



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1523243 E**

(51) Classificação Internacional:

A23J 1/20 (2006.01) **A23C 9/146** (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01) **A61K 38/40** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.06.30**

(30) Prioridade(s): **2002.07.02 FR 0208234**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.04.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.10**
004/2007

(73) Titular(es):

COMPAGNIE LAITIERE EUROPEENNE
F-50890 CONDÉ-SUR-VIRE

FR

(72) Inventor(es):

JÉRÔME SOUPPE

FR

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ISOLADO DE PROTEÍNA DE LEITE E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO.**

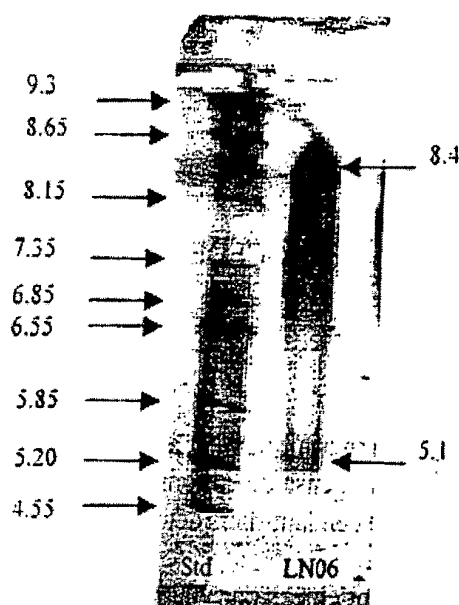
(57) Resumo:

ISOLADO DE PROTEÍNA DE LEITE E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO.

RESUMO

"ISOLADO DE PROTEÍNA DE LEITE E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

A invenção diz respeito a um novo processo de isolamento de proteínas do leite a partir do leite ou de um soro lácteo, incluindo passos de passagem do leite ou do soro de leite através de uma resina de permuta catiónica, a eluição da fracção retida por uma solução aquosa salgada, e a dessalinização e esterilização do eluído. Ela tem também como objecto uma fracção proteica leiteira obtida por este processo e a sua utilização para a preparação de composições farmacêuticas ou alimentares.



DESCRIÇÃO

"ISOLADO DE PROTEÍNA DE LEITE E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

A invenção presente tem como objecto um novo processo de isolamento de proteínas do leite, a composição, o isolado de proteínas de leite ou fracção proteica láctea, que resultam das suas aplicações, bem como as suas aplicações, nomeadamente alimentares e farmacêuticas.

Conhecem-se diversos documentos da técnica anterior que descrevem a purificação de proteínas do leite.

O documento EP-348508 descreve a obtenção de uma lactoferrina bovina com elevada pureza (> 80% num passo ou >98% em dois passos) por adsorção do leite ou do soro de leite sobre uma resina de permuta de catiões que inclui grupos carboximetilo, seguindo-se uma lavagem e a desorção da lactoferrina.

O documento EP-348508 descreve igualmente um processo de preparação de uma lactoferrina bovina de elevada pureza (>95%) por adsorção do leite ou do soro de leite sobre uma resina de permuta catiónica do tipo polissacárido, incluindo as funções de éster de ácido sulfúrico, com eluição por uma solução aquosa de sal.

O documento EP-298875 descreve um processo que permite isolar determinadas proteínas do soro de leite por adsorção sobre um suporte inorgânico poroso, sob a forma de grãos, estando os grãos referidos revestidos com uma camada de polissacárido aminado que apresenta superficialmente grupos funcionais ácidos, tais como grupos carboxílicos ou sulfônicos.

O documento EP-418704 descreve um processo para se purificar sequencialmente a lactoferrina e a lactoperoxidase, por eluição sobre uma coluna carregada com uma resina polissacarídica com enxertos de grupos de ácido sulfônico.

O documento US-6.096.870 descreve um processo de separação sequencial das proteínas do leite, por eluição do leiteiro sobre resinas catiónicas.

O documento EP-1017286 descreve um processo de separação sequencial das proteínas do leiteiro por cromatografia com caudal radial.

A lactoferrina e a lactoperoxidase são proteínas do leite que possuem propriedades interessantes: a sua capacidade de se ligar a ferro confere-lhes um papel de agentes antibacterianos contra as bactérias cujo metabolismo necessita de quantidades importantes de ferro.

A lactoperoxidase é indispensável para a marcação proteica com iodo. A lactoferrina favorece o crescimento dos linfócitos e favorece a absorção do ferro por parte do organismo, regula a diferenciação dos leucócitos e inibe a peroxidação dos lípidos.

No entanto, todos estes documentos dizem respeito a processos com o objectivo de se obter lactoferrina e/ou uma lactoperoxidase o mais puras que seja possível, ou seja são processos que visam diminuir o mais possível as proporções de outras proteínas inicialmente presentes no leite ou no soro de leite. Por outro lado, as condições de fixação da matéria-prima e as de eluição das proteínas são condições pouco agressivas, com caudais materiais pequenos. Em contrapartida, o objectivo que motivou a autora deste pedido é a obtenção de uma fracção proteica de leite incluindo entre outros constituintes a lactoferrina e a lactoperoxidase, mas incluindo sobretudo uma proporção das outras proteínas que é mais elevada do que no leite ou no soro de leite de que se parte. Para este efeito a autora desenvolveu um processo com caudais muito maiores do que os descritos nos documentos analisados acima, permitindo este processo uma fixação mais selectiva no que toca a determinadas proteínas.

O documento W093/13676 divulga um processo que permite isolar a lactoferrina e a lactoperoxidase por passagem sobre uma resina de permuta de catiões, com caudais elevados, a partir do leiteiro. Este processo

difere do processo de acordo com a invenção presente pelo facto de o caudal ser mais elevado do que no processo de acordo com a invenção (superior a 5 m/h) e por se destinar a purificar a lactoferrina e a lactoperoxidase, e não a obter uma fracção proteica específica de leite que contenha uma porção relativamente elevada das outras proteínas e possuindo propriedades biológicas melhoradas.

Conhece-se também, pelo documento EP-704218, um agente destinado a reforçar os ossos, incluindo esse agente uma fracção proteica básica ou uma fracção peptídica básica, provenientes de leite obtidas por passagem do leite sobre uma resina catiónica, e por eluição. No entanto, as condições de adsorção e de eluição descritas nesse documento são distintas das que são empregues no processo de acordo com a invenção, e permitem isolar uma fracção proteica distinta e a obtida de acordo com a invenção presente.

Os documentos JP-8165249, JP-9187250, JP-9294537 e EP-1010430 descrevem as composições destinadas ao reforço dos ossos e/ou à prevenção das doenças periodontais, contendo essas composições uma fracção proteica básica derivada do leite que é obtida por adsorção do leite e por eluição sobre uma resina catiónica.

No entanto, as condições de adsorção e de eluição descritas nestes documentos são distintas das empregues no processo de acordo com a invenção e permitem isolar uma

fracção proteica diferente daquela que se obtém de acordo com a invenção presente.

Foi portanto com surpresa que a autora verificou obter um novo processo de isolamento de proteínas de leite que permite obter uma fracção proteica do leite, que é dotada de propriedades biológicas melhoradas, nomeadamente uma fracção proteica do leite que favorece o crescimento dos osteoblastos.

A invenção tem como objecto um processo de isolamento de proteínas do leite a partir de leite ou de soro de leite, que inclui os passos seguintes:

a) esteriliza-se e desengordura-se o leite ou o soro de leite;

b) passa-se a fracção láctea proveniente do passo a) sobre uma resina de permuta de catiões utilizada como enchimento de uma coluna eluível;

c) elui-se a fracção retida na coluna, com uma solução aquosa de sal;

d) retira-se o sal do eluído proveniente do passo c), de preferência por ultrafiltração e por diafiltração, e depois esteriliza-se, de preferência por microfiltração.

Sendo este processo caracterizado por:

α) a resina de permuta de catiões ser uma resina com funções ácido forte enxertadas;

designando-se pelo parâmetro BV a razão entre o volume de matéria-prima e o volume de resina húmida na coluna,

designando-se pelo parâmetro SV a razão entre o caudal de alimentação à coluna e o volume da resina húmida na coluna,

designando-se pelo parâmetro LV a razão entre o caudal de alimentação da coluna e a secção da coluna,

β) no decurso do passo b), os parâmetros de fixação têm os seguintes valores

- BV_f está compreendido entre 80 e 120;
- SV_f está compreendido entre 8 e 15 h^{-1} ;
- LV_f é superior ou igual a 3 m/h e inferior ou igual a 4,8 m/h.

γ) no decurso do passo c), os parâmetros de eluição têm os seguintes valores

- BV_e está compreendido entre 3 e 7;

- LV_e é inferior a 1 m/h, de preferência inferior a 0,5 m/h.

Pode-se utilizar como matéria-prima no processo da invenção, quer leite quer soro de leite, de preferência provenientes da vaca. O soro de leite é o líquido residual que se obtém depois da extracção das proteínas e da gordura do leite, ou do leiteiro. Distinguem-se em geral duas categorias de soro de leite, consoante a sua acidez seja superior a 1,8 g de ácido láctico por L, o soro lácteo doce, resultante da fabricação de queijo de massa comprimida cozida ou não cozida (emental, saint-paulin etc.) e o soro de leite ácido, proveniente da caseína ou de outros queijos obtidos por coagulação mista ou láctica (massas moles, massas frescas). A composição média do soro de leite doce é, a título indicativo, para 61 g de matéria seca por kg de soro de leite, de 42 a 48 g de lactose, 8 g de proteínas, 2 g de gorduras, 5 a 7 g de minerais, 1 a 5 g de ácido láctico sendo o resto minerais e vitaminas.

Conhece-se também o soro de leite ideal obtido por microfiltração do leite sobre um suporte com uma porosidade média de 0,1 μm .

De acordo com uma primeira variante da invenção, utiliza-se leite como matéria-prima, e de forma vantajosa leite de vaca, cuja composição permite, pelo processo de acordo com a invenção, a obtenção de um isolado de

proteínas que tem as propriedades biológicas mais interessantes. Esta variante permite igualmente obter um rendimento em proteínas que é superior ao obtido nas variantes em que se parte de soro de leite como matéria-prima.

De acordo com uma segunda variante preferida da invenção, utiliza-se como matéria-prima soro de leite ácido de caseinaria. Esta variante apresenta uma vantagem económica importante, na medida em que a matéria-prima é um subproduto obtido de explorações industriais, tendo portanto um custo baixo.

No primeiro passo do processo, esteriliza-se o leite ou o soro de leite, e desengordura-se por desnatação, de modo conhecido:

A desnatação do leite designa a separação da nata do leite, qualquer que seja o processo utilizado para conseguir esta separação.

De modo tradicional, a fabricação da nata faz-se de acordo com um processo natural: quando se deixa o leite em repouso, dá-se uma separação dos seus elementos constituintes em função da sua densidade. Como são mais leves do que a água, os glóbulos de matérias gordas sobem à superfície para formar uma camada de nata. Na produção industrial, acelera-se a formação da nata passando o leite por uma desnatadora centrífuga.

No modo de proceder habitual, a pasteurização é levada a cabo por um aquecimento controlado com uma duração curta, de modo a eliminar os germes patogénicos eventualmente presentes na nata. De forma vantajosa, pode levar-se a cabo a pasteurização a uma temperatura no intervalo de 65 a 95°C, de preferência a entre 80 e 95°C. Pode-se por exemplo tratar o leite ou o soro de leite durante 15 segundos a uma temperatura compreendida entre 65 e 82°C. Pode igualmente esterilizar-se o leite ou o soro de leite utilizado como matéria-prima, por microfiltração através de um filtro que possua poros com um diâmetro de entre 0,1 e 2 μm .

Passa-se então a matéria-prima estéril e desengordurada através de uma resina de permuta catiónica. De acordo com a invenção a resina de permuta de catiões é uma resina que possui funções ácido forte, e que tenha uma capacidade de permuta de iões de entre 200 e 1000 $\mu\text{E/mL}$, de preferência entre 400 e 700 $\mu\text{E/mL}$. Entende-se por função ácido forte, uma função dotada de um $\text{pK}_a \leq 2$. A resina pode nomeadamente sofrer os enxertos com funções de ácido sulfónico para ficar apropriada, em geral sob a forma de sais sulfonato, sendo a natureza do sal determinada pela solução que se utilize para o acondicionamento da coluna antes de se levar a cabo o processo. De preferência, escolhe-se uma enxertia com grupos aromáticos ou alifáticos portadores de funções de ácido sulfónico, ainda mais preferivelmente sob a forma de sais de propilsulfonato. A

resina sobre a qual são enxertadas as funções de ácido sulfônico pode ter uma natureza qualquer, nomeadamente poliacrílica ou poliestirénica. A granulometria da resina estará de forma vantajosa compreendida entre 100 μm e 900 μm , de preferência entre 200 e 750 μm , ainda mais preferivelmente entre 250 e 600 μm . A resina utilizável de acordo com a invenção deve apresentar de preferência uma densidade superior a 1,15.

Podem citar-se como resinas disponíveis no comércio e que podem ser utilizadas na invenção presente, nomeadamente: a resina Trisacryl SP® comercializada pela sociedade BIOSEPRA, a resina MacroPrep High S® comercializada pela sociedade BioRad. De preferência, escolhe-se uma resina poliestirénica enxertada com funções alquilsulfonato ou arilsulfonato.

Acondiciona-se a resina numa coluna, antes da sua utilização, de um modo que é do conhecimento dos especialistas da técnica, por tratamento com uma solução desinfectante seguido de lavagem, para evitar a sua contaminação com microrganismos. Em seguida equilibra-se eventualmente a coluna fazendo-a atravessar por uma solução tampão, seguindo-se uma lavagem

O passo b) de fixação da matéria-prima, leite ou soro de leite, estéril e desengordurado, prossegue nas seguintes condições preferenciais:

Acondiciona-se a resina dentro de uma coluna, cuja temperatura é mantida a entre 2 e 15°C, de preferência a entre 4 e 12°C. A alimentação das matérias-primas à coluna é, de preferência, feita por baixo. De modo vantajoso trabalha-se em leito fluidizado. Os parâmetros de fixação são ajustados de preferência de modo a que se observe uma, ou várias, das condições seguintes:

- BV_f está compreendido entre 80 e 150, de preferência entre 80 e 120;

- SV_f está compreendido entre 5 e 40 h^{-1} , preferivelmente entre 8 e 20 h^{-1} , e de preferência a entre 8 e 15 h^{-1} ;

- LV_f está compreendido entre 3 e 4,8 m/h, de preferência entre 3,2 e 4 m/h.

De preferência verificam-se as seguintes condições durante o passo b):

- BV_f está compreendido entre 80 e 120;

- SV_f está compreendido entre 8 e 15 h^{-1} ;

- LV_f está compreendido entre 3 e 4,8 m/h.

durante o passo c):

- BV_e está compreendido entre 3 e 7;

- LV_e é inferior a 1 m/h.

Pela permuta de iões, as proteínas da fracção de leite que se utilizou como matéria-prima vêm fixar-se sobre as funções ácidas da resina. A escolha dos parâmetros de fixação de acordo com a invenção permite levar a cabo uma fixação selectiva das proteínas sobre a coluna. nas condições clássicas de fixação do leite sobre uma resina catiónica, a lactoferrina e a lactoperoxidase, maioritárias, fixam-se preferencialmente sobre a resina. No processo de acordo com a invenção, as outras proteínas, minoritárias, são favorecidas pelas condições de fixação definidas acima neste documento, e a sua quantidade no conjunto de proteínas fixadas sobre a resina é significativamente superior à sua proporção na matéria-prima. O processo de acordo com a invenção permite portanto isolar uma fracção de leite que possui uma nova composição em proteínas, em relação às composições proteicas de leite da técnica anterior, e que apresenta propriedades biologicamente interessantes.

O passo c) de eluição das proteínas fixadas, é levado a cabo nas seguintes condições preferenciais:

Mantém-se a resina a uma temperatura compreendida entre 2 e 15°C, de preferência a entre 4 e 12°C. De preferência faz-se a alimentação da coluna em matéria-prima

(solução aquosa de sal) pela parte superior. A solução aquosa salina empregue para se levar a cabo a invenção é em geral uma solução de um cloreto de um metal alcalino tal como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Utiliza-se de preferência uma solução aquosa de cloreto de sódio. De forma vantajosa, a solução aquosa de sal tem uma concentração no intervalo de 2 e 25%, de preferência entre 5 e 15%, em peso, de sal, por peso de líquido. De preferência, a força iónica da solução aquosa de sal é de entre 1 e 2 M. O pH da solução de eluição é em geral de entre 6 e 7, vantajosamente entre 6,5 e 7.

De preferência os parâmetros de eluição obedecem a uma ou mais das seguintes condições:

- BV_e está compreendido entre 3 e 7 e de preferência entre 3 e 5;

- LV_e é inferior a 0,5 m/h.

Depois deste passo, o eluído que se obtém contendo a mistura de proteínas de leite é submetido de modo contínuo a um ou mais passos de ultrafiltração e de diafiltração destinados a eliminar os sais. Podem utilizar-se neste passo outros procedimentos conhecidos dos especialistas da técnica, tais como a electrodialise ou a passagem sobre resinas de permuta aniónicas e catiónicas, em vez da ultrafiltração e da diafiltração. De preferência, este tratamento é efectuado até se obter um permeado que

possua uma condutividade inferior a 15 mS. Pode utilizar-se neste passo em substituição, qualquer outro procedimento que permita eliminarem-se os sais, tal como nomeadamente a electrodialise. Submete-se então a solução a uma microfiltração destinada a esterilizar o retentado da ultrafiltração antes da sua secagem. Podem empregar-se outros procedimentos técnicos para esterilizar a fracção de leite obtida neste passo, nomeadamente um tratamento térmico adaptado, ultrassons ou campos eléctricos pulsados.

De preferência, seca-se o produto dessalinizado e esterilizado de modo a obter-se uma fracção de leite proveniente do processo da invenção, sob a forma de um pó, o que permite o seu acondicionamento e a sua armazenagem. Tal como se sabe, a secagem pode ser levada a cabo por liofilização ou por atomização.

É nova a fracção de leite obtida de preferência a partir de leite de vaca pelo processo da invenção. Sob forma seca, ela é caracterizada por possuir:

- um conteúdo em proteínas superior a 90%,
- um teor em sais inorgânicos inferior a 1%,
- um teor em matérias gordas inferior a 1%,
- um teor em lactose inferior a 1%,
- um teor em humidade inferior a 5%,
- um teor em lactoferrina inferior a 80%,
- um pH em solução a 2%, de entre 6 e 7,5,
- uma pureza espectrofotométrica no UV-

-visível, definida por uma razão $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$,

- pelo menos 1% de proteínas que tenham um ponto isoeléctrico superior ou igual a 8, estando as percentagens apresentadas em relação ao peso de material seco da fracção de leite de acordo com a invenção.

No caso em que a matéria-prima utilizada seja leite e não soro de leite, o produto obtido pelo processo da invenção caracteriza-se por condições suplementares:

- presença de pelo menos 40% de proteínas com um ponto isoeléctrico superior ou igual a 8,

- um teor em lactoferrina superior a 30% e inferior a 80%,

- uma actividade de lactoperoxidase superior ou igual a 120 unidades ABTS por mg de isolado (ABTS = Ácido 2,2'-azino-bis(e-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).

A medição do DO a 412 nm proporciona uma avaliação quantitativa da lactoferrina e da lactoperoxidase presentes na fracção proteica do leite.

A medição do DO a 412 nm proporciona uma avaliação quantitativa da totalidade das proteínas presentes na fracção proteica do leite.

A razão $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$ mostra que a lactoferrina e a lactoperoxidase estão em menor concentração, em relação às outras proteínas, na composição

obtida de acordo com a invenção, quando se compare com as proporções em que elas estão presentes no leite e nas fracções proteicas do leite provenientes da técnica anterior.

De preferência, a fracção proteica de leite obtida pelo processo de acordo com a invenção apresenta pelo menos uma das seguintes características:

- um conteúdo em proteínas superior a 95%,
- um teor em sais inorgânicos inferior a 0,5%,
- um teor em matérias gordas inferior a 0,5%,
- um teor em lactose inferior a 0,5%,
- um teor em humidade inferior a 4%,
- um pH em solução a 2%, de entre 6 e 7,2,
- uma pureza espectrofotométrica no UV-visível, definida por uma razão $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$,
- pelo menos 1% de proteínas que tenham um ponto isoeléctrico superior de entre 8,2 e 8,7.

No caso em que a matéria-prima utilizada seja leite e não soro de leite, o produto obtido pelo processo da invenção caracteriza-se pela seguinte condição suplementar:

- um teor em lactoferrina superior a 50% e inferior a 80%.

As fracções proteicas do leite de acordo com a

invenção apresentam propriedades vantajosas: elas favorecem nomeadamente o crescimento das células osteoblásticas e o das células intestinais.

As fracções proteicas do leite de acordo com a invenção são de igual forma eficazes na inibição do crescimento dos osteoclastos e dos pré-osteoclastos.

Estas propriedades bem como as propriedades já conhecidas das fracções proteicas do leite provenientes da técnica anterior, permitem encarar a utilização destas composições em numerosas aplicações, nomeadamente nos domínios da alimentação e da farmácia. A invenção tem portanto igualmente como objecto todas as composições alimentares e farmacêuticas, como também qualquer produto de higiene, que contenham uma fracção de proteínas de leite de acordo com o processo da invenção.

Uma composição alimentar de acordo com a invenção poderá ser por exemplo um leite alimentar, em especial um leite destinado à alimentação infantil, obtido por uma simples hidratação do pó de fracção proteica de leite obtido de acordo com a invenção. A invenção tem portanto como objecto a utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com a invenção, para a preparação de um leite alimentar.

A invenção tem igualmente como objecto composições alimentares que incluam uma fracção proteica de

leite de acordo com a invenção, e outros ingredientes alimentares, Pode-se em especial encarar a adição da fracção proteica do leite de acordo com a invenção a um leite de vaca, com o objectivo de o enriquecer em determinadas proteínas. A presença de cálcio nos alimentos que incluem a fracção proteica de leite de acordo com a invenção, será especialmente benéfica na medida em que essa fracção proteica de leite melhorar a absorção do cálcio pelo organismo humano, e nomeadamente a fixação do cálcio no tecido ósseo.

A invenção tem portanto igualmente como objecto a associação de uma fracção proteica de leite de acordo com a invenção, com cálcio.

A invenção diz igualmente respeito a estojos alimentares que incluam diversos constituintes acondicionados isoladamente, destinados a uma preparação extemporânea do alimento, e contendo uma fracção proteica de leite de acordo com a invenção.

Tais alimentos podem ser utilizados na prevenção de patologias tais como: atrasos de crescimento, osteoporose, fragilidade óssea, fracturas ósseas, reumatismo, artrose, doenças periodontais, deficiência da barreira intestinal...

Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção, contendo pelo menos uma fracção proteica de leite

de acordo com a invenção e um suporte aceitável do ponto de vista farmacêutico, pode ser utilizada no tratamento de várias das patologias seguintes: atraso de crescimento, osteoporose, fragilidade óssea, fracturas ósseas, reumatismo, artrose, doenças periodontais, deficiência da barreira intestinal...

É ponto assente que uma tal composição pode por outro lado conter um ou mais agentes terapêuticos. Pode vantajosamente associar-se cálcio à fracção proteica de leite de acordo com a invenção. Uma tal associação integra a invenção presente. Com efeito, uma fracção proteica de leite de acordo com a invenção permite melhorar a absorção do cálcio pelo organismo, nomeadamente a fixação do cálcio no tecido ósseo, o que permite melhorar o efeito de reforço dos ossos.

Pode também associar-se com vantagem cálcio e vitamina D à fracção proteica de leite de acordo com a invenção. Uma tal associação integra a invenção presente. Com efeito, a vitamina D melhora a absorção intestinal do cálcio, e uma fracção proteica de leite de acordo com a invenção permite melhorar a fixação do cálcio pelo tecido ósseo. Este efeito sinérgico permite em especial melhorar a saúde dos ossos.

Podem administrar-se composições farmacêuticas ou complementos alimentares de acordo com a invenção, sob qualquer forma apropriada tal como sob a forma de pós,

granulados, comprimidos, gélulas, bebidas como por exemplo em solução ou em xarope. A frequência da administração e a dose a administrar são adaptadas de forma conhecida de acordo com o peso e a idade do indivíduo.

Também se encontram igualmente incluídos na invenção presente produtos de higiene, nomeadamente sob a forma de um gel ou de uma pasta, os fluidos para lavagens bucais, as gomas de mascar, que contenham uma fracção proteica de leite de acordo com a invenção.

EXEMPLOS:

I - Preparação de isolados de proteínas de leite

Condições gerais:

A resina utilizada nos exemplo adiante neste documento é uma resina Trisacryl SP ®. Ela foi submetida aos tratamentos de acondicionamento seguintes, antes do início da sua utilização: foi posta em contacto com uma solução aquosa a 0,4% do desinfectante ASEPTO ®, utilizando-se 3 litros de desinfectante por quilograma de resina húmida, seguindo-se uma lavagem. Foi em seguida equilibrada por passagem de um tampão de acetato (80 mM, pH = 5,3), contendo cloreto de cálcio (33 g/L), à razão de 4 litros de tampão por quilograma de resina húmida. Por último lava-se a resina com água até que o eluído apresente um pH de entre 6 e 7, e uma condutividade inferior a 5 mS.

Depois de cada sequência de fixação da matéria-prima, seguida da sua eluição, limpa-se a resina por um tratamento enzimático com protease alcalina de *Bacillus licheniformis* num tampão a pH = 8, a 60°C durante 2 horas, seguindo-se um tratamento com uma solução de NaCl a 100 g por litro, durante 30 minutos (repetido 2 vezes). Antes de ser esterilizada, ela é submetida ao tratamento de acondicionamento que se expõe adiante neste documento.

Leva-se a cabo a ultrafiltração do eluído, a uma temperatura de entre 5 e 10°C, através de membranas orgânicas cujo limiar de corte é de 10 kD. O factor de concentração em volume que se pratica é de entre 10 e 60, de modo a obter-se um retentado que possua a maior quantidade possível de extracto, de preferência entre 15 e 20%. A diafiltração é levada a cabo a uma temperatura de entre 15 e 25°C utilizando as mesmas membranas, e utilizando como volume de água desmineralizada entre 8 e 10 vezes o volume do retentado obtido no passo de ultrafiltração, até que a condutividade do permeado seja inferior a 15 mS.

Efectua-se a microfiltração a 35°C a partir do retentado proveniente da ultrafiltração e diafiltração, sobre membranas cerâmicas cujo limiar de corte é de 1,4 µm.

Leva-se a cabo a secagem do permeado da microfiltração com uma torre de atomização com turbinas, a

uma temperatura de entrada de 140°C e a uma temperatura de saída de 80°C.

Característica da resina

A resina SPEC 70 é constituída por um suporte quimicamente inerte e mecanicamente resistente.

Do ponto de vista químico, a resina é fabricada por polimerização de AMPS: ácido 2-acrilamida-2-metilpropanossulfónico. A resina tem uma capacidade de permuta de iões de entre 400 e 700 $\mu\text{F/mL}$, e uma capacidade de fixação proteica medida com lactoferrina (mínimo 20 mg/mL) ou a lactoperoxidase (mínimo 40 mg/mL), ou ainda a lisozima (mínimo 70 mg/mL); a sua densidade é superior a 1,15 e a sua granulometria situa-se a entre 250 e 500 μm .

Exemplo 1:

A 10°C fazem-se passar 300.000 litros de leite desnatado e tratado termicamente a 68°C durante 15 segundos, através de 3.000 litros de resinas de permuta de catiões (SPEC 70, fornecida por BIOSEPRA), com um caudal de 14.000 litros/h em percurso ascendente de duas colunas que funcionavam em paralelo, cada uma delas com um raio de 1 metro.

Eluem-se as proteínas que se fixaram sobre a resina usando 9.000 litros de uma solução de cloreto de

sódio a 10%, que circulou de cima para baixo.

O eluído que se obteve apresenta um pH de 6,5 e um extracto seco de 80 g/kg. Ele é passado sobre membranas de ultrafiltração com limiar de corte de 10 kD e com uma área superficial de 17 m² que se haviam adquirido na DSS, a 11°C e com um caudal de permeação de 16 l/h/m², até se obter um factor de concentração em volume de 7.

O retentado apresenta um pH de 5,9 e tem um extracto seco de 170 g/kg; para eliminar o sal, diafiltra-se em seguida este retentado sobre as mesmas membranas, a 25°C e com água constituindo 70% do volume do eluído que se tratou, até se obter um factor de concentração em volume de 9,5, com um caudal de permeação de 16 l/h/m².

O retentado diafiltrado apresenta um pH de 6,5 e um extracto seco de 95 g/kg; é nesta altura passado através de membranas de microfiltração com uma porosidade de 1,4 µm e a 30°C, com um caudal de permeação de 320 l/h/m². O permeado desta microfiltração apresenta um pH de 6,6 e um extracto seco de 75 g/kg.

Seca-se em seguida este permeado sobre uma torre de atomização munida de uma turbina; a temperatura de entrada da torre é de 140'° e a temperatura de saída é de 80°C.

O isolado em pó que desta forma se obtém

apresenta as características seguintes:

- Humidade: 4,7%,
- Proteínas (Nx6,38) 96,2%, das quais:
 - Lactoferrina: 54%
 - Lactoperoxidase: 125 unidades ABTS/mg
- Cinzas: 0,1%, das quais:
 - Na: 0,02%
 - Cl: 0,44%
- Pureza espectrofotométrica: $DO^{412}/DO^{280} = 0,06$.

O perfil electroforético obtido por isofocagem com revelação com nitrato de prata está ilustrado pela Figura 1. Na Figura 1 compara-se a distribuição de pontos isoeléctricos da fracção proteica de leite de acordo com a invenção (anotada como LN06) com um produto de referência anotado Std, que é um estojo de calibração proteica comercializado pela Sociedade Pharmacia sob a referência 17047101 e é denominado "Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad PI 3-10". Constata-se que se encontram maioritariamente presentes proteínas possuindo pontos isoeléctricos elevados, (de cerca de 8,4). Este produto contém cerca de 50%, em peso, de lactoferrina, em relação ao peso total de isolado.

Exemplo 2:

Fazem-se passar 4,4 litros de soro ácido de caseinaria (pH 4,7, extracto seco 65 g/kg), a 10°C, através

de 22 mL de resina de permuta de catiões (SPEC 70 fornecida pela BIOSEPRA), com um caudal de 400 mL/h, em percurso descendente, numa coluna que tinha um diâmetro de 15 mm.

Eluem-se as proteínas que se fixaram sobre a resina, usando 90 mL de uma solução de cloreto de sódio a 10%, em percurso descendente.

Para se eliminar o sal, dialisa-se em seguida o eluído que se obteve (100 mL), contra água desmineralizada, durante 48 horas a 4°C.

O produto dialisado apresenta as seguintes características:

- Extracto seco: 1,5 g/kg,
- pH 5,4,
- Condutividade: 24 μ S,
- $DO^{412} < 0,005$,
- $DO^{280} = 4,6$ (0,46 após diluição a 1/10).

O perfil electroforético permite constatar que pelo menos 1% das proteínas presentes têm um perfil isoeléctrico superior ou igual a 8. Este produto contém cerca de 3% de lactoferrina, em peso em relação ao peso total do isolado proteico.

II - Testes biológicos

A - Métodos gerais

1. Testes de proliferação das células MC3T3 (linhagem celular de osteoblastos)

Cultivam-se as células MC3T3 a 37°C sob uma atmosfera húmida contendo 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado é o α -MEM (Meio Eagle Modificado alfa), suplementado com 10% de soro fetal de bovino e com 50 U/mL de penicilina e 50 μ g/mL de estreptomicina.

Para se testar o efeito das diferentes proteínas sobre o crescimento das células, semeiam-se as células sobre placas de 48 poços, com uma densidade de 5×10^4 células/cm³. Passadas 48 horas após a sementeira, adicionam-se as proteínas às células. As soluções proteicas haviam sido preparadas em meio de cultura, com uma concentração de 10 mg/mL, e depois são submetidas a uma filtração através de um filtro de 0,22 μ m, e diluídas com meio de cultura até à concentração pretendida, imediatamente antes da sua utilização. Contam-se as células após 72 h de cultura, avaliando a quantidade de ADN.

2. Teste de proliferação das células RAW 264.7 (linhagem celular pré-osteoclástica)

Cultivam-se as células RAW264.7 a 37°C sob uma

atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂. O meio de cultura que se utiliza é meio DMEM (Meio Eagle Modificado da Dulbecco), contendo glucose 25 mM, glutamina 4 mM e 1,5 g/L de bicarbonato, com um suplemento feito com 10 % de soro fetal de bovino e com 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina.

Para testar o efeito das diferentes proteínas sobre o crescimento celular, semeiam-se as células sobre placas de 48 poços, à razão de 5×10^4 células/cm². Passadas 48 horas após a sementeira, adicionam-se as proteínas às células. As soluções proteicas haviam sido preparadas em meio de cultura, com uma concentração de 10 mg/mL, e depois são submetidas a uma filtração através de um filtro de 0,22 µm, e diluídas com meio de cultura até à concentração pretendida, imediatamente antes da sua utilização. Contam-se as células após 72 h de cultura, avaliando a quantidade de ADN.

3. Teste de proliferação das células Caco-2 (linhagem celular intestinal)

Cultivam-se as células Caco-2 a 37°C sob uma atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂. O meio de cultura que se utiliza é meio DMEM (Meio Eagle Modificado da Dulbecco), contendo glucose 25 mM com um suplemento feito com 15% de soro fetal de bovino, 1% de aminoácidos não essenciais, glutamina 6 mM e com 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina.

Para testar o efeito das diferentes proteínas sobre o crescimento celular, semeiam-se as células sobre placas de 48 poços, à razão de 4×10^4 células/cm². Passadas 48 horas após a sementeira, adicionam-se as proteínas às células. As soluções proteicas haviam sido preparadas em meio de cultura, com uma concentração de 10 mg/mL, e depois são submetidas a uma filtração através de um filtro de 0,22 µm, e diluídas com meio de cultura até à concentração pretendida, imediatamente antes da sua utilização. Contam-se as células após 72 h de cultura, avaliando a quantidade de ADN.

B - Resultados

Foram levados a cabo os testes que se descreveram acima sobre três produtos:

- um isolado de proteínas de leite de vaca, composto por 90% de lactoferrina (Produto de comparação):

T₁,

- um isolado de proteínas de leite de vaca cujo teor em lactoferrina era de pelo menos 0,01% (Produto de comparação): T₂,

- o produto preparado no exemplo 1: P₁,

- o produto preparado no exemplo 2: P₂.

Expõem-se os resultados na tabela I:

Produto	Concentração	Estimulação da produção de células MC3T3	Inibição da proliferação de células RAW 264.7	Estimulação da proliferação de células Caco-2
T1	1,0 mg/mL	+65%	-70%	+67%
	0,1 mg/mL	+37%	-30%	+40%
T2	1,0 mg/mL	+9%	-8%	+9%
	0,1 mg/mL	+6%	-4%	-
P1	1,0 mg/mL	+36%	-70%	+40%
	0,1 mg/mL	+15%	-22%	+30%
P2	1,0 mg/mL	+31%	-32%	+41%
	0,1 mg/mL	+6%	-17%	+37%

TABELA I

A concentração designa a concentração em isolado proteico de leite, no meio de cultura.

O estado da técnica tendia a demonstrar que a actividade de um isolado proteico de leite se ligava à percentagem de lactoferrina que ele contivesse (vejam-se os resultados de T₂).

Ao contrário deste preconceito proveniente da técnica anterior, os resultados dos testes apresentados acima neste documento mostram que os isolados proteicos de

leite da invenção, ainda que contenham pouca lactoferrina em comparação com a amostra T₁, apresentam uma actividade notável nos testes de crescimento das células osteoblastos e das células intestinais, bem como nos da inibição da proliferação dos pré-osteoclastos.

Lisboa, 5 de Abril de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de isolamento de proteínas do leite, a partir de leite ou de um soro de leite, que inclua os seguintes passos:

a) o leite e ou o soro de leite seja esterilizado e desengordurado;

b) a fracção proteica de leite proveniente do passo a) seja passada através de uma resina de permuta de catiões acondicionada numa coluna de eluição;

c) a fracção retida sobre a resina seja eluída por uma solução aquosa salgada;

d) o eluído resultante do passo c) seja dessalinizado e esterilizado.

Caracterizando-se este processo por:

a resina de permuta de iões é uma resina possuindo enxertos de funções ácido forte;

o parâmetro BV que designa a razão entre o volume de matéria-prima e o volume de resina húmida na coluna,

o parâmetro SV que designa a razão entre o caudal

de alimentação da coluna e o volume de resina húmida na coluna,

o parâmetro LV que designa a razão entre o caudal de alimentação da coluna e a secção da coluna,

β) no decurso do passo b), os parâmetros de fixação apresentam os seguintes valores:

BV_f está compreendido entre 5 e 400;

- SV_f está compreendido entre 2 e 40 h^{-1} ;

- LV_f é superior ou igual a 1 m/h e inferior ou igual a 5 m/h.

γ) no decurso do passo c), os parâmetros de eluição têm os seguintes valores

- BV_e está compreendido entre 1,5 e 7;

- LV_e é inferior a 1 m/h.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a matéria-prima ser leite de vaca.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a matéria-prima ser um soro de leite ácido de caseína.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a resina de permuta de cátions ser uma resina com enxertos de funções ácidas com $pK_a \leq 2$ e possuindo uma capacidade de permuta de iões de entre 200 e 1000 $\mu E/mL$.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a resina possuir enxertos de funções ácido sulfônico ou sal de sulfonato.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a resina possuir enxertos de funções propilsulfônicas ou de propilsulfonato.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por durante a fase b) de fixação da matéria-prima, se cumprir uma ou várias de entre as condições seguintes:

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por durante o passo b) de fixação da matéria-prima, ser cumprida uma ou mais das condições seguintes:

BV_f está compreendido entre 80 e 150;

- SV_f está compreendido entre 5 e 40 h^{-1} ;

- LV_f está compreendido entre 3 e 4,3 m/h.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por serem cumpridas as condições seguintes:

durante a fase b):

- BV_f está compreendido entre 80 e 120;
- SV_f está compreendido entre 8 e 15 h^{-1} ;
- LV_f está compreendido entre 3 e 4,8 m/h.

durante a fase c):

- BV_e está compreendido entre 3 e 7;
- LV_e ser inferior a 1 m/h.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por durante o passo b) a resina estar acondicionada dentro de uma coluna cuja temperatura seja mantida entre 2 e 15°C.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por durante o passo c) de eluição das proteínas fixadas, se cumprir pelo menos uma das seguintes condições:

- BV_e está compreendido entre 3 e 5;

- LV_e ser inferior a 0,5 m/h.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por durante o passo c) a resina estar acondicionada dentro de uma coluna cuja temperatura seja mantida entre 2 e 15°C.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a solução aquosa salina empregue para levar a cabo a invenção ser uma solução de um metal alcalino seleccionado de entre K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .

14. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por a solução aquosa salina ser uma solução de cloreto de sódio.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a solução aquosa salina ter uma concentração de entre 2 e 25%, em peso, de sal, por peso de líquido.

16. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a solução aquosa salina ter uma força iónica de entre 1 e 2 M.

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o pH da solução aquosa salina de eluição ser de entre 6 e 7, vantajosamente de entre 6,5 e 7.

18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se retirarem os sais por ultrafiltração e diafiltração.

19. Processo de acordo com qualquer a reivindicação 18, caracterizado por os tratamentos de ultrafiltração e de diafiltração serem efectuados até se obter um permeado com uma condutividade inferior a 15 mS.

20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a esterilização ser feita por microfiltração.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o produto dessalinizado e esterilizado ser seco de modo a obter-se a fracção de leite do processo da invenção sob a forma de um pó.

22. Fracção proteica de leite, caracterizada por ser susceptível de ser obtida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21.

23. Fracção proteica de leite, caracterizada por

apresentar as seguintes características:

- um conteúdo em proteínas superior a 90%,
- um teor em sais inorgânicos inferior a 1%,
- um teor em matérias gordas inferior a 1%,
- um teor em lactose inferior a 1%,
- um teor em humidade inferior a 5%,
- um teor em lactoferrina inferior a 80%,
- um pH em solução a 2%, de entre 6 e 7,5,
- uma pureza espectrofotométrica no UV-visível, definida por uma razão $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$,
- pelo menos 1% de proteínas que tenham um ponto isoeléctrico superior ou igual a 8,

estando as percentagens apresentadas em relação ao peso de material seco da fracção de leite de acordo com a invenção.

24. Fracção proteica de leite de acordo com a reivindicação 23, caracterizada por ela apresentar pelo menos uma das seguintes características:

- um conteúdo em proteínas superior a 95%,
- um teor em sais inorgânicos inferior a 0,5%,
- um teor em matérias gordas inferior a 0,5%,
- um teor em lactose inferior a 0,5%,
- um teor em humidade inferior a 4%,
- um teor em lactoferrina inferior a 80%,
- um pH em solução a 2%, de entre 6 e 7,2,
- uma pureza espectrofotométrica no UV-

visível, definida por uma razão $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$,

- pelo menos 1% de proteínas que tenham um ponto isoeléctrico entre 8,2 e 8,7.

25. Fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizada por ser obtida do leite de vaca.

26. Fracção proteica de leite de acordo com a reivindicação 25, caracterizada por conter pelo menos 40% de proteínas que tenham um ponto isoeléctrico superior ou igual a 8.

27. Fracção proteica de leite de acordo com a reivindicação 25 ou a reivindicação 26, caracterizada por conter um teor em lactoferrina superior ou igual a 30% e uma actividade de lactoperoxidase superior ou igual a 120 unidades ABTS por mg de isolado.

28. Fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizada por provir de um soro lácteo ácido de caseína.

29. Associação de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 28, com cálcio.

30. Associação de acordo com a reivindicação 29, caracterizada por conter também vitamina D.

31. Composição alimentar, caracterizada por conter uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30.

32. Estojos alimentares contendo um pó de fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30.

33. Utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, para fabricar um leite alimentar.

34. Utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, para a preparação de um alimento destinado à prevenção de uma patologia seleccionada de entre: atraso de crescimento, osteoporose, fragilidade óssea, fracturas ósseas, reumatismo, artrose, doenças periodontais, deficiência da barreira intestinal.

35. Utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, para a preparação de um alimento destinado favorecer o crescimento dos osteoblastos.

36. Composição farmacêutica caracterizada por conter pelo menos uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, e um suporte

aceitável do ponto de vista farmacêutico.

37. Utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, para a preparação de um medicamento destinado à prevenção e/ou ao tratamento de uma patologia seleccionada de entre: atraso de crescimento, osteoporose, fragilidade óssea, fracturas ósseas, reumatismo, artrose, doenças periodontais.

38. Utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, para a preparação de um medicamento destinado a melhorar a absorção do cálcio pelo organismo

39. Utilização de uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30, para a preparação de um medicamento destinado a favorecer o crescimento dos osteoblastos

40. Produto de higiene caracterizado por conter pelo menos uma fracção proteica de leite de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 30.

Lisboa, 5 de Abril de 2007

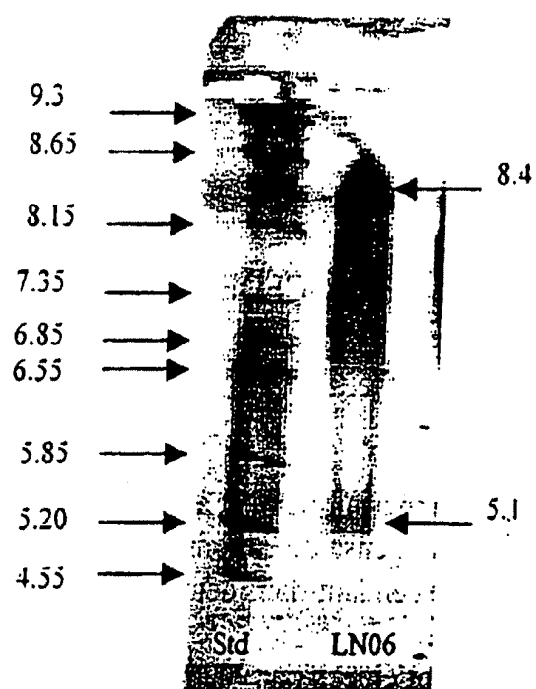


Figura 1