterol (durante 1h30min) empregando o método de espectrofotometria utilizando o Kit colesterol COD-ANA (Labtest). Os resultados destas experiências permitem demonstrar que as bactérias contidas no iogurte (lactobacilos e o *Streptococcus thermophyllus* possuem a capacidade de degradar o colesterol *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: iogurte, efeito hipocolesterolêmico, degradação do colesterol.

ABSTRACT

The authors demonstrate through *in vitro* tests that bacterial compounds of yogurt have the property of degrading cholesterol. These properties would be an additional support to the hypocholesterolemia effect of yogurt in the prophylaxis of atherosclerosis. In order to prove this hypothesis, the authors conduct the study of levels of dissolved cholesterol in a sample of natural yogurt, through a sequential analysis of cholesterol content (during one hour and a half) using spectrophotometry with a COD-ANA (Labtest) kit. The results show that bacteria of yogurt (lactobacilli and thermophilic streptococci) are capable of degrading cholesterol *in vitro*.

KEY WORDS: yogurt, hypocholesterolemia effect, degradation of cholesterol.

* Professor de Patologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

** Acad. Medicina e Bolsista CNPq.

*** Acad. Biologia e Bolsista FURG.

INTRODUÇÃO

De acordo com os conhecimentos existentes sobre a etiopatogenia da aterosclerose^{5,7}, sabe-se que existe, além dos fatores da hipertensão arterial e da hipercolesterolemia, a ação oxidante dos radicais livres sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), como os agentes desencadeantes das lesões iniciais da aterosclerose, conhecidas com o nome de estrias amareladas, clinicamente assintomáticas nos primeiros 30 anos da vida¹⁶.

Entre estes fatores aceita-se que a hipercolesterolemia seja o principal agente a incidir na instalação desta doença arterial⁷. O aumento do teor de colesterol no sangue acima dos valores normais, em experiências realizadas em animais alimentados com dietas aterogênicas, tem confirmado a hipótese de que o excesso de colesterol desencadeia as lesões aterocleróticas².

Devido a este fato, dentro das linhas de pesquisa sobre a aterosclerose existem aquelas orientadas na busca de substâncias naturais de origem vegetal: beringela¹⁰, cebola¹⁵, flavonóides⁴, e de origem animal: leite ou iogurte^{6,8}, que possam diminuir a hipocolesterolemia, portanto capazes de evitar parcial ou totalmente o efeito aterogênico do colesterol.

Dentro destas linhas de pesquisa, temos realizado estudos experimentais do efeito hipocolesterolemizante do iogurte no coelho⁹ baseados em observações realizadas por Mann⁸ que foram confirmadas por Hepner et al.⁶ em estudos feitos em grupos de voluntários alimentados com dietas suplementadas com iogurte.

Não se conhece ainda o mecanismo pelo qual o iogurte comporta-se como um alimento hipocolesterolemizante nos seres humanos.

Podemos questionar-nos se o iogurte age inibindo a síntese do colesterol endógeno, como sugerem os resultados dos trabalhos de Mann⁸, ou se existe um mecanismo de degradação microbiológico no nível do trato gastrointestinal que produza uma diminuição do nível do colesterol exógeno.

A existência de microorganismo com a propriedade de degradar o colesterol já foi observada por Stadman et al.¹⁴, em 1953, em estudos realizados com bactérias extraídas do solo, assim como por pesquisas de vários autores (Brinklev et al.³, Mott¹²), os quais comprovam que bactérias do gênero *Eubacterium* apresentavam essa propriedade biológica, assim como trabalhos de Sadzikowskie et al.¹³, que conseguem demonstrar a existência de microorganismos nos materiais fecais do ser humano com capacidade de reduzir o colesterol.

Os autores, baseados nestas observações, realizaram experiências (*in vitro*) pretendendo demonstrar que os microorganismos (*Lactobacillus* e o *Streptococcus thermophyllus*) existentes no iogurte são os responsáveis pela queda dos valores do colesterol dissolvido nele. Para esse fim, os autores fazem uma análise seqüencial da concentração do colesterol em amostras tiradas da solução teste durante um período de 1h30min, a partir do início da experiência.

MATERIAL E MÉTODO

1 – Material e reagentes

- Foram utilizadas diversas marcas comerciais de iogurte do tipo natural e sem sabor, embalado em recipientes de 50ml;
- colesterol no estado cristalino produzido pela VETEC Química-Fina Ltda, Rio de Janeiro;
- Kit colesterol COD-ANA; sistema enzimático para a determinação do colesterol (LABTEST).

2 – Metodologia

Empregou-se a Metodologia Enzimática-Trinder, Sistema Colesterol Enzimático Labtest. Este sistema é uma modificação da metodologia original, introduzida em 1974 por Allain et al.¹, utilizando uma reação de oxidação catalizada pela colesterol-oxidase, após hidrólise de ésteres de colesterol, utilizando um tampão que assegura maior sensibilidade e estabilidade das enzimas e reagentes.

A concentração de colesterol nas amostras é diretamente proporcional à intensidade da cor vermelha formada após misturada ao reagente de cor.

Procedimentos utilizados para a determinação do colesterol total, adicionado em amostras de iogurte:

- 1.º) Preparo do reagente de cor;
- 2.º) 50ml de iogurte natural, aquecido a 37 °C em banho-maria;
- 3.º) 10mg de colesterol cristalino;
- 4.º) Mistura-se o colesterol ao iogurte e anota-se o horário do início deste procedimento;

A continuação utilizam-se três tubos de ensaio:

1.º tubo: Branco – Coloca-se 1,0ml de reagente de cor. Adiciona-se 0,01ml de iogurte diluído em soro fisiológico (numa concentração de 1:2), a fim de descontar a turbidez dada pelo iogurte nas amostras, obtendo assim as absorbâncias reais dos testes. Não levar para o banho-maria.

Nota: O branco tem como finalidade o acerto no ponto zero do espectrofotômetro para determinar as absorbâncias do teste (amostra de iogurte com colesterol) e padrão.

2.º tubo: Padrão – Adiciona-se 1,0ml de reagente de cor a 0,01ml de padrão (n.º 30). Coloca-se em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. A cor é estável em até 60 minutos.

3.º tubo: Teste (amostra de iogurte com colesterol). Adiciona-se 1,0ml de reagente de cor com 0,01ml de iogurte (diluído em soro fisiológico numa concentração de 1:2*). Essa mistura vai em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. A cor é estável em até 60 minutos.

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
AMOSTRA	—	0,01	—
PADRÃO	—	—	0,01
REAGENTE DE COR	1,0 ml	1,0ml	1,0ml

Determinam-se as absorvâncias do teste e padrão no espectrofotômetro em 500nm, acertando o zero com o branco.

Os valores de colesterol total nas amostras são obtidos por cálculos através da linearidade:

$$\text{mg/dl} = 200 \times \text{Absorvância do teste} \times \text{valor da diluição} / \text{Absorvância do padrão}$$

ou pode-se empregar o método de calibração:

$$\text{Fator de calibração} = 200 / \text{absorvância do padrão}$$

$$\text{mg/dl} = \text{absorvância do teste} \times (\text{valor da diluição}) \times \text{fator}$$

Esses procedimentos foram feitos em intervalos de meia hora após misturar-se o colesterol com iogurte aquecido a 37 °C, sendo que o primeiro procedimento foi feito após ser colocado o colesterol no iogurte.

RESULTADOS

Primeira experiência – Misturou-se 50ml de iogurte natural aquecido em banho-maria a 37 °C com 10mg de colesterol cristalino no horário das 15h, usando uma diluição de 1:2 (iogurte/soro).

O valor da absorvância do padrão foi 0,300; fator de calibração: $200/0,300 = 667$

Primeira amostra: 15h (faz-se o branco)

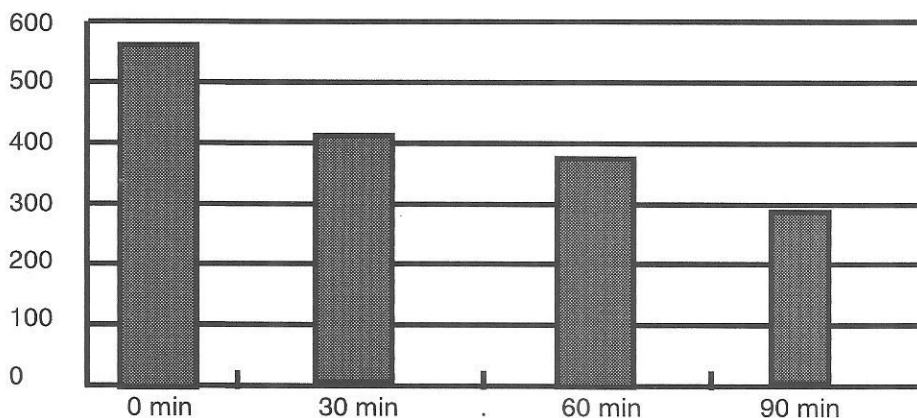
$$\text{Cálculo: mg/dl} = \text{absorvância do teste} \times (\text{x diluição}) \times \text{fator}$$

$$\text{mg/dl} = 0,387 \times (2) \times 667 = 516,25$$

Segunda amostra: 15h30min (faz-se o branco)

* Nas diluições de iogurte, podem-se utilizar outros valores de concentração, no entanto deve-se manter o mesmo valor da concentração tanto para o Branco quanto para o Teste.

Gráfico 1



Cálculo: $\text{mg/dl} = 0,275 \times (2) \times 667 = 366,85$

Terceira amostra: **16h** (faz-se o branco)

Cálculo: $\text{mg/dl} = 0,241 \times (2) \times 667 = 321,49$

Quarta amostra: **16h30min** (faz-se o branco)

Cálculo: $\text{mg/dl} = 0,2 \times (2) \times 667 = 266,8$

Observações: Estes experimentos foram realizados com várias marcas de iogurte, misturadas com colesterol, e todos mostraram quedas nos valores de colesterol com o passar dos intervalos já mencionados .

Contraprova

Segunda experiência: 50ml de iogurte natural aquecido em banho-maria a 37°C , sem colesterol, horário 15h. Usou-se uma diluição de 1:2 (iogurte/soro). Valor da absorbância do padrão: 0,300; fator de calibração: $200/0,300 = 667$

Primeira amostra: 15h

Cálculo: $\text{mg/dl} = 0,2 \times 2 \times 667 = 266,8$

Segunda amostra: 15h30min

lácteo que inibe a síntese do colesterol.

Os estudos realizados por Hepner et al.⁶ consideram que o efeito hipocolesterolêmico não é devido à ação direta do iogurte sobre a flora intestinal.

Os autores sugerem que estudos posteriores devem ser realizados para determinar se dito efeito é devido a modificações químicas dos componentes do iogurte ou aos metabólicos bacterianos existentes no mesmo.

Baseados neste estudo, conseguiu-se demonstrar que este alimento lácteo tem a capacidade de degradar o colesterol *in vitro* através da atividade dos componentes microbianos existentes no iogurte (lactobacilos e *Streptococcus thermophilus*). A propriedade de degradação do teor de colesterol existente na solução de iogurte é proporcional ao tempo de exposição dos microorganismos sobre o colesterol existente na solução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Allain CA, Ponn LS, Cahn CSG, et al. Clin Chem 1970;20:470.
- 2 Anitschkov NN. Über die veränderungen der kaninchenacrtta hei experimenteller cholesterinsteastse. Beitrögen Path Anat Jerra 1913;56:379-404.
- 3 Brinkley AW, Gottesman AR, Mott GE. Growth of cholesterol reducing Eubacterium on cholesterol brain agar. Appl Envirom Microb 1978;36:530-2.
- 4 Cook NC, Samman S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. Nutritival Biochemistry 1996;7:66-76.
- 5 Goldstein JL, Browns MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Am Rev Bioch 1977;46:897-930.
- 6 Hepner G, Fried R., ST. Geor., Sachiko et al. Hipocolesterolêmico effect of yogurt and milk. Am J Clin Nutr 1979;32:19-24.
- 7 Kannel WB, CASTELLI WP, et al. Serum cholesterol lipoprotein and the risk of coronary heart disease. The Frassingham study. Ann Intern Med 1971;74:1.
- 8 Mann GV. A factor in yogurt which lowers cholesterolmia in man. Atherosclerosis 1977;26:337.
- 9 Mendoza AD, Bech J, Levy J, et al. Aterosclerose experimental. Efeito inibidor do iogurte na aterogênese em coelhos. Vittalle 1985;1:38-48.
- 10 Mistschek GH. Effect of solanum melongena on experimental atherosclerosis. Exp Path 1974;9:157-62.
- 11 Mohamad N, Folgelman AM, Berlinger JÁ, et al. Pathogenesis of atherosclerosis. Am J Cardiol. 1995;76:18-23.
- 12 Mott GE, Brinkley AW, Mersinger CL. Biochemical characterization of cholesterol-reducing Eubacterium. Appl Envir Microb 1980;40:1017-22.
- 13 Sadzikowski MR, Sperry JF, Wilkins TD. Cholesterol reducing bacterium from human feces. Appl Envir Microb 1977;34:355-62.
- 14 Stadtman TC, Cherkes A, Anfinsen CB. Studies on the microbiological degradation of cholesterol. J Biol Chem 1953;206:511-23.
- 15 Vatsala TM, Megha S. Effects of anion in atherosclerosis in rabbits: IV) Maintenance of normal activity of aortic enzymes. Current Science 1982;51:276-8.
- 16 Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet 1994;344:793-5.