



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0713778-8 A2**

(22) Data de Depósito: 29/06/2007
(43) Data da Publicação: 30/10/2012
(RPI 2182)



(51) *Int.Cl.:*
A23L 1/29

(54) **Título:** FÓRMULAS INFANTIS ENRIQUECIDAS E USOS

(30) **Prioridade Unionista:** 30/06/2006 US 11/479.504

(73) **Titular(es):** Abbott Laboratories

(72) **Inventor(es):** Alejandro Barranco, Eduardo Valverde, Enrique Vazquez, Margaret Dohnalek, Maria Ramirez, Pedro Prieto, Ricardo Rueda-Cabrera

(74) **Procurador(es):** Ricardo Pinho

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007072528 de 29/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/005862 de 10/01/2008

(57) **Resumo:** FÓRMULAS INFANTIS ENRIQUECIDAS E USOS. Divulgadas são fórmulas infantis compreendendo, com base na matéria natural, (A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos, (B) pelo menos 150 mg/L de fosfolípidos, (C) lactoferrina, e (D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico, com pelo menos cerca de 2,5% em peso do ácido siálico como ácido siálico ligado ao lípido. De cerca de 50% a 100% em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolípidos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, com o concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural. Também divulgados são métodos de usar a fórmula para reduzir o risco de crianças com diarreia, e produzir um perfil de microflora intestinal similar àquele de lactentes.

“FÓRMULAS INFANTIS ENRIQUECIDAS E USOS”

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção refere-se a fórmulas infantis enriquecidas com, e compreendendo combinações selecionadas de fosfolipídeos, lactoferrina, gangliosídeos, e ácido siálico, cada um dos quais é fornecido na totalidade ou em parte por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, para tornarem-se mais parecidas com a composição natural e o desempenho do leite humano.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 Fórmulas infantis comerciais são comumente usadas nos dias atuais para fornecer fonte suplementar ou exclusiva de nutrição nos primeiros anos de vida. Estas fórmulas compreendem uma faixa de nutrientes adequada para satisfazer as necessidades nutricionais do crescimento infantil, e tipicamente incluem lipídeos, carboidratos, proteína, vitaminas, minerais, e outros nutrientes auxiliares para o crescimento e desenvolvimento infantil ideais.

15 Fórmulas infantis comerciais são designadas para assimilarem-se tanto quanto possível à composição e função do leite humano. Nos Estados Unidos, a Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA) define fórmula infantil como “um alimento que objetiva ser ou é representado para uso dietético especial somente como um alimento para crianças pela razão de sua semelhança ao leite humano ou sua adequação como um substituto completo ou parcial para o leite humano”. (FFDCA 201(z)).

20 Fórmulas infantis comerciais, sob as normas da FFDCA, são definidas por nutrientes básicos que devem ser formulados em fórmulas infantis não isentas nos Estados Unidos. Estes nutrientes incluem, por 100 kcal de fórmula: proteína (1,8 a 4,5 g pelo menos nutricionalmente equivalente à caseína), gordura (3,3 a 6,0 g), ácido linoléico (pelo menos 300 mg), vitamina A como equivalentes de retinol (75 a 225 mcg), vitamina D (40 a 100 IU), vitamina K (pelo menos 4,0 mcg), vitamina E (pelo menos 0,7 IU/g de ácido linoléico), ácido ascórbico (pelo menos 8,0 mg), tiamina (pelo menos 40 mcg), riboflavina (pelo menos 60 mcg), piridoxina (pelo menos 35,0 mcg com 15 mcg/g de proteína na fórmula), vitamina B12 (pelo menos 0,15 mcg), niacina (pelo menos 250 mcg), ácido fólico (pelo menos 4,0 mcg), ácido pantotênico (pelo menos 300,0 mcg), biotina (pelo menos 1,5 mcg), colina (pelo menos 7,0 mg),
25 inositol (pelo menos 4,0 mg), cálcio (pelo menos 50,0 mg), fósforo (pelo menos 25,0 mg com razão cálcio para fósforo de 1,1 para 2,0), magnésio (pelo menos 6,0 mg), ferro (pelo menos 0,15 mg), iodo (pelo menos 5,0 mcg), zinco (pelo menos 0,5 mg), cobre (pelo menos 60,0 mcg), manganês (pelo menos 5,0 mcg), sódio (20,0 a 60,0 mg), potássio (80,0 a 200,0 mg), e cloreto (55,0 a 150,0 mg).

35 Não obstante a controles regulatórios mais rígidos, fórmulas infantis comerciais ainda não são idênticas ao leite humano, tanto na composição quanto na função. Aproximadamente 200 compostos diferentes foram identificados no leite humano, mais que 100 dos

quais ainda não são tipicamente encontrados em quantidades totais ou significantes, em fórmulas comerciais. Tais compostos incluem uma série de imunoglobulinas, enzimas, hormônios, certas proteínas, lactoferrina, gangliosídeos, fosfolipídeos (esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol), e assim por diante. Muitos destes materiais são específicos do leite humano ou estão de outro modo presentes apenas em concentrações menores no leite de vaca ou outras fontes de proteína usadas na preparação de uma fórmula infantil comercial.

Portanto, há uma necessidade contínua quanto a novas fórmulas infantis que contenham ainda mais dos ingredientes naturais encontrados no leite humano, para deste modo fornecer potencialmente mais benefícios nutricionais correntemente desfrutados pelo lactente.

A presente invenção é dirigida a fórmulas infantis com concentrações e tipos selecionados desses compostos inerentemente encontrados no leite humano, incluindo fosfolipídeos, gangliosídeos, lactoferrina, e ácido siálico. Em virtude destes ingredientes selecionados e suas concentrações correspondentes nas fórmulas infantis, os perfis do nutriente das fórmulas infantis descritas neste relatório são mais parecidos com o leite humano do que são as fórmulas infantis convencionais.

Descobriu-se que, além de se assimilarem com alguns dos ingredientes encontrados no leite humano, as fórmulas infantis da presente invenção também reduzem o risco de diarreia como demonstrado em um estudo animal descrito neste relatório. O estudo mostra uma duração reduzida de diarreia em um modelo animal comparando-se a fórmula infantil da presente invenção a uma fórmula infantil comercial contendo pouca ou nenhuma lactoferrina, fosfolipídeos, e gangliosídeos.

Descobriu-se também que as fórmulas infantis da presente invenção promovem o desenvolvimento de um perfil de microflora intestinal similar àquele encontrado em crianças alimentadas com a fórmula, como demonstrado usando em uma dinâmica de validação, um sistema de modelo *in vitro* do intestino grosso desenvolvido pela TNO Quality of Life (Modelo Invitro da TNO ou TIM-2). É bem conhecido que lactentes e crianças alimentadas com a fórmula apresentam perfis de microflora intestinal significativamente diferentes. Assim, acredita-se que o perfil do lactente seja mais saudável.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Uma primeira modalidade da presente invenção é dirigida a fórmulas infantis compreendendo, com base na matéria natural (A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos, (B) pelo menos cerca de 150 mg/L de fosfolipídeos, (C) lactoferrina, e (D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico, com pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico como ácido siálico ligado ao lipídeo. A partir de cerca de 50 a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado

de proteína do soro de leite enriquecido, com o concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

Uma segunda modalidade da presente invenção é dirigida a um método de reduzir o risco de diarreia em uma criança, incluindo um método de reduzir a duração de diarreia em crianças sofrendo com a mesma. O método compreende a administração a uma criança em necessidade do mesmo, uma fórmula compreendendo, com base na matéria natural (A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos, (B) pelo menos cerca de 150 mg/L de fosfolipídeos, (C) lactoferrina, e (D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico, com pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico como ligado ao lipídeo. A partir de cerca de 50 a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, com o concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

Uma terceira modalidade da presente invenção é dirigida a um método de promover microflora intestinal similar àquela encontrada em lactentes. O método compreende a administração a um criança em necessidade do mesmo, uma fórmula compreendendo, com base na matéria natural (A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos, (B) pelo menos cerca de 150 mg/L de fosfolipídeos, e (C) lactoferrina, e (D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico, em que pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico está ligado ao lipídeo. A partir de cerca de 50 a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, com o concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

Descobriu-se que, além de se assimilarem com alguns dos ingredientes encontrados no leite humano, as fórmulas infantis da presente invenção também reduzem o risco de diarreia como demonstrado em um estudo animal descrito em seguida. O estudo mostra uma duração reduzida de diarreia em um modelo animal comparando a fórmula infantil da presente invenção a uma fórmula infantil comercial.

Descobriu-se também que as fórmulas infantis da presente invenção promovem o desenvolvimento de um perfil de microflora intestinal similar àquela encontrado em crianças alimentadas com a fórmula, como demonstrado usando um modelo do Sistema TIM-2. É bem conhecido que lactentes e crianças alimentadas com a fórmula têm perfis de microflora intestinal significativamente diferentes. Assim, acredita-se que o perfil do lactente seja mais saudável.

BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

A Fig. 1 é um gráfico de setores resumindo o perfil de ácido graxo de cadeia curta para uma fórmula infantil convencional com 0,5 g/L de FOS de cadeia curta após 72 h de fermentação da flora do lactente (Experimento I).

A Fig. 2 é um gráfico de setores resumindo o perfil de ácido graxo de cadeia curta para uma fórmula infantil convencional com 2,0 g/L de FOS de cadeia curta após 72 h de fermentação da flora do lactente (Experimento 1).

5 A Fig. 3 é um gráfico de setores resumindo o perfil de ácido graxo de cadeia curta para uma fórmula infantil convencional com 2,0 g/L de FOS de cadeia curta e longa após 72 h de fermentação da flora do lactente (Experimento 1).

A Fig. 4 é um gráfico de setores resumindo o perfil de ácido graxo de cadeia curta para uma modalidade da fórmula infantil da presente invenção compreendendo 0,8 g/L de FOS de cadeia curta após 72 h de fermentação da flora do lactente (Experimento 1).

10 A Fig. 5 é um gráfico de setores resumindo o perfil de ácido graxo de cadeia curta típico para lactentes, resultante da fermentação pela microflora no intestino (Experimento 1).

A Fig. 6 é um gráfico de setores resumindo o perfil de ácido graxo de cadeia curta típico para uma fórmula infantil convencional após 72 h de fermentação da flora do lactente (Experimento 1).

15 A Fig. 7 é um gráfico de barras mostrando a duração (dias) da diarreia em leitões alimentados tanto com a Dieta A (fórmula infantil comercial com concentrado de proteína do soro de leite convencional) ou com as Dietas B e C (fórmula infantil com concentrado de proteína do soro de leite enriquecido em um nível de 7,1 g/L da fórmula com base na matéria natural). Dados são a Média \pm SEM. (*) Significativamente diferente do grupo A ($p < 0,05$) (Experimento 2).

20 A Fig. 8 é um gráfico de barras mostrando a duração (dias) da diarreia em leitões alimentados tanto com as Dietas A e C (fórmulas infantis comerciais com concentrado de proteína do soro de leite convencional) ou com a Dieta B (fórmula infantil com concentrado de proteína do soro de leite enriquecido em um nível de 6,4 g/L da fórmula com base na matéria natural) (Experimento 3).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

30 As composições da presente invenção compreendem gangliosídeos, fosfolípidos, lactoferrina, e ácido siálico, cada um dos quais é fornecido na totalidade ou em parte por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, cada um dos quais é descrito em detalhe a seguir.

O termo "criança" conforme empregado neste relatório refere-se a indivíduos de não mais do que cerca de um ano de idade, e inclui crianças de 0 a cerca de 4 meses de idade, crianças de cerca de 4 a cerca de 8 meses de idade, crianças de cerca de 8 a cerca de 12 meses de idade, crianças com baixo peso ao nascer, com menos do que 2.500 gramas no nascimento, e crianças nascidas prematuras com menos do que cerca de 37 semanas de idade gestacional, tipicamente de cerca de 26 semanas a cerca de 34 semanas de idade gestacional.

O termo "fórmula infantil" conforme empregado neste relatório, a menos que de outro modo especificado, refere-se a formulações compreendendo gordura, proteína, carboidratos, vitaminas, e minerais, e que são adequadas para administração oral a crianças como fontes de nutrição suplementares, primárias, ou exclusivas, os exemplos não limitantes dos quais incluem pós reconstituíveis, concentrados diluíveis, e líquidos prontos para o consumo.

O termo "matéria natural" conforme empregado neste relatório, a menos que de outro modo especificado, refere-se a fórmulas líquidas adequadas para administração oral direta a uma criança, em que as fórmulas são líquidos prontos para o consumo, pós reconstituídos, ou concentrados diluídos.

Todas as faixas de ingrediente conforme empregadas neste relatório, a menos que de outro modo especificado, usadas para caracterizar as fórmulas infantis da presente invenção estão em peso da fórmula infantil com base na matéria natural.

Todas as porcentagens, partes e razões conforme empregadas neste relatório estão em peso da composição total, a menos que de outro modo especificado. Todos os tais pesos relacionados aos ingredientes listados estão fundamentados no nível ativo e, portanto, não incluem solventes ou subprodutos que podem ser incluídos em materiais comercialmente disponíveis, a menos que de outro modo especificado.

As fórmulas infantis da presente invenção também podem ser substancialmente livres de qualquer ingrediente ou característica essencial opcional ou selecionado descrito neste relatório, contanto que a fórmula remanescente ainda contenha todos os ingredientes ou características necessários como descrito neste relatório. Neste contexto, e a menos que de outro modo especificado, o termo "substancialmente livre" significa que a composição selecionada contém menos do que uma quantidade funcional do ingrediente opcional, tipicamente menos do que 0,1 % em peso, e também incluindo zero por cento em peso de tal ingrediente essencial opcional ou selecionado.

Todas as referências para características ou limitações no singular da presente invenção deverão incluir a característica ou limitação no plural correspondente, e vice-versa, a menos que de outro modo especificado ou claramente implícito ao contrário, pelo contexto no qual a referência é feita.

Todas as combinações de etapas de método ou processo conforme empregadas neste relatório podem ser realizadas em qualquer ordem, a menos que de outro modo especificado ou claramente implícito ao contrário, pelo contexto no qual a combinação mencionada é feita.

Os métodos e composições da presente invenção, incluindo componentes dos mesmos, podem compreender, consistir de, ou consistir essencialmente dos elementos e limitações essenciais da invenção descritos neste relatório, assim como quaisquer ingredi-

entes, componentes, ou limitações adicionais ou opcionais descritos neste relatório ou de outro modo úteis em aplicações da fórmula nutricional.

Concentrado de Proteína do Soro de Leite Enriquecido

5 As fórmulas infantis da presente invenção compreendem níveis selecionados de concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos que fornecem, na totalidade ou em parte, o gangliosídeo, lactoferrina, fosfolípídeo, e componentes de ácido siálico na fórmula. O concentrado de proteína do soro de leite enriquecido pode fornecer de cerca de 10 % a 100 %, incluindo de cerca de 50 % a cerca de 100 %, também incluindo de cerca de 50 % a cerca de 90 %, e também incluindo de cerca de 60 % a cerca de 85 %, em peso, de cada 10 um dos níveis de fosfolípídeo, gangliosídeo, lactoferrina, e ácido siálico totais na fórmula infantil. Embora os compostos mencionados por último possam ser adicionados individual e separadamente, como compostos isolados do leite de mamífero ou outras fontes adequadas, é preferido que a maioria, se não todos os tais compostos sejam fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido.

15 O nível de concentrado de proteína do soro de leite enriquecido na fórmula infantil deve exceder cerca de 6,5 g/L da fórmula, com base na matéria natural. Tais concentrações também podem variar de cerca de 6,5 a cerca de 10,9 g/L, incluindo de cerca de 6,6 a cerca de 8,5 g/L, e também incluindo de cerca de 6,7 a cerca de 7,3 g/L da fórmula, com base na matéria natural.

20 Os concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos para o uso nas fórmulas infantis da presente invenção são aqueles tendo uma alta concentração de materiais da membrana do glóbulo de gordura do leite. Materiais da membrana do glóbulo de gordura do leite são os materiais da membrana e associados com a membrana que circundam os glóbulos de gordura do leite ricos em triacilglicerol no leite bovino ou de outro mamífero. Muitos 25 dos compostos identificados nos materiais da membrana do glóbulo de gordura do leite estão presentes em concentrações muito mais altas no leite humano do que em fórmulas infantis comerciais. Adicionando-se concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos em tais materiais a uma fórmula infantil, a fórmula resultante é mais parecida em composição com o leite humano, especialmente com respeito a concentrações de leite humano de 30 gangliosídeos, fosfolípídeos, lactoferrina, e ácido siálico.

O termo "concentrado de proteína do soro de leite enriquecido" conforme empregado neste relatório, a menos que de outro modo especificado, refere-se geralmente a qualquer concentrado de proteína do soro de leite tendo pelo menos cerca de 3 %, mais tipicamente pelo menos cerca de 5 %, em peso de fosfolípídeos, dos quais pelo menos cerca de 35 20 % em peso de esfingomielina; pelo menos cerca de 0,5 %, tipicamente pelo menos cerca de 1,2 % em peso de um ácido siálico; e pelo menos cerca de 0,05 %, tipicamente pelo menos cerca de 0,1 %, em peso de gangliosídeos. Pelo menos cerca de 25 % em peso do áci-

do siálico do concentrado é ligado ao lipídeo.

Fontes adequadas de concentrado de proteína do soro de leite enriquecido para o uso neste relatório incluem qualquer concentrado de proteína do soro de leite tendo os níveis acima descritos de ingredientes enriquecidos, os exemplos não limitantes dos quais incluem LACPRODAN® MFGM-10, Whey Protein Concentrate, disponível da Aria Food Ingredients, Dinamarca, que contém 6,5 % de fosfolipídeos, 0,2 % de gangliosídeos, 1,80 % de ácido siálico (pelo menos 2,5 % de ácido siálico ligado ao lipídeo em peso do ácido siálico total), e 1,5 % de lactoferrina, em peso do concentrado.

Ácido Siálico

As fórmulas infantis da presente invenção compreendem ácido siálico em uma concentração, com base na matéria natural, de pelo menos 70 mg/L, incluindo de cerca de 90 mg/L a cerca de 4000 mg/l, também incluindo de cerca de 190 mg/l a cerca de 2000 mg/l, também incluindo de cerca de 300 mg/L a cerca de 900 mg/L, com pelo menos 2,5 %, incluindo de cerca de 2,6 % a cerca de 10 %, incluindo de cerca de 2,7 % a cerca de 5 %, em peso do ácido siálico como ligado ao lipídeo. Algum ou todo o ácido siálico pode ser fornecido pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como descrito neste relatório.

O componente ácido siálico ligado ao lipídeo da fórmula infantil está mais tipicamente na forma de um gangliosídeo, que inerentemente contém ácido siálico ligado ao lipídeo. O componente gangliosídeo da presente invenção, como descrito em seguida, pode, portanto, ser uma fonte primária ou exclusiva do componente ácido siálico ligado ao lipídeo da presente invenção.

O termo “ácido siálico” conforme empregado neste relatório, a menos que de outro modo especificado, refere-se a todas as formas conjugadas e não conjugadas de ácido siálico, incluindo derivados de ácido siálico. O ácido siálico na fórmula infantil da presente invenção pode, portanto, incluir ácido siálico livre, ácido siálico ligado à proteína, ácido siálico ligado ao lipídeo (incluindo gangliosídeos), ácido siálico ligado ao carboidrato, e combinações ou derivados destes. Todas as concentrações de ácido siálico descritas neste relatório são fundamentadas na porcentagem em peso do composto ou porção ácido siálico por si só, menos proteína, lipídeo, carboidrato, ou outros conjugados ligados à estrutura do ácido siálico.

Fontes de ácido siálico para o uso nas fórmulas infantis podem ser adicionadas ou obtidas como ingredientes separados. Entretanto, mais tipicamente, o ácido siálico é fornecido principalmente como um ingrediente inerente de um componente do concentrado de proteína do soro de leite, preferivelmente de um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como descrito neste relatório. Embora menos preferido, o ácido siálico pode ser obtido a partir de, e adicionado como um ingrediente separado à fórmula infantil, caso este em que o ácido siálico adicionado é combinado com ácido siálico inerente a partir de outros

ingredientes para fornecer o teor de ácido siálico total na fórmula infantil.

Como um composto ou porção individual, o ácido siálico é um amino-açúcar com 9 carbonos, a estrutura de que é prontamente descrita na literatura química. Outros nomes geralmente aceitos para ácido N-acetilneuramínico incluem ácido siálico; Ácido o-siálico; 5 Ácido 5-acetamido-3,5-dideóxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulossônico; Ácido 5-acetamido-3,5-dideóxi-D-glicero-D-galactonulossônico; Ácido aceneurâmico; N-acetil-neuraminato; Ácido N-acetilneuramínico; NANA; NANA, Neu5Ac; e Neu5Ac.

Fontes de ácido siálico adequadas podem ser tanto naturais quanto sintéticas, e incluem qualquer uma das mais do que as 40 que ocorrem naturalmente e correntemente identificadas derivados de ácido siálico, que incluem ácido siálico livre, conjugados de oligossacarídeo (por exemplo, sialiloligossacarídeos), conjugados de lipídeo (isto é, glicolipídeos), conjugados de proteína (isto é, glicoproteínas), e combinações destes.

Ácido siálico adequado para o uso neste relatório inclui sialiloligossacarídeos comumente encontrados no leite humano, se naturais ou sintéticos, os dois mais abundantes do quais são 3'sialilactose (3'SL, NeuNAc α 2-3Galactose β 1-4Glucose) e 6'sialilactose (6'SL, NeuNAc α 2-6Galactose β 1-4Glucose). Outros sialiloligossacarídeos adequados incluem aqueles que contêm uma ou mais moléculas de ácido siálico conjugadas conjuntamente com o leite humano ou outros oligossacarídeos mais complexos.

Outros ácidos siálicos adequados para o uso neste relatório incluem qualquer glicolipídeo correspondente que também é adequado para o uso em uma fórmula infantil, incluindo gangliosídeos tais como glicolipídeos contendo ácido siálico compreendendo um ácido graxo, esfingosina, glicose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, e molécula de ácido N-acetilneuramínico. Estes compostos de ácido siálico também podem incluir qualquer uma ou mais das várias glicoproteínas comumente encontradas no leite humano que são conhecidas serem sialiladas (por exemplo, κ -caseína, α -lactalbumina, lactoferrina).

Fontes adequadas de ácido siálico para o uso neste relatório incluem isolatos, concentrados, ou extratos de leite de mamífero ou de produtos do leite, incluindo leite humano e bovino. Leite bovino é uma fonte preferida para o uso neste relatório, incluindo concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos como descrito neste relatório.

Fontes individuais de ácido siálico adequadas para o uso neste relatório incluem Lacprodan CGMP-10 (caseína-glico-macropéptido com 4,2 % de ácido siálico), disponível da AriaFood Ingredients, Dinamarca; e Biopure glico-macropéptido (com 7 a 8 % de ácido siálico), disponível da Davisco Foods International, Eden Prairie, Minnesota, E.U.A.

Embora as fórmulas infantis possam compreender glicomacropéptidos como uma fonte de ácido siálico, as fórmulas são preferível e substancialmente reduzidas no teor de glicomacropéptido. Glicomacropéptido é parte da molécula de proteína caseína do leite

bovino. Apenas quantidades muito pequenas de glicomacropeptídeo livre são encontradas no leite desnatado, porém concentrado de proteína do soro de leite contém quantidades mais altas de glicomacropeptídeo livre. Descobriu-se que glicomacropeptídeos não são tolerados por crianças assim como outras fontes de ácido siálico. Assim, fórmulas infantis fabricadas com concentrado de proteína do soro de leite têm teor de glicomacropeptídeo livre mais alto, mas também podem ser menos toleradas pela criança. Neste contexto, o termo "substancialmente reduzido" significa que as fórmulas infantis preferivelmente contêm menos do que 0,5 %, incluindo menos do que 0,4 %, e também incluindo menos do que 0,35 %, e também incluindo zero por cento, em peso da fórmula como glicomacropeptídeo livre com base na matéria natural. Fórmulas infantis convencionais tipicamente contêm de 0,6 a 0,8 % de glicomacropeptídeo como um ingrediente inerente de um concentrado de proteína do soro de leite típico a partir do soro do queijo.

Gangliosídeos

As fórmulas infantis da presente invenção compreendem concentrações enriquecidas de um ou mais gangliosídeos, um grupo de compostos formados de um glicoesfingolípido (ceramida e oligossacarídeo) com um ou mais ácidos siálicos (ácido n-acetilneuramínico) ligados à cadeia de oligossacarídeo. Alguns ou todos os gangliosídeos podem ser fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como descrito neste relatório.

Gangliosídeos são componentes normais de membranas plasmáticas de células de mamíferos e são particularmente abundantes em membranas neuronais. Eles são glicoesfingolípídeos ácidos compreendendo uma porção hidrofóbica, a ceramida, e uma porção hidrofílica, uma cadeia de oligossacarídeo contendo uma ou mais moléculas de ácido siálico. As porções oligossacarídeo dos gangliosídeos têm estruturas químicas diferentes que constituem a base de referência para separação de gangliosídeos e sua identificação como entidades individuais. A porção ceramida dos gangliosídeos mais comuns tem uma composição em ácido graxo heterogênea com uma prevalência de derivados C18 e C20.

Gangliosídeos são o mais comumente denominados usando designações M, D e T, que referem-se a mono-, di- e trisialogangliosídeos, respectivamente, e os números 1, 2, 3, etc, referem-se à ordem de migração dos gangliosídeos na cromatografia de camada fina. Por exemplo, a ordem de migração dos monosialogangliosídeos é GM3 > GM2 > GM1. Para indicar variações dentro das estruturas básicas, outros subscritos são adicionados, por exemplo, GM1a, GD1b, etc.

As fórmulas infantis da presente invenção compreendem pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos, incluindo de cerca de 7 mg/L a 50 mg/L, também incluindo de cerca de 10 a cerca de 30 mg/L. Estas concentrações de gangliosídeo são similares àquelas encontradas no leite humano, o qual tipicamente contém pelo menos cerca de 3 mg/L de gan-

gliosídeos, mais tipicamente de cerca de 3 mg/L a cerca de 30 mg/L de gangliosídeos. Estes gangliosídeos para o uso nas fórmulas infantis tipicamente compreendem um ou mais, mais tipicamente todos os gangliosídeos GD3, O-Acetil-GD3 e GM3. Estes gangliosídeos geralmente representam pelo menos cerca de 80 %, mais tipicamente pelo menos cerca de 90 %
5 % , em peso dos gangliosídeos totais na fórmula infantil neste relatório.

Fontes adequadas de gangliosídeos para o uso neste relatório incluem isolatos, concentrados, ou extratos de leite de mamífero ou produtos do leite, incluindo leite humano e bovino. Leite bovino é uma fonte de gangliosídeo preferida para o uso neste relatório, incluindo concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos como descrito neste relatório.
10 rio.

Fontes individuais de gangliosídeos adequados para o uso neste relatório incluem Gangliosídeo 500 (>0,5 % de GM3 e <1,0 % de GD3) e Gangliosídeo 600 (>1,2 % de GD3), disponível da Fonterra, Nova Zelândia.

Concentrações de gangliosídeo para propósitos de definição das fórmulas infantis da presente invenção são medidas de acordo com o método do gangliosídeo descrito em seguida.
15 da presente invenção são medidas de acordo com o método do gangliosídeo descrito em seguida.

Fosfolipídeos

As fórmulas infantis da presente invenção compreendem concentrações enriquecidas de fosfolipídeos. Tais concentrações são mais altas do que aquelas encontradas nas fórmulas infantis convencionais, porém similares àquelas encontradas no leite humano. Alguns ou todos os fosfolipídeos podem ser fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como descrito neste relatório.
20 fórmulas infantis convencionais, porém similares àquelas encontradas no leite humano. Alguns ou todos os fosfolipídeos podem ser fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como descrito neste relatório.

Fosfolipídeos adequados para o uso neste relatório incluem aqueles comumente encontrados no leite bovino e de outros mamíferos. Fosfolipídeos preferidos incluem esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, e combinações destes. As mais preferidas são combinações de todos os cinco fosfolipídeos, especialmente tais combinações em que esfingomielina representa pelo menos 20 % em peso dos fosfolipídeos totais.
25 fosfolipídeos adequados para o uso neste relatório incluem aqueles comumente encontrados no leite bovino e de outros mamíferos. Fosfolipídeos preferidos incluem esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, e combinações destes. As mais preferidas são combinações de todos os cinco fosfolipídeos, especialmente tais combinações em que esfingomielina representa pelo menos 20 % em peso dos fosfolipídeos totais.

Concentrações de fosfolipídeo nas fórmulas infantis da presente invenção estão em pelo menos cerca de 150 mg/L, incluindo de cerca de 200 mg/L a cerca de 600 mg/L, também incluindo de cerca de 250 a cerca de 450 mg/L. O leite humano, por comparação, geralmente contém de cerca de 163 a cerca de 404 mg/L de fosfolipídeos, com esfingomielina representando cerca de 51 % dos fosfolipídeos totais.
30 pelo menos cerca de 150 mg/L, incluindo de cerca de 200 mg/L a cerca de 600 mg/L, também incluindo de cerca de 250 a cerca de 450 mg/L. O leite humano, por comparação, geralmente contém de cerca de 163 a cerca de 404 mg/L de fosfolipídeos, com esfingomielina representando cerca de 51 % dos fosfolipídeos totais.

Fontes adequadas de fosfolipídeos para o uso neste relatório incluem isolatos, concentrados, ou extratos de leite de mamífero ou produtos do leite, incluindo leite humano e bovino. Leite bovino é uma fonte de fosfolipídeo preferida para o uso neste relatório, incluindo concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos como descrito neste relatório.
35 Fontes adequadas de fosfolipídeos para o uso neste relatório incluem isolatos, concentrados, ou extratos de leite de mamífero ou produtos do leite, incluindo leite humano e bovino. Leite bovino é uma fonte de fosfolipídeo preferida para o uso neste relatório, incluindo concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos como descrito neste relatório.

Outras fontes de fosfolípido adequadas incluem soja, tal como lecitina de soja. As fórmulas infantis da presente invenção, entretanto, são preferível e substancialmente livres de fosfolípidos da soja. As fórmulas infantis também são preferível e substancialmente livres de fosfolípidos de ovo, que também são referidos como lecitina de ovo. Neste contexto, o termo “substancialmente livre” significa que as fórmulas infantis contêm menos do que 0,5 %, mais preferivelmente menos do que 0,1 %, incluindo zero por cento, em peso de fosfolípidos de soja ou de ovo.

Fontes individuais de fosfolípidos adequados para o uso neste relatório incluem fontes derivadas do leite tais como concentrado de Fosfolípido 600 (>18,0 % de Esfingomielina, >36,0 % de Fosfatidilcolina, >9,0 % de Fosfatidiletanolamina, 4,0 % de Fosfatidilserina), disponível da Fonterra, Nova Zelândia.

Lactoferrina

As fórmulas infantis da presente invenção compreendem lactoferrina, uma proteína transportadora de ferro encontrada no leite humano. Estas fórmulas contêm concentrações enriquecidas de lactoferrina em níveis mais altos do que aqueles encontrados em fórmulas infantis convencionais. Alguma ou toda a lactoferrina pode ser fornecida por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como descrito neste relatório.

O termo “lactoferrina” conforme empregado neste relatório inclui tanto lactoferrina desnaturada quanto lactoferrina como um todo, fragmentos biologicamente ativos de lactoferrina (por exemplo, fragmentos de lactoferrina) e lactoferrina não desnaturada ou natural. A lactoferrina é uma glicoproteína que pertence à família transportadora de ferro ou transferrina. Ela é encontrada no leite bovino e de outros mamíferos como um componente de proteína inferior de proteínas do soro de leite. A lactoferrina contém 703 aminoácidos, tem um peso molecular de 80 kilodaltons, e também é encontrada no leite humano.

O termo “lactoferrina natural” conforme empregado neste relatório refere-se à lactoferrina que não é agregada com outras proteínas ou lipídeos. A lactoferrina natural pode, entretanto, ser ligada ao ferro ou a outros minerais.

Concentrações de lactoferrina nas fórmulas infantis da presente invenção estão preferivelmente em pelo menos cerca de 50 mg/L, incluindo de cerca de 50 mg/L a cerca de 2000 mg/L, incluindo de cerca de 100 a cerca de 1500 mg/L; com preferivelmente pelo menos cerca de 6 % em peso, incluindo de cerca de 6 a cerca de 30 %, e também incluindo de cerca de 7 a 14 %, da lactoferrina como lactoferrina natural. O leite humano, por comparação, geralmente contém de cerca de 1390 a cerca de 1940 mg/L de lactoferrina.

Fontes adequadas de lactoferrina para o uso neste relatório incluem isolatos, concentrados, ou extratos de leite de mamífero ou produtos do leite, incluindo leite humano e bovino. Leite bovino é uma fonte de lactoferrina preferida para o uso neste relatório, incluindo concentrados de proteína do soro de leite enriquecidos como descrito neste relatório.

Fontes individuais de lactoferrina adequada para o uso neste relatório incluem Lactoferrina FD (80 % de Lactoferrina), disponível da DMV International, Veghel, Países Baixos.

Outros Nutrientes

As fórmulas infantis da presente invenção compreendem gordura, proteína, carboidrato, vitaminas e minerais, todos os quais são selecionados em tipo e quantidade para satisfazer a necessidade de nutrição exclusiva, primária, ou suplementar da criança-alvo ou população de crianças definida.

Muitas fontes e tipos diferentes de carboidratos, gorduras, proteínas, minerais e vitaminas são conhecidos e podem ser usados nas fórmulas de base neste relatório, contanto que tais nutrientes sejam compatíveis com os ingredientes adicionados na formulação selecionada e sejam de outro modo adequados para o uso em uma fórmula infantil.

Carboidratos adequados para o uso nas fórmulas neste relatório podem ser simples ou complexos, contendo lactose ou livres de lactose, ou combinações destes, os exemplos não limitantes dos quais incluem amido de milho, maltodextrina, polímeros de glicose, sacarose, glicose de milho, sólidos de glicose de milho, carboidrato derivado de arroz ou batata, glicose, frutose, lactose, glicose de milho da frutose elevada e oligossacarídeos não digeríveis tais como fruto-oligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GUS) hidrolisados, intactos, natural e/ou quimicamente modificados, e combinações destes.

Proteínas adequadas para o uso nas fórmulas neste relatório incluem proteínas ou fontes de proteína hidrolisadas, parcialmente hidrolisadas, e não hidrolisadas ou intactas, e podem ser derivadas de qualquer fonte conhecida ou de outro modo adequada tal como do leite (por exemplo, caseína, soro de leite, proteína do leite humano), animal (por exemplo, carne, peixe), de cereal (por exemplo, arroz, milho), vegetal (por exemplo, soja), ou combinações destas.

Proteínas para o uso neste relatório também podem incluir, ou serem completa ou parcialmente substituídas por aminoácidos livres conhecidos para, ou de outro modo adequado, para o uso em fórmulas infantis, os exemplos não limitantes dos quais incluem alanina, arginina, asparagina, carnitina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, taurina, treonina, triptofano, taurina, tirosina, valina, e combinações destes. Estes aminoácidos são mais tipicamente usados em suas L-formas, embora os D-isômeros correspondentes também possam ser usados quando nutricionalmente equivalentes. Misturas racêmicas ou isoméricas também podem ser usadas.

Gorduras adequadas para o uso nas fórmulas neste relatório incluem óleo de côco, óleo de soja, óleo de milho, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de girassol com alto teor de ácido oléico, óleo de alga, óleo MCT (triglicerídeos de cadeia média), óleo de girassol, óleo de girassol com alto teor de ácido oléico, óleos de palmeira e palmiste, oleína de palma,

óleo de canola, óleos marinhos, óleos de caroço de algodão, e combinações destes. As fórmulas infantis da presente invenção incluem aquelas modalidades compreendendo menos do que cerca de 1 %, incluindo menos do que cerca de 0,2 %, também incluindo zero por cento, em peso de gordura do leite com base na matéria natural.

5 Vitaminas e outros ingredientes similares adequados para o uso nas fórmulas incluem vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, tiamina, riboflavina, piridoxina, vitamina B12, niacina, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, vitamina C, colina, inositol, sais e derivados destes, e combinações destes.

10 Minerais adequados para o uso nas fórmulas de base incluem cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre, cromo, iodo, sódio, potássio, cloreto, e combinações destes.

As fórmulas de nutrição infantil da presente invenção preferivelmente compreendem nutrientes de acordo com as diretrizes relevantes de fórmula infantil para o consumidor-alvo ou população usuária, um exemplo do qual seria Infant Formula Act, 21 U.S.C. Seção 15 350(a). Concentrações de carboidrato, lipídeo, e proteína preferidas para o uso nas fórmulas são apresentadas na seguinte tabela.

Tabela 1: Faixas de Macronutriente

Nutriente	Faixa ¹	g/100 kcal	pó g/100 g	Matéria natural g/l
Carboidrato	Preferido	8 a 16	30 a 90	54 a 108
	Mais preferido	9 a 13	45 a 60	61 a 88
Lipídeo	Preferido	3 a 8	15 a 35	20 a 54
	Mais preferido	4 a 6,6	25 a 25	27 a 45
Proteína	Preferido	1 a 3,5	8 a 17	7 a 24
	Mais preferido	1,5 a 3,4	10 a 17	10 a 23

1. Todos os valores numéricos são preferivelmente modificados pelo termo "cerca de"

20 As fórmulas infantis também podem incluir por 100 kcal da fórmula, um ou mais dos seguintes: vitamina A (de cerca de 250 a cerca de 750 IU), vitamina D (de cerca de 40 a cerca de 100 IU), vitamina K (mais do que cerca de 4 µm), vitamina E (pelo menos cerca de 0,3 IU), vitamina C (pelo menos cerca de 8 mg), tiamina (pelo menos cerca de 8 µg), vitamina B12 (pelo menos cerca de 0,15 µg), niacina (pelo menos cerca de 250 µg), ácido fólico 25 (pelo menos cerca de 4 µg), ácido pantotênico (pelo menos cerca de 300 µg), biotina (pelo menos cerca de 1,5 µg), colina (pelo menos cerca de 7 mg), e inositol (pelo menos cerca de 2 mg).

As fórmulas infantis também podem incluir por 100 kcal da fórmula, um ou mais dos

seguintes: cálcio (pelo menos cerca de 50 mg), fósforo (pelo menos cerca de 25 mg), magnésio (pelo menos cerca de 6 mg), ferro (pelo menos cerca de 0,15 mg), iodo (pelo menos cerca de 5 µg), zinco (pelo menos cerca de 0,5 mg), cobre (pelo menos cerca de 60 µg), manganês (pelo menos cerca de 5 µg), sódio (de cerca de 20 a cerca de 60 mg), potássio (de cerca de 80 a cerca de 200 mg), cloreto (de cerca de 55 a cerca de 150 mg) e selênio (pelo menos cerca de 0,5 mcg).

As fórmulas infantis podem ainda compreender fruto-polissacarídeos, concentrações das quais podem variar até cerca de 5 % em peso da fórmula, com base na matéria natural, incluindo de cerca de 0,05 % a cerca de 3 %, e também incluindo de cerca de 0,1 % a cerca de 2 %. Estes fruto-polissacarídeos podem ser de cadeia longa (por exemplo, inulina), de cadeia curta (por exemplo, FOS ou fruto-oligossacarídeos), ou combinações destes, com misturas compreendendo estruturas de comprimento de cadeia variado, a maioria das quais têm um DP (grau de polimerização) de cerca de 2 a cerca de 60.

As fórmulas infantis da presente invenção podem ainda compreender ácidos graxos poliinsaturados tais como ácido docosahexaenóico, ácido araquidônico, ou combinações destes. Qualquer fonte de tais ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa é adequada para o uso neste relatório, contanto que tal fonte seja segura e eficaz para o uso em crianças, e seja de outro modo compatível com o outro ingrediente selecionado na fórmula infantil. Concentrações de ácido araquidônico nas fórmulas infantis da presente invenção podem variar até cerca de 2,0 %, mais preferivelmente de cerca de 0,1 % a cerca de 1,0 %, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,15 a cerca de 0,7 %, incluindo de cerca de 0,2 % a cerca de 0,45 %, também incluindo de cerca de 0,38 % a cerca de 0,43 %, em peso dos ácidos graxos totais na fórmula. Concentrações de ácido docosahexaenóico nas fórmulas infantis da presente invenção podem variar até cerca de 1,0 %, incluindo de cerca de 0,09 % a cerca de 1,0 %, também incluindo de cerca de 0,1 % a cerca de 0,36 %, em peso dos ácidos graxos totais na fórmula. Exemplos não limitantes de algumas fontes adequadas de ácido araquidônico, e/ou ácido docosahexaenóico incluem óleo marinho, óleos derivados de ovo, óleo fúngico, óleo de alga, outros óleos de célula única, e combinações destes.

As fórmulas infantis podem ainda compreender outros ingredientes opcionais que podem modificar as características físicas, químicas, estéticas ou de processamento das composições ou servem como componentes nutricionais farmacêuticos ou adicionais quando usados na criança-alvo ou população de crianças. Muitos dos tais ingredientes opcionais são conhecidos ou são de outro modo adequados para o uso em produtos nutricionais e também podem ser usados nas fórmulas infantis da presente invenção, contanto que tais materiais opcionais sejam compatíveis com os materiais essenciais descritos neste relatório e sejam de outro modo adequados para o uso em uma fórmula infantil.

Exemplos não limitantes de tais ingredientes opcionais incluem antioxidantes, agen-

tes emulsificadores, tampões, corantes, sabores, nucleotídeos e nucleosídeos, probióticos, prebióticos, e derivados relacionados, agentes espessantes e estabilizadores adicionais, e assim por diante.

Método de Uso

5 A presente invenção também é dirigida a um método de reduzir o risco de diarreia em uma criança, incluindo reduzir tal risco reduzindo-se a duração de diarreia em uma criança propensa ao desenvolvimento ou sofrendo de diarreia, pela preparação e depois administração, ou instrução de um prestador de cuidados em administrar as fórmulas infantis a uma criança como uma fonte exclusiva, fonte primária, ou fonte suplementar de nutrição.

10 Nutrição de fonte exclusiva é preferida.

A presente invenção também é dirigida a um método de produzir um perfil de microflora intestinal similar àquele encontrado em lactentes, pela preparação das fórmulas infantis como descrito neste relatório e depois administração, ou instrução de um prestador de cuidados em administrar a fórmula a uma criança como uma fonte exclusiva, fonte primária, ou fonte suplementar de nutrição. Nutrição de fonte exclusiva é preferida.

15 A presente invenção também é dirigida a um método de fornecer nutrição a uma criança pela preparação das fórmulas infantis como descrito neste relatório e depois administração, ou instrução de um prestador de cuidados em administrar a fórmula a uma criança como uma fonte exclusiva, fonte primária, ou fonte suplementar de nutrição. Nutrição de fonte exclusiva é preferida.

20 No contexto dos métodos da presente invenção, as fórmulas infantis podem fornecer nutrição exclusiva, primária, ou suplementar às crianças. Para modalidades em pó, cada método também pode incluir a etapa de reconstituir o pó com um veículo aquoso, mais tipicamente água ou leite humano, para formar a densidade calórica desejada, que depois é oral ou enteralmente administrado à criança para fornecer a nutrição desejada. O pó é reconstituído com uma quantidade de água, ou outro fluido adequado tal como leite humano, para produzir um perfil de volume e nutrição adequado durante cerca de uma alimentação.

25 As fórmulas infantis da presente invenção mais tipicamente terão uma densidade calórica de cerca de 19 a cerca de 24 kcal/fl oz, mais tipicamente de cerca de 20 a cerca de 21 kcal/fl oz, com base na matéria natural.

Método Analítico do Gangliosídeo

30 Concentrações de gangliosídeo para o uso neste relatório são determinadas de acordo com o seguinte método analítico.

35 Lipídeos totais são extraídos a partir de Lacprodan MFGM-10 ou de amostras de fórmula infantil com uma mistura de clorofórmio:metanol:água. Gangliosídeos são purificados a partir do extrato de lipídeo total por uma combinação de éter diisopropílico (DIPE)/1-butanol/partição da fase aquosa e extração da fase sólida através de cartuchos C-18. Ácido

siálico ligado ao lipídeo (LBSA) nos gangliosídeos purificados é medido espectrofotometricamente por reação com resorcinol. A quantidade de gangliosídeos nas amostras é obtida multiplicando-se LBSA por um fator de conversão. Este fator é obtido a partir da razão do peso molecular de gangliosídeos e unidades de ácido siálico. Devido ao fato de que os gangliosídeos são um família de compostos com pesos moleculares diferentes e número de resíduos de ácido siálico, a separação por HPLC é usada para medir a distribuição do gangliosídeo individual de modo a calcular este fator de conversão mais precisamente.

Padrões

- 10 • Disialogangliosídeo GD1a, a partir de cérebro bovino, min. 95 % (TLC) SIGMA, ref G-2392.
- Monosialogangliosídeo GM1, a partir de cérebro bovino, min. 95 % (TLC) SIGMA, ref G-7641.
- Disialogangliosídeo GD3 sal de amônio, a partir de soro de leite bovino, min. 98 % (TLC) Calbiochem, ref 345752 ou Matreya, ref. 1503.
- 15 • Monosialogangliosídeo GM3 sal de amônio, a partir de leite bovino, min. 98 % (TLC) Calbiochem, ref 345733 ou Matreya, ref. 1504.
- Ácido n-acetilneuramínico, (ácido siálico, NANA) a partir de Escherichia coli, min. 98 % SIGMA, ref A-2388.

20 Padrões de gangliosídeo não são considerados como padrões precisos visto que os fornecedores tipicamente não garantem suas concentrações. Por esta razão, concentrações são estimadas como LBSA medido pelo procedimento do resorcinol. Os padrões são diluídos com clorofórmio:metanol (C:M)1:1 (v/v) para uma concentração teórica de 1 a 2,5 mg/ml dependendo do tipo de gangliosídeo. Alíquotas de 10, 20 e 40 μ l são tomadas, levadas à secura sob corrente de N₂ e medidas como ilustrado abaixo (Medição de LBSA). Uma con-

25 centração média das três alíquotas é considerada como concentração de padrões de gangliosídeo expressados como LBSA. A concentração de gangliosídeo é obtida multiplicando-se LBSA por um fator de conversão obtido a partir de razões de peso molecular (Fator de conversão: Gangliosídeo MW/n x Ácido siálico MW onde n = número de unidades de ácido siálico).

30

Reagentes

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Clorofórmio, grau HPLC, Prolabo. • Metanol, grau HPLC, Merck. • Éter diisopropílico, grau HPLC, | <ul style="list-style-type: none"> • Fosfato de sódio dibásico, PA, Panreac. • Ácido clorídrico 35 %, PA, Panreac. • Sulfato de cobre, PA, Panreac. |
|---|--|

Prolabo.

- Acetato de butila, PA, Merck.
- 1-Butanol, PA, Merck.

- Resorcinol, 99 %, Merck.
- Cloreto de sódio, PA, Panreac.

Equipamento

- Equilíbrio analítico, com uma precisão de 0,1 mg.
- Frascos, tampas com rosca e insertos HPLC da Waters.
- Microseringas Hamilton (50, 100, 250, 500, 1000 µl).
- HPLC: Alliance 2690 da Waters.
- Detector UV HPLC, referência número 2487, da Waters.
- Integrador HPLC: Waters Millennium 32.
- Solvac Filter Holder (polipropileno), ref. N° 4020.
- Filtros de membrana Durapore de 0,45 µm, ref. N° VLP04700
- Multi-reax Vortex (Heidolph)
- Pipetas Digitais (2 a 20, 5 a 50, 40 a 200, 200 a 1000 µl)
- Tubo de vidro de 10 ml para centrífuga com fundo redondo
- Tubo de vidro de 50 ml para centrífuga com fundo redondo
- Tubo de vidro de 40 ml para centrífuga com fundo cônico
- 500 mg cartuchos C-18 (5 ml, ref 52604-U, Supelco)
- Modelo Reacti-Vap III evaporator 27-port (Pierce)

- Centrífuga
- Banho ultrassônico
- Modelo SPE-Vacuum manifolds 24-port
- Bomba de vácuo tipo diafragma
- Triple-Block Reacti-Therm III (Pierce)
- Bomba de água-vácuo
- Pipeta de vidro Pasteur
- Dispensador de solvente orgânico (2,5 a 25 ml)
- Vortex (Heidolph)
- Banho de água 40 a 100 °C.
- Pipetas de vidro (5, 10, 25 ml).
- Espectrofotômetro (ThermoSpectronic UV500).

Procedimento

Extração de Lipídeo: extratos de lipídeo são preparados como segue: amostras de 1 g da fórmula ou 100 mg de Lacprodan MFGM-10 são pesadas em tubos de vidro para centrífuga de fundo redondo (tubos de 50 ml para fórmula e tubos de 10 ml para Lacprodan MFGM-10). Vinte e cinco ml de clorofórmio:metanol:água (C:M:W) 50:50:10 (v/v) por g de amostra são adicionados, sendo as amostras completamente dispersas por turbilhamento e sonicação alternativos durante 1 min. Tubos são incubados durante 45 min na temperatura ambiente com turbilhamento vigoroso e contínuo (2000 rpm) com sonicação em banho com pulsos de 1 min a cada 15 min. Amostras são centrifugadas (1500 x g, 10 min, 15 °C). Os sobrenadantes são transferidos para tubos de vidro para centrífuga de fundo cônico de 40 ml e a secagem é iniciada sob N₂ a 37 °C. Entretanto, as pelotas são reextraídas com 12,5 ml de C:M:W por g durante 15 min na temperatura ambiente com turbilhamento contínuo (2000 rpm) e com sonicação em banho com pulsos de 1 min a cada 7,5 min. Depois da centrifugação, os sobrenadantes são agrupados com os primeiro sobrenadantes nos tubos de 40 ml e a evaporação é continuada. As pelotas são lavadas com C:M 1:1 (v/v) e incubadas durante 10 min nas mesmas condições do que antes, com pulsos de sonicação a cada 5 min. Depois da centrifugação, os sobrenadantes também são adicionados aos tubos de 40 ml e evaporados.

A fração de gangliosídeo é purificada a partir do extrato de lipídeo total por uma combinação do éter diisopropílico (DIPE)/1-butanol/partição da fase aquosa descrita por Ladisch S. e Gillard B. (1985) *A solvent partition method for microscale ganglioside purification*. Anal. Biochem, 146:220-231. Isto é seguido por extração da fase sólida através de cartuchos C-18 como descrito por Williams M e McCluer R (1980), *The use of Sep-PakTM C18 cartridges during the isolation of gangliosides*, J. Neurochem, 35:266-269 com modificações.

Éter Diisopropílico/1-Butanol/Partição de NaCl Aquoso: 4 ml de DIPE/1-butanol 60:40 (v/v) são adicionados ao extrato de lipídeo seco. Amostras são turbilhonadas e sonicadas para obter suspensão fina do extrato de lipídeo. Dois ml de NaCl aquoso 0,1 % são adicionados, e os tubos alternadamente turbilhonados e sonicados com pulsos de 15 segundos durante 2 min, e depois centrifugados (1500 x g, 10 min, 15 °C). A fase orgânica superior (contendo os lipídeos e fosfolipídeos neutros) é cuidadosamente removida usando uma pipeta Pasteur tomando-se o cuidado de não remover a interfase. A fase aquosa inferior contendo gangliosídeos é extraída duas vezes com o volume original de solvente orgânico fresco. As amostras são parcialmente evaporadas sob uma corrente de N₂ a 37 °C durante 30 a 45 min até que o volume (perto de 2 ml) seja reduzido a aproximadamente uma metade do volume original.

Extração da Fase Sólida (SPE) através de cartuchos C-18 de fase reversa: 500 mg de cartuchos C-18 são ajustados a um coletor à vácuo SPE com tampa e com vinte e quatro

portas, e ativados com três lavagens consecutivas de 5 ml de metanol, 5 ml de C:M 2:1 (v/v) e 2,5 ml de metanol. Depois, cartuchos são equilibrados com 2,5 ml de NaCl aquoso 0,1 %:metanol 60:40 (v/v). Os volumes de fases inferiores parcialmente evaporadas são medidos, levados até 1,2 ml com água, e adicionados com 0,8 ml de metanol. Depois, eles são

5 centrifugados (1500 x g, 10 min) para remover qualquer material insolúvel e carregados duas vezes em cartuchos C-18. Cartuchos SPE são agitados com 10 ml de água destilada para remover sais e contaminantes solúveis em água e depois, secos durante 30 segundos sob vácuo. Gangliosídeos são eluídos com 5 ml de metanol e 5 ml de C:M 2:1 (v/v), secos sob uma corrente de N₂ e redissolvidos em 2 ml de C:M 1:1 (v/v). Amostras e solventes são

10 passados através dos cartuchos por gravidade ou forçados por vácuo fraco com uma taxa de fluxo de 1 a 1,5 ml/min. Gangliosídeos são armazenados a -30 °C até a análise. Gangliosídeos totais são medidos como LBSA. Uma alíquota de 500 µl é colocada em um tubo de vidro para centrífuga de 10 ml: seca sob N₂, e medida por ensaio de resorcinol (3).

Medição de LBSA: 1 ml do reagente resorcinol e 1 ml de água são adicionados. Os

15 tubos são enchidos e aquecidos durante 15 min a 100 °C em um banho de água em ebulição. Depois do aquecimento, os tubos são esfriados em um banho de água gelada, 2 ml de acetato de butila:butanol 85:15 (v/v) são adicionados, os tubos são agitados vigorosamente durante 1 min e depois centrifugados a 750 x g durante 10 min. As fases superiores são tomadas e medidas a 580 nm em um espectrofotômetro. Soluções padrão de NANA (0, 2, 4,

20 8, 16, 32 e 64 pg/ml) são tratadas da mesma maneira e são usadas para calcular a concentração de ácido siálico nas amostras.

O reagente resorcinol é preparado como segue: 10 ml de resorcinol a 2 % em água desionizada, 0,25 ml de sulfato de cobre 0,1 M, 80 ml de ácido clorídrico concentrado, completar até 100 ml com água. O reagente é preparado diariamente protegido da luz.

Separação de gangliosídeos por HPLC: gangliosídeos são separados por HPLC em

25 um equipamento Alliance 2690 com Detector de Absorvância Duplo, da Waters usando uma coluna Luna-NH₂, 5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm da Phenomenex, ref. 00G-4378-EO. Eles são eluídos na temperatura ambiente com o seguinte sistema de solvente: acetonitrila-tampão fosfato em razões de volume e resistências iônicas diferentes de acordo com o método de

30 Gazzotti G., Sonnion S., Ghidonia R (1985), *Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of non-derivatized ganglioside mixtures*. J Chromatogr. 348:371-378.

Um gradiente com duas fases móveis é usado:

- Solvente A: Acetonitrila – tampão fosfato 5 mM, pH 5,6 (83:17). Este tampão é preparado com 0,6899 g de NaH₂PO₄.H₂O para 1L de água, pH ajustado a 5,6
- 35 • Solvente B: Acetonitrila – tampão fosfato 20 mM, pH 5,6 (1:1). Este tampão é preparado com 2,7560 g de NaH₂PO₄.H₂O para 1L de água, pH ajustado a 5,6

O seguinte programa de eluição gradiente é usado:

Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	% A	% B
0	1	100	0
7	1	100	0
60	1	66	34
61	1	0	100
71	1	0	100
72	1	100	0
85	1	100	0

Amostras são fase líquida extraída, particionada e fase sólida extraída como descrito acima. Uma alíquota de 0,5 ml da amostra de 2 ml em C:M 1:1 é evaporada sob nitrogênio e redissolvida em 0,150 ml de água. Para perfeita reconstituição, a amostra é turbilhonda e sonicada. A solução final é transferida para um frasco de HPLC. O volume de injeção é de 30 µl para amostras e padrões.

Padrões GD3 e GM3 são medidos pelo procedimento do resorcinol e concentrações precisas calculadas como descrito acima. Quatro soluções padrão contendo GD3 e GM3, e uma vazia são preparadas em água. As concentrações dos padrões de calibração variaram aproximadamente de 0 a 0,5 mg/ml para GD3 e de 0 a 0,2 mg/ml para GM3. A concentração exata de cada conjunto de padrões pode variar dependendo da pureza dos padrões.

Um conjunto de padrões é injetado cada vez que o sistema é ativado, por exemplo, para uma nova coluna. O desempenho apropriado do sistema é verificado injetando-se um padrão de concentração intermediária a cada dez rodadas. Se a concentração interpolada não estiver entre 95 % a 105 % da concentração teórica, uma novo ajuste de calibração é injetado e usado para cálculos subseqüentes.

Método Analítico da Lactoferrina Natural

Concentrações de lactoferrina natural para o uso neste relatório são determinadas de acordo com o método de HPLC descrito neste relatório (cromatografia de exclusão por tamanho). Os parâmetros de teste são, por exemplo, como segue:

- Colunas (2 em série): Shodex KW-804 (Waters #36613) e Shodex KW-803 (Waters #35946)

- Fase Móvel: 525 mL Milli-Q Plus de H₂O, 475 mL de acetonitrila, 0,5 mL de ácido trifluoroacético

- Taxa de fluxo: 0,2 mL/minuto

- Temperatura: 40C

- Detecção: UV a 205 nm, 214 nm, 280 nm
- Injeção: 2,0 uL
- Tempo Conduzido: 150 minutos
- Faixa Padrão LF: 20 a 80 mg/L
- Prep Amostra WPC: ~1,0 mg/mL na fase móvel

Método de Fabricação

As fórmulas infantis da presente invenção podem ser preparadas por qualquer técnica conhecida ou de outro modo eficaz, adequada para fabricar e formular fórmulas infantis ou similares. Tais técnicas e variações destas para qualquer fórmula fornecida são facilmente determinadas e aplicadas por uma pessoa de habilidade comum na técnica de formulação ou fabricação de nutrição infantil na preparação das fórmulas descritas neste relatório.

Os métodos de fabricação das fórmulas infantis da presente invenção podem incluir a formação de uma pasta fluida a partir de uma ou mais soluções que podem conter água e um ou mais dos seguintes: carboidratos, proteínas, lipídeos, estabilizadores, vitaminas e minerais. Esta pasta fluida é emulsificada, homogeneizada e esfriada. Várias outras soluções, misturas ou outros materiais podem ser adicionados à emulsão resultante antes, durante, ou depois de outro processamento. Esta emulsão depois pode ser ainda diluída, esterilizada, e acondicionada para formar um líquido pronto para o consumo ou concentrado, ou ela pode ser esterilizada e subseqüentemente processada e acondicionada como um pó reconstituível (por exemplo, seca por pulverização, misturada a seco, aglomerada).

Outros métodos adequados para fabricar fórmulas infantis são descritos, por exemplo, na Patente U.S. 6.365.218 (Borschel) e Pedido de Patente U.S. 20030118703 A1 (Nguyen, *et al.*), cujas descrições são incorporadas neste relatório como referência.

EXPERIMENTO I

O propósito deste experimento é avaliar os efeitos das fórmulas infantis da presente invenção na microflora intestinal, e comparar esses efeitos àqueles produzidos a partir do leite humano. Isto é realizado medindo-se as concentrações de ácido graxo de cadeia curta resultantes a partir do leite humano e fórmulas infantis usando um sistema de modelo de intestino grosso validado.

É bem conhecido que o perfil de microflora intestinal de lactentes é diferente daquele de crianças alimentadas com a fórmula. Visto que, a microflora intestinal é responsável em assumir a produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino, a diferença entre o perfil de microflora intestinal das crianças lactentes e das alimentadas pela fórmula pode ser avaliada medindo-se suas concentrações respectivas de ácidos graxos de cadeia curta no cólon. Os lactentes tipicamente produzem quantidades maiores de acetato e quantidades menores de propionato e butirato, em comparação às crianças alimentadas pela fórmula.

Um sistema de modelo de intestino grosso validado é usado para conduzir as avali-

ações (Sistema TIM-2, TNO Quality of Life, Zeist, Países Baixos). Neste sistema particular, a microflora colônica de um lactente é apresentada a uma fórmula infantil de teste e as mudanças observadas a medida em que elas ocorrem nos perfis de ácido graxo de cadeia pequena.

5 Cada fórmula infantil a ser avaliada é pré-digerida de modo que sua adição ao sistema TIM-2 é representativa das características químicas de uma fórmula infantil passando no intestino grosso depois da passagem através do estômago e do intestino delgado da criança. O sistema TIM-2 contém microbiota representativa cultivada a partir de amostras fecais de lactentes exclusivamente, tipicamente de crianças de 2 a 4 meses de idade.

10 Visto que a microflora do lactente é alimentada com a fórmula infantil pré-digerida, durante o curso de um período de fermentação de 72 h, os produtos finais da fermentação (ácidos graxos de cadeia pequena) se alteram conforme refletido por mudanças nas proporções relativas de ácidos graxos de cadeia curta definidos (acetato, propionato, butirato). O perfil do SCFA a 72 horas para cada fórmula de teste depois é comparado àquele de um
15 perfil do SCFA conhecido a partir do leite humano (Fig. 5) e àquele de uma fórmula infantil convencional (Fig. 6).

Este experimento avalia e compara o perfil do SCFA das seguintes fórmulas infantis (Fórmulas 1 a 4):

20 Tabela 2

	Fórmula 1 Fórmula infantil comercial	Fórmula 2 Fórmula infantil comercial	Fórmula 3 Fórmula infantil comercial	Fórmula 4 Exemplo 1 fórmula infantil
Gangliosídeos mg/L	3,2 a 4,8	3,2 a 4,8	3,2 a 4,8	14
Ácido siálico mg/L	115 a 150	115 a 150	115 a 150	190
Lactoferrina mg/L	2,6	2,6	2,6	100
Fosfolípidos mg/L	118	118	118	450
FOS - cadeia curta mg/L	0,5	2,0	–	–
FOS - cadeia curta e longa mg/L	–	–	2,0	–
Perfil do ácido graxo de cadeia pequena a 72 horas na presença da flora do lactente				
n-butilato	10 %	10 %	10 %	15 %
Propionato	28 %	8 %	9 %	7 %
Acetato	62 %	82 %	81 %	78 %
Resumo do resultado	Fig. 1	Fig. 2	Fig. 3	Fig. 4

Um resumo dos perfis do SCFA depois de 72 horas para cada uma das Fórmulas 1 a 4 é mostrado nas Figs. 1 a 4, respectivamente. Para propósitos de comparação, um perfil do SCFA típico no cólon de um lactente de 2 a 4 meses de idade é mostrado na Fig. 5 (Gibson, G.R. e M.B. Roberfroid, 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *Journal of Nutrition*, 125; 1401-1412) enquanto que o perfil do SCFA típico depois de 72 h quando uma fórmula infantil com base em leite pré-digerida (fórmula infantil convencional) é introduzida como uma fonte exclusiva de nutrição, é mostrada na Fig. 6 (Knol, J., Scholtens, P., Kafka, C., Steenbakkers, J., Gross, S., Heim, K., Klarczyk, M., Schopfer H., Bockier, H.-M., e Wells, J., 2004. Colon microflora in infants fed formula with gactacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants, *Journal Pediatric Gastroenterology*, 40(1): 36-42).

A partir dos resultados resumidos acima, pode ser observado que a fórmula infantil da presente invenção (Fórmula 4) resulta em um perfil de atividade metabólica, conforme refletido por concentrações de SCFA relativas de n-burirato, propionato, e acetato, similar àquele do lactente (Fig. 5), e significativamente diferente do perfil associado com uma fórmula infantil convencional (Fig. 6.). Este perfil de atividade metabólica semelhante àquele do lactente ajudará a produzir um ambiente intestinal que pode inibir o crescimento de patógenos potenciais, tais como *C. difficile* e assim prevenir a probabilidade de doença diarreica infecciosa (Marleen H.M.C. van Nuenen, P. Diederick Meyer, e Koen Venema, 2003. The effects of various inulins and *Clostridium difficile* on the metabolic activity of the human colonic microbiota in vitro, *Microbial Ecology in Health Disease*, 15: 137-144).

Deve ser observado que cada uma das Fórmulas 1 a 4 continham FOS, um ingrediente bem conhecido quanto ao seu efeito probiótico no perfil da microflora no intestino. As Fórmulas 2 e 3 continham 2 g/L de FOS e como era esperado produziram um perfil do SCFA similar àquele do leite humano, enquanto que uma formulação idêntica com apenas 0,5 g/L de FOS (Fórmula 1) resultou em um perfil do SCFA similar àquele de uma fórmula infantil convencional. De maneira interessante, a Fórmula 4 produziu um perfil do SCFA similar àquele do leite humano, ainda que ela contivesse apenas 0,8 g/L de FOS. Acredita-se que a concentração selecionada e combinação de lactoferrina, ácido siálico, fosfolípido, e gangliosídeos da Fórmula 4 são responsáveis para o perfil do SCFA similar àquele do leite humano.

EXPERIMENTO II

O propósito deste estudo é comparar os benefícios do desempenho em porcos recém-nascidos alimentados com uma fórmula de controle ou uma de duas modalidades das diferentes fórmulas da presente invenção com concentrações enriquecidas de gangliosídeos, fosfolípídeos, lactoferrina, e ácido siálico.

Fundamentos

O leitão recém-nascido constitui um modelo apropriado para avaliar a intervenção nutricional antes do projeto e implementação de experiências clínicas humanas. Sua adequação consiste nas similaridades da fisiologia gastrointestinal do leitão àquelas do ser humano recém-nascido. O modelo é uma ferramenta útil para predizer a tolerância de fórmulas infantis (Miller, E.R., Ulkey, *The pig as model for human nutrition*, Annu Rev Nutr 1987; 7; 361-82). O presente estudo é designado para fornecer uma avaliação biológica dos efeitos de duas modalidades da fórmula da presente invenção.

Aspectos significantes são observados na área de redução do risco da diarreia, isto é, duração reduzida da diarreia.

Projeto Experimental

O estudo é longitudinal e inclui 3 grupos de leitões alimentados com as dietas experimentais, A, B ou C (vide Tabela 3) com três pontos no tempo de sacrifício depois de 8 a 9, 15 a 16 e 29 a 30 dias de alimentação. Um grupo adicional, sacrificado no início do estudo, é usado como uma referência. O estudo é dividido em dois experimentos. Os leitões no estudo são fornecidos por uma fazenda certificada.

No primeiro de dois experimentos no estudo, 33 leitões domésticos machos (4 a 5 dias de idade) são alojados em gaiolas de fio de aço inoxidável (2 animais por gaiola) em um ambiente condicionado de 27 a 30 °C. Os animais são alimentados 4 vezes ao dia com uma dieta adaptada para o porco, de acordo com suas necessidades nutricionais. Depois de um período de adaptação de 3 dias, 3 leitões são sacrificados. O momento em que estes animais são sacrificados é considerado “Tempo Zero” no estudo. O restante dos leitões é emparelhado em peso e ninhada, e é dividido em 3 grupos (n=10, n=10, e n=10, respectivamente) que também são alimentados 4 vezes ao dia com as seguintes dietas:

- Dieta A: Similar à Fórmula Infantil Similac® Advance®, disponível da Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, USA, com concentrado de proteína do soro de leite convencional.

- Dietas B e C: Modalidade da fórmula infantil da presente invenção com concentrado de proteína do soro de leite enriquecido em um nível de 7,1 g/L da fórmula com base na matéria natural.

As dietas A, B e C são adaptadas em termos de micronutrientes (minerais e vitaminas) às necessidades especiais dos leitões recém-nascidos. A tabela seguinte mostra a composição das dietas A, B, C, e uma dieta padrão para o porco.

Tabela 3: Dietas Experimentais

	Dieta padrão para o porco por 100 g	Dieta padrão para o porco por 100 ml	Dietas A, B, C por 100 g	Dietas A, B, C por 100 ml
Proteína	25,5	4,79	10,9	1,40

Gordura	36,3	6,82	28,9	3,71
Carboidratos	31	5,83	53	6,81
Cinza	5,2	0,98	5,2	0,67
Umidade	2	0,38	2	0,26
Minerais				
Na (mg)	201,9	37,96	201,9	25,94
K (mg)	800	150,40	800	102,80
Cl (mg)	300	56,40	300	38,55
Fe (mg)	32,7	6,15	32,7	4,20
Zn (mg)	13	2,44	13	1,67
Cu (mg)	0,8	0,15	0,8	0,10
Mg (mg)	61,4	11,54	61,4	7,89
Mn (mg)	0,5	0,09	0,5	0,06
Ca (mg)	1069	200,97	1069	137,37
P (mg)	792	148,90	792	101,77
I (µg)	61,7	11,60	61,7	7,93
Se (µg)	20	3,76	20	2,57
Vitaminas				
Vitamina A (IU)	400	75,20	400	51,40
Vitamina D (IU)	53	9,96	53	6,81
Vitamina E (IU)	5	0,94	5	0,64
Vitamina K (µg)	21,5	4,04	21,5	2,76
Tiamina (B1) (mg)	0,2	0,04	0,2	0,03
Riboflavina (B2) (mg)	0,5	0,09	0,5	0,06
Piridoxina (B6) (mg)	0,317	0,06	0,317	0,04
Cianocobalamina (B12) (µg)	3,5	0,66	3,5	0,45
Ácido pantotênico (mg)	2	0,38	2	0,26
Ácido fólico (µg)	100	18,80	100	12,85
Biotina (µg)	26,5	4,98	26,5	3,41
Niacina (mg)	3	0,56	3	0,39
Vitamina C (mg)	71,25	13,40	71,25	9,16
Colina (mg)	170	31,96	170	21,85
Outros				
Nucleotídeos (mg)	–	–	56,14	7,21
Energia	552,7	103,91	515,7	66,27

Tabela 4

	Dieta A (controle)	Dieta B	Dieta C
Proteína	Milacteal-65 ¹	PSNU 2900 ² (7,1 g/L de matéria natural)	PSNU 2900 ² (7,1 g/L de matéria natural)
Gangliosídeo mg/L	3,2 a 4,8	14	14
Ácido siálico mg/L	115 a 150	190	190
Ácido siálico ligado ao lipídeo (% em peso de ácido siálico total)	< 0,1 %	2,5 a 3,0	2,5 a 3,0
Fosfolipídeo mg/L	118	450	450
Lactoferrina mg/L	2,6	100	100
FOS g/L	0	2	2
Lactoferrina natural - % em peso de lactoferrina	~ 12	~ 12	~ 12
Ácido araquidônico - % em peso de ácidos graxos totais	0,4	0,4	0,2
Ácido docosahexaenóico - % em peso de ácidos graxos totais	0,15	0,15	0,1

1. Milacteal-75, concentrado de proteína do soro de leite, Dairy Specialties, Inc., MILEI GmbH. Alemanha; contém

2. Lacprodan MFGM10, concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, Arla Food Ingredients, Dinamarca

10 Todas as dietas, uma vez preparadas, são usadas imediatamente ou são armazenadas em latas com atmosfera inerte a 4 °C e usadas dentro de 24 horas. As dietas estão na forma de pó e são reconstituídas com água a 18,8 % em peso para a dieta adaptada ao porco e a 12,85 % em peso para as Dietas A, B, e C. As dietas reconstituídas com líquido são vertidas nos alimentadores da gaiola. O líquido remanescente é removido e medido e os alimentadores são limpos antes das alimentações subsequentes. Para cada grupo, 3 ou 4

15 No segundo experimento do estudo, 44 leitões domésticos machos (4 a 5 dias de idade) são alojados individualmente no mesmo tipo de gaiolas e no mesmo ambiente descrito para o primeiro experimento. O protocolo da alimentação é o mesmo e 4 leitões são sacrificados, depois do período adaptativo, para completar o grupo de referência. O restante dos leitões é emparelhado em peso e ninhada e dividido em 3 grupos (n=13, n=13, e n=14, res-

pectivamente) que são alimentados com as dietas A, B e C. Um ou dois leitões são incluídos em cada grupo para substituir as retiradas.

A entrada dietética e ganho de peso são monitorados 4 vezes ao dia e duas vezes semanais, respectivamente, para cada leitão. A incidência e duração da diarreia são registradas e avaliadas. A diarreia é definida como consistência das fezes registrada como aquosa (score de 5) durante 2 dias ou mais com concomitante crescimento acelerado insatisfatório. Uma vez que a diarreia persistente é confirmada, os leitões afetados são tratados com antibióticos seguindo protocolos padrão para o porco recém-nascido.

Resultados

Retiradas

Experimento 1: Um leitão do grupo A é muito pequeno ao nascimento e não cresce como o restante dos leitões. Um porco do grupo C morre 10 dias depois do registro. Um outro porco do grupo C é uma fêmea conforme confirmado no final do experimento. Por conseguinte, n para o grupo A de 29 a 30 dias é 3 ao invés de 4, e n do grupo C na mesma idade é 2 ao invés de 4.

Experimento 2: Um leitão morre durante o período de adaptação. Um outro leitão do grupo B morre 6 dias depois do registro. Dois porcos do grupo A e um do grupo B são excluídos do estudo pelo fato de que eles são muito pequenos ao nascimento e não cresceram como o restante dos leitões.

Por conseguinte, o alvo do estudo concluído de 7 leitões para cada ponto no tempo e grupo é adequado em todos os grupos exceto para o grupo A de 29 a 30 dias (n=6).

Peso corpóreo e entrada dietética

A evolução do peso corpóreo e da entrada dietética é muito similar para os 3 grupos dietéticos diferentes. Não existem diferenças na evolução do peso corpóreo entre os grupos durante a duração do experimento. A entrada dietética é significativamente maior no grupo C do que nos grupos A e B, apenas durante o intervalo de tempo entre 16 e 28 dias. Durante o restante do tempo não existem diferenças entre os grupos. Quando a entrada é representada como entrada dietética acumulada não existem diferenças entre os grupos. Do mesmo modo, a evolução da eficiência do alimento, calculada como gramas de peso corpóreo / 100 kcal da entrada é similar para os 3 grupos. Não existem diferenças entre os grupos quando intervalos diferentes de tempo são considerados ou durante o período do estudo completo.

Diarreia

O número de porcos que sofreu de diarreia durante o estudo é similar para os três grupos dietéticos (nenhuma diferença significativa observada). Entretanto, quando a duração dos episódios de diarreia é analisada (Fig. 7), é possível detectar diferenças significantes entre os grupos. A duração da diarreia é significativamente menor no grupo C do que no

grupo A, e o grupo B mostrou uma tendência ($p=0,1512$) em ser menor do que o grupo A para este parâmetro. De fato, se a correção de Bonferroni não for usada para esta última comparação, uma tendência mais forte é encontrada, com um valor p de 0,0504.

Conclusões

5 A duração da diarreia é significativamente menor no grupo C do que no grupo A, e o grupo B mostrou uma tendência ($p=0,1512$) em ser menor do que a do grupo A para este parâmetro. De fato, se a correção de Bonferroni não for usada para esta última comparação, uma tendência mais forte é encontrada, com um valor p de 0,0504.

10 A duração reduzida da diarreia parece ser o resultado do uso de um concentrado de proteína do soro de leite com níveis enriquecidos de lactoferrina, fosfolípideo, ácido siálico, e gangliosídeos (PSNU 2900 WPC para as Amostras B e C) em comparação a um isolato de proteína do soro de leite convencional (Fórmula Infantil SIMILAC ADVANCE®, Abbot Labs, Columbus, Ohio - modificada para a Amostra A).

EXPERIMENTO III

15 Este segundo estudo animal é conduzido, similar ao protocolo usado no Experimento II, com a diferença que este estudo compara os benefícios de desempenho das seguintes alimentações:

20 Dieta A: Modalidade da fórmula infantil da presente invenção com concentrado de proteína do soro de leite enriquecido em um nível de 6,4 g/L da fórmula com base na matéria natural.

Dieta B: Fórmula Infantil Similac® Advance®, disponível da Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, USA, com concentrado de proteína do soro de leite convencional.

Dieta C: Fórmula Infantil Enfalac DHA+ARA™, disponível da Bristol-Myers Squibb (Tailândia), com concentrado de proteína do soro de leite convencional.

Projeto Experimental

25 O estudo é longitudinal e inclui três grupos de leitões alimentados com dietas experimentais, A, B ou C (vide Tabela 4) com dois pontos no tempo de sacrifício depois de 7 a 8 dias e 14 a 15 dias de alimentação. Um grupo adicional de leitões alimentados com leite de porca é incluído no estudo como uma referência. Os animais no grupo do leite de porca são emparelhados de acordo com a idade para coincidir com os pontos no tempo de sacrifício dos animais alimentados com as dietas experimentais. Os animais do grupo do leite de porca são sacrificados no início do estudo, depois de 14 a 16 dias de idade, e depois de 23 a 24 dias de idade.

35 Sessenta leitões domésticos (3 a 4 dias de idade) são fornecidos por uma fazenda certificada. Oito leitões do grupo de referência do leite de porca são sacrificados. Quarenta e oito dos leitões são emparelhados em peso, ninhada e sexo, e são divididos em 3 grupos ($n=16$, $n=16$, e $n=16$, respectivamente). Quatro dos leitões remanescentes são colocados

aleatoriamente aos 3 grupos (1 ao Grupo A, 1 ao Grupo B, e 2 ao Grupo C). Os leitões são alojados em gaiolas de fio de aço inoxidável em um ambiente condicionado a 27 °C. Os animais são alimentados quatro vezes ao dia com uma dieta adaptada para o porco, de acordo com suas necessidades nutricionais durante o período de três dias. Passados os três dias do período de adaptação, os leitões são alimentados quatro vezes ao dia com uma ou três dietas experimentais. O momento em que os animais são primeiro alimentados com a dieta experimental é considerado "Tempo Zero" no estudo.

As seguintes tabelas mostram a composição da dieta padrão do porco e das dietas A, B e C.

10 Tabela 5: Dietas Experimentais

	Dieta padrão para o porco por 100 g	Dieta padrão para o porco por 100 ml	Dietas A e B por 100 g	Dietas A e B por 100 ml	Dieta C por 100 g	Dieta C por 100 ml
Proteína	25,5	4,79	10,9	1,40	12	1,5
Gordura	36,3	6,82	28,9	3,71	30	3,9
Carboidratos	31	5,83	55,3	7,1	52	6,7
Cinza	5,2	0,98	2,9	0,37	3,5	0,45
Minerais						
Na (mg)	201,9	37,96	126	16	147	19
K (mg)	800	150,40	552	71	620	80
Cl (mg)	300	56,40	342	44	390	50
Fe (mg)	32,7	6,15	9,5	1	9,4	1
Zn (mg)	13	2,44	3,94	1	5,8	1
Cu (mg)	0,8	0,15	0,473	0,061	,370	,048
Mg (mg)	61,4	11,54	32	4	47	6
Mn (mg)	0,5	0,09	0,05	0,006	,076	,01
Ca (mg)	1069	200,97	410	53	390	50
P (mg)	792	148,90	221	28	260	33
I (mcg)	61,7	11,60	32	4	79	10
Se (mcg)	20	3,76	12	2	17,3	2
Vitaminas						
Vitamina A (IU)	400	75,20	1577	203	470	60
Vitamina D (IU)	53	9,96	315	41	310	40
Vitamina E (IU)	5	0,94	16	2	9,4	1

Vitamina K (mcg)	21,5	4,04	42	5	50	6
Tiamina (mg)	0,2	0,04	0,53	,07	0,39	,05
Riboflavina (mg)	0,5	0,09	0,79	0,1	0,85	0,1
Piridoxina (mg)	0,317	0,06	0,32	0,04	0,35	0,05
Cianocobalamina (mcg)	3,5	0,66	1,31	0,17	2,1	0,27
Ácido pantotênico (mg)	2	0,38	2365	304	3000	386
Ácido fólico (mcg)	100	18,80	79	10	84	11
Biotina (mcg)	26,5	4,98	23	3	14,7	2
Niacina (mg)	3	0,56	5,5	1	6,3	1
Vitamina C (mg)	71,25	13,40	47	6	120	15
Outros						
Nucleotídeos (mg)	–	–	56	7	17	2
Energia	552,7	103,91	525	68	523	67

Tabela 6

	Dieta A	Dieta B	Dieta C
Proteína PSNU 2900 ¹ , fórmula infantil g/L	6,9	0	0
Gangliosídeo mg/L	17,2	4	4,6
Ácido siálico mg/L	157	139	248
Ácido siálico ligado ao lipídeo (% em peso de ácido siálico total)	4,4	1,1	0,6
Fosfolipídeo mg/L	440	140	850
Lactoferrina natural - % em peso de lactoferrina	~ 5	~ 12	~ 16
Prebiótico g/L	0,8 g/L de FOS	0	3,6 (GOS + Inulina)
Ácido araquidônico - % em peso de ácidos graxos totais	0,4	0,4	0,65
Ácido docosahexaenóico - % em peso de ácidos graxos totais	0,2	0,15	0,35

1. Lacprodan MFGM10, concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, Arla Food Ingredients, Dinamarca

Todas as dietas, uma vez preparadas, são usadas imediatamente ou são armazenadas em latas com atmosfera inerte a 4 °C e usadas dentro de 24 horas. As dietas estão na forma de pó e são reconstituídas com água a 12,85 % em peso para Dietas A, B, e C. As dietas reconstituídas com líquido são vertidas nos alimentadores da gaiola. O líquido remanescente é removido e medido e os alimentadores são limpos antes das alimentações subsequentes.

Para cada grupo, 8 leitões são sacrificados de 7 a 8 e 14 a 15 dias depois da iniciação da alimentação com controle (Dietas B e C) ou fórmulas experimentais (Dieta A).

Resultados

10 Retiradas

Quatro leitões de cada grupo morrem. Três dos leitões no grupo A e um dos leitões no grupo B morre durante o período de adaptação. Um leitão do grupo B é excluído do estudo, pelo fato de que o leitão é muito pequeno e não cresceu como o restante dos leitões.

15 Por conseguinte, de 7 a 8 dias, n para o grupo A é 7, n para o grupo B é 8, e n para o grupo C é 8. De 14 a 15 dias, n para o grupo A é 6, n para o grupo B é 4, e n para o grupo C é 6.

Peso corpóreo e entrada dietética

A evolução do peso corpóreo e entrada dietética é muito similar para os 3 grupos dietéticos diferentes. Não existem diferenças na evolução do peso corpóreo entre os grupos durante a duração do experimento. Quando a entrada é representada como entrada dietética acumulada não existem diferenças entre os grupos. A evolução da eficiência do alimento, calculada como gramas de peso corpóreo / 100 kcal de entrada, é maior mas não significativamente diferente, no grupo C do que nos grupos A e B, apenas durante o intervalo de tempo entre 7 e 14 dias. Uma variabilidade alta é observada durante o intervalo de tempo entre 25 0 e 6 dias, porém não existem diferenças entre os grupos.

Diarréia

O número de porcos que sofreu de diarréia durante o estudo é similar para os três grupos dietéticos (nenhuma diferença significativa observada). Também não existem diferenças significantes na duração da diarréia entre os grupos (Fig. 8).

30 Conclusões

O experimento I mostra que as fórmulas infantis compreendendo isolato de proteína do soro de leite convencional (Dieta A) não reduzem a duração da diarréia.

35 O experimento 1 também mostra que as fórmulas infantis (Dietas B e C) compreendendo níveis enriquecidos de lactoferrina, fosfolípideo, ácido siálico, e gangliosídeos, cada um dos quais é fornecido no total ou em parte pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido (PSNU 2900 WPC a 7,1 g/L da fórmula com base na matéria natural) reduziram

a duração da diarreia.

O experimento 2 mostra que as fórmulas infantis (Dieta A) compreendendo níveis enriquecidos de lactoferrina, fosfolípido, ácido siálico, e gangliosídeos, porém níveis menores do concentrado de proteína do soro de leite enriquecido (PSNU 2900 WPC a 6,4 g/L da fórmula com base na matéria natural) não reduzem a duração da diarreia.

O resultado de ambos os experimentos sugere, portanto, que as fórmulas infantis compreendendo níveis enriquecidos de lactoferrina, fosfolípido, ácido siálico, e gangliosídeos, reduzam a duração da diarreia, contanto que a fórmula inclua um nível de limiar mínimo do concentrado de proteína do soro de leite enriquecido como definido neste relatório.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes representam modalidades específicas dentro do escopo da presente invenção, cada um dos quais é fornecido somente para o propósito de ilustração e não devem ser interpretados como limitações da presente invenção, visto que muitas variações destes são possíveis sem divergir do espírito e do escopo da invenção. Todas as quantidades exemplificadas são porcentagens em peso com base no peso total da composição, a menos que de outro modo especificado.

Fórmulas Infantis em Pó

As seguintes são modalidades da fórmula em pó da presente invenção, incluindo os métodos de uso da fórmula em crianças. Os ingredientes para cada fórmula são listados na tabela abaixo.

Tabela 5: Exemplos 1 a 4

Ingredientes	EXEMPLO 1	EXEMPLO 2	EXEMPLO 3	EXEMPLO 4
	QUANTIDADE POR 1000 kg DA FÓRMULA			
LACTOSE	428,76 kg	428,76 kg	428,76 kg	525,02 kg
LEITE EM PÓ NÃO GORDUROSO COM BAIXO AQUECIMENTO	200,62 kg	197,62 kg	197,62 kg	N/A kg
ÓLEO DE GIRASSOL COM ALTO TEOR DE ÁCIDO OLÉICO	106,53 kg	106,53 kg	106,53 kg	102,97 kg
ÓLEO DE CÔCO	90,74 kg	91,09 kg	92,87 kg	87,57 kg
ÓLEO DE SOJA	86,37 kg	86,37 kg	86,37 kg	83,49 kg
LACPRONDAN MFGM-10	51,00 kg	53,96 kg	53,96 kg	154,18 kg
CITRATO DE POTÁSSIO	7,20 kg	7,20 kg	7,20 kg	7,20 kg
OLIGOFRUTOSE (FRUTOOLIGOSSACARÍDEO)	7,04 kg	7,04 kg	7,04 kg	7,04 kg

CARBONATO DE CÁLCIO	4,018 kg	4,02 kg	4,02 kg	9,563 kg
ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA)	2,87 kg	2,87 kg	1,44 kg	2,87 kg
CLORETO DE POTÁSSIO	1,614 kg	1,61 kg	1,61 kg	1,717 kg
ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)	1,40 kg	1,05 kg	0,70 kg	1,40 kg
CLORETO DE SÓDIO	1,303 kg	1,30 kg	1,30 kg	3,280 kg
CLORETO DE COLINA	1,04 kg	1,04 kg	1,04 kg	1,04 kg
ÁCIDO ASCÓRBICO	766,88 g	766,88 g	766,88 g	766,88 g
PRÉ MISTURA DE VITAMINA PREMIX 25913	746,460 g	746,46 g	746,46 g	746,460 g
CLORETO DE MAGNÉSIO	641,63 g	641,63 g	641,63 g	2,18 g
SULFATO FERROSO	511,98 g	511,98 g	511,98 g	508,79 g
TAURINA	373,84 g	373,84 g	373,84 g	373,84 g
PALMITATO DE ASCORBILA	349,22 g	349,22 g	349,22 g	349,22 g
PRÉ MISTURA DE VITAMINA A, D, RRR-E, K	345,00 g	345,00 g	345,00 g	345,00 g
M-INOSITOL	254,64 g	254,64 g	254,64 g	254,64 g
5'-MONOFOSFATO DE CITIDINA	243,188 g	243,19 g	243,19 g	243,188 g
5'-MONOFOSFATO DE URIDINA DISSÓDICO 25 %	192,286 g	192,29 g	192,29 g	192,286 g
5'- MONOFOSFATO DE GUANOSINA DISSÓDICO	175,452 g	175,45 g	175,45 g	175,452 g
ANTIOXIDANTE DA GRADEA ALIMENTAR TOCOFEROL-2	166,37 g	166,37 g	166,37 g	166,37 g
SULFATO DE ZINCO	165,70 g	165,70 g	165,70 g	206,02 g
5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA	92,043 g	92,04 g	92,04 g	92,043 g
SULFATO DE COBRE ENCAPSULADO	26,136 g	26,14 g	26,14 g	27,691 g
BETA CAROTENO 30 %	11,64 g	11,64 g	11,64 g	11,64 g
FOSFATO TRICÁLCICO	3,000 g	3,00 g	3,00 g	3,000 g
SULFATO DE MANGANÊS	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g
SELENATO DE SÓDIO	232,03 mg	232,03 mg	232,03 mg	232,03 mg

Cada um dos exemplificados pode ser preparado em uma maneira similar fabricando-se pelo menos duas pastas fluidas separadas que são mais tarde combinadas entre si,

tratadas com calor, padronizadas, evaporadas, secas e acondicionadas.

Inicialmente, em um reservatório de combinação de óleo, sob condições de Nitrogênio, uma pasta fluida de óleo é preparada combinando-se óleo de girassol com alto teor de ácido oléico, óleo de soja e óleo de côco, seguido pela adição de palmitato de ascorbila, beta caroteno, vitamina ADEK e tocoferóis mistos. O reservatório depois é agitado durante 20 minutos e a análise da QA. A seguir da liberação por QA e imediatamente antes do processamento, o óleo ARA, e óleo DHA são adicionados ao reservatório de combinação de óleo. A pasta fluida de óleo resultante é mantida sob agitação moderada na temperatura ambiente (<30 °C) até que mais tarde ela seja combinada com a outra pasta fluida preparada.

A pasta fluida de óleo-leite desnatado é preparada combinando-se a pasta fluida combinação de óleo em aproximadamente 40 % do leite desnatado fluido de 35 a 45 °C em um processo de agitação contínuo seguido pela adição de um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido. Esta pasta fluida óleo-proteína é aquecida de 65 a 70 °C, dois estágios homogeneizados de 154 a 190/25 a 45 bars, esfriada de 3 a 6 °C e armazenada no processo de silo.

A pasta fluida de carboidrato-leite desnatado é preparada dissolvendo-se lactose e leite desnatado em pó em aproximadamente 60 % do leite desnatado fluido de 60 a 75 °C. Esta pasta fluida é mantida sob agitação no reservatório de solubilização durante aproximadamente 2 minutos antes do bombeamento para o trocador de placa onde é esfriada de 3 a 6 °C e transportada para o processo de silo onde é combinada com a pasta fluida de óleo-leite desnatado.

A pasta fluida de mineral 1 é preparada dissolvendo-se cloreto de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e citrato de potássio em água na temperatura ambiente e mantida sob agitação durante um mínimo de 5 minutos. A pasta fluida de mineral 1 é adicionada no processo de silo.

A pasta fluida de mineral 2 é preparada dissolvendo-se fosfato tricálcico e carbonato de cálcio em água de 40 a 60 °C e mantida sob agitação durante um mínimo de 5 minutos. A pasta fluida de mineral 2 é adicionada no processo de silo.

A pasta fluida de oligofrutose é preparada dissolvendo-se oligofrutose em água de 40 a 60 °C e mantida sob agitação durante um mínimo de 5 minutos. A pasta fluida de oligofrutose é adicionada no processo de silo.

O lote é agitado no processo de silo durante um mínimo de 45 minutos antes de tomar uma amostra para o teste analítico. Com base nos resultados analíticos dos testes de controle de qualidade, um processo de padronização apropriado é realizado.

A pasta fluida de Vitamina C é preparada dissolvendo-se citrato de potássio e ácido ascórbico em água na temperatura ambiente e mantida sob agitação durante um mínimo de

5 minutos. A pasta fluida de Vitamina C é adicionada no processo de silo.

A pasta fluida de vitaminas-inositol solúvel em água é preparada dissolvendo-se citrato de potássio, pré mistura de vitamina solúvel em água e inositol em água de 40 a 60 °C e mantida sob agitação durante um mínimo de 5 minutos. A pasta fluida de vitamina-inositol solúvel em água é adicionada no processo de silo.

A pasta fluida de sulfato ferroso é preparada dissolvendo-se citrato de potássio e sulfato ferroso em água na temperatura ambiente e mantida sob agitação durante um mínimo de 5 minutos.

A pasta fluida nucleotídeos-colina é preparada dissolvendo-se pré mistura de nucleotídeo-colina em água na temperatura ambiente e mantida sob agitação durante um mínimo de 5 minutos. A pasta fluida de nucleotídeos-colina é adicionada no processo de silo.

O lote final é agitado no processo de silo durante um mínimo de 60 minutos antes de tomar uma amostra para o teste analítico. Com base nos resultados analíticos dos testes de controle de qualidade, uma vitamina C apropriada e a correção do pH podem ser realizadas. O lote final é mantido sob agitação moderada de 3 a 6 °C.

Depois de esperar durante um período de não mais do que 7 dias, a combinação resultante é pré aquecida de 90 a 96 °C, aquecida de 110 a 130 °C durante 3 segundos. A combinação aquecida é passada através de um resfriador instantâneo para reduzir a temperatura de 93 a 97 °C e depois através de um evaporador para obter os sólidos desejados. O produto depois é aquecido de 75 a 78 °C e bombeado à torre de pulverização-secagem. O produto em pó resultante é coletado e armazenado em silos do pó a granel e testado quanto à qualidade. O produto acabado depois é colocado em recipientes adequados. As amostras são tomadas para o teste microbiológico e analítico tanto durante o processo em andamento quanto nos estágios do produto acabado.

Processo Alternativo

Cada um dos exemplificados pode ser preparado em uma maneira similar fabricando-se pelo menos duas pastas fluidas separadas que são mais tarde combinadas entre si, tratadas com calor, padronizadas, secas, misturadas a seco e acondicionadas.

Inicialmente, a pasta fluida de leite desnatado-mineral é preparada dissolvendo-se aproximadamente 80 % do leite desnatado em pó em água desmineralizada de 60 a 65 °C, seguido pela adição de citrato de potássio e hidróxido de potássio. O pH da combinação resultante é ajustado de 7,7 a 8,7 com hidróxido de potássio ou ácido cítrico.

O restante do leite desnatado em pó e cloreto de magnésio é adicionado à combinação prévia. O pH da combinação resultante é ajustado de 6,7 a 7,2 com hidróxido de potássio ou ácido cítrico.

Em um reservatório separado, uma nova pasta fluida é preparada dissolvendo-se cloreto de colina e inositol em água desmineralizada na temperatura ambiente. A pasta flui-

da resultante é combinada com a pasta fluida de leite desnatado-mineral e é mantida sob agitação moderada de 60 a 65 °C durante não mais do que 1 hora até que ela seja mais tarde combinada com os ingredientes adicionais.

Em um reservatório separado, uma nova pasta fluida é preparada dissolvendo-se Taurina em água desmineralizada a 70 °C. A pasta fluida resultante é combinada com a pasta fluida de leite desnatado-mineral e é mantida sob agitação moderada de 60 a 65 °C durante não mais do que 1 hora até que ela seja mais tarde combinada com os ingredientes adicionais.

Um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido é adicionado à pasta fluida de leite desnatado-mineral seguido por lactose e oligofrutose. A pasta fluida é agitada no processo de silo durante um mínimo de 30 minutos antes de tomar uma amostra para o teste analítico. O pH da combinação resultante é ajustado de 6,5 a 7,1 com hidróxido de potássio ou ácido cítrico.

Em um reservatório de processo de óleo, sob condições de Nitrogênio, uma pasta fluida de óleo é preparada combinando-se óleo de girassol com alto teor de ácido oléico, óleo de soja e óleo de côco, seguido pela adição de vitamina ADEK Beta caroteno, tocoferóis mistos, palmitato de ascorbila, óleo ARA, e óleo DHA. A pasta fluida de óleo resultante é mantida sob agitação moderada na temperatura ambiente durante não mais do que seis horas até que ela seja mais tarde combinada com a pasta fluida de proteína-carboidrato-mineral.

Depois de esperar durante um período de não menos do que 30 minutos nem mais do que 6 horas, a pasta fluida de proteína-carboidrato-mineral é desaerada de 70 a 80 °C e aquecida ainda de 84 a 86 °C. Neste ponto do processo, a pasta fluida de óleo é injetada em linha de 50 a 80 °C. A combinação final é esfriada de 68 a 72 °C e emulsificada através de um homogeneizador de duplo estágio de 145 a 155 bars no primeiro estágio e de 30 a 40 bars no segundo estágio. A combinação aquecida é passada através de um resfriador de placa para reduzir a temperatura de 3 a 5 °C e é armazenada em um processo de silo.

Uma solução mineral e uma solução de ácido ascórbico são preparadas separadamente adicionando-se os ingredientes seguintes ao combinado processado. A solução mineral é preparada adicionando-se os ingredientes seguintes a uma quantidade suficiente de água desmineralizada com agitação: ácido cítrico, sulfato de manganês, selenato de sódio e sulfato de zinco. A solução de ácido ascórbico é preparada adicionando-se ácido ascórbico a uma quantidade de água desmineralizada para dissolver o ingrediente. A combinação processada é mantida sob agitação moderada de 3 a 5 °C durante não mais do que 48 horas. As amostras são tomadas para o teste analítico.

A combinação esfriada depois é aquecida de 69 a 73 °C e homogeneizada de 60 a 70/30 a 40 bars e enviada à torre de pulverização-secagem. O produto à base de pó é cole-

tado e armazenado em recipientes para pó a granel. As amostras são tomadas para o teste microbiológico e analítico.

Depois que os testes analíticos e microbiológicos correspondentes são concluídos, o produto à base de pó é liberado para a mistura a seco do restante dos ingredientes. As quantidades dos ingredientes remanescentes necessários para obter o produto em pó final são determinadas e introduzidas no sistema automático de peso. O sistema pesa cada componente da pré mistura da combinação a seco (pré mistura de lactose, carbonato de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, água solúvel, nucleotídeo citidina-5-monofosfato, nucleotídeo uridina-5-monofosfato dissódico, nucleotídeo guanosina-5-monofosfato dissódico, nucleotídeo adenosina-5-monofosfato, sulfato de cobre e fosfato de cálcio tribásico. O produto à base de pó e a pré mistura da combinação a seco são transportados ao liquidificador. A combinação é mantida sob agitação durante um período de não menos do que 20 minutos.

Depois que a combinação é concluída, o produto acabado é transportado à máquina de empacotamento e colocado em recipientes adequados. As amostras são tomadas para o teste microbiológico e analítico.

As fórmulas exemplificadas (Exemplos 1 a 4) são exemplos não limitantes das modalidades da fórmula em pó da presente invenção. Cada fórmula é reconstituída com água antes do uso a uma variação de densidade calórica de cerca de 19 a cerca de 24 kcal/fl oz, e depois dada como alimento a uma criança como uma fonte exclusiva de nutrição durante os primeiros 9 meses de vida, incluindo os primeiros 4 meses de vida. As crianças utilizando o experimento da fórmula reduzem o risco de diarréia e doença menos severas na forma da duração reduzida da diarréia quando sofrendo com a mesma. Estas crianças também desenvolvem uma microflora intestinal similar àquela de lactentes.

25 Fórmulas Infantis Líquidas

Os Exemplos 1 a 4 são modificados por meios convencionais para formar modalidades de fórmula líquida pronta para o consumo (Exemplos 5 a 8) da presente invenção. Os ingredientes dos Exemplos 5 a 8 correspondem aos ingredientes dos Exemplos 1 a 4, respectivamente.

30 As fórmulas exemplificadas (Exemplos 5 a 8) são exemplos não limitantes das modalidades de fórmula líquida da presente invenção. Cada fórmula é ajustada a uma variação de densidade calórica de cerca de 19 a cerca de 24 kcal/fl oz. A fórmula é dada como alimento a uma criança como uma fonte exclusiva de nutrição durante os primeiros 9 meses de vida, incluindo os primeiros 4 meses de vida. As crianças utilizando o experimento da fórmula reduzem o risco de diarréia na forma da duração reduzida da diarréia quando sofrendo com a mesma. Estas crianças também desenvolvem um perfil de atividade metabólica intestinal similar àquele de lactentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Fórmula infantil, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende, com base na matéria natural:

(A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos,

5 (B) pelo menos cerca de 150 mg/L de fosfolídeos,

(C) lactoferrina, e

(D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico, com pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico como ácido siálico ligado ao lipídeo;

10 em que de cerca de 50 % a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, o dito concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

2. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o ácido siálico ligado ao lipídeo representa de cerca de 2,7 % a cerca de 5 % em peso do ácido siálico total.

3. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende, com base na matéria natural, (A) de cerca de 7 mg/L a cerca de 50 mg/L de gangliosídeos, (B) de cerca de 200 mg/L a cerca de 600 mg/L de fosfolídeos, e (C) de cerca de 90 mg/L a cerca de 250 mg/L de ácido siálico.

20 4. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende, com base na matéria natural, de cerca de 50 mg/L a cerca de 2000 mg/L de lactoferrina, com pelo menos cerca de 6 % em peso da lactoferrina como lactoferrina natural.

25 5. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o fosfolídeo total compreende pelo menos 20 % em peso de esfingomielina.

6. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 5, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o fosfolídeo compreende esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, e fosfatidilserina.

30 7. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda de cerca de 0,05 % a cerca de 5 % de um fruto-polissacarídeo.

8. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a fórmula contém menos do que cerca de 0,5 % de glicomacropéptidos livres, com base na matéria natural.

35 9. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a fórmula infantil é substancialmente livre de fosfolídeos, fosfolídeos do ovo, e combinações destes.

10. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato

de que a fórmula infantil compreende menos do que cerca de 0,2 % em peso de gordura do leite com base na matéria natural.

11. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a fórmula infantil é um pó.

5 12. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a fórmula infantil é um líquido pronto para o consumo.

13. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende, com base na matéria natural, de cerca de 6,5 g/L a cerca de 10,9 g/L de concentrado de proteína do soro de leite enriquecido.

10 14. Fórmula infantil, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que de cerca de 60 % a cerca de 90 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, o dito concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

15 15. Uso, com base na matéria natural, de:

(A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos,

(B) pelo menos cerca de 150 mg/L de fosfolipídeos,

(C) lactoferrina,

20 (D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico total com pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico como ácido siálico ligado ao lipídeo;

o dito uso **CHARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de uma fórmula infantil para reduzir o risco de diarreia em uma criança, em que de cerca de 50 % a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, o dito concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

25 16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula é administrada como uma fonte exclusiva de nutrição.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula infantil compreende, com base na matéria natural, de cerca de 50 mg/L a cerca de 30 2000 mg/L de lactoferrina, com pelo menos cerca de 6 % em peso da lactoferrina como lactoferrina natural.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o ácido siálico ligado ao lipídeo representa de cerca de 2,7 % a cerca de 5 % em peso do ácido siálico total.

35 19. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula infantil compreende, com base na matéria natural, (A) de cerca de 7 mg/L a cerca de 50 mg/L de gangliosídeos, (B) de cerca de 200 mg/L a cerca de 600 mg/L de fosfolipí-

deos, e (C) de cerca de 90 mg/L a cerca de 250 mg/L de ácido siálico.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o fosfolípídeo total compreende pelo menos 20 % em peso de esfingomielina.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula infantil compreende menos do que cerca de 0,2 % em peso de gordura do leite com base na matéria natural.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula compreende menos do que 0,5 % em peso de glicomacropéptídeos livres com base na matéria natural.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula infantil compreende, com base na matéria natural, de cerca de 6,5 g/L a cerca de 10,9 g/L de concentrado de proteína do soro de leite enriquecido.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que de cerca de 60 % a cerca de 90 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolípídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, o dito concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

25. Uso, com base na matéria natural, de:

(A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos,

(B) pelo menos cerca de 150 mg/L de fosfolípídeos,

(C) lactoferrina,

(D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico total com pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico como ácido siálico ligado ao lipídeo;

o dito uso **CHARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de uma fórmula infantil para produzir um perfil de microflora intestinal similar àquele de lactentes, em que de cerca de 50 % a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolípídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, o dito concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula infantil com base na matéria natural.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula compreende, com base na matéria natural, de cerca de 50 mg/L a cerca de 2000 mg/L de lactoferrina, com pelo menos cerca de 6 % em peso da lactoferrina como lactoferrina natural.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula infantil compreende, com base na matéria natural, de cerca de 6,5 g/L a cerca de 10,9 g/L de concentrado de proteína do soro de leite enriquecido.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que de

cerca de 60 % a cerca de 90 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos pelo concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, o dito concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.

5 29. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que de cerca de 50 % a 100 % em peso da combinação de gangliosídeos, fosfolipídeos, e ácido siálico são a partir de um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido.

10 30. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o ácido siálico ligado ao lipídeo representa de cerca de 2,7 % a cerca de 5 % em peso do ácido siálico total.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula compreende, com base na matéria natural, (A) de cerca de 7 mg/L a cerca de 50 mg/L de gangliosídeos, (B) de cerca de 200 mg/L a cerca de 600 mg/L de fosfolipídeos, e (C) de cerca de 90 mg/L a cerca de 250 mg/L de ácido siálico.

15 32. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o fosfolipídeo total compreende pelo menos 20 % em peso de esfingomielina.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula compreende menos do que cerca de 0,2 % em peso de gordura do leite com base na matéria natural.

20 34. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula compreende menos do que 0,5 % em peso de glicomacropéptidos livres com base na matéria natural.

35. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fórmula compreende ainda de cerca de 0,05 % a cerca de 5 % de um fruto-polissacarídeo.

Fig. 1. Perfil de ácido graxo de cadeia curta para fórmula infantil convencional com 0,5 g/L de FOS depois de 72 horas na presença da flora do lactente.

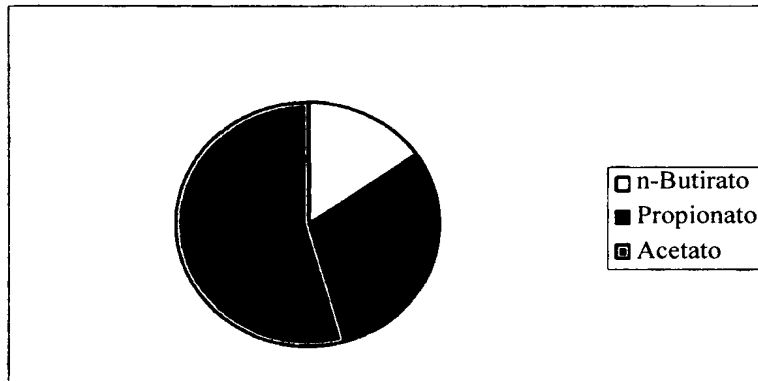


Fig. 2. Perfil de ácido graxo de cadeia curta para fórmula infantil convencional com 2,0 g/L de FOS de cadeia curta depois de 72 h na presença da flora do lactente.

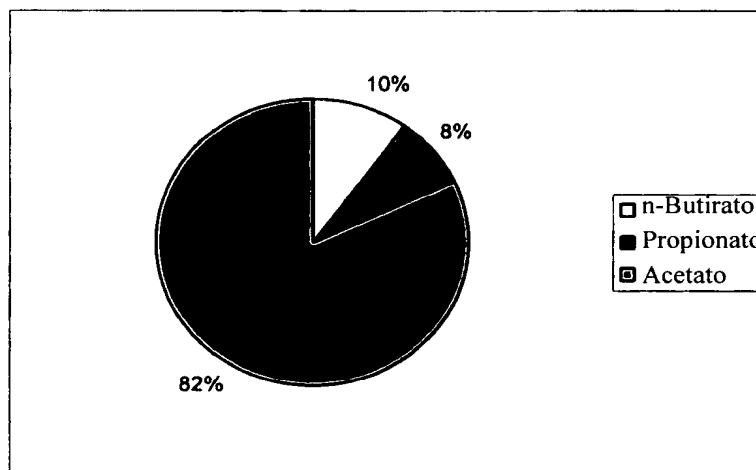


Fig. 3. Perfil de ácido graxo de cadeia curta para fórmula infantil convencional com 2,0 g/L de FOS de cadeia curta depois de 72 h na presença da flora do lactente.

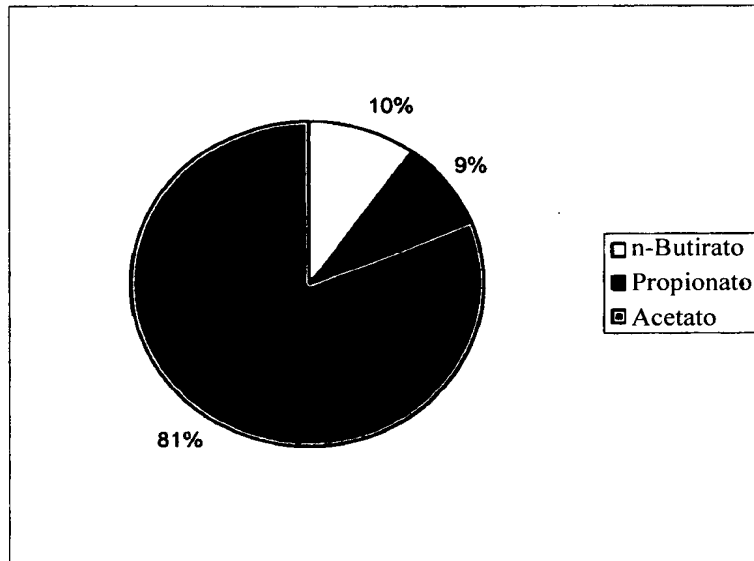


Fig. 4. Perfil de ácido graxo de cadeia curta para a modalidade da fórmula infantil da presente invenção com 0,8 g/L de FOS depois de 72 h na presença da flora do lactente.

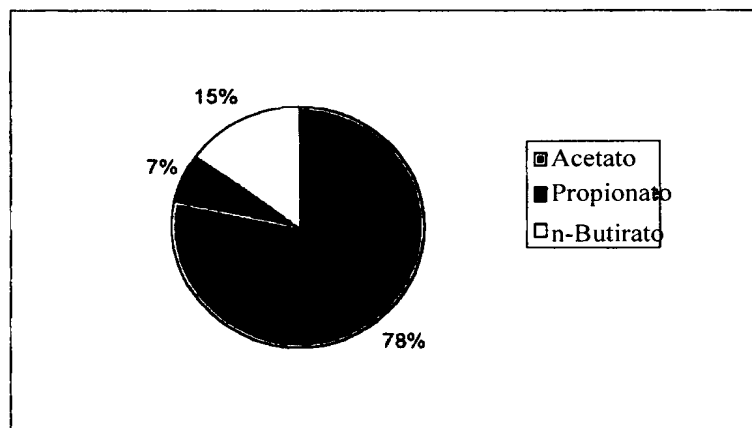


Fig. 5. Perfil de ácido graxo de cadeia curta típico no cólon de lactentes.

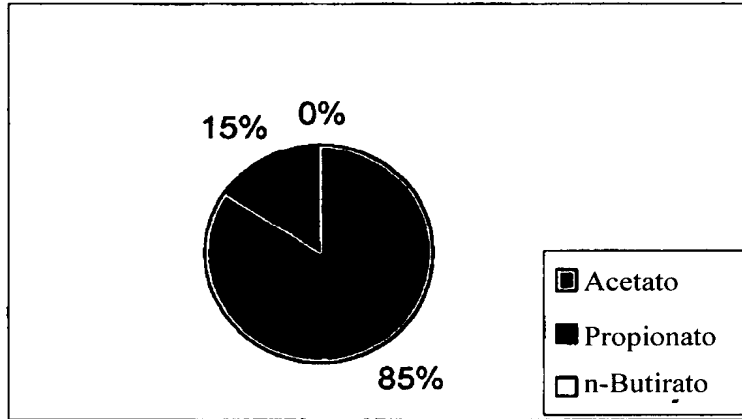
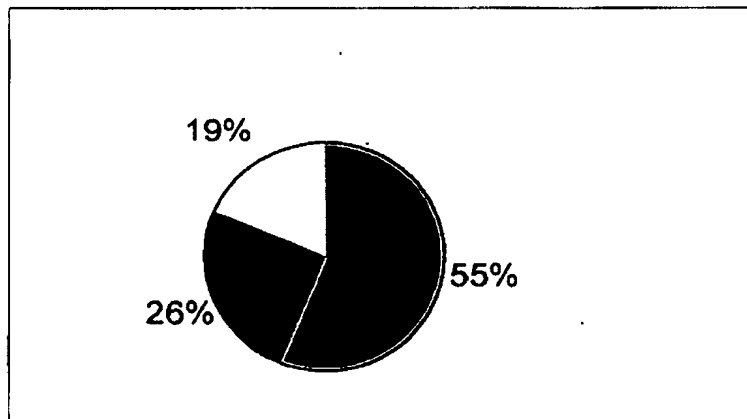


Fig. 6. Perfil de ácido graxo de cadeia curta típico no cólon de crianças alimentadas com fórmulas infantis com base em leite convencionais como uma fonte exclusiva de nutrição.



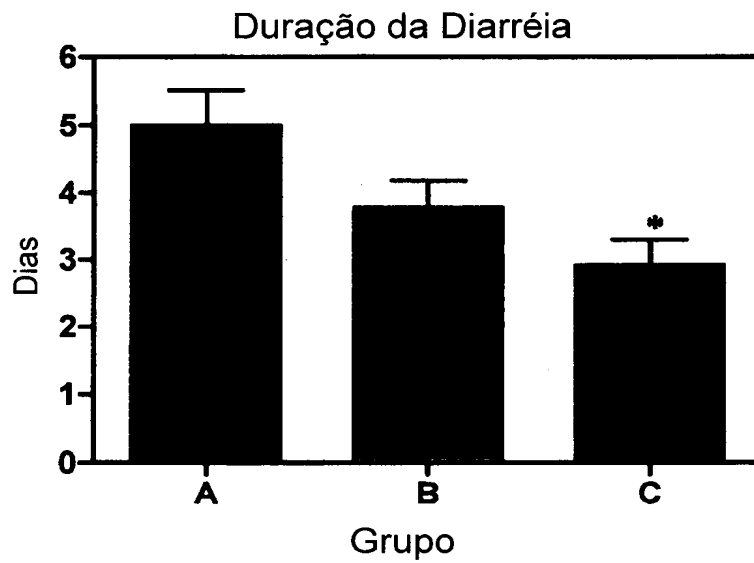


Fig. 7. Duração de episódios de diarréia em leitões alimentados com dietas diferentes (Grupo A - Fórmula convencional; Grupos B e C - modalidades da fórmula da presente invenção). Dados são Média \pm SEM. (*) Significativamente diferente do grupo A ($p < 0,05$)

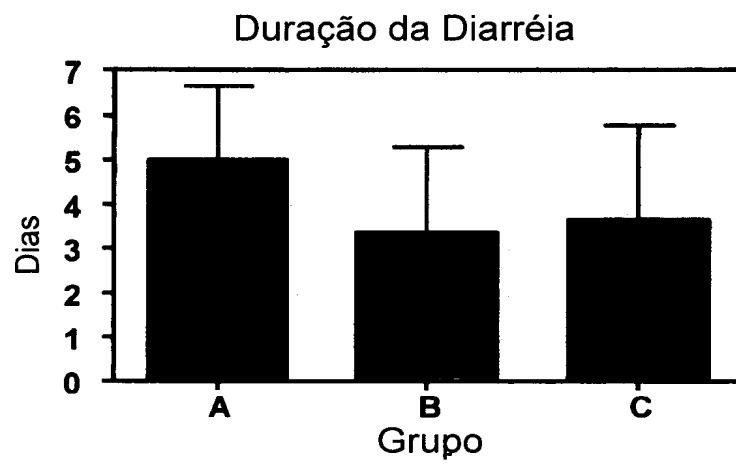


Fig. 8. Duração (dias) de episódios de diarréia em leitões alimentados com as dietas do Experimento III (Dieta A, B ou C).

RESUMO

"FÓRMULAS INFANTIS ENRIQUECIDAS E USOS"

- Divulgadas são fórmulas infantis compreendendo, com base na matéria natural, (A) pelo menos cerca de 5 mg/L de gangliosídeos, (B) pelo menos 150 mg/L de fosfolipídeos,
- 5 (C) lactoferrina, e (D) pelo menos cerca de 70 mg/L de ácido siálico, com pelo menos cerca de 2,5 % em peso do ácido siálico como ácido siálico ligado ao lipídeo. De cerca de 50 % a 100 % em peso de cada um dos gangliosídeos, fosfolipídeos, lactoferrina, e ácido siálico são fornecidos por um concentrado de proteína do soro de leite enriquecido, com o concentrado representando pelo menos cerca de 6,5 g/L da fórmula com base na matéria natural.
- 10 Também divulgados são métodos de usar a fórmula para reduzir o risco de crianças com diarreia, e produzir um perfil de microflora intestinal similar àquele de lactentes.