



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014008944-2 B1**



**(22) Data do Depósito:** 12/10/2012

**(45) Data de Concessão:** 15/09/2020

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL SIMBIÓTICA COMPREENDENDO LC-PUFA, PROBIÓTICO E MISTURA DE OLIGOSSACARÍDEOS PARA CRESCIMENTO CEREBRAL E/OU DESENVOLVIMENTO COGNITIVO E/OU PSICOMOTOR

**(51) Int.Cl.:** A23L 33/00; A23L 33/12; A23L 33/135; A23L 33/21; A61K 31/702; (...).

**(52) CPC:** A61K 35/741; A23L 33/105; A23L 33/12; A23L 33/135; A23L 33/21; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 18/10/2011 EP 11 185600.1.

**(73) Titular(es):** SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A..

**(72) Inventor(es):** CLARA GARCIA-RODENAS; KURT ORNSTEIN.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2012070281 de 12/10/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/057049 de 25/04/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 14/04/2014

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO E SEUS USOS PARA CRESCIMENTO CEREBRAL E/OU DESENVOLVIMENTO COGNITIVO E/OU PSICOMOTOR. A presente invenção se refere a uma composição que compreende pelo menos um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa, pelo menos um probiótico e uma mistura de oligossacarídeos, a dita mistura contendo pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado, pelo menos um oligossacarídeo sialilado e pelo menos um oligossacarídeo neutro, para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor. Essa composição é particularmente adaptada para uso em bebês, notavelmente bebês prematuros. A presente invenção também se refere ao uso da referida composição como um agente nutricional sintético, para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor, bem como a o uso da referida composição para preparar um agente nutricional sintético para promoção do crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL SIMBIÓTICA COMPREENDENDO  
LC-PUFA, PROBIÓTICO E MISTURA DE OLIGOSSACARÍDEOS  
PARA CRESCIMENTO CEREBRAL E/OU DESENVOLVIMENTO  
COGNITIVO E/OU PSICOMOTOR".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a uma composição para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor. Essa composição é para uso em mamíferos, preferivelmente em seres humanos, mais preferivelmente em crianças.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Durante o desenvolvimento, especialmente nos primeiros anos de vida, as crianças mostram padrões interessantes de desenvolvimento neural e um alto grau de neuroplasticidade. O relacionamento do desenvolvimento cerebral e o desenvolvimento cognitivo é extremamente complexo e, desde 1990, uma área crescente de pesquisa.

[003] Alguns desenvolvimentos novos pretendem provar uma ligação entre o crescimento do cérebro e o desenvolvimento cognitivo em crianças e, particularmente, em bebês prematuros ou recém-nascidos com idade gestacional extremamente baixa (ELGANs) (*J. Pediatr.* 2009; 155:344-9).

[004] Portanto, há um grande interesse na promoção do crescimento cerebral, particularmente em crianças prematuras, tal que seja favorecido seu desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[005] A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa tem sido proposta para promover o desenvolvimento cognitivo e psicomotor e vários testes clínicos têm investigado essa hipótese. Entretanto, uma meta-análise recente que combinou esses dados não mostrou um efeito significativo da suplementação sobre o

neurodesenvolvimento (Schulzke SM, Patole SK, Simmer K, Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants (Review) The Cochrane Library 2011, Issue 2).

[006] O desenvolvimento cognitivo também pode ser aperfeiçoado em crianças prematuras aumentando grandemente a ingestão de proteína e energia (I Brandt, E.J. Sticker e M.J. Lentze, catch-up growth of head circumference of very low birth weight, small gestational age preterm infants and mental development to adulthood, *J. Pediatr* 2003; 142:463-8). Entretanto, os grandes volumes de alimentação enteral e/ou a alta densidade de proteína/energia das alimentações podem induzir a intolerância à alimentação. Adicionalmente, a grande ingestão de proteína que leva a produção aumentada de ureia, pode aumentar o risco de insuficiência renal e acidose metabólica em crianças prematuras. Adicionalmente, a ingestão de muita proteína/energia durante a infância tem sido associada a alterações de longo prazo sobre a saúde metabólica (risco aumentado de obesidade, diabetes tipo II e doença cardiovascular) (KK ONG & RJF LOOS, Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: Systematic reviews and hopeful suggestions *Acta Pædiatrica*, 2006; 95: 904 908; J Rotteveel, MM van Weissenbruch, JWR Twisk, HA Delemarre-Van de Waal, Infant and Childhood Growth Patterns, Insulin Sensitivity, and Blood Pressure in Prematurely Born Young Adults *Pediatrics* 2008;122:313–321).

[007] Há necessidade de uma composição nutricional para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor, em particular em lactentes e crianças pequenas, preferivelmente lactentes, que nasceram prematuros ou com baixo peso ao nascer (LBW) ou que experimentaram retardo do crescimento intrauterino (IUGR) ou que sofreram de retardo no crescimento devido à desnutrição, tal como nutrição uterina subótima e/ou doença.

[008] Há uma necessidade mais geral dessa intervenção nutricional em mamíferos jovens, em particular lactentes e crianças, preferivelmente crianças, mas também filhotes jovens.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] Os presentes inventores constataram surpreendentemente que a administração de uma mistura de oligossacarídeos específicos em combinação com pelo menos um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LC-PUFA) e pelo menos um probiótico, é particularmente eficaz no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[0010] Consequentemente, a presente invenção fornece uma composição compreendendo pelo menos um LC-PUFA, pelo menos um probiótico e uma mistura de oligossacarídeos, a dita mistura contendo pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado, pelo menos um oligossacarídeo sialilado e pelo menos um oligossacarídeo neutro, para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[0011] A composição de acordo com a invenção é preferivelmente uma composição nutricional.

[0012] O LC-PUFA é preferivelmente selecionado entre ácido araquidônico (ARA) e ácido oicodocosa-hexaenoico (DHA), mais preferivelmente o LC-PUFA é uma mistura de ARA e DHA.

[0013] O probiótico é preferivelmente selecionado entre cepas de bactérias probióticas, mais preferivelmente o probiótico é um *lactobacillus* ou uma *bifidobacterium*. Em uma modalidade preferida, o probiótico é *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus reuteri*.

[0014] O oligossacarídeo neutro é preferivelmente selecionado entre fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS), preferivelmente GOS.

[0015] Em uma modalidade, a mistura de oligossacarídeo pode ser

derivada de leite de origem animal, tal como um ou mais de leite de vaca, cabra, ovelha ou búfala. Por exemplo, ele foi obtido pelo fracionamento do leite de vaca e tratamento enzimático posterior.

[0016] Em uma segunda modalidade, a mistura de oligossacarídeo pode ser preparada usando meios enzimáticos, quimio-enzimáticos e/ou químicos.

[0017] Em uma terceira modalidade, a mistura de oligossacarídeos pode ser preparada usando tecnologias de fermentação por levedura e/ou bacteriana. Por exemplo, células de levedura e/ou bacterianas que expressam as enzimas adequadas tal como glicosidases e/ou glicosiltransferases depois da modificação genética ou não, podem ser usadas para essa finalidade.

[0018] A composição da invenção é preferivelmente usada para crianças que nasceram prematuras ou com baixo peso ao nascer (LBW) ou que experimentaram retardo de crescimento intrauterino (IUGR) e/ou que sofreram retardo do crescimento devido à doença e/ou má nutrição.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0019] Como usados aqui, as seguintes expressões possuem os seguintes significados.

[0020] A expressão "criança" significa um ser humano entre os estágios do nascimento e puberdade. Um adulto é um ser humano mais velho do que uma criança.

[0021] A expressão "lactente" significa uma criança abaixo da idade de 12 meses.

[0022] A expressão "bebê prematuro" (ou "criança prematura") significa uma criança nascida com menos do que 37 semanas de idade gestacional.

[0023] A expressão "criança com baixo peso ao nascer" significa uma criança nascida viva que tenha um peso inferior a 2500 g.

[0024] A expressão "criança pequena" significa uma criança com idade entre um e três anos.

[0025] A expressão "fórmula infantil" significa um gênero alimentício pretendido para um uso nutricional em particular por bebês durante os primeiros quatro a seis meses de vida e que satisfaz por ele mesmo as necessidades nutricionais dessa categoria de pessoa (Artigo 1.2 da European Commission Directive 91/321/EEC de 14 de maio de 1991 sobre fórmulas infantis e fórmulas de transição).

[0026] A expressão "fórmula infantil para prematuro" significa uma fórmula infantil pretendida para um bebê prematuro.

[0027] A expressão "fortificante para leite humano" significa um suplemento usado para aumentar as calorias, proteínas, minerais e vitaminas no leite materno para bebês prematuros ou bebês com baixo peso ao nascer.

[0028] A expressão "fórmula de transição" significa um alimento pretendido para uso nutricional particular pelos bebês acima de quatro meses e que constitui o elemento líquido principal na dieta progressivamente diversificada dessa categoria de pessoa.

[0029] A expressão "fórmula infantil inicial" significa um alimento pretendido para uso nutricional em particular por bebês durante os primeiros quatro meses de vida.

[0030] A expressão "alimento para bebê" significa um alimento pretendido para uso nutricional, em particular por crianças, durante os primeiros anos de vida.

[0031] A expressão "composição de cereal infantil" significa um alimento pretendido para uso nutricional, em particular por crianças, durante os primeiros anos de vida.

[0032] A expressão "leite de crescimento" significa uma bebida à base de leite adaptada para as necessidades específicas nutricionais de crianças pequenas.

[0033] A expressão "período de desmame" significa o período durante o qual o leite materno ou a fórmula infantil são parcialmente ou totalmente substituídos por outro alimento na dieta de uma criança. A expressão "crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor" significa o suporte do crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[0034] A expressão "composição nutricional" significa uma composição que nutre um indivíduo. Essa composição nutricional é geralmente para ser dada por via oral, intragástrica ou intravenosa e geralmente inclui um lipídeo ou uma fonte de gordura e uma fonte de proteína.

[0035] A expressão "mistura sintética" significa uma mistura obtida por meios químicos e/ou biológicos, que pode ser quimicamente idêntica à mistura que ocorre naturalmente nos leites de mamíferos.

[0036] A expressão "composição hipoalergênica" significa uma composição que improvavelmente causa reações alérgicas.

[0037] A expressão "probiótico" significa preparações de células microbianas ou componentes de células microbianas ou metabolitos de células microbianas com um efeito benéfico sobre a saúde ou o bem-estar do hospedeiro. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al. *"Probiotics: how should they be defined"* Trends Food Sci. Technol. 1999;10 107-10).

[0038] A expressão "oligossacarídeo" significa um carboidrato que possui um grau de polimerização (DP) que varia entre 2 e 20 inclusive, mas que não inclui lactose.

[0039] A expressão "oligossacarídeo neutro" significa um oligossacarídeo que não possui carga e nem resíduo N-acetila.

[0040] A expressão "oligossacarídeo sialilado" significa um oligossacarídeo que possui um resíduo de ácido siálico (tal como ácido N-acetilneuramínico e/ou ácido N-glicolilneuramínico).

[0041] A expressão oligossacarídeo "N-acetilado" significa um oligossacarídeo que possui pelo menos uma hexose que carrega um resíduo N-acetil.

[0042] Todos os percentuais são em peso a menos que estabelecido de outra maneira.

[0043] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo

pelo menos um LC-PUFA,

pelo menos um probiótico, e

uma mistura de oligossacarídeos, a dita mistura contendo

pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado selecionado do grupo compreendendo  $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=3'\text{GalNAc-lac} = \text{N-acetil-galactosaminil-lactose}$ ),  $\text{Gal}\beta 1,6\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=6'\text{Gal-3GalNAc-lac} = \text{galactosil-N-acetil-galactosaminil-lactose}$ ),  $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  (lacto-N-neotetraose ou LNnT) e  $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1$  (lacto-N-tetraose ou LNT), pelo menos um oligossacarídeo sialilado selecionado do grupo que compreende  $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=3'\text{-sialilactose}$ ) e  $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=6'\text{-sialilactose}$ ), e pelo menos um oligossacarídeo neutro selecionado do grupo que compreende  $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}$  ( $=\beta 1,6\text{-digalactosídeo}$ );  $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=6'\text{Gal-lac}$ );  $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Glc}$ ;  $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Glc}$ ;  $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=3'\text{Gal-lac}$ );  $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=6',6\text{-diGal-lac}$ );  $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=6',3\text{-diGal-lac}$ );  $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=3',6\text{-diGal-lac}$ );  $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=3',3\text{-diGal-lac}$ );  $\text{Gal}\beta 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=4'\text{Gal-lac}$ ) e  $\text{Gal}\beta 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=4',4\text{-diGal-lac}$ ); e  $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  ( $=2'\text{ fucosilactose ou FL}$ ),

para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[0044] Em um segundo aspecto, a invenção se refere a uma



composição que compreende pelo menos um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa, pelo menos um probiótico e uma mistura de oligossacarídeo que compreende:

0,25 a 20% em peso, preferivelmente 0,3 a 10% em peso, mais preferivelmente 0,3 a 5% em peso e até mais preferivelmente cerca de 0,5% em peso, com relação ao peso total da mistura de oligossacarídeo, de pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado,

0,5 a 30% em peso, preferivelmente 0,75 a 15% em peso, mais preferivelmente 0,75 a 10% em peso e até mais preferivelmente cerca de 1% em peso, com relação ao peso total da mistura de oligossacarídeo, de pelo menos um oligossacarídeo sialilado e

50 a 99,3% em peso, preferivelmente 20 a 80% em peso, mais preferivelmente 10 a 50% em peso e até mais preferivelmente cerca de 50% em peso, com relação ao peso total da mistura de oligossacarídeo, de pelo menos um oligossacarídeo neutro,

para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[0045] De acordo com uma modalidade preferida, a mistura de oligossacarídeo está presente em uma quantidade de 0,5 a 70%, mais preferivelmente 1 a 20%, até mais preferivelmente 2 a 5% com relação ao peso total da composição.

[0046] Os compostos de oligossacarídeo são definidos por suas estruturas, onde GalNAc é N-acetil galactosamina, GlcNAc é N-acetil glucosamina, Gal é galactose, NeuAc é ácido N-acetil neuraminico, Glc é glicose e Fuc é fucose.

[0047] A mistura de oligossacarídeo da composição de acordo com a invenção pode ser a única fonte de oligossacarídeo na composição.

[0048] Em uma primeira modalidade, o oligossacarídeo neutro é preferivelmente selecionado entre FOS e GOS, preferivelmente GOS tal como aqueles citados acima.

[0049] Em uma segunda modalidade, independente ou não da primeira modalidade, o oligossacarídeo neutro é preferivelmente 2'-fucosilactose (FL). Nesse caso, FL é preferivelmente incluído no grupo de oligossacarídeos neutros na mistura de oligossacarídeo durante sua fabricação.

[0050] O oligossacarídeo neutro pode ser preparado como uma mistura pela aquisição e misturação dos componentes individuais. Por exemplo, galacto-oligossacarídeos sintetizados tais como Gal $\beta$ 1,6Gal, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc, e Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc e misturas desses estão comercialmente disponíveis sob o nome comercial de Vivinal® de Friesland Campina, Holanda e Elix'or®. Outros fornecedores de oligossacarídeos são Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH e Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente, glicosiltransferases específicas e/ou glicosidases, tais como galactosiltransferases e/ou fucosiltransferases e/ou galactosidases e/ou fucosidases podem ser usadas para produzir galacto-oligossacarídeos e/ou oligossacarídeos fucosilados.

[0051] A fucosilactose é um oligossacarídeo fucosilado (o que quer dizer um oligossacarídeo que possui um resíduo de fucose). Esse oligossacarídeo fucosilado pode ser isolado por tecnologia de cromatografia ou filtração a partir de uma fonte natural tal como leites de origem animal. Alternativamente, ele pode ser produzido por meios biotecnológicos usando fucosiltransferases e/ou fucosidase específicas através do uso de uma tecnologia de fermentação à base de enzima (enzimas recombinantes ou naturais) ou tecnologia de fermentação microbiana. No último caso, os micróbios podem expressar suas enzimas naturais e substratos ou podem ser

manipulados para produzir os respectivos substratos e enzimas. Culturas microbianas isoladas e/ou culturas mistas podem ser usadas. A formação de oligossacarídeo fucosilado pode ser iniciada pelos substratos aceptores começando a partir de qualquer grau de polimerização (DP), a partir de DP = 1 em diante. Alternativamente, oligossacarídeos fucosilados podem ser produzidos pela síntese química a partir de lactose e fucose livre. Oligossacarídeos fucosilados também são disponibilizados, por exemplo, por Kyowa, Hakko, Kogyo of Japan.

[0052] De acordo com a invenção, o oligossacarídeo sialilado pode ser selecionado do grupo que compreende 3'-sialilactose e 6'-sialilactose. Preferivelmente, o oligossacarídeo sialilado compreende ambas, 3'-sialilactose e 6'-sialilactose. Nessa modalidade, a proporção entre 3'-sialilactose e 6'-sialilactose está preferivelmente entre 5:1 e 1:2.

[0053] As formas 3' e 6' de sialilactose podem ser obtidas pela adição à composição de uma fonte natural tal como de leite de origem animal ou podem ser isoladas pela tecnologia de cromatografia ou filtração a partir de tal fonte natural. Alternativamente, elas podem ser produzidas por meios biotecnológicos usando sialiltransferases ou sialidases, neuraminidases específicas por uma tecnologia de fermentação à base de enzima (enzimas recombinantes ou naturais), pela síntese química ou tecnologia de fermentação microbiana. No último caso, os micróbios podem expressar suas enzimas naturais e substratos ou podem ser manipulados para produzir os respectivos substratos e enzimas. Culturas microbianas isoladas e/ou culturas mistas podem ser usadas. A formação de sialil-oligossacarídeo pode ser iniciada pelos substratos aceptores começando a partir de qualquer grau de polimerização (DP), a partir de DP = 1 em diante. Alternativamente, sialilactoses podem ser produzidos pela síntese química a partir de lactose e ácido N'-acetilneuramínico (ácido siálico).

As sialilactoses também são comercialmente disponibilizadas, por exemplo, por Kyowa Hakko Kogyo of Japan.

[0054] Os oligossacarídeos N-acetilados podem ser obtidos pela adição à composição de uma fonte natural tal como leite de origem animal. Alternativamente, eles podem ser preparados pela ação de glicosaminidase e/ou galactosaminidase sobre N-acetil-glicose e/ou N-acetil galactose. Igualmente, N-acetil-galactosil transferases e/ou N-acetil-glicosil-transferases podem ser usadas para esse propósito. Os oligossacarídeos N-acetilados também podem ser produzidos através do uso da tecnologia de fermentação usando as respectivas enzimas (recombinantes ou naturais) e/ou fermentação microbiana. No último caso os micróbios podem expressar suas enzimas naturais e substratos ou podem ser manipulados para produzir seus respectivos substratos e enzimas. Culturas microbianas isoladas e/ou culturas mistas podem ser usadas. A formação de oligossacarídeo N-acetilado pode ser iniciada pelos substratos aceptores começando a partir de qualquer grau de polimerização (DP), a partir de DP = 1 em diante. Outra opção é a conversão química de ceto-hexoses (por exemplo, frutose) livres ou ligadas a um oligossacarídeo (por exemplo, lactulose) em N-acetil-hexosamina ou um oligossacarídeo que contém N-acetil-hexosamina como descrito em Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* 38:827-828.

[0055] LNnT e LNT podem ser sintetizados pela transferência enzimática de unidades de sacarídeo a partir de porções doadoras para as porções aceptoras usando glicosil-hidrolases e/ou glicosiltransferases como descritas, por exemplo, na patente US No. 5.288.637 e no WO 96/10086. Alternativamente, LNnT pode ser preparada pela conversão química de ceto-hexoses (por exemplo, frutose) livres ou ligadas a um oligossacarídeo (por exemplo, lactulose) em N-acetil-hexosamina ou um oligossacarídeo contendo N-acetil-

hexosamina como descrito em Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38:827-828. N-acetil-lactosamina produzida dessa maneira pode então ser transferida para lactose como a porção aceptora.

[0056] Preferivelmente, o oligossacarídeo N-acetilado é selecionado do grupo que compreende lacto-N-neotetraose (ou LNnT) ou lacto-N-tetraose (ou LNT). Preferivelmente LNnT e/ou LNT estão incluídos no grupo de oligossacarídeos sialilados na mistura de oligossacarídeo durante sua fabricação.

[0057] A cepa bacteriana probiótica presente na composição da invenção pode ser selecionada a partir de qualquer cepa que satisfaça a definição de um probiótico e tenha uma vida útil aceitável para a composição na qual será incorporada. Por exemplo, se a composição é incorporada em uma fórmula infantil, a dita fórmula infantil deve permanecer estável e eficaz por até 12 meses. A cepa bacteriana probiótica é preferivelmente um *lactobacillus* ou uma *bifidobacterium*.

[0058] Exemplos de espécies de *Bifidobacterium* preferidos incluem *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*. Cepas particularmente preferidas são *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 vendida, inter alia, pela companhia Christian Hansen da Dinamarca sob o nome comercial de Bb12, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 vendido por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. of Japan sob o nome comercial de BB536, a cepa de *Bifidobacterium breve* vendida por Danisco sob o nome comercial de Bb-03, a cepa de *Bifidobacterium breve* vendida por Morinaga sob o nome comercial de M-16V, a cepa de *Bifidobacterium infantis* vendida por Procter & Gamble Co. sob o nome comercial de Bifantis e uma cepa de *Bifidobacterium breve* vendida por Institut Rosell (Lallemand) sob o nome comercial de R0070.

[0059] Exemplos de espécies de *Lactobacillus* são *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus reuteri*. As cepas particularmente preferidas são *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, e *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116. Até mais preferivelmente o probiótico é *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

[0060] *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 é vendido por BioGaia A.B. sob o nome comercial de Reuteri.

[0061] De acordo com a invenção, o probiótico é selecionado entre as cepas bacterianas probióticas, preferivelmente o probiótico é um *lactobacillus* ou uma *bifidobacterium*, mais preferivelmente o probiótico é *Bifidobacterium lactis* ou *Lactobacillus reuteri*.

[0062] O probiótico pode estar presente na composição em uma ampla faixa de percentuais para que o probiótico libere o efeito descrito. Entretanto, preferivelmente, o probiótico está presente na composição em uma quantidade equivalente a entre  $10^2$  a  $10^{12}$  cfu (= unidade formadora de colônia) de uma cepa bacteriana probiótica, mais preferivelmente entre  $10^6$  e  $10^9$  cfu, para cada grama da composição. Essa expressão inclui as possibilidades de que as bactérias estejam vivas, inativadas ou mortas ou até presentes como fragmentos tais como DNA, materiais de parede celular, materiais intracelulares ou metabólitos de bactérias. Em outras palavras, a quantidade de bactéria que a composição contém é expressa em termos de habilidade de formação de colônia daquela quantidade de bactérias se todas as bactérias estivessem vivas, não importando se elas estão, de fato, vivas, inativadas ou mortas, fragmentadas ou uma mistura de qualquer um ou de todos esses estados.

[0063] A composição contém pelo menos um LC-PUFA, que é geralmente um n-3 ou n-6 LC-PUFA. O n-3 LC-PUFA pode ser um ácido graxo n-3 C20 ou C22. O n-3 LC-PUFA C20 ou C22 está

presente preferivelmente em uma quantidade de pelo menos 0,1% em peso de todos os ácidos graxos na composição. Preferivelmente, o n-3 LC-PUFA é o ácido docosa-hexaenoico (DHA, C22:6, n-3). O n-6 LC-PUFA pode ser um ácido graxo C20 ou C22. O n-6 LC-PUFA C20 ou C22 está preferivelmente presente em uma quantidade de pelo menos 0,1% em peso de todos os ácidos graxos na composição. Preferivelmente o n-6 LC-PUFA é o ácido araquidônico (ARA, C20:4, n-6). A fonte de LC-PUFA pode ser, por exemplo, lipídeos do ovo, óleo de fungos, óleo de peixe de baixo EPA ou óleo de alga. O LC-PUFA da composição da invenção pode ser fornecido em pequenas quantidades de óleos contendo altas quantidades de ácido araquidônico e ácido docosa-hexaenoico tal como óleos de peixe ou óleos microbianos.

[0064] A composição de acordo com a invenção é preferivelmente uma composição nutricional, mais preferivelmente uma composição nutricional sintético. Nesse caso, ela pode ser uma fórmula para bebê prematuro, um fortificador de leite humano, uma fórmula infantil inicial, uma fórmula de transição, uma fórmula de alimento para bebê, uma fórmula de cereal infantil, um leite para crescimento, um produto alimentício médico para nutrição clínica ou um suplemento, tipicamente para serem usados durante a permanência no hospital ou depois da dispensa hospitalar. Um suplemento pode ser para um bebê prematuro ou uma criança ou um adulto. A dita composição é preferivelmente um produto para alimentação de um prematuro tal como uma fórmula para criança prematura, um fortificante de leite humano ou um suplemento para criança prematura. De acordo com uma modalidade, a composição é preferivelmente uma fórmula para criança prematura, um fortificante de leite humano ou um suplemento. A composição de acordo com a invenção pode ser também um produto para crianças e adultos tal como um iogurte ou alimento

médico, assim como ração para animais de estimação.

[0065] De acordo com uma modalidade particularmente preferida, a composição de acordo com a invenção é para uso em bebês e crianças pequenas que nasceram prematuras ou com LBW ou que experimentaram IUGR ou que sofreram de deficiência de crescimento devido à doença e/ou má nutrição, preferivelmente bebês prematuros.

[0066] A composição de acordo com a invenção pode ser para uso antes e/ou durante e/ou depois do período de desmame.

[0067] A invenção também inclui o uso de uma composição de acordo com a invenção, como um agente nutricional sintético, para o uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor.

[0068] Todos os usos determinados acima são particularmente pretendidos para bebês e crianças pequenas, preferivelmente bebês, no caso de seres humanos. Mas esses usos também são pretendidos para filhotes de animais. As composições e os usos da presente invenção são particularmente adequadas para bebês e crianças, preferivelmente bebês, que nasceram prematuros ou com LBW ou experimentaram IUGR ou que sofreram retardo do crescimento devido à doença e/ou má nutrição, particularmente durante a infância.

[0069] Sem desejar estar ligado à teoria, os inventores acreditam que a eficácia da combinação de mistura de oligossacarídeo na composição descrita acima no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor pode ser o resultado da combinação sinérgica dos efeitos moduladores da imunidade desencadeados pela cepa bacteriana probiótica e o LC-PUFA através de sua estimulação com a mistura de oligossacarídeo específica.

[0070] A mistura de oligossacarídeo, o LC-PUFA e a cepa bacteriana probiótica podem ser administrada na mesma composição ou podem ser administradas sequencialmente.



[0071] Se o grupo de bebês prematuros e crianças com LBW é para ser atingido, a composição é preferivelmente uma composição nutricional, por exemplo, consumida na forma líquida. Ela pode ser uma formula nutricional completa tal como uma fórmula para bebês (prematuros), um suplemento, um fortificante de leite humano, uma fórmula de transição ou um leite de crescimento. Alternativamente, para o grupo de filhotes de mamíferos, a composição pode ser uma ração para filhotes.

[0072] A composição de acordo com a invenção também pode conter uma fonte de proteína. O tipo de proteína não é considerado ser crítico para a presente invenção desde que os requisitos mínimos para o conteúdo de aminoácidos essenciais sejam atingidos e o crescimento satisfatório seja garantido. Portanto, as fontes de proteína à base de soro de leite, caseína e suas misturas podem ser usadas assim como as fontes de proteína à base de soja. A medida em que as proteínas do soro do leite são de interesse, a fonte de proteína pode ser à base de soro de leite ácido ou soro de leite doce ou suas misturas e pode incluir alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina em quaisquer proporções desejadas. As proteínas podem ser parcialmente hidrolisadas a fim de intensificar a tolerância oral a alérgenos, especialmente alérgenos alimentícios. Nesse caso, a composição é uma composição hipoalergênica.

[0073] A composição de acordo com a presente invenção também pode conter uma fonte de carboidrato em adição à mistura de oligossacarídeo. Isso é particularmente preferível no caso onde a composição da invenção é uma fórmula para bebês. Nesse caso, qualquer fonte de carboidrato convencionalmente encontrado em fórmulas para bebês tal como lactose, sacarose, maltodextrina, amido e suas misturas pode ser usada embora a fonte preferida de carboidratos seja a lactose. Em qualquer caso, a mistura de oligossacarídeo é

preferivelmente uma fonte única de prebiótico na composição de acordo com a invenção.

[0074] A composição de acordo com a presente invenção também pode conter uma fonte de lipídeos em adição a LC-PUFA. Isso é particularmente relevante se a composição nutricional da invenção é uma fórmula para bebês. Nesse caso, a fonte de lipídeos pode ser qualquer lipídeo ou gordura que seja adequada para uso em fórmulas infantis. Fontes de gordura preferidas incluem óleo palmoleico, óleo de girassol com alto teor oleico e óleo de cártamo com alto teor oleico. Os ácidos graxos linoleico e  $\alpha$ -linolenico também podem ser adicionados. Na composição, a fonte de gordura (incluindo LC-PUFA tal como ARA e/ou DHA) preferivelmente tem uma proporção de ácidos graxos n-6 para n-3 de cerca de 1:2 a cerca de 10:1, preferivelmente cerca de 3:1 a cerca de 8:1.

[0075] A composição da invenção também pode conter todas as vitaminas e minerais compreendidos serem essenciais na dieta diária e em quantidades nutricionalmente significativas. As necessidades mínimas já foram estabelecidas para certas vitaminas e minerais. Exemplos de minerais, vitaminas e outros nutrientes opcionalmente presentes na composição da invenção incluem vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantotênico, colina, cálcio, fósforo, iodo, ferro, magnésio, cobre, zinco, manganês, cloro, potássio, sódio, selênio, cromo, molibdênio, taurina, e L-carnitina. Minerais são geralmente adicionados na forma de sal. A presença e as quantidades de minerais específicos e outras vitaminas variará dependendo da população pretendida. Se necessário, a composição da invenção podem conter emulsificantes e estabilizadores tais como soja, lecitina, ésteres de ácido cítrico de mono e diglicerídeos e similares.

[0076] A composição da invenção também pode conter outras

substâncias que podem ter um efeito benéfico tal como lactoferrina, nucleotídeos, nucleosídeos, gangliosídeos, poliaminas e similares.

[0077] A preparação da composição de acordo com a invenção será descrita agora por meio de exemplo.

[0078] A fórmula pode ser preparada de qualquer maneira adequada. Por exemplo, ela pode ser preparada pela mistura de uma fonte de proteína, uma fonte de carboidrato (diferente da mistura de oligossacarídeo) e uma fonte de gordura incluindo LC-PUFA em proporções apropriadas. Se usados, os emulsificantes podem ser incluídos nesse ponto. As vitaminas e os minerais podem ser adicionados nesse ponto, mas são geralmente adicionados mais tarde para evitar a degradação térmica. Qualquer vitamina lipofílica, emulsificantes e similares podem ser dissolvidos na fonte de gordura antes da mistura. A água, preferivelmente a água que tenha sido submetida a osmose reversa, pode então ser misturada em uma forma de mistura líquida. A temperatura da água está convenientemente na faixa entre cerca de 50°C e cerca de 80°C para ajudar a dispersão dos ingredientes. Agentes de liquefação comercialmente disponíveis podem ser usados para formar a mistura líquida. A mistura de oligossacarídeo pode ser adicionada nesse estágio se o produto final é para ter a forma líquida. Se o produto final é para ser um pó, os oligossacarídeos podem igualmente ser adicionados nesse estágio se desejado. A mistura líquida é então homogeneizada, por exemplo, em dois estágios.

[0079] A mistura líquida pode então ser termicamente tratada para reduzir as cargas bacterianas, pelo aquecimento rápido da mistura líquida até uma temperatura na faixa entre cerca de 80°C e cerca de 150°C por uma duração entre cerca de 5 segundos e cerca de 5 minutos, por exemplo. Isso pode ser realizado por meio de uma injeção de vapor, uma autoclave ou um trocador de calor, por exemplo,

uma placa de troca de calor.

[0080] Depois, a mistura líquida pode ser resfriada para entre cerca de 60°C e cerca de 85°C, por exemplo, pelo resfriamento rápido. A mistura líquida pode então ser homogeneizada, por exemplo, em dois estágios entre cerca de 10 MPa e cerca de 30 MPa no primeiro estágio e entre cerca de 2 MPa e cerca de 10 MPa no segundo estágio. A mistura homogeneizada pode então ser resfriada para adicionar qualquer componente sensível ao calor, tal como vitaminas e minerais. O pH e o conteúdo de sólidos da mistura homogeneizada são convenientemente ajustados nesse ponto.

[0081] A mistura homogeneizada é transferida para um aparelho de secagem adequado tal como um secador por pulverização ou liofilizador e convertida em pó. O pó deve ter um conteúdo de umidade inferior a cerca de 5% em peso. A mistura de oligossacarídeo pode ser adicionada nesse estágio pela misturação a seco junto com as cepas de bactéria probiótica ou misturando-a em um xarope para formar cristais, junto com as cepas bacterianas probióticas e secando por pulverização (ou liofilizando).

[0082] Se a composição líquida é preferida, a mistura homogeneizada pode ser esterilizada e depois assepticamente preenchida em recipientes adequados ou pode ser preenchida primeiro nos recipientes e depois esterilizada.

[0083] Em outra modalidade, a composição da invenção pode ser um suplemento em uma quantidade suficiente para obter o efeito desejado em um indivíduo. Essa forma de administração é geralmente mais adequada para bebês prematuros ou com LBW ou IUGR, crianças mais velhas e adultos.

[0084] A quantidade de oligossacarídeos, LC-PUFA e cepa bacteriana probiótica a ser incluída no suplemento será selecionada de acordo com a maneira na qual o suplemento vai ser administrado.

[0085] O suplemento pode estar, por exemplo, na forma de pó, comprimidos, cápsulas, pastilhas ou um líquido. O suplemento pode conter adicionalmente hidrocoloides protetores (tais como gomas, proteínas, amidos modificados), aglutinantes, agentes que formam filme, agentes/materiais para encapsulação, agentes para parede/concha, compostos de matriz, revestimentos, emulsificantes, agentes ativos na superfície, agentes de solubilização (óleos, gorduras, ceras, lecitinas etc.), absorventes, veículos, cargas, co-compostos, agentes de dispersão, agentes umectantes, auxiliares de processamento (solventes), agentes de fluidez, agentes de mascaramento de sabor, agentes de ponderação, agentes de gelificação e agentes que formam gel. O suplemento também pode conter aditivos e adjuvantes farmacêuticos convencionais, excipientes e diluentes incluindo, mas não limitados a água, gelatina de qualquer origem, gomas vegetais, lignino-sulfonato, talco, açúcares, amido, goma arábica, óleos vegetais, polialquilenoglicóis, agentes flavorizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsificantes, tampões, lubrificantes, corantes, agentes umectantes, cargas e similares.

[0086] O suplemento pode ser adicionado em um produto aceitável para o consumidor (que é um ser humano ou animal), tal como um veículo ou suporte ingerível, respectivamente. Exemplos de tais veículos ou suportes são uma composição farmacêutica ou um alimento ou uma ração para animal. Exemplos não limitantes para tais composições são leite, iogurte, coalhada, queijo, leites fermentados, produtos fermentados a base de leite, produtos à base de cereais fermentados, pós à base de leite, leite humano, fórmula para prematuro, fórmula infantil, suplemento oral e alimentação por sonda.

[0087] Além disso, o suplemento pode conter um material transportador orgânico ou inorgânico adequado para administração

enteral ou parenteral assim como vitaminas, elementos residuais minerais e outros micronutrientes de acordo com as recomendações de órgãos governamentais tais como USRDA.

[0088] As vantagens, natureza e vários aspectos adicionais da invenção aparecerão mais completamente depois da consideração do experimento ilustrativo que será descrito agora em detalhes em conjunto com as figuras em anexo. Nas figuras:

[0089] FIG. 1 é um diagrama para ilustrar o protocolo dos experimentos.

[0090] FIG. 2 é um gráfico de barra que mostra os resultados dos experimentos, em termos de peso do cérebro (g) no dia pós-natal (=PND) 35.

[0091] FIG. 3 é um gráfico de barra que mostra os resultados dos experimentos, em termos de peso de cérebro(g) no dia pós-natal (=PND) 26.

### EXEMPLO

[0092] Os experimentos foram realizados com relação ao efeito da suplementação de uma mistura de oligossacarídeo, que é uma mistura de oligossacarídeos de leite de vaca (CMOS) enriquecidos com galacto-oligossacarídeos (permeado de soro de leite desmineralizado, sem lactose ou DDWP), LC-PUFA (ácido araquidônico – ARA – e ácido docosa-hexaenoico – DHA -) e *Bifidobacterium lactis* (BL), e opcionalmente 2'-fucosilactose (FL) ou a combinação de 2'-fucosilactose (FL) e lacto N-neotetraose (LNNT) sobre filhotes.

### 1. METODOLOGIA

#### PROTOCOLO EXPERIMENTAL

[0093] Os experimentos foram realizados com a aprovação da Swiss Animal Protection Law (grau de gravidade 1) e foram aprovados pelo Office Vétérinaire Cantonal (Lausanne, Suíça, autorização nº 2028). Ratos Long-Evans Hooded reprodutores machos e fêmeas

virgens foram adquiridos de Janvier (França), chegando à instalação de alojamento de animal duas semanas antes do cruzamento.

[0094] As fêmeas prenhas receberam alimento (Kliba 3437) e água *ad libitum*, foram alojadas sob temperatura e umidade constantes e mantidas em um ciclo de 12:12 escuro:claro. As condições de alojamento foram mantidas por toda a duração do protocolo. No dia pós-natal (=PND) 2 depois do nascimento (B), as parideiras foram removidas de suas gaiolas maternidade e o sexo dos filhotes foi determinado. Ninhadas padronizadas de 8 filhotes machos foram designadas para adoção, depois de randomizar pelo peso corporal. As parideiras e os filhotes foram designados para uma de duas condições de criação: 1) grupos com privação materna, expostos a um período de 180 min de separação materna diária do PND2 a PND14 (**MS**) ou 2) controles não manuseados (**NS**).

[0095] Filhotes MS foram desmamados (W) no PND15. Eles foram randomizados pelo peso e cuidados e distribuídos em grupos de 16 animais que foram alimentados com uma dieta controlada (AIN 93G modificado, grupo MS-cont) ou um dieta similar adaptada para conter LC-PUFA, *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (BL) e oligossacarídeos (DDWP). Os animais MS (grupo **MS-Cont**) foram hospedados em grupos de 8 filhotes até o PND21 para reduzir a carga de estresse do desmame precoce e depois individualmente abrigados até o final do experimento. Animais do grupo NS foram desmamados com uma dieta controlada (grupo NS-Cont) em PND21 e individualmente hospedados até o final do experimento.

[0096] Os animais foram sacrificados (†) no PND26 ou no PND26 por sangramento exaustivo sob anestesia com isoflurano. O peso do cérebro foi registrado: o cérebro foi coletado depois da abertura do crânio e pesado em uma balança.

## 2. TRATAMENTO E DIETAS

[0097] A seguir, ingredientes funcionais usados para a gavagem experimental e a composição da dieta compreendida pelo ingrediente DDWP em 98,8% da matéria seca, cuja composição está detalhada na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1. Composição da mistura de DDWP**

	% de matéria seca
Lactose	33,4
Oligossacarídeos totais	25,51
Glicose	9,06
Galactose	8,13
Proteína	4,03
Cinzas	11,43
Desconhecido	8,44

[0098] O DDWP é tipicamente obtido de acordo com as descrições de WO2007/101675 ou WO 2007/090894 e geralmente contém uma mistura de cerca de 30% em peso de GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc e Gal $\beta$ 1,6GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; 50% em peso de Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc e Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; 20% em peso de NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc e NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc.

[0099] Os animais foram alimentados desde o desmame até o fim do experimento com dietas semissintéticas adaptadas nutricionalmente (AIN 93G modificado) cuja composição é mostrada nas Tabelas 2, 3 e 4.

**TABELA 2: Receitas de dieta (por 100 g de dieta)**

	Controle	PUFA- BL- DDWP	PUFA- BL- DDWP- FL	PUFA- BL- DDWP- FL-LNNT
Caseinato de K- (g)	20,00	20,00	20,00	20,00
Amido de milho (g)	33,95	33,95	33,95	33,95



	Controle	PUFA- BL- DDWP	PUFA- BL- DDWP- FL	PUFA- BL- DDWP- FL-LNNT
Maltodextrina (g)	20,00	13,69	13,85	14,05
Sucrose (g)	10,00	10,00	10,00	10,00
Lactose (g)	2,82	-	0,28	0,56
Glicose (g)	0,55	-	0,06	0,11
Galactose (g)	0,63	-	0,06	0,12
DDWP (g) <sup>1</sup>	-	9,94	8,95	7,95
LNnT (g) <sup>2</sup>	-	-	-	0,41
FL(g) <sup>3</sup>	-	-	0,43	0,43
Mistura de gordura (g) (veja composição abaixo)	7,00	7,00	7,00	7,00
Mistura de mineral (AIN-93- G) (g)	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura de vitamina (AIN- 93-VX) (g)	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cisteína (g)	0,30	0,30	0,30	0,30
Hidrogenotartarato de colina DAB 10 (g)	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>B. lactis</i> em pó (BL) (5,40E+10 cfu/g) (g) <sup>4</sup>	-	0,37	0,37	0,37
<b>Total (g)</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

[00100] <sup>1</sup>DDWP (permeado de soro de leite desmineralizado, delactosado); <sup>2</sup>LNNT = Lacto-N-neo Tetraose; <sup>3</sup>FL = 2-Fucosil-Lactose;

<sup>4</sup>*B. lactis* = BL= *B. lactis* CNCM I-3446, seco por pulverização.

**Tabela 3: Mistura de gordura (g/100 g de mistura de gordura)**

	Controle	PUFA-BL-DDWP	PUFA-BL-DDWP-FL	PUFA-BL-DDWP-FL-LNNT
Óleo de soja	21,80	21,90	21,90	21,90
Manteiga de cacau	37,34	27,41	27,41	27,41
Óleo de milho	40,86	40,10	40,10	40,10
ARASCO (PUFA)	-	5,15	5,15	5,15
DHASCO (PUFA)	-	5,44	5,44	5,44

**Tabela 4: Composição nutricional das dietas**

	Controle	PUFA-BL-DDWP	PUFA-BL-DDWP-FL	PUFA-BL-DDWP-FL-LNNT
Digestíveis				
Kcal/100g (predito) <sup>5</sup>	415	408	408	408
Proteína (g/100g, Nx6,25) <sup>6</sup>	17,87	18,36	18,20	18,11
Gordura (g/100g) <sup>7</sup>	7,11	7,09	7,03	7,17
AA (%FA) <sup>8</sup>	NA	NA	NA	NA
DHA(%FA) <sup>9</sup>	NA	NA	NA	NA
<i>B. lactis</i> (cfu/100 g dieta) <sup>10</sup>	ND	1,24E+09	4,00E+09	1,89E+09

[00101] <sup>5</sup>*predito a partir da composição nutricional (1 g de carboidrato digestível=4 Kcal; 1 g de oligossacarídeo=2 Kcal; 1 g de proteína=4 Kcal; 1 g de gordura=9 Kcal);* <sup>6</sup>*analisado por Kjeldhal;* <sup>7</sup>*analisado por Soxhlet;* <sup>8</sup>*AA=ácido araquidônico,* <sup>9</sup>*DHA=ácido docosa-hexaenoico;* <sup>10</sup>*analisado por método de cultura padronizado e PCR; NA= Não analisado; ND=abaixo dos limites de detecção (menos do que 1,00E+03).*

[00102] O perfil de ácido graxo das quatro dietas foi equilibrado

para fornecer uma proporção similar de n-6/n-3 e uma proporção similar de ácidos graxos saturados, monossaturados e poli-insaturados. Portanto, a composição de ácido graxo das quatro dietas era aproximadamente a mesma em termos de perfil de ácido graxo.

[00103] Os animais foram sacrificados no dia pós-natal, PND, 26 ou 35.

### 3. PESO DO CÉREBRO

[00104] A partir dos resultados das Figuras 2 e 3, parece que a primeira composição de PUFA-BL-DDWP, de acordo com a invenção, mostra um peso do crebro melhor do que os pesos dos cérebros obtidos pela composição de controle MS-CONT.

[00105] Adicionalmente, a terceira composição de acordo com a invenção PUFA-BL-DDWP-FL-LNNT mostrou um peso de cérebro superior à composição PUFA-BL-DDWP no PND 26. Na realidade, parece que se DDF-BL-PUFA foi eficiente no PND26, uma suplementação mais prolongada no PND35 mostrou um efeito mais significativo. DDWP-BL-PUFA-FL-LNNT mostrou um efeito significativo já no PND26.

[00106] Todas as composições de acordo com a invenção provaram resultar em um cérebro mais pesado do que do grupo MS-CONT. Essa é a real vantagem das composições de acordo com a invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição para uso no crescimento cerebral e/ou desenvolvimento cognitivo e/ou psicomotor, caracterizada pelo fato de que compreende:

pelo menos 0,1% em peso de um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LC-PUFA),

de  $10^2$  a  $10^{12}$  cfu (unidade formadora de colônia) de pelo menos um probiótico, e

de 0,5 a 70% em peso de uma mistura de oligossacarídeos, a dita mistura contendo pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado, pelo menos um oligossacarídeo sialilado e pelo menos um oligossacarídeo neutro;

sendo que o oligossacarídeo N-acetilado é selecionado do grupo que compreende lacto-N-neotetraose (ou LNnT) e lacto-N-tetraose (ou LNT); e

sendo que o oligossacarídeo neutro é 2'-fucosilactose (ou FL).

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que, além do FL, o oligossacarídeo neutro é selecionado dentre fruto-oligossacarídeos (FOS) e/ou galacto-oligossacarídeos (GOS), preferivelmente GOS.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que, além dos LNnT, LNT e FL, a dita mistura de oligossacarídeo contém pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado selecionado do grupo que compreende  $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  (=3'GalNAc-lac= N-acetil-galactosaminil-lactose),  $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ ,  $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  e  $\text{Gal}\beta 1,6\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  (= 6'Gal-3GalNAc-lac = galactosil-N-acetil-galactosaminil-lactose),  $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$  (lacto-N-neotetraose ou LNnT) e

Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc (lacto-N-tetraose ou LNT), pelo menos um oligossacarídeo sialilado selecionado do grupo que compreende NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc (= 3'-sialilactose) e NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc (= 6'-sialilactose), e pelo menos um oligossacarídeo neutro selecionado do grupo que compreende Gal $\beta$ 1,6Gal (=  $\beta$ 1,6-digalactosídeo); Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc (= 6'Gal-lac); Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc; Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Glc; Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc (= 3'Gal-lac); Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc (=6',6-diGal-lac); Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc (=6',3-diGal-lac); Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc (=3',6-diGal-lac); Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc (=3',3-diGal-lac); Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc (=4'Gal-lac) e Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc (=4',4-diGal-lac); e Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4Glc (= 2' fucosilactose ou FL).

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a mistura de oligossacarídeos compreende:

0,25 a 20% em peso, preferivelmente 0,3 a 10% em peso, mais preferivelmente, 0,3 a 5% em peso, e, até mais preferivelmente, 0,5% em peso, com relação ao peso total da mistura de oligossacarídeo, de pelo menos um oligossacarídeo N-acetilado,

0,5 a 30% em peso, preferivelmente, 0,75 a 15% em peso, mais preferivelmente, 0,75 a 10% em peso, e, até mais preferivelmente, 1% em peso, com relação ao peso total da mistura de oligossacarídeo, de pelo menos um oligossacarídeo sialilado, e

50 a 99,3% em peso, preferivelmente, 20 a 80% em peso, mais preferivelmente, 10 a 50% em peso, e, até mais preferivelmente, 50% em peso, com relação ao peso total da mistura de oligossacarídeo, de pelo menos um oligossacarídeo neutro.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a mistura de oligossacarídeos compreende de 1 a 20%, até mais preferivelmente, 2

a 5%, com relação ao peso total da composição.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o LC-PUFA é selecionado dentre ácido araquidônico (ARA) e ácido docosa-hexaenoico (DHA), preferivelmente o LC-PUFA é uma mistura de ARA e DHA.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o probiótico é selecionado dentre cepas bacterianas probióticas, preferivelmente, o probiótico é um *lactobacillus* ou uma *bifidobacterium*, mais preferivelmente, o probiótico é *Bifidobacterium lactis* ou *Lactobacillus reuteri*.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o oligossacarídeo sialilado é selecionado do grupo que compreende 3'-sialilactose e 6'-sialilactose, e, preferivelmente, o oligossacarídeo sialilado compreende ambos 3'-sialilactose e 6'-sialilactose, a proporção entre 3'-sialilactose e 6'-sialilactose estando preferivelmente na faixa entre 5:1 e 1:2.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é uma fórmula para bebês prematuros, um fortificante de leite humano, uma fórmula infantil inicial, uma fórmula infantil de transição, uma fórmula de alimento para bebê, uma fórmula de cereal infantil, um leite de crescimento, um produto alimentício médico para nutrição clínica ou um suplemento e preferivelmente, a dita composição é uma fórmula para bebês prematuros, um fortificante de leite humano ou um suplemento.

Fig.1

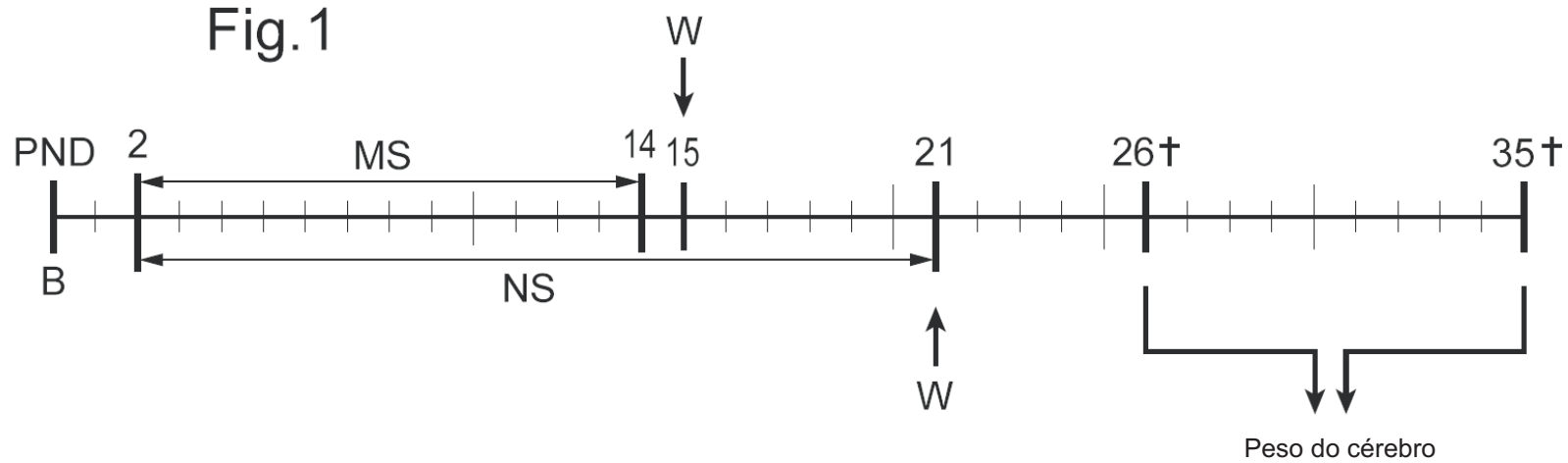


Fig.2

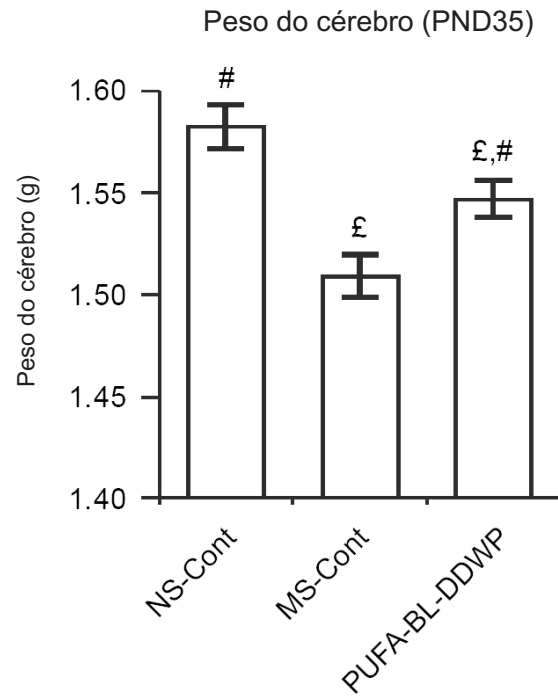
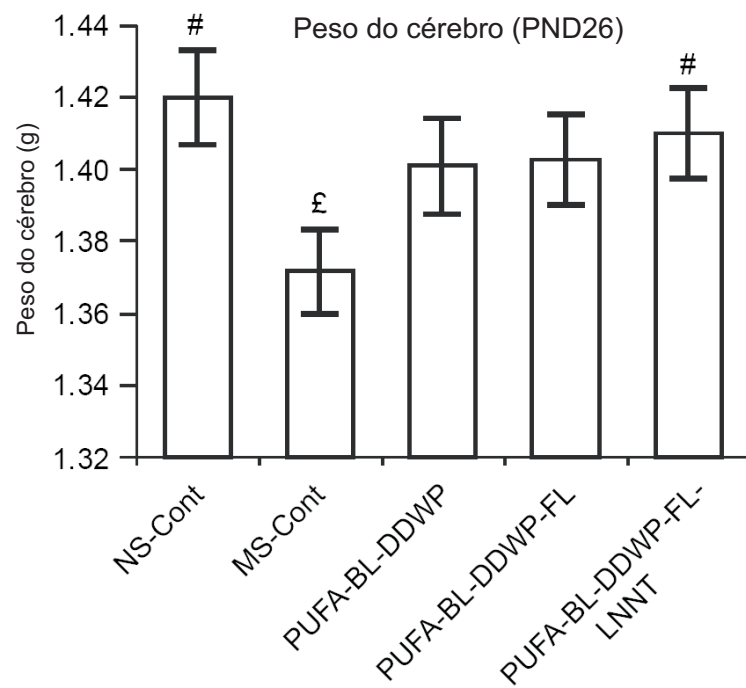


Fig.3



£ diferente de NS-Cont  
# diferente de MS-Cont