

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Intolerância à lactose, uso terapêutico da lactase e sua microencapsulação
como estratégia farmacotécnica.**

Mariana Sayuri Takakura

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de
Oliveira Rangel Yagui

São Paulo
2022

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	6
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
4.1 A intolerância à lactose	7
4.2 A lactose e a lactase	7
4.3 Má absorção da lactose x intolerância à lactose	10
4.4 Origens da intolerância à lactose	10
4.5 Sintomas da intolerância à lactose	11
4.6 Dose mínima de lactose que pode ser ingerida, IBS e SIBO	12
4.7 Diagnóstico	13
4.8 Efeito placebo	14
4.9 Tratamento	15
4.10 Métodos de microencapsulação da lactase	15
4.10.1 Micropartículas sólidas lipídicas produzidas por processo de spray de congelamento.....	16
4.10.2 Emulsão dupla água óleo em água (A1/O/A2) com coacervação complexa	20
4.10.3 Cápsulas exinas esporopolenina (SEC) de <i>L. clavatum</i> aprisionadas com o carboximetilpachymaran	21
4.10.4 Microcápsulas ocas com macroporos responsivos a pH	27
4.10.5 Comparação das técnicas de microencapsulação da lactase estudadas	30
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE ABREVIATURAS

SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta (<i>Short Chain Fatty Acids</i>)
IBS	Síndrome do intestino irritável (<i>Irritable bowel syndrome</i>)
SIBO	Supercrescimento bacteriano do intestino delgado (<i>Small intestinal bacterial overgrowth</i>)
MCM6	Gene de manutenção de minicromossomo tipo 6
SLM	Micropartícula sólida lipídica (<i>Solid lipid microparticle</i>)
FaSSGF	Ambiente gástrico pré-prandial simulado (<i>Fasted State Simulated Gastric Fluid</i>)
FeSSGF	Ambiente gástrico pós-prandial simulado (<i>Fed State Simulated Gastric Fluid</i>)
PGPR	Poliricineolato de poliglicerila
SEC	Cápsulas exinas esporopolenina (<i>Sporopollenin exine capsules</i>)
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser (<i>Confocal laser scanning microscopy</i>)
CMP	<i>Carboxymethylpachymaran</i>
SGF	Fluido gástrico simulado (<i>Simulated gastric fluid</i>)
SIF	Fluido intestinal simulado (<i>Simulated intestinal fluid</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
SEM	Microscópio eletrônico de varredura (<i>Scanning electron microscope</i>)
FNP	Nanopartículas de poliestireno fluorescente (<i>Fluorescent polystyrene nanoparticles</i>)
SRB	Sulforodamina b (<i>Sulforhodamine b</i>)
ONPG	<i>ortho-Nitrophenyl-β-galactoside</i> (orto-nitrofenil-β-galactosídeo)

RESUMO

TAKAKURA, M.S. **Intolerância à lactose, uso terapêutico da lactase e sua microencapsulação como estratégia farmacotécnica.** 2022. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: lactose, enzima, intolerância, microencapsulação

INTRODUÇÃO: A intolerância à lactose é uma desordem metabólica caracterizada pela má absorção da lactose, gerando os sintomas de dor abdominal, gases, náusea e diarreia. Estima-se que entre 70%-75% dos adultos no mundo irão desenvolver intolerância à lactose ao longo da vida. A indústria alimentícia tem produzido cada vez mais alimentos “zero lactose”, ou seja, nos quais é adicionada a enzima lactase durante a sua produção, a qual catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose, monossacarídeos que são facilmente absorvidos impedindo os sintomas nos indivíduos intolerantes. No entanto, isso acaba alterando a cor e gosto do alimento, o que pode ser desagradável ao consumidor. Assim, tem se investido nos suplementos de lactase, os quais o indivíduo ingere antes de consumir algum alimento com lactose. Por ser uma enzima administrada por via oral, a lactase enfrenta desafios no trato gastrointestinal como mudanças de pH e presença de proteases, sendo que muitas vezes atinge o intestino delgado, seu local de ação, já inativa. Diante do exposto, tecnologias têm sido estudadas para aumentar a estabilidade da enzima aumentando seu *delivery* no local de ação, como as técnicas de microencapsulação. **OBJETIVO:** Discutir todos os fatores que envolvem a condição de intolerância à lactose e realizar uma revisão sobre os métodos de microencapsulação da lactase a fim de favorecer o seu *delivery* e aumentar o tempo de ação. **MATERIAL E MÉTODOS:** Revisão bibliográfica nas bases de dados *Web of Science* e *PubMed* utilizando as palavras-chave “lactose intolerance”, “microencapsulation”, “lactase” combinadas ou de forma isolada, sendo considerados somente os artigos publicados entre 2011 e 2022. Para os trabalhos sobre intolerância à lactose, foram usados os de revisão e com “lactose intolerance” no título. Aqueles que abordavam a intolerância à lactose em grupos étnicos e de faixa etárias específicas, outros tipos de tratamento sem ser o uso terapêutico da lactase e que usavam a técnica de microencapsulação em outros tipos de composto bioativo sem ser a lactase foram desconsiderados. **RESULTADOS:** Com base na vasta revisão bibliográfica observou-se que a maior parte dos indivíduos chamados “lactase persistentes”, ou seja, aqueles que continuam produzindo altos níveis de lactase ao longo da vida adulta são encontrados majoritariamente na Europa, enquanto que na Ásia e África apresentam baixa incidência. A intolerância à lactose pode ser classificada em primária, secundária e congênita, de acordo com a sua origem. Existem algumas formas de diagnosticar tal condição, como através de biópsia, teste genético, teste respiratório de hidrogênio expirado e o teste de tolerância a lactose. Dentre as formas de tratamento expostas neste trabalho, o uso da lactase como suplemento alimentar foi a escolhida para ser melhor explorada. Tendo em vista os desafios envolvidos no uso terapêutico da lactase devido à administração ser via oral, estudos foram realizados provando a eficácia do uso de nanotecnologia na proteção da enzima contra o pH e lipases do meio gástrico, de forma

que a mesma chegue no intestino delgado com menos danos, apresentando maior ação. A técnica de dupla emulsão seguida de coacervação complexa foi a que apresentou maior potencial de sucesso devido a alta eficácia de encapsulação e resultados positivos após exposição a meio gástrico e *delivery* no meio intestinal *in vitro*. **CONCLUSÃO:** Com este trabalho pôde-se analisar e expor importantes fatores sobre a intolerância à lactose para o melhor entendimento e tratamento do paciente. Como a dose mínima de lactose que pode ser ingerida sem que o paciente apresente sintomas, sua origem, populações que apresentam maior incidência e o motivo para isso, além dos tipos possíveis de diagnóstico e tratamento. Tais informações podem possibilitar uma melhor qualidade de vida aos indivíduos diagnosticados. Além disso, apesar de ainda não se terem testes *in vivo* da lactase encapsulada, existem técnicas já estudadas *in vitro* que apresentaram resultados muito promissores, se destacando a da dupla emulsão seguida da coacervação complexa.

1 INTRODUÇÃO

Indivíduos diagnosticados com intolerância à lactose apresentam os sintomas de dor abdominal, diarreia, náusea e gases após ingestão de alimentos com lactose. Isso ocorre pois a lactose não é bem absorvida pelo intestino delgado devido à deficiência da enzima β -galactosidase. (LEMBER, 2012) A lactose é um dissacarídeo que precisa ser hidrolisado em galactose e glicose para ser absorvido pelo intestino delgado, sendo tal reação catalisada pela lactase (β -galactosidase). Nos casos de baixa atividade ou ausência da enzima, a lactose chega no intestino grosso onde as bactérias a fermentam, gerando gases e ácidos de cadeia curta como gás hidrogênio, dióxido de carbono e metano que podem causar os sintomas característicos da intolerância (PORZI et al., 2021). Existem três tipos de intolerância à lactose que são definidas com base na sua causa. A primária, também chamada de lactase não persistente, é a mais comum entre as demais e trata-se de uma condição autossômica recessiva (LEVITT et al., 2013; VANDENPLAS, 2015). Mamíferos recém nascidos sobrevivem de leite materno, ingerindo uma alta quantidade de lactose e por isso possuem altas concentrações de lactase no intestino delgado para conseguirem digerir esse dissacarídeo. Após o desmame, cerca de 70% a 75% da população tende a apresentar uma queda na síntese da enzima, apesar de continuar sendo exposta a lactose. Cerca de 25% a 30% da população não apresenta esse quadro, mantendo os altos níveis de lactase durante a vida adulta, sendo chamados de persistentes a lactase (LEVITT et al., 2013; BROWN-ESTERS et al., 2012). A secundária é consequência da danificação das vilosidades do intestino delgado devido às doenças gastrointestinais, como doença celíaca, doença de Crohn e gastroenterites. Por fim, tem-se a congênita, em que o recém nascido não produz a lactase, sendo uma condição rara (VANDENPLAS, 2015).

Existem alguns métodos para diagnóstico da intolerância, sendo eles: biópsia das microvilosidades do intestino delgado para se avaliar a atividade de lactase; exame de sangue, no qual o indivíduo ingere determinada quantidade de lactose e então mede-se o nível de glicose no sangue ao longo do tempo (curva glicêmica); teste respiratório de hidrogênio expirado, no qual após uma noite em jejum, o indivíduo ingere um xarope de lactose e então expira em um saco, sendo quantificada a quantidade de hidrogênio expirada; por fim, o teste genético (JANSSON-KNODELL et al., 2020).

Algumas formas de se lidar com essa condição, a fim de melhorar os sintomas gastrointestinais, consistem na redução da lactose na dieta de indivíduos intolerantes ou na ingestão de alimentos com lactose preferencialmente como parte de uma refeição completa, pois o trânsito gastrointestinal é menor na presença de outros alimentos sólidos, reduzindo a quantidade de lactose que chega ao intestino grosso de uma só vez permitindo a eliminação dos gases produtos da fermentação, amenizando os sintomas da intolerância (BROWN-ESTERS et al., 2012). Além disso, sugere-se a ingestão de leites e alimentos com lactose pré hidrolisada, porém esses não mostraram evitar totalmente os sintomas, e o uso de lactase oral como um suplemento ingerido antes da refeição. A total exclusão de alimentos lácteos não é recomendada, devido ao fato de impactar na ingestão de elementos importantes para a dieta como vitamina D e cálcio, podendo levar ao desenvolvimento de doenças como a osteoporose (BERTONI et al., 2018).

A β -galactosidase pode ser encontrada em leveduras, bactérias e fungos, sendo a obtida da levedura *Kluyveromyces lactis* muito usada na indústria alimentícia para produção de alimentos “zero lactose” devido seu pH ótimo ser entre 6 e 7. Já a β -galactosidase obtida do fungo *Aspergillus oryzae* é utilizada nos suplementos de uso oral, ou também chamada de lactase para uso terapêutico, devido seu pH ótimo ser aproximadamente 5 (SOUZA et al., 2019). O uso de suplementos é preferível em relação aos alimentos “zero lactose”, pois a adição da enzima no alimento anteriormente à sua comercialização altera as características sensoriais como cor e sabor (SOUZA et al., 2019). Entretanto, devido à administração dos suplementos ser via oral, o ambiente gástrico influencia muito na atividade da enzima (HOMAYUN et al., 2020). Tendo isso em vista, estratégias usando diferentes tipos de tecnologias têm sido testadas a fim de se obter um suplemento contendo lactase com maior eficácia, sendo uma delas a microencapsulação, tecnologia baseada no aprisionamento da enzima em uma matriz

polimérica ou membrana, feita através de diversos métodos físicos, químicos e físico-químicos, protegendo a lactase da degradação no trajeto do trato gastrointestinal tornando possível um maior *delivery* do suplemento no intestino delgado (BERTONI et al., 2018; SOUZA et al., 2019).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão sobre o que se sabe até os dias atuais acerca das causas, tipos, diagnóstico e tratamentos disponíveis da intolerância à lactose, com foco no emprego da lactase. Além disso, pretende-se apresentar tipos de microencapsulação da lactase para uso terapêutico, a fim de aumentar sua estabilidade no trânsito pelo trato gastrointestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma extensa pesquisa bibliográfica de artigos científicos acerca da intolerância à lactose, do uso terapêutico da lactase e na indústria alimentícia, e de formas de microencapsulação da enzima. As bases de dados utilizadas foram Web of Science e PubMed e as palavras-chave usadas nas pesquisas foram “lactose intolerance”, “microencapsulation”, “lactase” de forma combinada ou isolada. Como critério de inclusão empregou-se a data de publicação, sendo considerados apenas os trabalhos publicados entre 2011 e 2022, com o objetivo de se obter informações atualizadas. Na pesquisa de artigos que abordavam a intolerância à lactose foram considerados somente os artigos de revisão e “lactose intolerance” no título, a fim de diminuir o número de resultados para os que abordassem mais o tema de uma forma geral, que era o esperado. Para os artigos sobre microencapsulação da lactase não foi necessário usar tal critério devido ao menor número de trabalhos publicados. Os critérios de exclusão adotados consistiram em artigos que abordam o tratamento para intolerância à lactose com outras alternativas à lactase, por exemplo com probióticos, estudos sobre a intolerância em grupos étnicos e de faixa etária específica e métodos de microencapsulação de outras enzimas que não a lactase.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A intolerância à lactose

A primeira descrição da intolerância à lactose foi feita por Hipócrates 400 a.C., entretanto, somente nos últimos 50 anos que esta passou a ser analisada cientificamente. O leite é composto por minerais, vitaminas, gorduras, proteínas e carboidratos como a lactose, sendo essa essencial para o desenvolvimento da microbiota do recém nascido, principalmente da bifidobacteria, gênero de bactérias probióticas anaeróbicas que possuem papel essencial na proteção do trato gastrointestinal contra infecções (FASSIO et al., 2018). Durante o primeiro ano de vida, a lactose é a fonte de energia mais importante para o bebê, compondo aproximadamente 7% do leite materno (SILANIKOVE et al., 2015). Pacientes com essa condição clínica após ingerirem a lactose apresentam os sintomas de dor abdominal, diarreia, gases e cólica estomacal, devido a má absorção do carboidrato (MISSELWITZ et al., 2013).

4.2 A lactose e a lactase

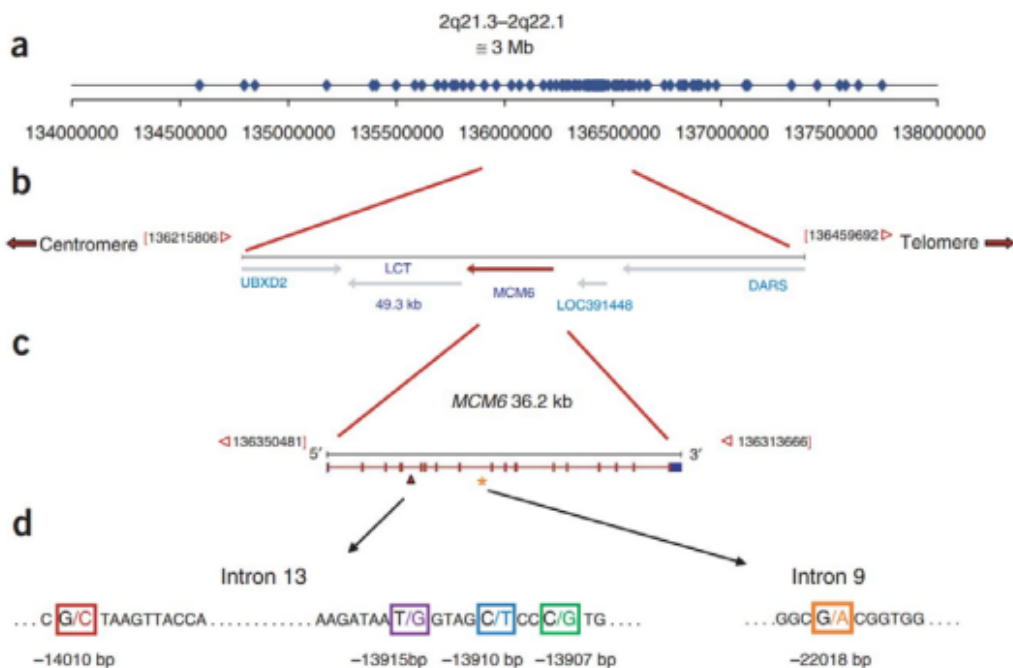
A lactose é um dissacarídeo encontrado no leite de mamíferos, com exceção dos leões marinhos e morsas, que apesar de serem mamíferos produzem um leite viscoso, gorduroso e sem lactose (MISSELWITZ et al., 2019). A presença em algumas espécies raras de plantas também é questionável. Esse açúcar é composto por D-galactose e D-glicose que são ligadas pela enzima lactose sintetase formando a ligação glicosídica β -1,4, a qual é composta pela ligação do carbono 1 da galactose e carbono 4 da glicose (FASSIO et al., 2018; TOCA et al., 2022). É usada na produção de alimentos como carnes, margarinas, molhos, pães e refeições prontas como aditivo realçando a textura e sabor, e como excipiente em fármacos (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018; DOMINICI et al., 2022). Para ser absorvida, a lactose precisa ser hidrolisada pela lactase, também chamada de lactase-florizina hidrolase ou β -galactosidase, enzima encontrada no intestino delgado, mais especificamente na superfície apical das microvilosidades do jejuno (FASSIO et al., 2018). A lactase é composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas de 160 kDA (MISSELWITZ et al., 2019). Apresenta dois sítios de ação sendo que um está envolvido na clivagem da lactose e o outro na clivagem de florizina e outros glicolipídeos. Diferente de outras enzimas, a lactase não apresenta um efeito substrato indutor, ou seja, quando aumenta a quantidade de lactose ingerida, a concentração da

enzima não aumenta proporcionalmente, assim como ocorre com a maltase, por exemplo (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018). Primeiramente ela é sintetizada como pré-prólactase, então tem sua sequência sinal hidrolisada resultando na pro-lactase, a qual é N- e O-glicosilada no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi gerando a lactase, que é transportada às células epiteliais da membrana apical do intestino delgado (PORZI et al., 2021). Sua síntese começa desde a oitava semana de gestação, aumentando até a trigésima quarta semana e apresenta pico de produção no nascimento, para se seguir então o período de amamentação (DENG et al., 2015; DOMINICI et al., 2022). Após o período de desmame, entre os 2 e 3 anos de idade, os níveis de lactase diminuem, entrando em uma faixa de concentração estável entre os 5 e 10 anos de idade. A maior parte dos seres humanos então permanecem com os níveis de lactase de aproximadamente 10% em relação ao do nascimento e são chamados de indivíduos “lactase não persistentes” (MISSELWITZ et al., 2013). Entretanto, existem exceções para este quadro, indivíduos que continuam produzindo altos níveis de lactase ao decorrer da vida adulta, sendo chamados de “lactase persistentes”. Relaciona-se este fenômeno a povos que cultivam atividades de pecuária nos últimos 10.000 anos e que tradicionalmente domesticam gado e continuam o consumo de leite e derivados. Os indivíduos “lactase persistentes” têm maior incidência no norte da Europa, compondo mais de 90% da população na Escandinávia e Holanda e são encontrados com menor frequência no sul do continente e Oriente Médio, sendo aproximadamente 50% da população espanhola, italiana e da Arábia Saudita. Na Ásia e na maior parte da África a incidência é bem baixa, aproximadamente 1% na China e entre 5% e 20% nas regiões agricultoras do oeste da África (DENG et al., 2015; SZILAGYI, 2015).

Descobriu-se na segunda metade do século 20 que a persistência na produção de lactase durante a vida adulta é uma característica autossômica dominante (SZILAGYI et al., 2018). A lactase é composta por 1927 aminoácidos e o gene que a codifica (LCT) se encontra no cromossomo 2, posição 21 (2q21) e apresenta 17 exons (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018). Alguns polimorfismos (SNP) foram identificados como os responsáveis pela característica de o indivíduo ser ou não lactase persistente, variando dependendo da população étnica. Nos descendentes europeus são encontrados os LCT-13910C/T e LCT-22018G/A, em populações da África e Oriente Médio é o LCT-13915T/G, e em algumas tribos africanas os LCT-14010G/C e LCT-13907C/G. No caso da população europeia, os indivíduos homocigotos que apresentam genótipo T/T-13910

e A/A-22018 e os heterozigotos C/T-13910 e G/A-22018 estão relacionados ao fenótipo de lactase persistentes e os homozigotos C/C-13910 e G/G-22018 ao de não persistentes a produção de lactase, podendo se tornarem intolerantes à lactose (PORZI et al., 2021; DI COSTANZO et al., 2019). Estes polimorfismos se encontram dentro dos íntrons 9 e 13 do gene MCM6 (manutenção de minicromossomo tipo 6) que se localiza no mesmo cromossomo do gene LCT e regula a sua expressão, como pode ser visto na **Figura 1** (DENG et al., 2015). Assim, visto que a característica de persistência da lactase é dada por um gene autossômico dominante, os indivíduos homozigotos recessivos para o gene da persistência a lactase apresentam níveis da enzima 10 vezes menores no jejuno, em relação aos homozigotos dominantes, e os heterozigotos apresentam níveis intermediários (MISSELWITZ et al., 2013). Os mecanismos envolvidos na baixa síntese da lactase podem ser vários, como a menor síntese de mRNA, erros na transcrição ou tradução do gene da enzima ou diminuição de enterócitos que a sintetizam (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018).

Figura 1 - Representação do gene LCT e íntrons 9 e 13 do gene MCM6 (manutenção de minicromossomo tipo 6) com os possíveis polimorfismos



Fonte: Deng et al., (2015).

Como mencionado anteriormente, para que a lactose possa ser absorvida, essa deve ser hidrolisada pela lactase em glicose e galactose, monossacarídeos que através

de proteínas de membrana SGLUT 1 (proteína de transporte sódio-glicose 1) localizadas nos enterócitos são co-transportados por transporte ativo junto de dois íons de Na⁺ para o interior da célula. Posteriormente são transportados para o sangue de forma passiva ou facilitada pela proteína GLUT 2, sendo que podem ser usados pelo corpo humano como fonte de energia e a galactose também pode compor glicolípídeos e glicoproteínas (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018).

4.3 Má absorção da lactose x intolerância à lactose

Apresentar o quadro de má absorção da lactose não significa obrigatoriamente que o indivíduo é um intolerante à lactose. É necessário apresentar os sintomas característicos para ser considerado intolerante, pois o indivíduo pode apresentar má absorção provocada tanto pela falta de lactase quanto por doenças intestinais, e não ter os sintomas da intolerância à lactose. No entanto, para ser um intolerante a lactose é necessário apresentar a condição de má absorção do carboidrato (MISSELWITZ et al., 2013)

4.4 Origens da intolerância à lactose

A intolerância à lactose pode ter diferentes origens que serão citadas a seguir. A congênita é uma condição rara com a maior parte dos casos relatados na Finlândia. Trata-se de uma mutação autossômica recessiva que provoca a inibição ou baixos níveis de produção da lactase pelas células do intestino delgado. É um quadro grave pois recém-nascidos são incapazes de digerir a lactose, o que gera diarreia severa, acidose e hipercalcemia, sendo recomendado a isenção total do consumo de leite e derivados (SZILAGYI et al., 2018). A primária é a mais comum, atinge dois terços da população mundial e é caracterizada por uma diminuição progressiva da produção de lactase, sendo composta pelos indivíduos citados anteriormente como “lactase não persistentes”. Os níveis da enzima costumam diminuir aproximadamente aos 2 anos de idade, podendo ser depois, porém os sintomas de intolerância aparecem somente na adolescência ou vida adulta (SILANIKOVE et al., 2015). Por fim, na secundária tem-se a diminuição da enzima devido a doenças ou infecções que afetam o intestino delgado, como doença celíaca, doenças inflamatórias intestinais (como doença de Crohn e colite ulcerativa),

enterites bacterianas ou virais, pós cirurgias ou tratamentos farmacológicos. Neste caso, uma vez que a doença ou infecção é resolvida, a síntese de lactase volta ao normal (FASSIO et al., 2018).

4.5 Sintomas da intolerância à lactose

Quando a lactose é ingerida e não é hidrolisada no intestino delgado, passa direto para o cólon onde provoca um aumento da carga osmótica e assim a entrada de fluidos e eletrólitos para o lúmen intestinal (LEVITT et al., 2013). O dissacarídeo é então fermentado pela microbiota gerando ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) como acetato, propionato e butirato, e gases hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4). Estes, vão para a circulação e são eliminados na respiração, assim como também podem causar o sintoma de flatulência e aumentar o tempo de trânsito intestinal e a pressão intraluminal (PORZI et al., 2021). Devido à produção de SCFA o pH do cólon diminui ficando acidificado o que aumenta ainda mais a carga osmótica do lúmen, atraindo mais fluidos e provocando o aumento do trânsito intestinal também, causando a diarreia (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018). A severidade dos sintomas típicos da intolerância dependem de diversos fatores como a quantidade de lactose ingerida, o quanto de lactase o indivíduo ainda expressa, se foram ingeridos outros alimentos junto com a lactose, o tempo de trânsito intestinal, o crescimento bacteriano no intestino delgado e a composição da microbiota (PORZI et al., 2021). Por exemplo, consumir alimentos ricos em lactose em refeições que incluem outros alimentos junto, principalmente gorduras, diminui o tempo de esvaziamento gástrico expondo o intestino delgado a pequenas quantidades de lactose, facilitando a sua absorção. Também há alimentos que aumentam o tempo de trânsito intestinal e assim geram mais sintomas característicos da intolerância, como café e pimentas. Iogurtes, por possuírem bactérias que fermentam a lactose, apresentam menor concentração do carboidrato. Além de alimentos, o trânsito intestinal pode ser alterado por fatores fisiológicos como gravidez, uso de medicamentos e doenças como diabetes e alterações na tireoide (SZILAGYI et al., 2018).

4.6 Dose mínima de lactose que pode ser ingerida, IBS e SIBO

A maior parte dos indivíduos não persistentes a lactase conseguem consumir até 12 g de lactose por vez, o que corresponderia a 250 mL de leite, sem apresentar sintomas, sendo que se for consumida essa quantidade ao longo do dia ou com outros alimentos, as chances de aparição de sintomas são ainda menores (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018; DENG et al., 2015). Um estudo foi realizado em uma população chinesa com indivíduos que apresentavam diarreia devido a síndrome do intestino irritável (IBS) e indivíduos saudáveis com deficiência na produção de lactase (controle, intolerantes à lactose). Para cada grupo, foram administradas diferentes doses de lactose, 10 g que seria uma dose menor do que a mínima para se observar sintomas, 20 g correspondendo a quantidade normal ingerida de lactose em uma refeição e 40 g como um “controle positivo”. Como resultado, ambos os grupos apresentaram um aumento de pelo menos 20 ppm de H₂ no teste respiratório de hidrogênio expirado, tendo valores próximos. Porém, em relação aos sintomas, o grupo de pacientes saudáveis não persistentes à lactase tiveram poucos casos de indivíduos com sintomas, com exceção dos que ingeriram a dose de 40 g, assim como o esperado. Já os pacientes com IBS apresentaram maior número de casos sintomáticos no consumo de todas as doses de lactose, como pode-se ver na **Tabela 1**, sendo estes mais severos e de diversos tipos.

Tabela 1 - Resultados do estudo com múltiplas doses de lactose realizado com indivíduos com IBS e indivíduos saudáveis intolerantes a lactose.

		Indivíduos com teste respiratório de H₂ expirado > 20 ppm (%)	Indivíduos que apresentaram os sintomas da intolerância à lactose (%)
Indivíduos saudáveis com deficiência na produção de lactase (controle)	10 g de lactose	35	3
	20 g de lactose	87	22
	40 g de lactose	93	73
Indivíduos com IBS	10 g de lactose	42	18
	20 g de lactose	80	47
	40 g de lactose	92	85

Fonte: Adaptado de Misselwitz et al. (2013).

Dessa forma, pode-se observar com este estudo que pacientes com IBS apesar de apresentarem um nível de má absorção da lactose parecido com pacientes saudáveis e intolerantes ao carboidrato, são mais sensíveis aos sintomas característicos da intolerância (MISSELWITZ et al., 2013; DENG et al., 2015). Outro fator que pode explicar a maior incidência e intensidade destes sintomas nestes pacientes, é o resultado de estudos que foram realizados em que exames de cintilografia e testes respiratórios de hidrogênio expirado mostraram que pacientes com IBS e intolerância à lactose apresentam uma maior prevalência de supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SIBO) do que pacientes controles. O SIBO pode exceder 10^5 organismos/mL, os quais apresentam um alto nível de fermentação da lactose o que causa os sintomas semelhantes ao da intolerância à lactose, como gases, desconforto abdominal e diarreia (DENG et al., 2015).

4.7 Diagnóstico

Em relação ao diagnóstico, para se determinar um quadro de intolerância à lactose é necessário que antes disso, o paciente apresente uma má absorção do carboidrato a qual pode ser identificada através de diferentes tipos de testes. O método mais invasivo seria a realização de uma biópsia da mucosa do intestino delgado, em que é feita a avaliação da atividade da lactase nas microvilosidades do jejuno. A vantagem deste método é a possibilidade de se excluir as chances de doenças ou infecções como a causa da má absorção, e a desvantagem é o fato de poderem ser encontradas diferentes concentrações da enzima em diferentes regiões da mucosa, além de ser um método invasivo. Também pode-se realizar a avaliação do genótipo do indivíduo visto que a persistência da lactase é uma característica autossômica dominante. Entretanto, a desvantagem deste teste é que diferentes populações apresentam diferentes polimorfismos (DENG et al., 2015; MISSELWITZ et al., 2013). Outro método é através do teste respiratório de hidrogênio expirado, no qual o paciente administra via oral entre 10 a 40 g de lactose dissolvida em 250 mL de água. Caso a lactose não seja hidrolisada pela lactase no intestino delgado, passa direto para o intestino grosso e é fermentada por bactérias da microbiota produzindo os gases, sendo um deles o hidrogênio. Esse, é expirado na respiração e pode ser quantificado por cromatografia gasosa, no tempo zero e a cada 30 minutos durante 3 horas. É determinada a má absorção do carboidrato

quando se observa um aumento maior que 20 ppm de gás hidrogênio. Por ser simples e rápido, apresentando uma especificidade de 89% a 100% e sensibilidade de 69% a 100%, este é o teste mais usado para tal avaliação. Resultados falso positivos podem ser obtidos no caso de SIBO, e falso negativos no caso de indivíduos que a microbiota intestinal não produz gás hidrogênio. Esta última situação pode ser explicada pela ocorrência de uma adaptação da microbiota após muita ingestão de lactose provocar a seleção de bactérias que a fermentam rapidamente e não produzem H₂ (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018; MISSELWITZ et al., 2013; DI COSTANZO et al., 2019). Por último, existe o teste de tolerância à lactose, no qual o indivíduo ingere 50 g de lactose e são realizadas coletas de sangue para medição da glicose antes da ingestão e após a ingestão, no tempo zero, após 1 hora e 2 horas. Caso se observe um aumento acima de 20 mg/dL de glicose, o indivíduo é lactose tolerante. Resultados falso positivos podem ser obtidos devido uma resposta rápida da insulina e falso negativos em indivíduos diabéticos ou com SIBO (UGIDOS-RODRÍGUEZ et al., 2018).

4.8 Efeito placebo

Também é importante ressaltar a alta incidência de efeito placebo, pacientes que se auto declaram intolerantes à lactose mas ao serem realizados estudos e exames, é constatado que muitas vezes nem má absorção à lactose apresentam. Em uma população usada como base para estudos em que 9,5 a 25% relatou ser intolerante à lactose, apenas 25 a 40% destes indivíduos apresentaram sintomas aos alimentos lácteos oferecidos em um teste cego controlado. Outra evidência deste fenômeno foi demonstrada por um estudo aberto no qual pacientes ingeriram 240 mL de leite, sendo que 59% dentre os que apresentavam má absorção de lactose tiveram sintomas de intolerância. Entretanto, em um estudo controlado com placebo feito com indivíduos que se autodeclaravam intolerantes com severos sintomas, com a ingestão da mesma quantidade de leite, nenhum apresentou sintomas. E quando realizados os testes diagnósticos, 9 entre os 30 indivíduos não apresentavam nem a má absorção da lactose (MISSELWITZ et al., 2013).

4.9 Tratamento

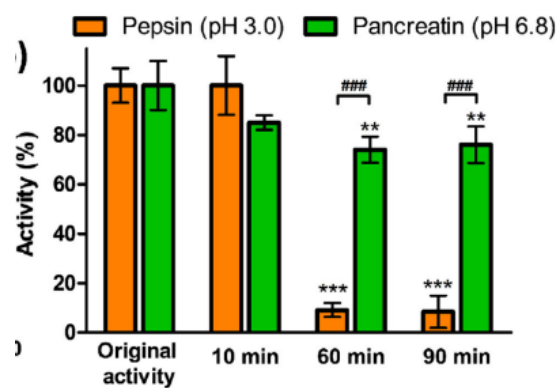
O tratamento deve ser baseado na melhora dos sintomas e não na tentativa de reduzir a má absorção da lactose. A exclusão total de alimentos com lactose da dieta mostrou não ser uma abordagem adequada, pois afeta a ingestão de outros elementos importantes presentes nesses alimentos, como cálcio, fosfato e vitamina D, o que pode acarretar no desenvolvimento de doenças como osteoporose (SZILAGYI et al., 2018). Como pacientes intolerantes ainda conseguem ingerir aproximadamente 12 g de lactose sem apresentar sintomas, a diminuição na ingestão de alimentos com lactose é mais recomendada, assim como o seu consumo com outros alimentos, diminuindo o trânsito intestinal e por consequência os sintomas, como já foi mencionado (MISSELWITZ et al., 2019). Consumo de probióticos também é recomendado. Estes, tratam-se de bactérias que produzem ácido láctico e lactase, o que auxilia na digestão da lactose. Podem estar presentes de forma natural em alimentos como iogurtes e kefir ou podem ser adicionados em outros alimentos (SZILAGYI et al., 2018). Hoje em dia existem diversos produtos “zero lactose” no mercado, os quais são tratados com lactase na sua produção de forma que quase toda a lactose do produto é hidrolisada gerando glicose e galactose, o que os tornam até 4 vezes mais adocicados, além de também terem sua cor alterada (AHN et al., 2013). Tal manipulação do produto mantém sua validade e características nutricionais. Por fim, também se tem a possibilidade do uso da lactase como suplemento oral, porém como possui curto tempo de ação, deve ser administrada de 5 a 30 minutos antes do consumo do alimento com lactose (FASSIO et al., 2018).

4.10 Métodos de microencapsulação da lactase

A β -galactosidase possui 465.400 Da, sua conformação é globular, tem pI 4,61, temperatura de desnaturação térmica 86°C e é anfifílica (McCLEMENTS, 2018). Tais informações precisam ser levadas em consideração ao escolher os métodos de encapsulação da enzima, além de pontuar seus maiores desafios. No caso da lactase para uso terapêutico, devido a sua administração ser por via oral, o maior desafio consiste no pH estomacal e fluidos gástricos que podem provocar a desnaturação, agregação e hidrólise da enzima (McCLEMENTS, 2018). Identificou-se que a atividade ótima da lactase de *Aspergillus oryzae* é no intervalo de pH 3-5 (BERTONI et al., 2018). Testes foram realizados para entender melhor o impacto que as enzimas do trato

gastrointestinal têm em relação à lactase livre, sendo observado que após 10 minutos de incubação com a pepsina, a atividade da enzima não foi alterada, entretanto após 60 minutos se observou apenas 9,1% da atividade inicial e após 90 minutos, 8,4%. Já as lipases pancreáticas após 10 minutos de incubação diminuíram a atividade da lactase a 85,7% e após 60 e 90 minutos a 75% (**Figura 2**). Assim, é possível observar que a pepsina nos primeiros minutos não causa efeito na lactase mas que após 1 hora a degrada significativamente. Enquanto que as lipases pancreáticas apesar de em um momento inicial prejudicarem mais a lactase, posteriormente não afetam tanto a atividade da mesma (BERTONI et al., 2018).

Figura 2 - Ação da pepsina e lipases pancreáticas na atividade da lactase



Fonte: Bertoni et al. (2018).

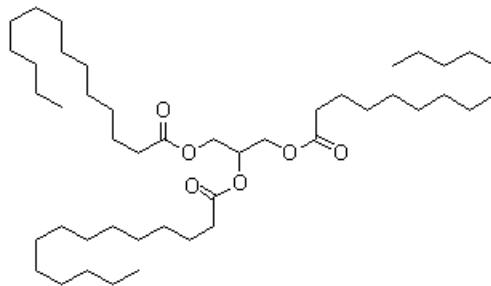
Também deve-se analisar qual o objetivo final do produto, que no caso da lactase é o seu *delivery* de forma prolongada e protegida das adversidades do meio enfrentadas pela enzima durante seu trajeto pelo trato gastrointestinal (McCLEMENTS, 2018). Foram então analisadas técnicas de microencapsulação da lactase com diferentes tipos de sistemas coloidais de *delivery*.

4.10.1 Micropartículas sólidas lipídicas produzidas por processo de spray de congelamento

A primeira técnica abordada trata-se da produção de micropartículas sólidas lipídicas (SLM) através do processo de spray de congelamento, carregadas de lactase obtida de *Aspergillus oryzae*, realizada em uma única etapa e sem uso de solvente descrita por Bertoni et al. (2018). Inicialmente, foi selecionado o glicerídeo mais adequado para compor a SLM. Para isso, cinco tipos foram avaliados, com cadeias de

ácido graxo apresentando números de carbono e níveis de esterificação variados, sendo eles o monoestearato de glicerila, Compritol 888 ATO (dibehenato de glicerila), Precirol ATO 5 (diestearato de glicerila), Dynasan 114 (trimiristato de glicerila) e Dynasan 118 (triestearato de glicerila). Todos foram expostos a sais biliares e lipases intestinais, sendo que o Dynasan 114 apresentou a maior resposta às lipases pancreáticas, ou seja, sofreu maior grau de lipólise em relação aos demais glicerídeos avaliados. Este, é um trimiristato de glicerila, composto por três cadeias de ácido graxo cada uma com 14 carbonos, como pode-se ver na **Figura 3**.

Figura 3 - Estrutura do trimiristato de glicerila



Fonte: Online Database of Chemicals from Around the World (2022).

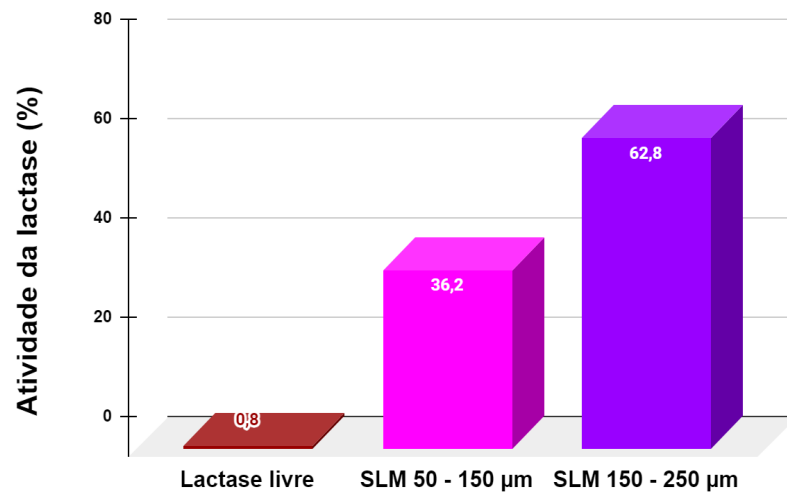
Durante os testes com os SLM (sem a enzima lactase) compostos por cada tipo de glicerídeo, verificou-se que as cadeias de ácido graxo mais curtas que compõem o Dynasan 114, em comparação as demais, apresentaram maior solubilidade, mobilidade e grupos de saída, tendo maior afinidade pelas lipases pancreáticas sofrendo mais lipólise. Dessa forma, o Dynasan 114 foi escolhido como o excipiente para a formação das SLM.

Em seguida, se analisou o efeito do tamanho da SLM em relação ao grau de lipólise testando diferentes diâmetros de micropartículas de Dynasan 114. Se concluiu que como a lipólise ocorre em ambiente aquoso, o glicerídeo precisa ser emulsificado para ser hidrolisado e então liberar a lactase quando carregado, o que se torna uma etapa limitante. Foi observado que SLM menores (75 - 100 μm) são emulsificadas mais rapidamente e de forma mais eficiente que as SLM com diâmetro maior (200 - 250 μm), apresentando área de superfície para que as lipases pancreáticas possam agir e assim sofrendo um maior grau de lipólise.

Após escolhido o glicerídeo para compor a micropartícula, as SLM carregadas de enzima foram produzidas e obteve-se rendimentos superiores a 95%. Para isso, o Dynasan 114 foi aquecido a aproximadamente 60-63°C, temperatura acima da sua temperatura de fusão, e foi adicionado ao tanque do atomizador à mesma temperatura e a pressão de entrada ajustada a 4,0 bar. As partículas fundidas que são atomizadas passaram por uma câmara cilíndrica que está à temperatura ambiente, provocando a solidificação das partículas. A lactase foi adicionada em forma de pó no glicerídeo fundido que alimenta o atomizador. As micropartículas carregadas com a enzima são formadas e recuperadas na câmara à temperatura ambiente. Após a encapsulação, observou-se que a enzima preservou seus parâmetros cinéticos.

O primeiro objetivo da técnica de microencapsulação é proteger a lactase do ambiente gástrico, então após sintetizadas as SLMs carregadas de enzima foram avaliadas frente a fluidos do trato gastrointestinal. Para isso, foram analisadas a lactase livre e dois tamanhos de SLM, com diâmetros de 50 - 150 μm e 150 - 250 μm . Como os usuários do suplemento de lactase geralmente o consomem de 5 a 30 minutos antes da refeição contendo lactose, foi simulado o ambiente gástrico pré-prandial (FaSSGF) o qual apresenta pH 1,6, ou seja, um meio mais drástico do que o ambiente pós-prandial (FeSSGF) que apresenta pH 5. Após exposição, a lactase livre teve sua atividade diminuída a 0,8% da atividade inicial, SLM de 50 - 150 μm apresentou atividade da lactase diminuída a 36,2% e a SLM de 150 - 250 μm a 62,8%. Os resultados foram exemplificados na **Figura 4**.

Figura 4 - Atividade da lactase livre e em micropartículas sólidas lipídicas (SLM) de tamanhos 50 - 150 μm e 150 - 250 μm em meio FaSSGF.



Fonte: Adaptado de Bertoni et al. (2018).

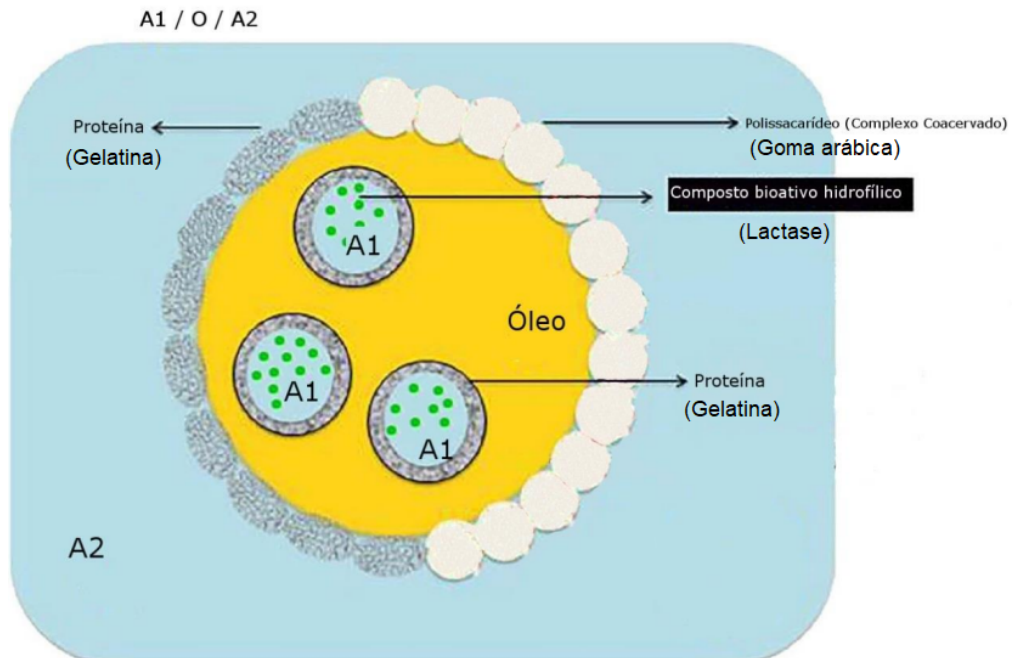
Sobre a diferença de atividade residual dos diferentes tamanhos de micropartículas, os autores sugerem que ocorreu pois a lactase localizada mais ao centro da SLM se encontra completamente protegida do meio pela camada de Dynasan 114 não sofrendo ação do pH e enzimas gástricas, enquanto a lactase mais perto da superfície da SLM é degradada. Portanto, pôde-se concluir que a micropartícula de triestearato de glicerila é efetiva na proteção da lactase durante o trajeto no trato gastrointestinal, e que o diâmetro maior de SLM (150 - 250 µm) fornece uma maior estabilidade a enzima.

O segundo objetivo da microencapsulação é liberar a enzima no seu local de ação, o intestino delgado. Para avaliar este fator, foi usada apenas a SLM de maior diâmetro 150 - 250 µm nos dois diferentes tipos de fluidos gástricos, pré e pós prandial, sendo que no meio pós-prandial houve maior *delivery* da enzima pelas micropartículas. Os autores explicam que isso ocorre pois os lipídeos parcialmente digeridos contidos neste fluido (dos alimentos ingeridos) formam com a lecitina e sais biliares estruturas coloidais que auxiliam na liberação da lactase. Dessa forma, conclui-se que os alimentos tem um efeito positivo na ação do suplemento de enzima, melhorando a dispersão e solubilização do sistema coloidal.

4.10.2 Emulsão dupla água óleo em água (A1/O/A2) com coacervação complexa

Outra técnica que pode ser utilizada para microencapsular a lactase é por emulsão dupla água óleo em água (A1/O/A2) seguida da coacervação complexa, descrita por Souza et al. (2019). Não é possível secar e transformar a emulsão água em óleo (A/O) em pó, além de ser muito instável devido ao fato de sua camada externa ser oleosa e facilmente oxidada. Como alternativa para estes problemas, foi usada a emulsão dupla (A1/O/A2) a qual por ser composta por uma emulsão A/O revestida por material hidrofílico, pode ser convertida em pó posteriormente. Apresenta também alta hidrofiliicidade e facilidade de absorção tendo alta biodisponibilidade, o que gera boas características de estabilidade, armazenamento e *delivery* (AHN et al., 2013). A coacervação trata-se da separação do sistema coloidal de líquidos em duas fases, sendo a complexa envolvendo mais de um tipo de biopolímero. O resultado da microencapsulação pode ser observado na **Figura 5**.

Figura 5 - Emulsão dupla água óleo em água (A1/O/A2) seguida da coacervação complexa.



Fonte: Adaptado de Guena (2019).

O autor realizou testes com a lactase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*. Inicialmente foi formada a emulsão primária (A1/O) a partir da dispersão da lactase em tampão de potássio, óleo de milho e um emulsificante lipofílico, o poliricineolato de

poliglicerila (PGPR) a 25°C. Então, foi adicionada solução de gelatina formando a emulsão dupla. Posteriormente, é adicionada a solução de goma arábica a 40°C e por fim solução de ácido clorídrico a fim de ajustar o pH para 4,4 sob agitação magnética constante, formando os coacervados. A temperatura é então diminuída para 10°C e as microcápsulas formadas são armazenadas a 7°C durante 24 horas promovendo a decantação, então são congeladas a -18°C e depois liofilizadas.

A adição do ácido clorídrico para ajuste de pH promove o processo de coacervação complexa entre a gelatina (proteína) e a goma arábica (polissacarídeo) pois, em meio ácido abaixo do seu ponto isoelétrico, a gelatina apresenta caráter catiônico e a goma arábica que contém ácidos urônicos apresenta caráter aniônico. Suas cargas opostas promovem interações eletrostáticas entre si, gerando um equilíbrio eletrostático e a divisão de fases entre os líquidos.

Apesar de emulsões preparadas a partir de biopolímeros apresentarem um alto grau de proteção do composto bioativo, são termodinamicamente instáveis sendo susceptíveis a floculação e coalescência, podendo levar a uma separação de fases ou à difusão da proteína da fase aquosa interna para a externa.

O efeito da temperatura e do pH sobre as microcápsulas foi avaliado e observou-se que a encapsulação por complexação foi efetiva na proteção da enzima contra os efeitos causados pelo pH e temperatura. Por fim, a liberação e atividade da lactase no ambiente gástrico e intestinal foi investigada *in vitro*, sendo que a técnica de microencapsulação foi capaz de manter mais de 80% da lactase durante as duas primeiras horas após a alimentação. Ao chegar no ambiente intestinal a liberação da lactase aumenta, atingindo aproximadamente 95%. A variação de pH e a alta concentração de sais do meio provocam a mudança de carga da gelatina e goma arábica, que se repelem e se atraem constantemente, expondo a emulsão primária às lipases pancreáticas e sais biliares presentes no fluido intestinal e levando à digestão do PRPG e liberação da lactase.

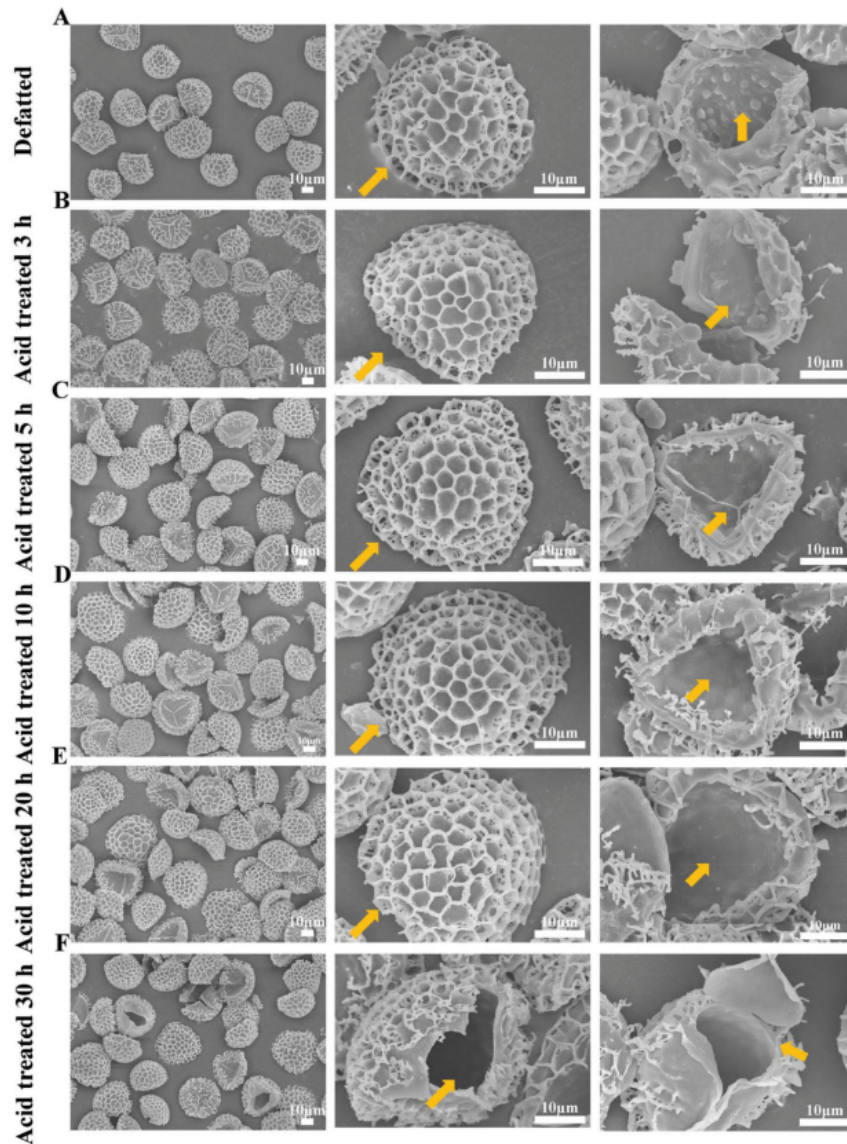
4.10.3 Cápsulas exinas esporopolenina (SEC) de *L. clavatum* aprisionadas com o carboximetilpachymaran

A terceira técnica de encapsulação da lactase que será abordada neste trabalho foi descrita por Deng et al. (2019). Essa, usa a exina, camada externa de grãos de pólen

e esporos composta por esporopolenina, um polímero que confere resistência física e química, proteção a raios UV, atividade antioxidante e boa elasticidade. Foi observado que este composto da planta *Lycopodium clavatum*, quando comparado com as demais, apresenta maior resistência a ambiente ácido e alcalino. As cápsulas exinas esporopolenina (SECs), além das propriedades já citadas, apresentam porosidade e grande cavidade interna para acomodar proteínas e por isso são investigadas para a encapsulação de fármacos e vacinas (DENG et al., 2020). Outro fator importante a se pontuar é que as SEC são abundantes na natureza e consideradas seguras pelo FDA (Food and Drug Administration), visto que no processo de extração das SECs são eliminadas todas as proteínas presentes no grão de pólen/esporo, gerando cápsulas sem risco de causarem qualquer tipo de alergia.

Para se extrair as SECs dos esporos de *L. clavatum*, esses foram lavados com éter de petróleo a fim de retirar a gordura, depois filtrados, secos a vácuo, suspensos em ácido fosfórico sob agitação, aquecidos também sob agitação, filtrados novamente e lavados com soluções aquecidas de água, acetona, ácido clorídrico e etanol. Por fim, passaram novamente por processo de secagem e foram armazenados. A fim de se aumentar a eficiência deste processo, que seria a retirada das proteínas das cavidades internas das SECs (para que dessa forma a lactase possa ser acondicionada) no menor tempo e sem as romper, foram realizados testes da extração das SECs por acidólise com ácido fosfórico em diferentes tempo, 3, 5, 10, 20 e 30 horas. Os resultados podem ser observados na **Figura 6**.

Figura 6 - SECs obtidas após retirada da gordura e suspensão em ácido fosfórico por 3, 5, 10, 20 e 30 horas.

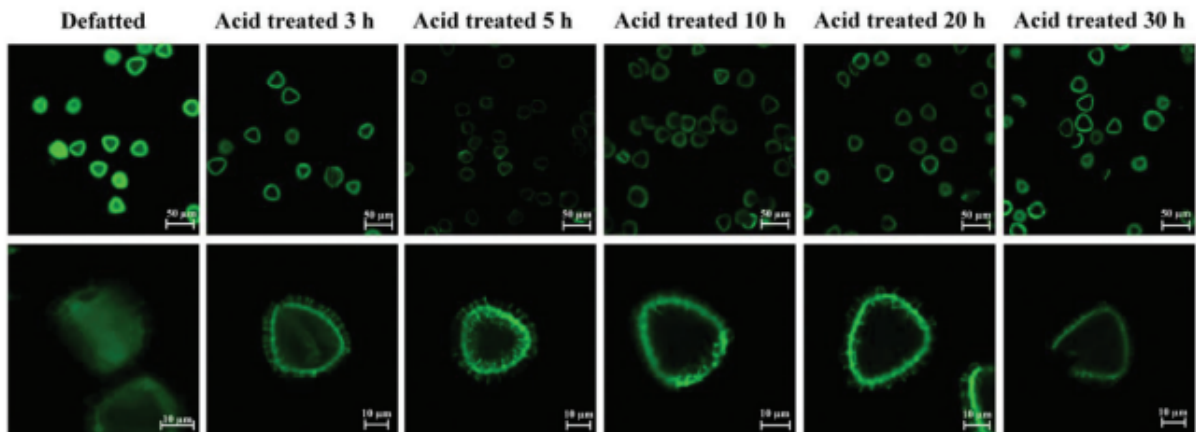


Fonte: Deng et al. (2019).

As imagens na fileira “A” correspondem às SECs após passar pelo processo de retirada de gordura apenas, possuindo morfologia uniforme e interior com organelas e biomoléculas que são apontadas. Na fileira “B” e “C” são apresentadas as SECs após 3h e 5h de suspensão em ácido, respectivamente, as organelas e biomoléculas no seu interior foram desfeitas, porém formou-se uma camada secundária enrugada de celulose. Nas fileiras “D” e “E”, são observadas as SECs após 10h e 20h, respectivamente em ácido, que apresentaram interior sem a camada secundária de celulose que apareceu em B e C. Na fileira “F” correspondendo as SECs após 30h em ácido foram rompidas e perdidas. Para se confirmar a eficácia do método foi usada a microscopia confocal de

varredura a laser (CLSM), a qual detecta a autofluorescência que os constituintes dos esporos apresentam. Os resultados são observados na **Figura 7**.

Figura 7 - SECs obtidas após retirada da gordura e suspensão em ácido fosfórico por 3, 5, 10, 20 e 30 horas observadas por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).



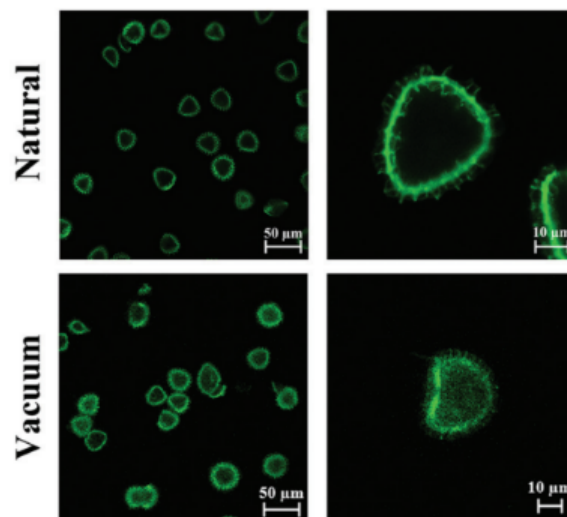
Fonte: Deng et al. (2019).

Os esporos que passaram somente pelo processo de retirada de gordura e as SECs que foram submetidas a processo de extração com ácido durante 3h e 5h tiveram fluorescência detectada no seu interior, mostrando que possuíam constituintes proteicos. Já as SECs que foram tratadas durante 10h e 20h com ácido fosfórico não apresentaram nenhuma fluorescência no seu interior, indicando a total remoção dos constituintes proteicos. Com esta técnica também foi observado que o processo de extração com ácido gerou SECs intactas e com diâmetro menor, devido à perda do material citoplasmático. Assim, se concluiu que a extração com ácido por 10h foi a mais eficaz, devido o menor tempo necessário e total retirada de proteínas do interior da cápsula.

Após ser identificada a melhor forma de extração das SECs, foi descrito o processo de incorporação da lactase nas microcápsulas, em que é usada uma técnica de carregamento a vácuo. 1 mg de lactase de *E. coli* é dissolvido em água e adicionada uma certa quantidade de SEC. Essa suspensão é submetida à agitação em vórtex durante 15 minutos, incubada em um forno de secagem a vácuo, dessa forma, a solução de lactase entra nas SECs que estão com seu interior vazio devido a diferença de pressão entre o meio e a cavidade interna da cápsula. As SECs carregadas com a enzima são centrifugadas, lavadas com água e centrifugadas novamente. A fim de se encontrar as melhores condições para realização deste processo, foram testadas

diferentes quantidades de SECs, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg e 50 mg para 1 mg de lactase, além de também ser analisado o tempo de incubação a vácuo, sendo testados os tempos 1h, 2h e 3h e verificar a taxa de retenção da enzima em cada situação. Observou-se que 50 mg de SEC e o tempo de incubação de 3h apresentaram a maior taxa de retenção da enzima no interior da cápsula, apresentando valor de 79,4%. Após o carregamento das cápsulas com a lactase, não foram identificadas alterações no diâmetro e morfologia da SEC. Através do CLSM antes do carregamento com a lactase não era observado fluorescência no interior da cápsula, e após o processo, é detectada mostrando o sucesso da técnica, como pode-se ver na **Figura 8**.

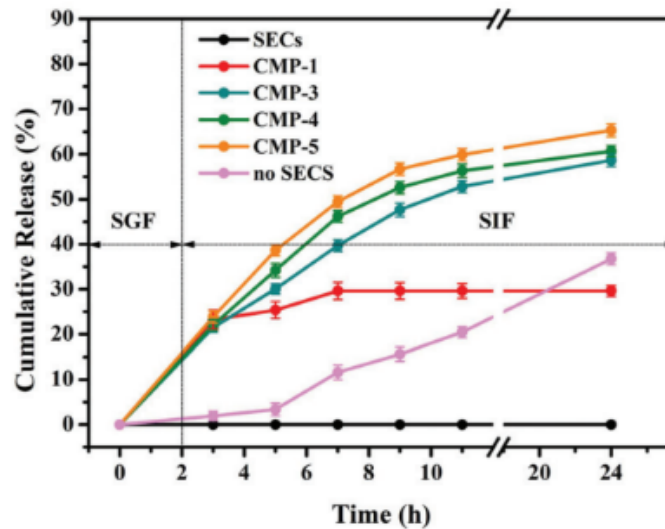
Figura 8 - SEC de 50 mg formada após ser submetida a 3h de incubação em ácido fosfórico observada no CLSM. Linha 1 – *Natural*: SEC vazia. Linha 2 – *Vacuum*: SEC carregada com lactase.



Fonte: Deng et al. (2019).

Apesar de a encapsulação da lactase ter tido resultados positivos, os testes *in vitro* em simulações de fluido gástrico demonstraram que, devido à presença de poros na exina a enzima não é mantida de forma adequada nas SECs, sendo liberada rapidamente e inativada. Tendo isso em vista, as cápsulas após serem carregadas com a lactase, foram aprisionadas com o carboximetilpachymaran, um polissacarídeo extraído de fungos basidiomicetos derivado do pachymaran, que apresenta ótima sensibilidade a alterações de pH e que poderia proteger a enzima em meio ácido. Os resultados podem ser vistos na **Figura 9**.

Figura 9 - Liberação *in vitro* da lactase em 24h em SGF (pH 2) e SIF (pH 7,4) encapsulada em SECs, aprisionada em CMP e encapsulada em SEC aprisionada com diferentes ciclos de CMP

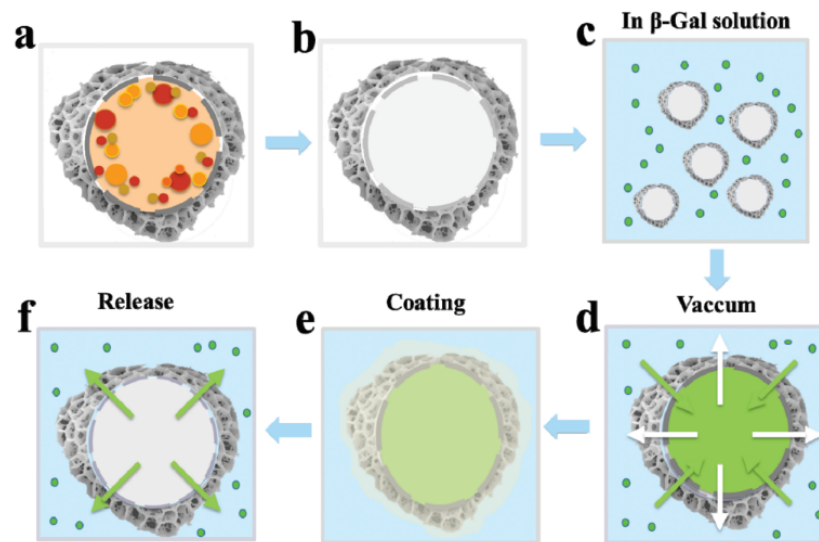


Fonte: Deng et al. (2019).

A linha rosa (“no SECS”) foi usada como controle, sendo a lactase aprisionada pela CMP sem ter sido encapsulada nas SECs, apresentou uma taxa de liberação de aproximadamente 36% após 24h no meio gastrointestinal *in vitro*, mostrando que a encapsulação em SEC melhora a sua liberação. A enzima encapsulada em SEC, correspondendo a linha preta, não apresentou atividade devido à rápida liberação em fluido gástrico (SGF), provocada pela porosidade da cápsula, assim, não tendo mais atividade no fluido intestinal (SIF). As SECs com lactase foram tratadas com CMP em 1, 3, 4 e 5 ciclos, sendo observado que após 5 ciclos a enzima apresentou melhor perfil de liberação. Dessa forma, pode-se concluir que a lactase encapsulada em SEC aprisionada por CMP pode ser protegida das ações do meio gastrointestinal e liberada adequadamente no intestino.

Na **Figura 10** é descrita de forma simplificada a técnica. Em “a” é observado o esporo de *L. clavatum*, em “b” apenas a sua cápsula (SEC), em “c” as SECs em solução de lactase, em “d” o vácuo provocando a encapsulação da lactase na SEC, em “e” o aprisionamento da SEC com lactase por CMP e em “f” a lactase sendo liberada *in vitro* no meio gastrointestinal.

Figura 10 - Técnica de microencapsulação da lactase em SEC e aprisionamento em CMP.



Fonte: Deng et al. (2019).

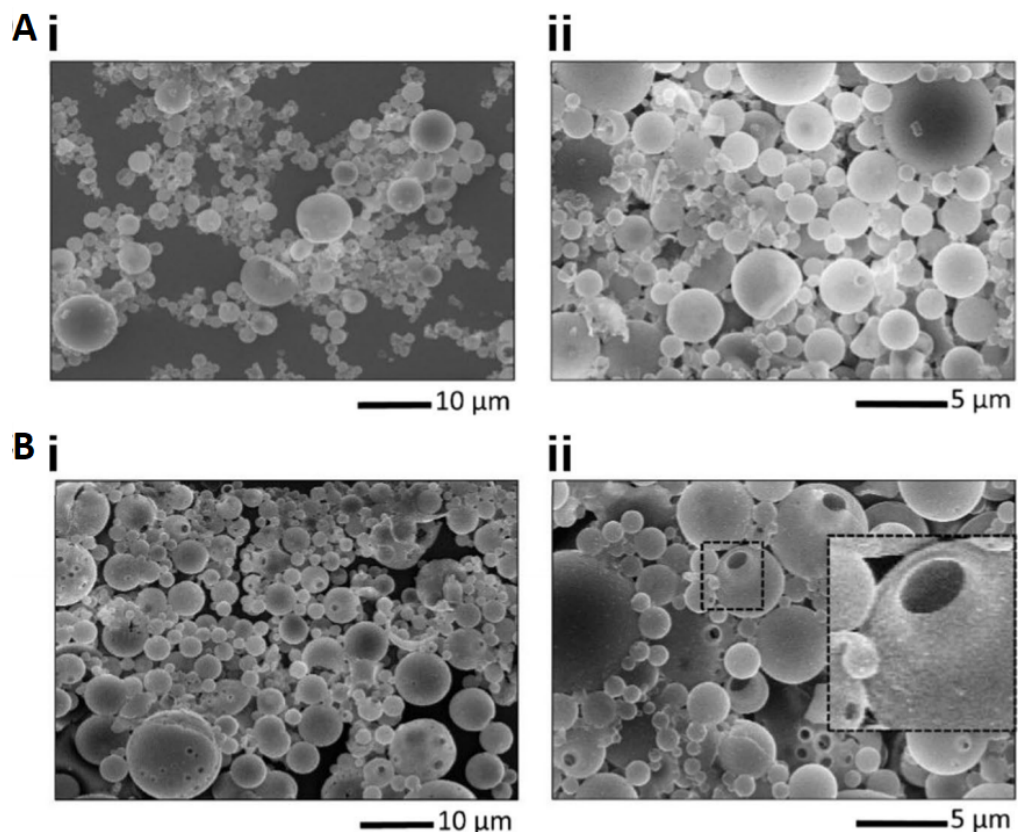
4.10.4 Microcápsulas ocas com macroporos responsivos a pH

A quarta técnica que será abordada é a da formação de micropartículas ocas com macroporos responsivos a pH, através do uso de microemulsão descrita por Kumar et al. (2017). Foi usado o copolímero aniônico Eudragit S100 composto por ácido metacrílico e metacrilato de metila para compor as micropartículas, um polímero que responde ao pH do meio. Dessa forma, em pH estomacal o macroporo da microcápsula formada por este material se mantém fechado e em pH intestinal ele se abre, liberando a lactase. Para produzir as microcápsulas, a solução de copolímero foi dissolvida em uma mistura de diclorometano, etanol e isopropanol formando a fase oleosa, a qual foi adicionada à fase aquosa composta por álcool vinílico e tensoativo Tween 20, gerando uma emulsão óleo em água (O/A) sob sonicação. Então, a emulsão formada foi agitada em temperatura ambiente, passou por outro ciclo de sonicação e foi centrifugada e lavada. O solvente ainda restante foi evaporado gerando uma suspensão que foi filtrada a vácuo para se coletar as microcápsulas formadas. Essas, foram concentradas e liofilizadas e através do microscópio eletrônico de varredura (SEM) foi confirmada a formação das micropartículas esféricas ocas com macroporos. A formação destes macroporos é importante para a encapsulação da lactase. Entretanto, o seu fechamento também é essencial para que a enzima seja preservada no meio ácido gástrico até chegar ao local

de ação, o intestino. Para isso, foi usada a técnica de liofilização que causou o fechamento dos macroporos e como não é necessário que as micropartículas fiquem expostas a solventes orgânicos ou altas temperaturas, a lactase encapsulada não sofre impacto. Para carregar as microcápsulas com a lactase, adicionou-se à elas uma solução de lactase com trehalose e carboximetil celulose. O sistema foi colocado em forno a vácuo a fim de que todo o ar possível fosse removido das microcápsulas dando lugar à lactase, e depois as microcápsulas foram ressuspensas em água e colocadas em nitrogênio líquido.

As microcápsulas carregadas com lactase foram colocadas em tampão pH 2 a 37°C durante duas horas simulando o meio gástrico e posteriormente em tampão pH 7,1 a 37°C durante quatro horas simulando o meio intestinal. Os resultados podem ser observados na **Figura 11**.

Figura 11 - Microcápsulas em pH 2 (A) e em pH 7,1 (B).



Fonte: Kumar et al. (2017).

Em Ai e Aii estão representadas as micropartículas em pH 2 e em Bi e Bii em pH 7,1. Ou seja, no meio gástrico os macroporos se mantêm fechados porém no meio

intestinal se abrem. Outro fato observado foi que em pH 2 as micropartículas não tiveram mudança em sua morfologia, enquanto em pH 7,1 dilataram um pouco para que os macroporos se abrissem. Posteriormente, amostras de micropartículas carregadas com nanopartículas de poliestireno fluorescente (FNP) e outras com sulforodamina b (SRB), um corante fluorescente tiveram suas atividades monitoradas pela avaliação da fluorescência emitida nos meios com diferentes valores de pH. Em pH 2 em ambas as amostras não foi observado aumento no nível de fluorescência durante as 2 horas, pois os macroporos se mantiveram fechados, como era o esperado. Já em pH 7,1 nos primeiros 20 minutos de exposição foi detectada a liberação parcial de FNP e de aproximadamente 65% após 1 hora. Nas amostras com SRB nos primeiros 20 minutos obteve-se uma liberação de 20% do SRB em pH 2 e após 10 minutos de exposição em pH 7,1 foi detectada uma liberação de 90%. A liberação mais rápida da amostra com SRB é devido ao seu menor tamanho.

Após estes testes foram comparadas as atividades de suplementos de lactase comercializados nos mercados com as microcápsulas carregadas com lactase, nas mesmas condições feitas com as microcápsulas de FNP e SRB, e a liberação de ambas foi avaliada através do uso de orto-nitrofenil- β -galactosídeo (ONPG). No caso do suplemento de lactase, em pH 2 não foi observada quase nenhuma atividade da enzima, e em pH 7,1 identificou-se atividade de aproximadamente 2,9%, indicando que após ser quase totalmente inativada no meio gástrico, quase não restou lactase para agir no local de ação. Em relação à lactase encapsulada, em pH 2 também não foi detectada atividade da enzima, entretanto em pH 7,1 observou-se aproximadamente 50% de atividade, indicando a sua preservação no meio gástrico devido aos macroporos se manterem fechados no pH baixo e liberação no meio intestinal provocada pela abertura dos macroporos em pH 7,1. Dessa forma, pode-se concluir que o uso de microcápsulas com macroporos na encapsulação da lactase é eficiente no *delivery* da enzima ao seu local de ação e que moléculas menores, como foi observado com o SRB, são liberadas mais rapidamente que moléculas maiores como o FNP, indicando a importância do tamanho do composto encapsulado na sua liberação.

4.10.5 Comparação das técnicas de microencapsulação da lactase estudadas

As quatro técnicas descritas na literatura para microencapsulação da lactase foram comparadas quanto à eficácia de encapsulação, manutenção da atividade e perfil de liberação *in vitro*, como pode-se observar na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Comparação entre as técnicas de microencapsulação levando em consideração os parâmetros de eficácia de encapsulação, ativ. da lactase que se manteve após exposição ao meio gástrico *in vitro* e liberação da lactase no meio intestinal *in vitro*.

	SLM por processo de spray de congelamento	A1/O/A2 com coacervação complexa	SEC de L. clavatum aprisionadas com CMP	Microcápsulas ocas com macroporos responsivos a pH
Eficácia de encapsulação (%)	>95	>99,19	79,4	Não especificado
Ativ. da lactase que se manteve após exposição ao meio gástrico <i>in vitro</i> (%)	62,8 (após 30 min, em meio FaSSGF)	~80% (após 2h)	Não especificado	Não especificado
Liberação da lactase no meio intestinal <i>in vitro</i> (%)	81 (em meio FaSSIF após 1h30) 100 (em meio FeSSIF após 1h30)	~90% (após 4h)	65,33 (após 24h)	50 (após 6h)

Fonte: Adaptado de Bertoni et al. (2018), Souza et al. (2019), Deng et al. (2019) e Kumar et al. (2017).

Portanto, tendo em vista a eficácia de encapsulação das quatro técnicas mencionadas, a atividade da enzima que se manteve após exposição a meio ácido similar ao ambiente gástrico e a taxa de liberação no meio intestinal *in vitro*, a que

apresentou os melhores resultados foi a de emulsão dupla água -óleo-água (A1/O/A2) com coacervação complexa. Apesar de esta ter se mostrado a mais eficaz, o uso de SEC de *L. clavatum* recoberto com o CMP para encapsulação da lactase foi mais atrativo do ponto de vista sustentável, por utilizar SEC retirada de esporos e grãos de pólen dessa planta, que são encontrados em abundância na natureza.

5 CONCLUSÃO

Apesar de a intolerância à lactose ser uma pauta cada vez mais presente na sociedade, aqueles que são diagnosticados com a condição não possuem muita informação, tanto do profissional de saúde quanto de outros meios como a internet e literatura. A extensa revisão bibliográfica sobre o assunto possibilitou elucidar diversos parâmetros importantes ao conhecimento do paciente como o fato de que diferentes alimentos lácteos podem apresentar diferentes concentrações de lactose, que existe uma quantidade máxima comum que a maioria dos intolerantes conseguem ingerir do carboidrato por vez, e sobre os diferentes tipos de diagnóstico e tratamentos possíveis. Além disso, é importante considerar que para os alimentos tidos como “zero lactose”, não é possível garantir que toda a lactose presente foi hidrolisada pois a enzima pode não ser suficiente ou sofrer degradação, o que pode gerar sintomas de desconforto no paciente da mesma forma, assim como pode ser pontuado para a lactase como suplemento alimentar também. Ambos os tratamentos são viáveis, porém o mercado de produtos “zero lactose” ainda é muito restrito e no caso da lactase para uso terapêutico devido aos desafios que o meio gástrico impõe à enzima, pode haver considerável redução da ação terapêutica. As técnicas de encapsulação apresentam-se como promissora estratégia farmacotécnica para este problema, entretanto, nenhuma delas ainda evoluiu para testes *in vivo*, sendo que o custo de desenvolvimento pode ser uma das barreiras para essa evolução. Apesar disso, dentre as estratégias apresentadas neste trabalho, a de dupla emulsão A1/O/A2 seguida de coacervação complexa foi a que apresentou melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- AHN, S.; LEE, Y.; KWAK, H. Optimization of water-in-oil-in-water microencapsulated β -galactosidase by response surface methodology, **Journal of Microencapsulation**, 30:5, 460-469, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.752534>. Acesso em: 14 set. 2022.
- BERTONI, S.; ALBERTINI, B.; DOLCI, L. S.; PASSERINI, N. Spray congealed lipid microparticles for the local *delivery* of β -galactosidase to the small intestine. **Eur J Pharm Biopharm**, 2018 Nov;132:1-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30176285/>. Acesso em: 04 fev. 2022.
- BROWN-ESTERS, O.; NAMARA, P. Mc.; SAVAIANO, D. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **International Dairy Journal**, v. 22, Issue 2, 2012, p. 98-10. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095869461100224X>. Acesso em: 26 jan. 2022.
- DENG, Y.; MISSELWITZ, B.; DAI, N.; FOX, M. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. **Nutrients**, 2015; 7(9):8020-8035. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7095380>. Acesso em: 31 jul. 2022.
- DENG, Z. *et al.* Carboxymethylpachymaran entrapped plant-based hollow microcapsules for *delivery* and stabilization of β -galactosidase. **Food Funct.**, 2019, DOI: 10.1039/c9fo00649d. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9FO00649D>. Acesso em: 12 set. 2022.
- DENG, Z. *et al.* Carboxymethylpachymaran-zein coated plant microcapsules-based β -galactosidase encapsulation system for long-term effective *delivery*, **Food Research International**, v. 128, 2020, 108867, ISSN 0963-9969. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108867>. Acesso em: 14 set 2022.
- DI COSTANZO, M.; BERNI, C. R. Lactose Intolerance: Common Misunderstandings. **Ann Nutr Metab**, 2018;73 Suppl 4:30-37. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30783042. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000493669>. Acesso em: 13 ago. 2022.
- DOMINICI, S. *et al.* Lactose: Characteristics, Food and Drug-Related Applications, and Its Possible Substitutions in Meeting the Needs of People with Lactose Intolerance. **Foods** 2022, 11, 1486. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11101486>. Acesso em: 30 ago. 2022.
- FASSIO, F.; FACIONI, M. S.; GUAGNINI, F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives. **Nutrients**, 2018; 10(11):1599. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10111599>. Acesso em: 10 ago. 2022.
- GUENA, A. C. A. Encapsulação da vitamina c por coacervação complexa empregando goma xantana e proteína como material de parede, 2019. 85 p. Dissertação (Programa de pós graduação em ciência e tecnologia de alimentos) - **Instituto de tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, 2019. Disponível em:

https://cursos.ufrrj.br/posgraduacao/ppgcta/files/2021/02/disserta_aline.pdf. Acesso em 16 set. 2022.

HOMAYUN, B.; CHOI, H. J. Halloysite nanotube-embedded microparticles for intestine-targeted co-delivery of biopharmaceuticals. **Int J Pharm**, 2020 Apr 15;579:119152. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32081802/>. Acesso em: 02 fev. 2022.

JANSSON-KNODELL, C. L.; KRAJICEK, E. J.; SAVAIANO, D. A.; SHIN, A. S. Lactose Intolerance: A Concise Review to Skim the Surface. **Mayo Clin Proc**, 2020 Jul;95(7):1499-1505. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32622451/>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KUMAR, A.; MONTEMAGNO, C.; CHOI, H. J. Smart Microparticles with a pH-responsive Macropore for Targeted Oral Drug Delivery. **Sci Rep** 7, 3059 (2017). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03259-x>. Acesso em: 18 set. 2022.

LEMBER M. Hypolactasia: a common enzyme deficiency leading to lactose malabsorption and intolerance. **Pol Arch Med Wewn**, 2012;122 Suppl 1:60-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23222197>. Acesso em: 26 jan. 2022.

LEVITT, M.; WILT, T.; SHAUKAT, A. Clinical implications of lactose malabsorption versus lactose intolerance. **J Clin Gastroenterol**, 2013 Jul;47(6):471-80. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23632346/>. Acesso em: 31 jan. 2022.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 253, 2018, p. 1-22, ISSN 0001-8686. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.02.002>. Acesso em: 28 ago. 2022.

MISSELWITZ, B.; POHL, D.; FRUHAUF, H.; FRIED, M.; VAVRICKA, S. R.; FOX, M. (2013), Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. **UEG Journal**, 1: 151-159. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2050640613484463>. Acesso em: 03 ago. 2022.

MISSELWITZ, B.; BUTTER, M.; VERBEKE, K.; FOX, M. R. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management, **Gut**, 2019;68:2080-2091. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/68/11/2080>. Acesso em: 17 ago. 2022.

Online Database of Chemicals from Around the World. **Chem Blink**, 2022. Disponível em: <https://www.chemblink.com/products/555-45-3.htm>. Acesso em: 25 set. 2022.

PORZI, M.; BURTON-PIMENTEL, K. J.; WALTHER, B.; VERGÈRES, G. Development of Personalized Nutrition: Applications in Lactose Intolerance Diagnosis and Management. **Nutrients** 2021, 13, 1503. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu13051503>. Acesso em: 18 ago. 2022.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U. The Interrelationships between Lactose Intolerance and the Modern Dairy Industry: Global Perspectives in Evolutional and

Historical Backgrounds. **Nutrients**, 2015; 7(9):7312-7331. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7095340>. Acesso em: 05 ago. 2022.

SOUZA, C. J.; COMUNIAN, T. A.; KASEMODEL, M. G.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of lactase by W/O/W emulsion followed by complex coacervation: Effects of enzyme source, addition of potassium and core to shell ratio on encapsulation efficiency, stability and kinetics of release. **Food Research International**, v. 121, 2019, Pages 754-764. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918310007>. Acesso em: 01 fev. 2022.

SZILAGYI, A. Adaptation to Lactose in Lactase Non Persistent People: Effects on Intolerance and the Relationship between Dairy Food Consumption and Evaluation of Diseases. **Nutrients**, 2015; 7(8):6751-6779. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7085309>. Acesso em: 19 ago. 2022.

SZILAGYI, A.; ISHAYEK, N. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. **Nutrients**, 2018; 10(12):1994. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10121994>. Acesso em: 06 ago. 2022.

TOCA, M. C.; FERNÁNDEZ, A.; ORSI, M.; TABACCO, O.; VINDEROLA, G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. **Arch Argent Pediatr** 2022;120(1):59-66. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5546/aap.2022.eng.59>. Acesso em: 20 set. 2022.

UGIDOS-RODRÍGUEZ, S.; MATALLANA-GONZÁLEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MATA, M. Lactose malabsorption and intolerance: a review. **Food Funct.**, 2018, DOI: 10.1039/C8FO00555A. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C8FO00555A>. Acesso em: 10 ago. 2022.

VANDENPLAS, Y. Lactose intolerance. **Asia Pac J Clin Nutr**, 2015;24 Suppl 1:S9-13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26715083/>. Acesso em: 31 jan. 2022.

DocuSigned by:

Mariana Takakura

11F80A5D8CBD4A3...

Data e assinatura do aluno(a)

Yaguê Rangil

12/10/2022

Data e assinatura do orientador(a)