

Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos

Elizeu Antonio Rossi, Regina Célia Vendramini, Iracilda Zeppone Carlos, Maurício Gonçalves de Oliveira, Graciela Font de Valdez

Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara. Brasil

RESUMO. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da ingestão diária de um novo produto de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* sobre os níveis de lípides séricos de indivíduos normocolesterolêmicos, adultos e do sexo masculino. O estudo foi randomizado, duplo cego e controlado por placebo, com duração de 6 semanas. Quarenta e quatro voluntários, com idade entre 40 e 55, anos foram aleatoriamente separados em 2 grupos: um que recebeu diariamente 200 ml do produto fermentado (grupo F) e o outro que recebeu 200 ml de placebo (grupo P). Amostras de sangue foram retiradas no início do estudo e depois de 3 e 6 semanas e analisadas quanto aos níveis de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides. A concentração do LDL-colesterol foi obtida por cálculo. Os resultados mostraram que nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides do grupo F, durante o período de 6 semanas, enquanto que o nível do HDL-colesterol se mostrou significativamente aumentado ($p \leq 0,05$) ao final do mesmo período. No grupo P, o colesterol total e o LDL-colesterol apresentaram-se com um aumento significativo ($p \leq 0,05$) ao final de 6 semanas, em relação aos valores iniciais, mas sem alterações nos níveis de HDL-colesterol e triglicérides. Em conclusão, a ingestão de 200 ml/dia do produto de soja fermentado foi capaz de manter inalterada a concentração de colesterol total e de LDL-colesterol, e de aumentar em 10% o nível do HDL-colesterol, nas condições de estudo.
Palavras-chave: Colesterol, soja, fermentação.

SUMMARY. Effect of a new fermented soy milk product on serum lipid levels in normocholesterolemic men. This study was undertaken to verify the effect of a daily intake of a new fermented soy milk produced with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus jugurti* on the serum lipid levels in normocholesterolemic middle-aged men. The study was randomized, double-blind and placebo-controlled and was performed for a period of 6 weeks. Forty-four normocholesterolemic healthy, male volunteers, aged 40-55 years old were randomly separated in two groups: The F-group received 200 ml of the fermented product daily and the P-group received 200 ml of placebo (chemically fermented). The blood samples were drawn initially and after 3 and 6 weeks and serum values for total cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride were determined. The LDL-cholesterol value was estimated. No significant changes in the fermented group (F) were observed for total cholesterol, LDL-cholesterol or triglyceride levels, while the HDL-cholesterol level was significantly higher ($p \leq 0,05$) after 6 weeks. The total cholesterol and LDL-cholesterol levels were significantly higher ($p \leq 0,05$) in the placebo group (P), but no changes were found for the HDL-cholesterol and triglyceride levels during the experimental period. In conclusion, the intake of 200 ml/day of the fermented soy milk, produced with *E. faecium* and *L. jugurti*, for 6 weeks, did not affect the serum total cholesterol and LDL-cholesterol, and led an increase of 10% in the HDL-cholesterol level.
Keywords: Cholesterol, soybean, fermentation.

INTRODUÇÃO

Os alimentos fermentados têm se constituído em importantes componentes da dieta devido não somente as suas características nutricionais, mas também, às suas propriedades profiláticas e/ou terapêuticas, dentre as quais, destaca-se o efeito hipocolesterolêmico.

Vários estudos têm investigado o efeito redutor de colesterol de certas bactérias lácticas presentes em determinados produtos fermentados (1-6). Entretanto, a maioria desses estudos foi realizada com o *Lactobacillus acidophilus*, não havendo muita informação sobre outras bactérias que poderiam apresentar efeitos similares.

Dentro desse contexto, Rossi et al (7) realizaram um

estudo com o *Enterococcus faecium* e demonstraram a capacidade *in vitro* desse microrganismo de reduzir em aproximadamente 54% o colesterol adicionado ao meio de cultivo. Apoiados nesses resultados, foi desenvolvido um produto de soja fermentado com o *E. faecium* associado ao *Lactobacillus jugurti*, o qual apresentou propriedades tecnológicas e sensoriais semelhantes aos fermentados tradicionais (8). O efeito hipocolesterolêmico desse produto foi verificado em coelhos machos, hipercolesterolêmicos e com idade de 8 semanas. Os resultados mostraram que uma dose de 10 ml/dia, administrada durante 30 dias, foi capaz de reduzir o nível de colesterol total em 18,4% e de aumentar a fração HDL em 17,8% (9). Considerando a importância de se conhecer o comportamento deste produto em humanos,

o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito decorrente da sua ingestão diária, sobre os níveis de lipídeos séricos de indivíduos normocolesterolêmicos, adultos e do sexo masculino.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Constituído por amostras de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* e de placebo (produto não fermentado), ambos produzidos na Unidade de Produção e Desenvolvimento de Derivados de Soja -UNISOJA da FCF-UNESP-Araraquara.

Grupo de estudo

Constituído por 44 pessoas voluntárias do sexo masculino, com idade entre 40 e 55 anos, que apresentavam níveis normais de colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides, glicose, alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e creatinina. Todos apresentavam pressão arterial abaixo de 130/85 mm Hg, não possuíam históricos de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares ou metabólicas. Os voluntários foram devidamente instruídos quanto ao tipo de estudo, objetivos, conduta individual, medidas de segurança e considerações sobre riscos*.

Planejamento experimental

O estudo foi duplo cego, randomizado, controlado por placebo e teve uma duração de 6 semanas.

Os indivíduos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos, cada um com 22 pessoas. Um grupo consumiu diariamente 200 ml do produto fermentado (grupo F), enquanto o outro consumiu diariamente 200 ml de placebo (grupo P). Todos foram orientados para que mantivesse constante o horário de ingestão do produto ao longo do experimento.

Amostras de sangue foram coletadas no início do estudo (determinação inicial) e no final da 3ª e 6ª semanas, sempre no período da manhã, após um jejum de no mínimo 12 horas.

Obtenção do produto fermentado

O produto foi processado na Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de soja -UNISOJA do Depto. de Alimentos e Nutrição da FCF/UNESP, a cada 7 dias, de acordo com a metodologia descrita por Rossi et al (10), tendo a seguinte constituição básica: extrato aquoso de soja (“leite” de soja) acrescido de 8% de sacarose; 1,0% de óleo de soja; 1% de lactose e 0,5% de gelatina. Como inóculo foi utilizado 1,5% (v/v) de cultivo *E. faecium* CRL 183 e 1,5% (v/v) de cultivo de *L. jugurti* 416. O produto depois de fermentado apresentou a seguinte composição química: 3,39% de

proteína; 2,74% de lipídes; 12,05% de carboidratos; 0,47% de cinzas e 81,32% de umidade, fornecendo 864,2 Kcal/litro.

Cada lote de produto foi submetido a uma quantificação de células viáveis, empregando-se meios de cultivos específicos: M17 ágar e MRS ágar. As colônias formadas foram contadas e tiveram suas características morfológicas observadas.

O placebo, de constituição idêntica ao produto fermentado, apenas sem conter os microrganismos em estudo, foi acidificado pela adição direta de ácido láctico de grau alimentício, até que fosse alcançado o pH idêntico ao do produto fermentado.

Dosagem dos lipídeos séricos

As dosagens do colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides foram realizadas em soros obtidos das amostras de sangue, por meio de “kits” enzimáticos específicos:

- Para o colesterol total foi empregado o método do “colesterol fast-color” (11).
- Para o HDL-colesterol, foi necessário primeiramente realizar uma precipitação seletiva de lipoproteínas, segundo a metodologia de Bergmeyer (12) e, posteriormente, determiná-lo pelo método utilizado para o colesterol total.
- Os triglicérides foram determinados pelo método do “triglicérides fast-color” (13).

Quanto ao LDL-colesterol, as concentrações foram calculadas por meio da equação de Friedwald (14).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As comparações, intra-grupos, das médias foram feitas pelo teste de Newman-Kewels, por meio do programa GB-STAT para MS windows, versão 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados clínicos dos indivíduos voluntários, observados no início do estudo, mostraram que todos apresentavam-se sem deficiências renais ou hepáticas, sem diabetes e não hipertensos, isto é: pressão arterial < 130/85 mm Hg (Tabela 1).

* Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP.

TABELA 1
Dados clínicos dos indivíduos pertencentes aos grupos de estudo

Nº de indivíduos	GF 22	GP 22
Pressão arterial sistólica (mm Hg)	118,0 ± 3	116,0 ± 2
Pressão arterial diastólica (mm Hg)	80,0 ± 1	78,0 ± 1
Colesterol total (mg/dl)	208,0 ± 5	173,0 ± 4*
Colesterol HDL (mg/dl)	46,0 ± 2	48,0 ± 2
Colesterol LDL (mg/dl)	128,0 ± 4	101,0 ± 5*
Triglicérides (mg/dl)	171,0 ± 18	118,0 ± 8*
Glicose (mg/dl)	90,0 ± 7	94,0 ± 13
AST-Aspartato amino transferase (U/l)	29,0 ± 6	30,0 ± 7
ALT-Alanina amino transferase (U/l)	32,0 ± 10	31,0 ± 10
Creatinina (mg/dl)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Todos os valores representam as determinações realizadas antes do início do estudo e são apresentados como média ± desvio padrão. GF = grupo de indivíduos que consumiram o produto fermentado e GP = grupo de indivíduos que consumiram o placebo.

* $p \leq 0,001$

Com exceção do colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides, que por consequência da distribuição randômica apresentaram valores significativamente maiores ($p \leq 0,05$) para o grupo F, nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos nos demais parâmetros avaliados.

Em todos os lotes dos produtos fermentados, processados e utilizados durante os experimentos, foram realizadas, em triplicata, as contagens de células viáveis (cocos e bacilos), as quais se apresentaram sempre na ordem de 10^8 UFC/ml, tanto para o *E. faecium* como para o *L. jurgurti*, número suficiente para que o produto pudesse ser caracterizado como probiótico (15).

Após 3 semanas de consumo do produto fermentado, o grupo F apresentou valor médio de colesterol total sem diferença significativa do valor inicial e mesmo do valor observado para o período de 6 semanas de estudo, isto é, o nível de colesterol total permaneceu inalterado durante todo o período de estudo (Tabela 2). O mesmo não foi observado para o grupo que consumiu o placebo (grupo P) cujo valor de 3 semanas foi significativamente maior ($p \leq 0,001$) que o valor inicial e significativamente menor ($p \leq 0,05$) que o valor observado ao final de 6 semanas, demonstrando, ao contrário do grupo F, que os níveis de colesterol total aumentaram em torno de 18% ao longo do estudo.

Com relação ao HDL-colesterol, os resultados mostraram que o grupo F apresentou uma elevação desses níveis, chegando a um aumento de cerca de 10% ao final de 6 semanas (Tabela 2), enquanto que o grupo P apresentou os valores inalterados durante todo o período.

TABELA 2
Concentração de lípides séricos nos grupos de indivíduos que consumiram produto fermentado e placebo, durante o período de estudo.

	Inicial	3 Semanas	6 Semanas
Colesterol total			
GF	208,0 ± 5,0	212,0 ± 5,0	212,0 ± 5,0
GP	173,0 ± 4,0	195,0 ± 6,0 ^a	205,0 ± 6,0 ^b
HDL-Colesterol			
GF	46,0 ± 2	46,0 ± 1	51,0 ± 2*
GP	48,0 ± 2	48,0 ± 2	44,0 ± 2
LDL-Colesterol			
GF	128,0 ± 4	133,0 ± 6	125,0 ± 5
GP	101,0 ± 5	125,0 ± 6*	132,0 ± 7*
Triglicérides			
GF	171,0 ± 18	193,0 ± 17	174,0 ± 12
GP	118,0 ± 8	140,0 ± 13	144,0 ± 10

valores expressos em mg/dl (média ± desvio-padrão)

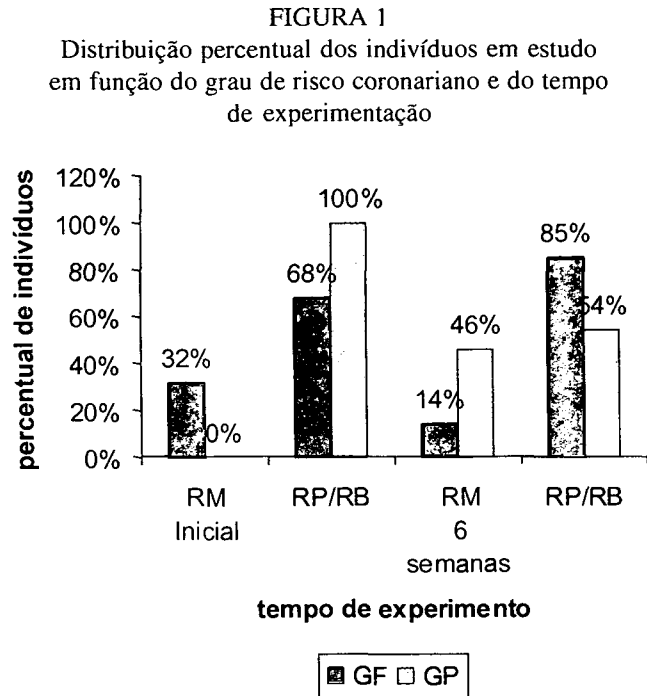
GF = grupo que consumiu produto fermentado; GP = grupo que consumiu placebo.

Comparação estatística intra-grupos: valores com letras diferentes indicam diferença significativa entre si para $p \leq 0,05$; * indica diferença significativa em relação ao valor inicial, para $p \leq 0,001$.

Também na Tabela 2 encontram-se os resultados referentes à fração LDL, cujos valores apresentaram-se sem diferença significativa, durante o período de estudo, para o grupo F, mas crescentes para o grupo P, indicando neste caso um aumento de aproximadamente 30% na 6ª semana, em relação ao valor inicial. Esse resultado é devido, em parte, ao aumento do colesterol total observado para o grupo P.

Para os triglicérides, os níveis permaneceram sem alterações durante as 6 semanas de estudo, tanto para o grupo F como para o grupo P, demonstrando que o produto fermentado não exerceu nenhum efeito sobre esse lípido sérico.

Os valores das frações HDL e LDL quando relacionados com o colesterol total ou entre si, permitem o estabelecimento do grau de risco coronariano (14). Com base nos valores de referência foi possível calcular o grau de risco coronariano para os dois grupos em estudo. Pode-se notar na Figura 1 que para o grupo F, no início do estudo, 32% dos indivíduos apresentavam um grau de risco moderado (RM) e ao final do estudo esse percentual caiu para 14%. Consequentemente o percentual de indivíduos com risco padrão (RP) ou baixo (RB) aumentou de 68% para 86%. Sem dúvida, o fato da grande maioria dos indivíduos do grupo F terem, ao final do estudo, se caracterizado como indivíduos de risco coronariano padrão ou baixo se deve ao aumento dos níveis da fração HDL e a manutenção dos níveis de LDL e de colesterol total.



GF = grupo que consumiu produto fermentado; GP = grupo que consumiu placebo.

RM = risco moderado; RP/RB = risco padrão ou risco baixo.

Por outro lado, os indivíduos do grupo P que no início do estudo apresentavam-se todos situados dentro do risco padrão ou baixo, ao final da 6ª semana apenas 54% permaneceram nessa faixa de risco e os restantes (46%) passaram para a faixa de risco moderado, fato este explicado certamente pelo aumento da fração LDL observado para o grupo em questão.

Em trabalho semelhante realizado por Agerbaek et al (16), os autores, utilizando também *E. faecium* e com um planejamento experimental de 6 semanas, encontraram que o produto fermentado levou a uma redução nos níveis de colesterol total, enquanto que o placebo fez com que esses valores permanecessem inalterados. Entretanto, é válido salientar que esses autores utilizaram o *S. thermophilus* como microrganismo associado ao *E. faecium* e o leite de vaca como matéria-prima, que segundo alguns pesquisadores, apresenta por si só um “fator de redução do colesterol” (17-19). Esse estudo foi refeito por outros pesquisadores, apenas aumentando o tempo de observação de 6 semanas para 6 meses. Os autores concluíram que a redução da fração LDL no grupo que consumia o produto fermentado, só era verificada até o primeiro mês de estudo. A partir disso, os níveis dessa fração passaram a apresentar-se sem diferença significativa para os dois grupos em estudo (20).

Desde a publicação do trabalho pioneiro de Mann &

Spoerry (21), demonstrando o efeito hipocolesterolêmico de produtos fermentados com *L. acidophilus*, muitos outros trabalhos nesta mesma linha têm sido apresentados e com eles um grande número de mecanismos foram sugeridos, sem, entretanto, nenhum ter sido comprovado até o presente momento.

Sendo assim, torna-se muito difícil tentar propor alguma explicação viável para os efeitos observados nesse estudo, principalmente pelo fato do efeito hipocolesterolêmico não ter sido explicitamente evidenciado, mas sim de uma forma indireta (impedindo o aumento do colesterol total no grupo F em relação ao grupo P). Por outro lado, o efeito positivo do aumento da fração HDL permite supor uma provável ação do produto fermentado ao nível da síntese do colesterol, não se aplicando neste caso em particular, nenhum dos mecanismos baseados na desconjugação de sais biliares pelos microrganismos do produto, condição que ocasionaria uma diminuição na absorção do colesterol exógeno (3, 22, 5). Entretanto, os resultados desse estudo, permitem afirmar que os efeitos observados para o grupo F são, sem dúvida, dependentes da presença dos microrganismos no produto fermentado, cuja ação poderia ser uma decorrência direta dessa presença ou então devido a algum metabólito produzido durante o processo fermentativo.

Por outro lado, é sabido que a soja apresenta componentes isoflavônicos que desempenham papel importante na redução do colesterol (23, 24). Entretanto, não se pode atribuir a elas, nem mesmo de forma parcial, os efeitos verificados no grupo F, uma vez que os mesmos efeitos não foram observados no grupo P. Isso pode ser explicado provavelmente pelo fato das isoflavonas terem sido eliminadas, em grande parte, no decorrer do processamento do “leite” (25) que se constitui na matéria-prima básica do produto fermentado em estudo.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o consumo de 200 ml/dia do produto fermentado com *E. faecium* e *L. jugurti*, por um período de 6 semanas, mostrou-se capaz de impedir um aumento do colesterol total e da fração LDL e de propiciar uma elevação em cerca de 10% na fração HDL. Essa situação permitiu que 86% dos indivíduos apresentassem grau de risco coronariano padrão ou baixo ao final do estudo, evidenciando que o produto pode conferir um “fator de proteção” a doenças ateroscleróticas. Entretanto, esses resultados não podem ser extrapolados para indivíduos do sexo feminino, hipercolesterolêmicos e com idade inferior a 40 ou superior a 55 anos, uma vez que o estudo foi conduzido apenas com pessoas do sexo masculino, normocolesterolêmicas e com idade entre 40 e 55 anos.

AGRADECIMENTOS

Aos técnicos de laboratório Roseli A. Pinto e Valéria Cristina O. Alves, ao grupo de voluntários do estudo, ao PADC/FCF-UNESP e à FAPESP.

REFERÊNCIAS

1. Fukushima M, Nakano M. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. *B J Nutr* 1995; 73: 701-10.
2. Gilliland SE. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J Food Prot* 1979;42: 164-167.
3. Gilliland SE., Nelson CR , Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49:377-381.
4. Grunewald KK. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Sci* 1982;47:2078-79.
5. Klaver FAM, Meer van der R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* is due to their bile salt - desconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1120-1124.
6. Mann GV. A factor in yogurth which lowers cholesterolemia in man. *Atherosclerosis* 1977; 26: 335-40.
7. Rossi EA, Giori GS, Holgado APR, Valdez GF. In vitro effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. *Microbiol Alim Nutr* 1994;12:267-70.
8. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Pei YC, Valdez GF. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *Eur Food Res Technol* 1999;209:305-07.
9. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Ueiji IS, Squinzari MM, Silva Jr SI, Valdez GF. Effects of a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. *Arq Bras Cardiol* 2000; 74: 213-16.
10. Rossi EA, Reddy KV, Silva RSFS. Formulation of soy-whey-yogurt, using response surface methodology. *Arq Biol Tecnol* 1984;7: 387-90.
11. Allain CA, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470.
12. Bergmeyer HW. *Methods of enzymatic analysis*. 2 ed. London: Academic Press, 1974, p.1890-3.
13. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produce hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982; 29: 2077.
14. Friedewald WT, Levy RJ, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative centrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-509.
15. Gonzales S, Albarracin G, Locascio MRP. Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. *Microbiol Alim Nutr* 1990;8: 349-54.
16. Agerbaeck M, Gerdes LU, Richelsen B. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European J Clin Nutr* 1995;49:346-52.
17. Steinmetz KA, Childs MT, Stimson C, Kushi LH, McGovern PG, Potter JD, Yamanaka Wk. Effect of consumption of whole milk and skim milk on blood lipid profiles in healthy men. *Am J Clin Nutr* 1994;59: 612-8.
18. Richardson F. The hypocholesterolemic effect of milk a review. *J Food Protect* 1978;41:226-35.
19. Ahmed AA, McCarthy RD, Porter GA. Effect of milk constituents on hepatic cholesterologenesis. *Atherosclerosis* 1979; 32: 347-57.
20. Richelsen B, Kristensen K , Pedersen SB. Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins – a placebo – controlled and double blind study. *Eur J Clin Nutr* 1996;50: 811-5.
21. Mann GV, Spoerry A. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. *Am J Clin Nutr* 1974; 27: 464-9.
22. Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews* 1990;87: 175-88.
23. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes Jr CL, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripuberal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996; 126: 43-50.
24. Potter SM. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effects of soy. *J Nutr* 1995; 125: 606S-611S.
25. Choi YB, Sohn HS. Recovery of isoflavones from soybean cooking water produced during soymilk manufacturing process. *J Food Sci Technol* 1997; 29: 522-6.

Recibido: 19-03-2002

Aceptado: 03-01-2003