



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

(21) **PI0611020-7 A2**

(22) Data de Depósito: 23/03/2006
(43) Data da Publicação: 10/08/2010
(RPI 2066)



(51) *Int.Cl.:*
A23L 1/29
A23L 1/308

(54) Título: **USO DE POLIDEXTROSE PARA ESTIMULAR OS ATRIBUTOS FUNCIONAIS DE OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO EM CRIANÇAS PEQUENAS ALIMENTADAS COM FÓRMULA**

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a um novo uso de PDX na fabricação de um medicamento para aumentar a produção de acetato, diminuir a produção de butirato, aumentar a população e espécies de bactérias benéficas e retardar a taxa de fermentação de pré-bióticos dentro do intestino de uma criança pequena alimentada com fórmula.

(30) Prioridade Unionista: 30/06/2005 US 11/172,123,
01/06/2005 US 60/686,390, 01/06/2005 US 60/686,390, 30/06/2005
US 11/172,123

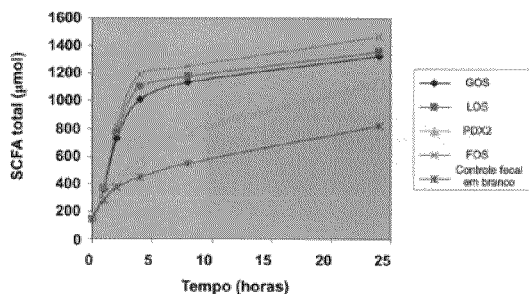
(73) Titular(es): Bristol-Myers Squibb Company

(72) Inventor(es): Anna-Marja Aura, Bryon W. Petschow, Glenn R. Gibson, Maria Saarela, Renia Gemmel, Robert A. Rastall, Robert J. McMahon

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006010608 de 23/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/130205 de 07/12/2006



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE POLIDEXTROSE PARA ESTIMULAR OS ATRIBUTOS FUNCIONAIS DE OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO EM CRIANÇAS PEQUENAS ALIMENTADAS COM FÓRMULA".

5 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1) Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao uso de povidextrose para estimular os atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano em crianças pequenas.

10 (2) Descrição da técnica Relacionada

A microflora do intestino infantil é rapidamente estabelecida nas primeiras poucas semanas após o nascimento. A natureza desta colonização intestinal é inicialmente determinada pela exposição preliminar a fontes ambientais de micróbios bem como à saúde da criança pequena. O fato da
15 criança pequena ser alimentada no peito ou alimentada com fórmula também tem uma forte influência sobre a população bacteriana intestinal.

Na criança pequena alimentada no peito, por exemplo, *Bifidobacterium* spp. domina entre as bactérias intestinais, com *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. como contribuintes menos comuns. Em contraste, a
20 microflora de crianças pequenas alimentadas com fórmula é mais diversa, contendo *Bifidobacterium* spp. e *Bacteroides* spp. bem como as espécies mais patogênicas, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Clostridia*. As espécies variadas de *Bifidobacterium* nas fezes de crianças pequenas alimentadas no peito e alimentadas com fórmula diferem também.

25 *Bifidobacteria* são geralmente consideradas bactérias "benéficas" e protegem, como se sabe, contra a colonização por bactérias patogênicas. Isto provavelmente ocorre através de competição por receptores de superfícies de células, competição por nutrientes essenciais, produção de agentes antimicrobianos, e produção de compostos inibidores como ácidos
30 graxos de cadeia curta (SCFA) que podem, diminuir o pH fecal e inibir as bactérias potencialmente patogênicas. *Bifidobacterium* também estão associadas com resistência à infecção do trato gastrointestinal (GI) e respiratório

bem como uma função imune melhorada em crianças e crianças pequenas. Assim, a promoção de um ambiente intestinal em que *Bifidobacterium* dominam tornar-se um objetivo no desenvolvimento de formulações nutricionais para crianças pequenas alimentadas com fórmula.

5 O leite humano (LH) contém vários fatores que podem contribuir para o crescimento e população de *Bifidobacterium* na microflora intestinal de crianças pequenas. Dentre estes fatores está uma mistura complexa de mais do que 130 oligossacarídeos diferentes que alcançam níveis tão elevados quanto 8-12 g/l em leite transicional e maduro. Kunz, *et al.*, *Oligossacari-*
10 *rides in Human Milk: Structure, Functional, and Metabolic Aspects*, Ann. Rev. Nutr. 20: 699-722 (2000). Estes oligossacarídeos são resistentes à digestão enzimática no trato gastrointestinal superior e alcançam o cólon intacto, onde servem como substratos para a fermentação colônica.

Acredita-se que os oligossacarídeos de LH elicitam um aumento
15 no número de *Bifidobacterium* na flora colônica, junto com uma redução no número de bactérias potencialmente patogênicas. Kunz, *et al.*, *Oligossacari-*
deos in Human Milk: Structure, Functional, and Metabolic Aspects, Ann. Rev. Nutr. 20: 699-722 (2000); Newburg, *Do the Binding Properties of Oligossacari-*
20 *deos in Milk Protect Human Infants from Gastrointestinal Bacteria?*, J. Nutr. 217:S980-S984 (1997). Um modo em que os oligossacarídeos de LH podem aumentar o número de *Bifidobacterium* e reduzir o número de bactérias potencialmente patogênicas é agindo como receptores competitivos e inibindo a ligação de patógenos à superfície das células. Rivero-Urgell, *et al.*, *Oligos-*
sacarídeos: Application in Infant Food, Early Hum. Dev. 65(S):43-52 (2001).

25 Além de reduzir o número de bactérias patogênicas e promover a população de bifidobactérias, quando os oligossacarídeos de LH são fermentados, eles produzem SCFAs como ácidos acético, propiônico e butírico. Acredita-se que estes SCFAs contribuem para o teor calórico, servem como uma fonte de energia principal para o epitélio intestinal, estimulam a absor-
30 ção de sódio e água no cólon, e melhoram a digestão e absorção no intestino delgado. Além disso, acredita-se que SCFAs contribuem para a saúde gastrointestinal global modulando o desenvolvimento gastrointestinal e fun-

ção imune.

A fermentação de oligossacarídeos de LH também reduz as concentrações de amônia, amina e fenol nas fezes, que estão implicados como os principais componentes de odor das fezes. Cummings & Macfarlane, *The Control and Consequences of Bacterial Fermentation in the Human Colon*, J. Appl. Bacteriol. 70:443-459 (1991); Miner & Hazen, *Ammonia and Amines: Components of Swine-Building Odor* ASAE 12:772-774 (1969); Spoelstra, *Origin of Objectionable Components in Piggery Wastes and the Possibility of Applying Indicator Components for Studying Odour Development*, Agric. Environ. 5:241-260 (1980); O'Neill & Phillips, *A Review of the Control of Odor Nuisance from Livestock Buildings: Part 3. Properties of the Odorous Substances which have been Identified in Livestock Wastes or in the Air Around them* J. Agric. Eng. Res. 53:23-50 (1992).

Como um resultado dos oligossacarídeos presentes do LH, o perfil de SCFA de uma criança pequena alimentada no peito é muito diferente do de uma criança pequena alimentada com fórmula. Por exemplo, crianças pequenas alimentadas no peito não produzem virtualmente butirato, com acetato compreendendo aproximadamente 96% da produção de SCFA total. Lifschitz, et al., *Characterization of Carbohydrate Fermentation in Feces of Formula-Fed and Breast-Fed Infants*, Pediatr. Res. 27:165-169 (1990); Siigur, et al., *Faecal Short-Chain Fatty Acids in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants*. Acta. Paediatr. 82:536-538 (1993); Edwards, et al., *Faecal Short-Chain Fatty Acids in Breast-Fed and Formula-Fed Babies*, Acta. Paediatr. 72:459-462 (1994); Parrett & Edwards, *In Vitro Fermentation of Carbohydrates by Breast Fed and Formula Fed Infants*, Arch. Dis. Child 76:249-253 (1997). Em contraste, apesar de crianças pequenas alimentadas com fórmula terem acetato (74%) como o SCFA principal nas fezes, elas têm quantidades consideráveis de propionato (23%) e quantidades pequenas de butirato (3%) presentes também. Estas diferenças entre os perfis de SCFA de crianças pequenas alimentadas no peito e crianças pequenas alimentadas com fórmula podem afetar a energia, digestão ou saúde global da criança pequena alimentada com fórmula.

Devido ao leite de vaca e fórmulas infantis comercialmente disponíveis que são baseadas em leite de vaca proverem somente quantidades de traço de oligossacarídeos, pré-bióticos são freqüentemente usados para suplementar a dieta de crianças pequenas alimentadas com fórmula. Os pré-bióticos são definidos como "ingredientes alimentícios não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou um número limitado de bactérias no cólon que podem melhorar a saúde do hospedeiro". Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B., *Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota-Introducing the Concept of Probiotics*, J. Nutr. 125:1401-1412 (1995). Pré-bióticos comuns incluem fruto-oligossacarídeo, gluco-oligossacarídeo, galacto-oligossacarídeo, iso-malto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo e lactulose.

A incorporação de vários ingredientes pré-bióticos em fórmulas infantis foi descrita. Por exemplo, o pedido de Patente US 20030072865 para Bindels, et al. descreve uma fórmula infantil com um teor de proteína melhorado e pelo menos um pré-biótico. O componente pré-biótico pode ser lacto-N-tetose, lacto-N-fuco-pentose, lactulose (LOS), lactosacarose, rafinose, galacto-oligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeo (FOS), oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de soja, oligossacarídeos baseados em manose, arabio-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, glucanos, sialil oligossacarídeos e fuco-oligossacarídeos.

Similarmente, o pedido de Patente US 20040191234 para Haschke descreve um método para melhorar a resposta imune que compreende administrar pelo menos um pré-biótico. O pré-biótico pode ser um oligossacarídeo produzido de glicose, galactose, xilose, maltose, sacarose, lactose, amido, xilano, hemicelulose, inulina, ou uma mistura dos mesmos. O pré-biótico pode estar presente em um cereal para crianças pequenas.

Infelizmente, no entanto, existem muitas desvantagens na administração dos pré-bióticos acima para crianças pequenas alimentadas com fórmula. Embora eles possam afetar benéficamente a população de probióticos no intestino, eles não produzem um perfil de SCFA que é similar ao de uma criança pequena alimentada no peito. Além disso, a fermentação de

5 muitas destas substâncias prebióticas ocorre em uma taxa muito rápida, que freqüentemente produz excesso de gases, distensão abdominal, inchaço e diarreia. Assim, a escolha de substâncias prebióticas em fórmulas infantis deve ser feita com o objetivo de maximizar os efeitos benéficos e minimizar os efeitos colaterais indesejados.

10 Conseqüentemente, seria benéfico prover uma substância prebiótica que simulasse os atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano em crianças pequenas, como um aumento na população e espécies de bactérias benéficas no intestino infantil e produção de um perfil de SCFA similar ao de uma criança pequena alimentada no peito. Além disso, a substância prebiótica deve ser bem tolerada em crianças pequenas e não deve produzir ou causar excesso de gases, distensão abdominal, inchaço ou diarreia.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 Assim, resumidamente, a presente invenção é dirigida a um novo uso de polidextrose (PDX) na fabricação de um medicamento para simular os atributos funcionais dos oligossacarídeos do leite humano em uma criança pequena alimentada com fórmula.

20 A presente invenção também é dirigida a um novo uso de PDX na fabricação de um medicamento para aumentar a população e espécies de bactérias benéficas em uma criança pequena alimentada com fórmula.

25 Em um outro aspecto, a presente invenção é dirigida um novo uso de PDX na fabricação de um medicamento para produzir um perfil de ácido graxo de cadeia curta (SCFA) em uma criança pequena alimentada com fórmula que é similar ao de uma criança pequena alimentada no peito. Especificamente, PDX pode fazer com o perfil de SCFA tenha um nível aumentado de acetato e um decréscimo em butirato.

30 Ainda em um outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um novo uso de PDX na fabricação de um medicamento para diminuir a taxa e extensão de fermentação de pré-bióticos no intestino de uma criança pequena alimentada com fórmula. Mais particularmente, a invenção reduz a produção de gás total bem como a produção de dióxido de carbono no intestino

infantil.

Dentre as várias vantagens encontradas a serem obtidas pela presente invenção, estão o fato de ser bem tolerado em crianças pequenas e estimular os atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano em crianças pequenas, como uma população aumentada e espécies de bactérias benéficas no intestino infantil, otimização das características das fezes e produção de um perfil de SCFA similar ao de uma criança alimentada no peito.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

10 Para uma compreensão mais completa da presente invenção, referência agora é feita às seguintes descrições tomadas em conjunto com os desenhos anexos.

A figura 1 ilustra a produção de SCFA total durante a fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

15 A figura 2 ilustra trocas de pH durante a fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

A figura 3 ilustra a proporção relativa da produção de ácido acético na fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

20 A figura 4 ilustra a proporção relativa da produção de ácido propiônico na fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

A figura 5 ilustra a proporção da produção de ácido butírico na fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

25 A figura 6 ilustra as proporções relativas da produção de ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e SCFA total na fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

A figura 7 ilustra a produção de SCFA total durante a fermentação de várias combinações de carboidratos pré-bióticos.

A figura 8 ilustra as trocas em pH durante a fermentação de várias combinações de carboidratos pré-bióticos.

30 A figura 9 ilustra a produção de SCFA total durante a fermentação de diferentes combinações de PDX e GOS.

A figura 10 ilustra a concentração e ácido acético produzido du-

rante a fermentação de diferentes combinações de PDX e GOS.

A figura 11 ilustra as concentrações de ácido propiônico produzido durante a fermentação de diferentes combinações de PDX e GOS.

5 A figura 12 ilustra a concentração de ácido butírico produzido durante a fermentação de diferentes combinações de PDX e GOS.

A figura 13 ilustra a formação de gases como volume total durante a fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

A figura 14 ilustra a formação de gases como concentração de dióxido de carbono durante a fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

10 A figura 15 ilustra a formação de gases como concentração de hidrogênio durante a fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

A figura 16 ilustra a formação de gases como concentração de dissulfeto de hidrogênio durante a fermentação de GOS, LOS, PDX2 e FOS.

15 A figura 17 é um resumo do efeito do pré-biótico de leite humano, FOS, LOS, GOS, PDX e várias combinações dos mesmos na microflora fecal.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

20 Será feita agora referência em detalhes às modalidades da invenção, sendo um ou mais exemplos descritos abaixo. Cada exemplo é apresentado para fins de explicação da invenção, e não uma limitação da mesma. Naturalmente, será evidente aos versados na técnica que várias modificações e variações podem ser feitas na presente invenção sem sair do escopo ou espírito da mesma. Por exemplo, os aspectos ilustrados ou descritos como parte de uma modalidade, podem ser usados em uma outra modalidade para dar ainda uma outra modalidade.

25 Assim, pretende-se que a presente invenção cubra estas modificações e variações como estão dentro do escopo das reivindicações anexas e seus equivalentes. Outros objetivos, características e aspectos da presente invenção são descritos em ou são óbvios a partir da seguinte descrição detalhada. Deve ser compreendido por um versado na técnica que a presente discussão é uma descrição de modalidades exemplares somente, e não se pretende que limite os aspectos mais amplos da presente invenção.

30

Definições

Como usado aqui, o termo “pré-biótico” significa um ingrediente alimentício não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon que podem melhorar a saúde do hospedeiro.

O termo “probiótico” significa um microorganismo com baixa ou nenhuma patogenicidade que exerce efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro.

Como usado aqui, o termo “criança pequena” significa um ser humano que tem menos do que cerca de um ano de idade.

Uma “quantidade terapêuticamente eficaz”, como usado no presente pedido, significa uma quantidade que ocasiona um efeito pré-biótico no indivíduo.

O termo “estimulando”, como usado aqui, significa tendo ou tomando a forma ou aparência de ou tendo ou produzindo uma semelhança sintomática.

Os termos “atributos funcionais” significam qualquer qualidade inerente ou característica que faz com que alguma coisa ocorra. Exemplos de atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano na presente invenção podem incluir o aumento da população e espécies de bactérias benéficas, a produção de um perfil de SCFA que é elevado em ácido acético e baixo em ácido butírico, e a produção de uma taxa baixa e extensão baixa de fermentação de pré-bióticos no intestino.

Como usado aqui, o termo “fórmula infantil” significa uma composição que satisfaz aos requisitos nutrientes de uma criança pequena ao ser um substituto para o leite humano. Nos US, o conteúdo de uma fórmula infantil é ditado pelos regulamentos federais descritos em 21 C.F.R. Seções 100, 106 e 107. Estes regulamentos definem níveis de macronutrientes, vitaminas, minerais, e de outros ingredientes em um esforço para estimular as propriedades nutricionais e outras do leite humano.

Invenção

De acordo com a presente invenção, foi descoberto um novo uso

de PDX na fabricação de um medicamento para estimular os atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano em crianças pequenas alimentadas com fórmula. A administração de PDX provê um efeito benéfico sobre a população e espécies de probióticos, produz um perfil de SCFA que é similar ao de crianças pequenas alimentadas com fórmula e é fisicamente bem tolerado por crianças pequenas.

PDX é um carboidrato não digerível que é sintetizado a partir de sorbitol e glicose reticulados aleatoriamente. Ele não é digerível no trato GI superior e é somente parcialmente fermentado no trato GI inferior, tornando-se um ingrediente benéfico para a saúde digestiva. Os benefícios fisiológicos de PDX incluem massa fecal aumentada, tempo de trânsito reduzido, pH fecal mais baixo e concentração reduzida de substâncias putrefativas no cólon. Em adultos, a ingestão de PDX também mostra ajudar na promoção e crescimento de bactérias benéficas no intestino e na produção de SCFAs.

PDX foi identificado como uma substância prebiótica para adultos com base em suas funções no trato GI. Por exemplo, o pedido de Patente US 20040062758 para Mayra-Makinem et al, refere-se a uma composição que compreende um probiótico e um ou mais pré-bióticos, onde o pré-biótico pode ser GOS, palatinosseoligossarídeo, oligossacarídeo de sódio, gentiooligossacarídeo, xilooligômeros, amido não degradável, lactossacarose, LOS, lactilol, maltitol, ou PDX. Similarmente, o pedido de Patente US 4.859.488 para Kan refere-se a um alimento líquido compreendendo PDX e oligossacarídeos que é utilizável para curar constipação.

PDX, no entanto, não foi identificado como um pré-biótico que provê os benefícios da presente invenção e pode ser administrado a crianças pequenas. Sabe-se que a microflora intestinal de crianças pequenas é bem menos desenvolvida do que a de um adulto. Apesar da microflora do humano adulto consistir de mais do que 10^{13} microorganismos e aproximadamente 500 espécies, a microflora intestinal de uma criança pequena contém somente uma fração destes microorganismos, tanto em número absoluto como em diversidade de espécies. Em razão das espécies e população bacterianas variarem tão imensamente entre o intestino de uma criança pe-

quena e de um adulto, não pode ser assumido que uma substância prebiótica que tem um efeito benéfico em adultos possa também ter um efeito benéfico em crianças pequenas.

5 Em adultos, a ingestão de PDX foi demonstrada como aumentando a produção de acetato e butirato. Devido a butirato não ser notado em níveis apreciáveis em crianças pequenas alimentadas no peito e estar associado com efeitos nocivos se produzido em níveis significativos no intestino infantil, PDX não pode geralmente ser considerado apropriado para nutrição de crianças pequenas com base em seus efeitos observados no sistema GI
10 de adultos. Assim, foi surpreendente e inesperado que PDX foi realmente metabolizado primeiramente em acetato e propionato, com pequena formação de butirato. Assim, PDX não somente tem um impacto positivo na população e espécies de bactérias benéficas no trato intestinal de crianças pequenas, mas PDX também criou um perfil de SCFA que foi muito similar ao
15 de uma criança pequena alimentada no peito e pode ser extremamente bem tolerado por crianças pequenas.

Uma referência particular que refere-se a PDX no contexto da administração em crianças pequenas realmente ensina o contrário da presente invenção. No pedido de patente U.S. 20030157146 para Rautonen,
20 declara-se que PDX pode estimular o sistema imunológico de crianças pequenas. Neste pedido, no entanto, A requerente descreve que PDX realmente *diminuiu* a população de *Bifidobacteria* no intestino infantil (Rautonen App., para. 0074). A requerente justifica este resultado notando que “uma abundância de bifidobactérias pode causar também efeitos fisiológicos menos desejáveis como doenças bacterianas entéricas e imunossupressão.”
25 (Rautonen App., para. 0069).

Devido à referência ensinar que PDX realmente diminui a população de *Bifidobacteria* no intestino infantil, isto está em um conflito direto com o ensinamento do presente pedido. Além disso, a referência não demonstra que PDX aumenta a produção de acetato, diminui a produção de
30 butirato ou diminui a taxa de fermentação de pré-bióticos no intestino infantil.

Na presente invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz

de PDX é administrada a uma criança pequena para o fim de estimular os atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de PDX pode estar entre cerca de 1,0 g/l e 10,0 g/l, administrada diariamente. Em uma outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de PDX pode estar entre 2,0 g/l e 8,0 g/l, administrada diariamente.

PDX está comercialmente disponível de uma variedade de fontes. Por exemplo, PDX STA-LITE® está disponível em sacos de 2,27 kg de Honeyville Grain, Inc., localizado em Salt Lake City, UT. Alternativamente, PDX Litesse® Ultra® está comercialmente disponível de Danisco Sweeteners, Ltd., localizado no Reino Unido.

PDX é bem-apropriado para incorporação em uma fórmula infantil, uma vez que ele contém somente 1 Cal/g, quando comparado a 4 Cal/g para pré-bióticos típicos. Ele também é elevadamente solúvel e de sabor neutro. Assim, sua adição à fórmula infantil não pode mudar as características físicas e de sabor da composição.

A forma de administração de PDX na invenção não é crítica, contanto que uma quantidade terapeuticamente eficaz seja administrada. Mais convenientemente, o PDX é suplementado na fórmula infantil que é então alimentada a uma criança pequena.

A fórmula infantil para uso na presente invenção é preferivelmente nutricionalmente completa e tipicamente contém tipos e quantidades apropriadas de lipídeos, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais. A quantidade de lipídeos ou gordura tipicamente pode variar de cerca de 3 a cerca de 7 g/100 kcal. A quantidade de proteína tipicamente pode variar de cerca de 1 a cerca de 5 g/100 kcal. A quantidade de carboidrato tipicamente pode variar de cerca de 8 a cerca de 12 g/100 kcal. As fontes de proteína podem ser qualquer uma usada na técnica, por exemplo, leite desnatado, proteína de soro, caseína, proteína caseína, proteína de soja, proteína hidrolisada, aminoácidos e outros. As fontes de carboidrato podem ser qualquer uma usada na técnica, por exemplo, lactose, glicose, sólidos de xarope de milho, maltodextrinas, sacarose, amido, sólidos de xarope de arroz, e outros.

As fontes de lipídeos podem ser qualquer uma usada na técnica, por exemplo, óleos vegetais como azeite de dendê, óleo de soja, palmoleína, óleo de coco, óleo de triglicerídeo de cadeia média, óleo de girassol de elevado teor oléico, óleo de cártamo de elevado teor oléico.

5 Convenientemente, a fórmula infantil comercialmente disponível pode ser usada. Por exemplo, Enfalac, Enfamil®, fórmula para prematuros Enfamil®, Enfamil® com ferro, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil®, ou ProSobee® (disponível de Mead Johnson & Company, Evansville, IN, U.S.A.) podem ser suplementados com níveis apropriados de PDX e usados
10 na prática da invenção.

Em uma modalidade da presente invenção, PDX pode ser administrado em combinação com um outro pré-biótico. O pré-biótico selecionado pode ser qualquer pré-biótico conhecido na técnica. Exemplos de pré-bióticos incluem, mas não estão limitados a: FOS, inulina, gluco-oligossacá-
15 rídeo, GOS, isomalto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, oligossacarídeos de soja, quito-oligossacarídeo, gentio-oligossacarídeo, manno-oligossacá- rídeo, LOS, lactossacarose, rafinose, arabinose-oligossacarídeo, glucanos, sia- lil-oligossacarídeo e fuco-oligossacarídeo.

Em uma modalidade particular da presente invenção, PDX é
20 administrado em combinação com GOS. GOS é uma mistura de oligossacá- rídeos consistindo em D-glicose e D-galactose. Algumas vezes é referido como trans-galacto-oligossacarídeo. Ele é produzido de D-lactose por β - galactosidase, que pode ser obtida a partir de *Aspergillus orizae*. Sugere-se que GOS aumenta a absorção de cálcio e previne a perda óssea em adultos.
25 GOS é identificado como um pré-biótico que é utilizável para administração a crianças pequenas no pedido de patente U.S. 20030072865 para Bindels, *et al.*

Nesta modalidade, PDX e GOS podem ser administrados em uma relação de PDX:GOS de entre cerca de 9:1 e 1:9. Em uma outra moda-
30 lidade, a relação de PDX:GOS pode estar entre cerca de 5:1 e 1:5. Ainda em uma outra modalidade, a relação de PDX:GOS pode estar entre cerca de 1:3 e 3:1. Em uma modalidade particular, a relação de PDX:GOS pode ser cerca

de 5:5. Em uma outra modalidade particular, a relação de PDX para GOS pode ser cerca de 8:2.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS pode estar entre cerca de 1,0 g/l e 10,0 g/l, administrada diariamente. Em uma outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS pode estar entre cerca de 2,0 g/l e 8,0 g/l, administrada diariamente. Em uma modalidade particular, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS pode ser cerca de 2 g/l de PDX e 2 g/l de GOS, administrada diariamente.

Em uma outra modalidade específica da presente invenção, PDX é administrado em combinação com LOS. LOS é um dissacarídeo semi-sintético formado a partir de D-galactose e D-frutose e unido por uma ligação β -glucosídica. Ele é resistente a hidrólise por enzimas digestivas humanas, mas é fermentado no intestino delgado. É elevadamente solúvel e tem um sabor doce. LOS é identificado como um pré-biótico que é utilizável para administração em crianças pequenas no pedido de Patente US 20030072865 para Bilels et al. LOS está comercialmente disponível de uma variedade de fontes.

Nesta modalidade, PDX e LOS podem ser administrados em uma relação de entre cerca de 9:1 e 1:9. Em uma outra modalidade, a relação de PDX para LOS pode estar entre cerca de 5:1 e 1:5. Ainda em uma outra modalidade, a relação de PDX para LOS pode estar entre cerca de 3:1 e 1:3. Em uma modalidade particular, a relação de PDX para LOS pode ser cerca de 5:5. Em uma outra modalidade particular, a relação de PDX para LOS pode ser cerca de 8:2.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:LOS pode estar entre cerca de 1,0 g/l e 10,0 g/l, administrada diariamente. Em uma outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:LOS pode estar entre cerca de 2,0 g/l e 8,0 g/l, administrada diariamente. Em uma modalidade particular, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:LOS pode ser cerca de 2 g/l de PDX e 2 g/l de LOS, administrada diariamente.

Ainda em uma outra modalidade da presente invenção, PDX é administrado em combinação com ambos GOS e LOS. Nesta modalidade, a combinação de PDX:GOS:LOS pode ser administrada em uma relação de cerca de 50:33:17. Alternativamente, a relação da combinação de PDX:GOS:LOS pode ser cerca de 1:1:1. Em uma modalidade particular, a relação de PDX:GOS:LOS pode ser cerca de 1:1,5:1.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS:LOS pode estar entre cerca de 1,0 g/l e 10,0 g/l, administrada diariamente. Em uma outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS:LOS pode estar entre cerca de 2,0 g/l e 8,0 g/l, administrada diariamente. Em uma outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS:LOS pode ser cerca de 2 g/l de PDX, 2 g/l de GOS e 2 g/l de LOS, administrada diariamente. Em uma modalidade particular, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS:LOS pode ser cerca de 2 g/l de PDX, 1,32 g/l de GOS e 2,6 g/l de LOS, administrada diariamente. Em uma outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de PDX:GOS:LOS pode ser cerca de 4 g/l de PDX, 2,64 g/l de GOS e 3,6 g/l de LOS, administrada diariamente.

Em uma modalidade da invenção, PDX pode ser combinado com um ou mais probióticos e administrado a uma criança pequena. Qualquer probiótico conhecido na técnica será aceitável nesta modalidade. Em uma modalidade particular, o probiótico é selecionado dentre o grupo consistindo em *Bifidobacterium* spp. ou *Lactobacillus* spp. Em uma outra modalidade, o probiótico é *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Em uma outra modalidade, o probiótico é *Bifidobacterium lactis*. Em uma modalidade específica, o probiótico é *Bifidobacterium lactis* Bb-12, disponível de Chr. Hansen Biosystems, localizado em Milwaukee, WI.

Em outras modalidades da presente invenção, a fórmula infantil pode conter outros agentes ativos como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA). LCPUFAs apropriados incluem, mas não estão limitados a, ácido α -linoléico, ácido γ -linoléico, ácido linoléico, ácido linolênico,

ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido araquidônico (ARA) e docosa-hexaenóico (DHA). Em uma modalidade, PDX é administrado em combinação com DHA. Em uma outra modalidade, PDX é administrado em combinação com ARA. Ainda em uma outra modalidade, PDX é administrado em
5 combinação com tanto DHA como ARA. Fórmula infantil comercialmente disponível que contém DHA, ARA, ou uma combinação dos mesmos pode ser suplementada com PDX e usada na presente invenção. Por exemplo, Enfamil® LIPIL®, que contém níveis eficazes de DHA e ARA, está comercialmente disponível e pode ser suplementado com LGG e utilizado na pre-
10 sente invenção.

Em uma modalidade, tanto DHA como ARA são administrados em combinação com PDX. Nesta modalidade, a relação em peso de ARA:DHA é tipicamente de cerca de 1:3 a cerca de 9:1. Alternativamente, esta relação pode ser de cerca de 1:2 a cerca de 4:1. Ainda em uma outra al-
15 ternativa, a relação pode ser de cerca de 2:3 a cerca de 2:1. Em uma modalidade particular, a relação é cerca de 2:1.

A quantidade eficaz de DHA em uma modalidade da presente invenção é tipicamente de cerca de 3 mg por kg do peso corporal por dia a cerca de 150 mg por kg do peso corporal por dia. Em uma modalidade da
20 invenção, a quantidade é de cerca de 6 mg por kg do peso corporal por dia a cerca de 100 mg por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a quantidade é de cerca de 10 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 60 mg por kg de peso corporal por dia. Em ainda outra modalidade a quantidade é de cerca de 15 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 30 mg
25 por kg de peso corporal por dia.

A quantidade eficaz de ARA em uma modalidade da presente invenção é tipicamente de cerca de 5 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 150 mg por kg de peso corporal por dia. Em uma modalidade desta
30 invenção, a quantidade varia de cerca de 10 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 120 mg por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a quantidade varia de cerca de 15 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 90 mg por kg de peso corporal por dia. Em ainda outra modalidade,

a quantidade varia de cerca de 20 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 60 mg por kg de peso corporal por dia.

A quantidade de DHA nas fórmulas infantis para uso com a presente invenção tipicamente varia de cerca de 5 mg/100 kcal a cerca de 80 mg/100 kcal. Em uma modalidade da presente invenção ela varia de cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 50 mg/100 kcal; e, em outra modalidade, de cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 20 mg/100 kcal. Em uma modalidade particular da presente invenção, a quantidade de DHA é cerca de 17 mg/100 kcal.

A quantidade de ARA nas fórmulas infantis para uso com a presente invenção tipicamente varia de cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 100 mg/100 kcal. Em uma modalidade da presente invenção, a quantidade de ARA varia de cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 70 mg/100 kcal. Em outra modalidade, a quantidade de ARA varia de cerca de 20 mg/100 kcal a cerca de 40 mg/100 kcal. Em uma modalidade particular da presente invenção, a quantidade de ARA é cerca de 34 mg/100 kcal.

A fórmula infantil suplementada com óleos contendo DHA e ARA para uso com a presente invenção pode ser feita usando técnicas padrões conhecidas na técnica. Por exemplo, eles podem ser adicionados à fórmula substituindo uma quantidade equivalente de um óleo, como óleo de girassol com elevado teor oléico, normalmente presente na fórmula. Como um outro exemplo, os óleos contendo DHA e ARA podem ser adicionados à fórmula substituindo uma quantidade equivalente do restante da mistura de gordura global normalmente presente na fórmula sem DHA e ARA.

A fonte de DHA e ARA pode ser qualquer fonte conhecida na técnica. Em uma modalidade da presente invenção, as fontes de DHA e ARA são óleos de células únicas, como ensinado nas patentes US. 5.374.567; 5.550.156; e 5.397.591, cujas descrições são aqui incorporadas em sua totalidade por referência. No entanto, a presente invenção não está limitada a somente estes óleos. DHA e ARA podem estar na forma natural ou refinada.

Em uma modalidade, a fonte de DHA e ARA é substancialmente

isenta de ácido eicosapentaenóico (EPA). Por exemplo, em uma modalidade da presente invenção, a fórmula infantil contém menos do que cerca de 16 mg de EPA/ 100 kcal; em uma outra modalidade, menos do que cerca de 10 mg de EPA/ 100 kcal; e ainda em uma outra modalidade, menos do que cerca de 5 mg EPA/100 kcal. Uma modalidade particular contém substancialmente nenhum EPA. Uma outra modalidade é isenta de EPA em que quantidades traços iguais de EPA estão ausentes da fórmula.

A fórmula infantil da presente invenção pode ser preparada usando qualquer método conhecido na técnica. Em uma modalidade, o PDX é provido na forma em pó. Ele pode ser misturado com água e outros ingredientes da fórmula infantil em um tanque de misturação. Se GOS e/ou LOS estão incluídos na fórmula infantil, eles podem ser providos na forma em pó ou líquida. A mistura pode então ser pasteurizada, homogeneizada e secada por pulverização para produzir um pó acabado ou enlatado e destilado para produzir um produto líquido.

Como uma alternativa para uma administração da fórmula infantil, o pré-biótico da presente invenção pode ser administrado como um suplemento não integral à alimentação da fórmula. Por exemplo, PDX pode ser ingerido na forma de uma pílula, comprimido, cápsula, *caplet*, pó, líquido ou gel. Nesta modalidade, o PDX pode ser ingerido em combinação com outros suplementos nutrientes, como vitaminas, ou em combinação com um suplemento LCPUFA, como DHA ou ARA.

Em uma outra modalidade, PDX pode ser provido em uma forma apropriada para crianças pequenas selecionada dentre o grupo consistindo na fórmula de seguimento, bebida, leite, iogurte, suco de frutas, bebida à base de frutas, comprimido mastigável, biscoito, bolacha, ou uma combinação dos mesmos.

Na presente invenção, a criança pequena é alimentada com fórmula. Em uma modalidade, a criança pequena é alimentada com fórmula desde o nascimento. Em uma outra modalidade, a criança pequena é alimentada no peito desde o nascimento até uma idade que é menor do que um ano, e é depois alimentada com fórmula, quando então começa a suple-

mentação com PDX.

Oligossacarídeos do leite humano podem aumentar a população e espécies de bactérias benéficas no trato intestinal, ter um perfil de SCFA que é elevado em acetato e muito baixo em butirato, e são levemente fermentados, impedindo a produção de gases em excesso. Como será visto nos exemplos, a administração de PDX, sozinho ou em combinação com outros pré-bióticos, pode ser usada para aumentar a população e espécies de bactérias benéficas no trato intestinal, pode preferencialmente deslocar a produção de SCFA para produção de mais acetato e propionato, deste modo limitando a produção de butirato, e pode diminuir a taxa de fermentação no intestino de modo que a produção de gases é limitada, minimizando o desconforto da criança pequena. Assim, a administração de PDX, sozinho ou em combinação com um ou mais outros pré-bióticos, pode simular os atributos funcionais de oligossacarídeos do leite humano em uma criança pequena alimentada com fórmula.

Os seguintes exemplos descrevem várias modalidades da presente invenção. Outras modalidades dentro do escopo das presentes reivindicações serão evidentes a um versado na técnica a partir da consideração do relatório ou prática da invenção como descrito aqui. Pretende-se que o relatório, junto com os exemplos, seja considerado como exemplar apenas, com o escopo e espírito da invenção sendo indicados pelas reivindicações que seguem os exemplos. Nos exemplos, todas as porcentagens são dadas em uma base em peso, salvo especificado em contrário.

Exemplo 1:

Este exemplo ilustra o modelo de fermentação fecal *in vitro* utilizado na presente invenção. O modelo de fermentação fecal *in vitro* imita a ação do microbiota do cólon infantil. Durante a fermentação, carboidratos são consumidos e SCFA e gases são produzidos. Após fermentação, uma análise do efeito dos pré-bióticos sobre as populações e espécies de microorganismos presentes pode ser realizada.

Os carboidratos individuais que foram estudados são descritos na tabela 1.

Tabela 1: Carboidratos Individuais

GOS: Ingredientes Vivinal GOS: Deb. n°. 00026961 Borculo Domo; recebidos em 17/09/02; pureza de 95,1%
LOS: Anidrido de Lactulose Morinaga: MLC-A(F), Lote n°. FRDL020926; Morinaga Milk Industry Co. Ltd; recebido em 4/10/02; pureza de 97%
PDX: Sta-Lite III PDX: Lote n°. DZ2K0351913; A.E. Staley
FOS: Fruto-oligossacarídeos Raftilose P95: Lote n°. PCAB022B02; Raffinerie Notre-Dame/Orafti SA; recebido em 6/9/02; Pureza de 95,1%
PDX2: polímero de elevado peso molecular PDX Litesse® Ultra®, máx. 22 000 MW; Danisco; Lote n°. V36020I
INU: Raftiline® HP: inulina de cadeia longa DP \geq 23 (Lote no: hptoh11oh1; Orafti B.V.; recebido em outubro de 2002; D.S. 96,9%, Inulina 99,9%, Sacarose + Frutose + Glicose 0,1%).

Amostras fecais foram coletadas de crianças pequenas saudáveis com 2,5-13 meses de idade. Cinco grupos experimentais foram testados, usando diferentes combinações de carboidratos pré-bióticos em cada grupo de fermentação. Doze bebês foram recrutados para as fermentações dos grupos 1 e 2, 17 bebês para a fermentação do grupo 3, 19 bebês para a fermentação do grupo 4 e 23 bebês para a fermentação do grupo 5. Nos grupos 1-3, somente cinco bebês foram capazes de doar uma amostra aceitável. Os bebês recrutados para a primeira fermentação tinham 4, 4, 4, 6, 6, 6, 8, 8, 9, 9, 9 e 10 meses de idade, para a segunda fermentação, 3, 4, 6, 6, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 12 e 13 meses de idade, e para a terceira fermentação, 2, 2,5, 3, 4, 4, 4, 4,5, 5, 5, 6, 6, 6, 9, 9, 10, 10 e 11 meses de idade. As idades dos bebês cujas amostras foram usadas na fermentação foram grupo 1: 6, 8, 9, 9, 9 meses; grupo 2: 4, 8, 10, 12, 13 meses; e grupo 3: 2,5, 5, 6, 10, 11 meses. Na fermentação do grupo 4, 10 bebês (dos quais um bebê duas vezes) foram capazes de doar uma amostra aceitável. Os doadores para a fermentação do grupo 4 tinham 2, 2,5, 4, 5, 7, 9, 9, 10, 11 e 15 meses de idade. Para a fermentação do grupo 5, doze bebês foram capazes de doar amostras, dos quais os quatro doadores mais jovens foram selecionados. Assim, os doadores tinham 5, 6, 6,5 e 6,5 meses de idade.

A fermentação fecal *in vitro* foi realizada de acordo com o método de Karppinen, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Karppinen S., *et al.*, *In Vitro Fermentation of Polysaccharides of Rye, Wheat, and Oat Brans and Inulin by Human Faecal Bacteria*, J. Sci. Food Agric.

80:1469-76 (2000).

No presente estudo, 100 mg de amostras de carboidrato foram pesados em frascos de 50 ml e hidratados usando 2 ml de tampão de carbonato-fosfato em pH 6,9. As amostras foram mantidas durante a noite em condições anaeróbicas a 5°C até a preparação do inóculo. A suspensão fecal (12,5%, peso/volume) foi preparada em condições estritamente anaeróbicas no mesmo tampão reunindo fezes recentes de crianças pequenas. Oito ml da suspensão foram dosados para as amostras do substrato e os frascos foram fechados na câmara anaeróbica dando a concentração de suspensão fecal final de 10% (peso/ volume). As amostras foram incubadas a 37°C durante 1, 2, 4, 8 ou 24 horas. As amostras da hora 0 foram preparadas similarmente aos tubos de centrifugação e congeladas rapidamente usando nitrogênio líquido. Controles fecais em branco sem carboidratos adicionados foram inclusos em todas as experiências de fermentação.

A fermentação foi acabada removendo os frascos do banho-maria e colocando os mesmos em gelo exceto antes da medição dos gases, quando as amostras foram mantidas em temperatura ambiente para amostragem imediata. O volume dos gases foi medido e a amostra de gases (5 ml) foi injetada em um frasco de topo nitrogenado. O frasco foi colocado em gelo após a amostragem. A amostra de fermentação foi transferida para um tubo de centrifugação, o pH foi medido e uma alíquota (2 ml) foi retirada da suspensão para análise de SCFA e congelada rapidamente com nitrogênio líquido.

Exemplo 2

Este exemplo ilustra os materiais e métodos necessários para determinar a eficácia de polidextrose como um pré-biótico para crianças pequenas alimentadas com fórmula. Especificamente, este exemplo ilustra os materiais e métodos necessários para analisar SCFAs e gases.

Os SCFAs foram extraídos com éter dietílico e analisados com cromatografia de gás como descrito por Karppinen, *et al.*, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Karppinen S., *et al.*, *In Vitro Fermentation of Polysaccharides of Rye, Wheat, and Oat Brans and Inulin by*

Human Faecal Bacteria, J. Sci. Food Agric. 80:1469-76 (2000). Gases (hidrogênio, dióxido de carbono, metano, dissulfeto de hidrogênio e oxigênio como um controle de qualidade) foram analisados isotermicamente a 30°C usando uma técnica de espaço de topo estático por cromatografia de gás de acordo com Karppinen, *et al. Id.*

Exemplo 3

Este exemplo ilustra o efeito de PDX sobre o perfil de SCFA *in vitro* produzido por microbiota do cólon infantil. As figuras 1 e 2 ilustram que a taxa de fermentação varia entre diferentes pré-bióticos. A produção de SCFA total (uma soma de ácidos acético, propiônico e butírico) é mostrada na figura 1. Um decréscimo em pH, mostrado na figura 2, também é uma indicação da produção de SCFA,

Como pode ser visto nas figuras, PDX2 é um carboidrato lentamente fermentável, em que FOS, GOS e LOS foram fermentados de modo rápido e completamente. A taxa de fermentação de PDX2 foi comparável à das fibras de cereais dietéticos. Não somente PDX2 foi fermentado na taxa inicial mais lenta, mas a extensão da fermentação estava somente levemente acima do controle fecal em branco. Em contraste, a taxa de fermentação de FOS foi tão rápida que foi consumida quase completamente nos primeiros pontos de tempo da amostragem e produziu a quantidade mais elevada de SCFAs entre os pré-bióticos testados.

Como mostrado nas figuras 3-5, a fermentação de PDX2 resulta na produção mais elevada de propionato e na produção mais baixa de butirato após 24 horas. Acetato foi ainda o SCFA mais elevado produzido durante a fermentação de PDX, embora a taxa inicial foi mais baixa do que as de outros substratos. A taxa inicial da produção de propionato de PDX2 foi similar à de outros substratos, mas níveis mais elevados foram verificados ao término da fermentação. Em contraste, a fermentação de FOS, GOS e LOS mostrou concentrações aumentadas de acetato e butirato e concentração diminuída de propionato. Como um resultado, a proporção relativa combinada de acetato e propionato foi muito mais elevada para PDX2 do que para FOS, LOS ou GOS. Estes resultados também podem ser vistos na figura 6.

Estes resultados demonstram que PDX2 foi o substrato produzindo menos butirato e o único substrato que aumentou a proporção relativa de propionato.

Estes resultados estão de acordo com um estudo *in vitro* conduzido por Wang, X. & Gibson, G.R., *Effects of the In Vitro Fermentation of Oligofructose and Inulin by Bacteria Growing in the Human Large Intestine*, J. Appl. Bacteriol. 75:373-380 (1993), em que a suspensão fecal de doadores adultos foi usada na fermentação de vários carboidratos. No entanto, a produção mais elevada de propionato de PDX *in vitro* não foi mostrada *in vivo* em uma experiência clínica com adultos chineses Jie, Z., *et al.*, *Studies on the Effects of Polydextrose Intake on Physiological Functions in Chinese People*, Am. J. Clin. Nutr. 72:1503-09 (2000), em que três concentrações de PDX diferentes podem aumentar os níveis de butirato e acetato, mas não a proporção de propionato. A produção maior de butirato de GOS e FOS também é mostrada com ratos associados à flora fecal humana (Djouzi, Z., *et al.*, *Compared Effects of Three Oligosaccharides on Metabolism of Intestinal Microflora in Rats Inoculated with a Human Faecal Flora*, Br. J. Nutr. 78:313-24 (1997).

Exemplo 4

Este exemplo ilustra o efeito de combinações de pré-bióticos sobre a taxa de fermentação *in vitro* por microbiota do cólon infantil. Várias combinações de carboidratos pré-bióticos foram selecionadas em uma tentativa para obter uma taxa desejável de fermentação microbiana *in vitro*. Neste exemplo, as combinações de substratos foram comparadas para sua taxa de fermentação (produção de SCFA total) e trocas em pH, mostradas nas figuras 7-8.

A adição de PDX à preparação de GOS diminuiu a taxa de fermentação da combinação como medido pela produção de SCFA total (figura 7). Similarmente, a adição de PDX à preparação de LOS diminuiu a taxa de fermentação da combinação. A adição de PDX a LOS ou GOS também resultou em um decréscimo mais moderado em pH, como mostrado na figura 8. Esta taxa mais lenta de acidulação do teor das fezes pode levar a menor

irritação na região anal ou do revestimento intestinal, aumentando a tolerância da criança pequena. O decréscimo mais lento em pH por PDX é consistente com a produção mais lenta de SCFA e taxa de fermentação *in vitro* global comparado a GOS e LOS. Estes resultados demonstram que PDX
 5 pode ser usado para diminuir a taxa de fermentação das misturas de PDX e pré-bióticos tradicionais como GOS ou LOS.

O efeito da relação de PDX:GOS sobre a produção de SCFA total, acetato, propionato e butirato também foi estudado (figuras 9-12). A figura 9 demonstra que a relação de PDX:GOS de 8:2 levou a uma taxa mais
 10 lenta da produção de SCFA total do que uma relação PDX:GOS de 5:5. A figura 9 confirma que uma relação de PDX:GOS de 8:2 produziu menos SCFA total do que uma relação de 5:5 ou 1:9. Assim, estes resultados demonstram que uma quantidade mais elevada de PDX na mistura de PDX:GOS resulta em uma taxa mais lenta de fermentação *in vitro*. A adição de PDX a
 15 GOS também teve a tendência de diminuir a taxa de produção de acetato e butirato, mas teve pouco impacto sobre a taxa global e produção de propionato final.

Exemplo 5

Este exemplo ilustra o efeito de PDX sobre a produção de gases
 20 *in vitro* por microbiota do cólon infantil. A produção de gases total, medida como o volume total por frasco de fermentação, foi quase igual que GOS, LOS e FOS, mostrado na figura 13. Em contraste, PDX resulta na produção global de gases mais baixa durante fermentação por microbiota bacteriano fecal de crianças pequenas. A produção global de gases mais baixa vista em
 25 PDX também indica que ele é fermentado mais lentamente do que com outros pré-bióticos estudados.

Além da produção total de gases, a produção de dióxido de carbono é uma importante medida da tolerância de crianças pequenas a pré-bióticos dietéticos. O principal gás produzido de todos os pré-bióticos testa-
 30 dos foi dióxido de carbono. Ele foi produzido em quantidades 3 e 44-76 vezes mais elevadas do que hidrogênio ou dissulfeto de hidrogênio, respectivamente.

Globalmente, a produção de dióxido de carbono foi a mais baixa para PDX quando comparado com FOS, GOS e LOS (figura 14). Dióxido de carbono foi o principal gás produzido durante a fermentação de FOS, GOS e LOS, mostrando níveis máximos entre 320-380 μmol . Em contraste, PDX mostrou níveis muito mais baixos de formação de dióxido de carbono (200 μmol). A formação de hidrogênio a partir de PDX por microbiota fecal de crianças pequenas foi mais baixa (cerca de um terço) do que a produção de dióxido de carbono, e consideravelmente mais baixa do que os níveis de hidrogênio produzido de FOS, GOS e LOS (figura 15). A formação de dissulfeto de hidrogênio a partir de PDX foi 1:44, comparada à formação de dióxido de carbono e a produção de dissulfeto de hidrogênio máxima foi quase o mesmo nível de concentração para todos os pré-bióticos do teste (figura 16). A maior proporção da formação de dióxido de carbono comparada à formação de hidrogênio (1000 vezes) e metano (10 vezes) também foi mostrada por Wang e Gibson. Wang, X. & Gibson, G.R., *Effects of the In Vitro Fermentation of Oligofructose and Inulin by Bacteria Growing in the Human Large Intestine*, J. Appl. Bacteriol. 75:373-380 (1993). Uma vez que metanogênese não foi observada no presente estudo, dissulfeto de hidrogênio foi formado provavelmente a partir de hidrogênio primário. Levitt, *et al.*, *Gas Metabolism in the Large Intestine*, CRC Press, Boca Raton 131-154 (1995). É possível que hidrogênio não foi detectado devido a seu outro metabolismo em gás secundário, dissulfeto de hidrogênio, em pontos de tempo posteriores.

Exemplo 6

Este exemplo ilustra os materiais e métodos necessários para determinar o efeito de PDX sobre a população e espécies de microbiota do cólon infantil. Resumidamente, o exemplo utiliza um modelo de intestino infantil para avaliar certos compostos pré-bióticos. O modelo *in vitro* de intestino infantil utilizado, que foi baseado em um modelo adulto, foi compreendido de dois frascos de vidro de 100 ml, dispostos em série para representar as regiões mais proximais e distais do cólon infantil. O fluxo de alimentação foi controlado em uma taxa que levou em conta o tempo de passagem mais curto no intestino da criança pequena, como comparado a um intestino de

adulto. As diferenças *in vivo* do modelo em pH no cólon, vaso 1 (V1) foi controlado em pH 5,2 e vaso 2 (V2) foi controlado em pH 6,7. A temperatura foi controlada a 37°C por um banho de água circulante. Os vasos de alimentação e cultura foram magneticamente agitados e mantidos em uma atmosfera anaeróbica por introdução no fluxo de nitrogênio isento de oxigênio (15 ml/min).

Uma vez que o sistema foi inoculado com suspensão fecal de crianças pequenas, os dois vasos fermentadores foram deixados por até 24 horas em modo em batelada. Isto permitiu que as populações bacterianas se equilibrassem em seu novo ambiente e aumentassem de densidade. O fluxo de alimentação foi então retornado e o fermentador foi levado a funcionar em modo de cultura contínua durante o restante da experiência. A taxa de fluxo de alimentação foi controlada em 11,11 ml/h. Neste estudo, os fermentadores funcionaram durante 12 dias, sendo 6 dias alimentados com a fórmula infantil Enfalac (Mead Johnson Nutritionals, Evansville, IN) e outros 6 dias sendo alimentados com Enfalac e o pré-biótico ou combinação de pré-bióticos adicionados.

Amostras de 5 ml foram então tomadas assepticamente de V1 e V2 e preparadas para o procedimento de enumeração microbiana independente de cultura " Fluorescence *In Situ* Hybridisation" (FISH) e microscopia para a identificação e enumeração de espécies bacterianas específicas. O uso de FISH permitiu a determinação precisa do efeito de pré-bióticos sobre as populações bacterianas específicas nas regiões proximais e distais do cólon infantil.

Os pré-bióticos foram adicionados à alimentação individualmente ou em combinações, em uma concentração total de 7,5 g/l (0,75% p/v). Os seguintes oligossacarídeos foram usados:

Tabela 2. Pré-bióticos testados

Pré-biótico	Tipo	Fabricante
Lactulose (LOS)	Xarope	Morinaga Milk Ind. Co. Ltd., Japan
Galacto-oligossacarídeo (GOS)	E0002 em pó	Suprido por Mead Johnson
Polidextrose (PDX)	'Litesse Ultra' em pó	Danisco
Fruto-oligossacarídeo	Raftilose® P95 em pó	Orafti

Os doadores infantis foram cuidadosamente selecionados e tinham idealmente 2-4 meses de idade, alimentados com a fórmula (exclusivamente quando possível), saudáveis e não estiveram sob tratamento com antibiótico recente. Uma idade mínima de 2 meses foi preferida uma vez que a microbiota do intestino infantil é estabelecida por volta desta idade.

Tabela 3. Informação do Doador

Código doador	Idade	Alimentação	Ciclos de fermentação
KB	16 semanas	SMA Gold	F1
JS	13 semanas	Cow & Gate	F2
F	19 semanas	SMA Gold e alimentada no peito	F3
AE	9½ semanas	alimentada no peito	F4
AE	14 semanas	alimentada no peito	F5

A flora microbiana do intestino infantil para testes de fermentação foi fornecida por fezes evacuadas recentemente de crianças pequenas. Uma amostra fecal de pelo menos 3,5 g foi geralmente requerida. A amostra fecal foi retida na fralda que, imediatamente quando da retirada da mesma da criança pequena, foi colocada pelo encarregado dos cuidados em um jarro anaeróbico com um pacote de gás aberto anaeróbico. Isto foi coletado e processado tão logo quanto possível (geralmente dentro de uma hora).

No laboratório, as fezes foram removidas da fralda e pesadas. Uma suspensão fecal a 10% (p/v) foi preparada homogeneizando as amostras em uma solução 1x PBS anóxica e preaquecida (durante a noite no armário anaeróbico), usando um aparelho homogeneizador "stomacher" em taxa média de 120 s.

Cada um dos vasos de fermentação foi inoculado com 5 ml da suspensão fecal a 10% (p/v). Uma alíquota da suspensão fecal (amostra S)

também foi tomada para análise.

Uma amostra de 375 μ l da suspensão fecal (amostra S) ou de cada amostra do fermentador foi requerida em duplicata para contagens bacterianas por FISH. Cada amostra foi fixada misturando completamente
5 em 1,125 ml de solução de paraformaldeído em PBS pH 7,2 a 4% (p/v), fria, filtrada e armazenando a 4°C durante a noite (ou pelo menos 4 horas).

A amostra fixada foi centrifugada em 13.000 x g durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pélete foi lavado duas vezes recolocando em suspensão em 1 ml de 1xPPS frio, filtrado, cada vez peletizando as
10 células por centrifugação e descartando o sobrenadante. O pélete foi finalmente recolocado em suspensão completamente em 150 μ l de PBS filtrado; 150 μ l de 96% (v/v) de etanol são então misturados também. A preparação de células foi então armazenada a -20°C durante pelo menos 1 h antes de outro processamento.

Na etapa de hibridização, 16 μ l da preparação de células (realizada em temperatura ambiente) foram misturados com 200 μ l de 2x tampão de hibridização (Tris-HCl 30,3 mM pH 7,2, NaCl 1,4 mM), filtrado, preaquecido contendo 15,1 ml/ 10% (p/v) de SDS. Esta mistura foi aquecida na temperatura de hibridização apropriada e então misturada com a sonda (50 ng/ μ l)
20 na relação de 9:1, respectivamente). A preparação da hibridização foi então retornada ao forno de hibridização para incubar durante a noite:

Finalmente, as preparações de células hibridizadas foram coletadas em filtros de 0,2 μ m para observação microscópica. Dependendo da densidade das células, entre 5 μ l e 100 μ l da preparação de células foram
25 adicionados ao tampão de lavagem (5-7 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7,2, NaCl 0,9 M), filtrado, preaquecido (na temperatura de hibridização). 20 μ l de DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) também foram adicionados à mistura para colorir todas as células e obter contagens de células totais para cada amostra. Isto foi então filtrado a vácuo em um filtro de policarbonato de 0,2 μ m e colocado
30 em uma lâmina de microscópio. Para minimizar o esmaecimento do corante fluorescente, uma gota de SlowFade® (Molecular Probes) foi colocada no filtro e coberta com uma tampa deslizante; as lâminas foram então armaze-

nadas no escuro a 4°C até serem usadas. Bactérias etiquetadas com uma sonda fluorescente Cy3 foram contadas usando microscópio de fluorescência (Leitz, Wetzlar, Alemanha) a 550 nm; luz UV foi usada para contagem de bactérias coloridas com DAPI. As bactérias foram contadas em pelo menos 15 campos tomados aleatoriamente e a média destes usada para estimar o número de células por ml da amostra original.

Para comparação, testes de fermentação foram realizados como listado abaixo.

Tabela 4. Ciclos de Fermentação

Ciclo de fermentação	Substâncias de Teste	
F1	FOS	
F2	Leite humano	PDX
F3	GOS	
F4	1:1 LOS:GOS	1:1 PDX:LOS
F5	LOS	1:1 PDX:GOS

10

Exemplo 7

Este exemplo ilustra o efeito de PDX sobre a população e espécies de bactérias no intestino infantil. No ciclo de fermentação 1 (F1), FOS foi adicionado à alimentação da fórmula e colocado em um sistema de fermentador. FOS, que foi tradicionalmente considerado como um bom ingrediente pré-biótico, resultou em aumentos em *Bifidobacteria* e *Clostridia* e diminuições em *Lactobacilli* e *Bacteroides* em V1. A adição de FOS à alimentação da fórmula resultou em nenhuma troca em níveis de *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* e aumentos em *Clostridia* e *Bacteroides* em V2.

Em F2, PDX e leite humano foram colocados em sistemas de fermentadores paralelos. Amostras de leite humano foram fornecidas por uma maternidade e armazenadas congeladas. Estas foram amostras de colostro de volumes variados de diversas doadoras. A alimentação com leite humano foi feita sem diluição ou adição de lactose a fim de manter níveis comparáveis de oligossacarídeos e outros nutrientes. Havia leite humano insuficiente para funcionar este fermentador durante 12 dias, em paralelo com o fermentador de PDX. As amostras mais freqüentes foram assim tomadas, nos dias 0, 4, 6 e 8. Para fins comparativos, amostras adicionais fo-

ram tomadas do fermentador de PDX no dia 8, e também no dia 11.

Como pode ser esperado, o leite humano promoveu bom crescimento de bactérias benéficas, tanto *Bifidobacteria* como *Lactobacilli*, e diminuiu níveis de *Clostridia*, como mostrado na figura 17. *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* aumentaram claramente na população em ambos os vasos. Os números de *Bacteroides* permaneceram em um nível similar durante toda a fermentação.

Os resultados da adição de PDX à alimentação da fórmula também foram favoráveis, com um aumento marcante em *Lactobacilli* e decréscimos em ambas *Clostridia* e *Bacteroides* em ambos os vasos (figura 17).

Em F3, GOS foi adicionado à alimentação da fórmula e colocado em um sistema de fermentador. A adição de GOS à alimentação da fórmula teve pouco efeito aparente em *Lactobacilli* em qualquer vaso, mas aumentou *Bifidobacteria* em V1 e V2, e diminuiu *Clostridia* e *Bacteroides* em V1 mas não em V2.

A combinação de LOS:GOS (1:1) foi colocada contra PDX:LOS 1:1 em um sistema de fermentador paralelo durante F4. A combinação de LOS:GOS foi eficaz para aumentar os números de *Lactobacilli* em ambos os vasos e *Bifidobacteria* em V1, e diminuir *Bacteroides* em V1. *Clostridia* diminuiu em V2 mas aumentou em V1.

A suplementação da alimentação com a fórmula com uma combinação 1:1 de PDX:LOS resultou em um aumento em *Lactobacilli* em V1, mas um leve decréscimo em *Bifidobacteria* em cada vaso. *Clostridia* tendeu a diminuir em ambos os vasos com *Bacteroides* diminuído principalmente em V2.

Em F5, LOS foi suplementado na alimentação com a fórmula e colocado em um sistema de fermentador paralelo contra uma combinação 1:1 de PDX e GOS. A adição de LOS à alimentação com a fórmula aumentou *Lactobacilli* em ambos os vasos. No entanto, *Clostridia* também aumentaram em V2 e *Bifidobacteria* diminuíram em ambos os vasos. Embora *Bacteroides* diminuíram em V1 isto não foi mantido em V2. A adição de PDX:GOS à alimentação com a fórmula aumentou os níveis de *Bifidobacteria* e

Lactobacilli em ambos os vasos, mas também fez com que os níveis de *Clostridia* aumentassem. Os níveis de *Bacteroides* aumentaram em V2 somente.

Globalmente, *Bifidobacteria* aumentaram em proporção à população bacteriana total em V1 com leite humano, GOS, FOS, PDX e a combinação de PDX:GOS. Em V2, GOS, a combinação de PDX:GOS e a combinação de LOS:GOS levaram a um aumento em *Bifidobacteria*. *Clostridia* diminuiu em proporção à população total em V1 com leite humano, GOS e PDX, e diminuiu em V2 com leite humano, PDX e a combinação de LOS:GOS.

Em V1, os *Lactobacilli* mostraram um aumento após suplementação com LOS, PDX, leite humano ou combinações de PDX, enquanto aumentos em *Lactobacilli* foram observados em V2 com LOS, PDX, leite humano e combinações de GOS. Os aumentos na porcentagem de *Lactobacilli* foram particularmente marcantes com PDX e a combinação de PDX:LOS e a combinação de LOS:GOS em V2.

Globalmente, PDX foi eficaz em aumentar *Lactobacilli* e diminuir os níveis de *Clostridia* e *Bacteroides*, com apenas leves aumentos em *Bifidobacteria* em V1. A combinação de PDX:GOS também mostrou ser favorável para *Bifidobacteria*, que aumentaram dentre as bactérias totais (embora não como uma porcentagem dos quatro grupos) e aumentaram *Lactobacilli* em um pH de 5:2, mas também teve um efeito desfavorável no aumento dos número de *Bacteroides*.

Quando leite humano foi testado no sistema modelo projetado pelos inventores, os níveis de *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* aumentaram em número, enquanto *Clostridia* diminuíram em número. Este efeito foi mais consistentemente duplicado com PDX, e com GOS, tanto sozinho como em combinação com LOS ou PDX. FOS, que é um outro carboidrato que é atualmente utilizado em várias fórmulas para crianças pequenas, foi testado e não produziu os mesmos resultados desejáveis.

Exemplo 8

Este exemplo ilustra uma modalidade de uma fórmula infantil da

presente invenção.

Tabela 5: Informação de nutrientes da fórmula infantil

Ingrediente	Por 10.000 L
Sólidos de soro de leite desmineralizado	534,337 kg
Mistura de gorduras	339,695 kg
Sólidos de leite desnatado	191,234 kg
Lactose	136,321 kg
Sólidos de xarope de galactooligossacarídeo	35,096 kg
Polidextrose	22,222 kg
Citrato de potássio	7,797 kg
Mono- e Diglicerídeos	7,233 kg
Óleo de ácido araquidônico de célula única	6,486 kg
Fosfato de cálcio, Tribásico	4,185 kg
Ácido ascórbico	1,403,323 g
Ascorbato de sódio	1,168,402 g
Inositol	407,029 g
Taurina	402,962 g
Sólidos de xarope de milho	188,300 g
Niacimamida	89,857 g
Pantotenato de cálcio	42,443 g
Vitamina B ₁₂	23,613 g
Trituração de biotina	23,613 g
Tiamina HCl	8,022 g
Piridoxina HCl	6,176 g
Ácido fólico	2,260 g
Concentrado de lecitina	3,694 kg
Óleo de ácido docosahexanóico de célula única	3,243 kg
Carrageenano	2,826 kg
Cloreto de cálcio	2,650 kg
Cloreto de sódio	1,410 kg
Maltodextrina	484,199 g
CMP, ácido livre	151,951 g
AMP, ácido livre	33,944 g
GMP, sal dissódico	18,347 g
UMP, sal dissódico	7,559 g
Sulfato ferroso	0,620 kg
Citrato de sódio	0,455 kg
Acetato de tocoferila, DL-Alfa	160,882 g
Óleo de soja	139,612 g
Palmitato de vitamina A	17,253 g
Concentrado de colecalciferol	5,715 g
Vitamina K, líquida Fitonadiona	0,538 g

Continuação

Ingrediente	Por 10.000 L
Sulfato de zinco	214,225 g
Selenita de sódio	51,112 g
Sulfato cúprico	22,885 g
Lactose	12,659 g
Sulfato de manganês	3,119 g
Água, Desfluorada	10.311,900 kg

LOS é gerado quando lactose é aquecida a uma temperatura elevada. Assim, nesta modalidade, o produto contém LOS inerente. O nível de LOS inerente no produto é de aproximadamente 2 g/L.

5

Exemplo 9

Este exemplo ilustra outra modalidade de uma fórmula infantil da presente invenção.

Tabela 6: Informação de nutrientes para a fórmula infantil

Ingrediente	Por 10.000 L
Sólidos de soro de leite desmineralizado	534,337 kg
Mistura de gorduras	339,695 kg
Sólidos de leite desnatado	191,234 kg
Lactose	142,000 kg
Xarope galactooligossacarídeo sólido	23,164 kg
Polidextrose	22,222 kg
Xarope lactulose sólido	10,353 kg
Citrato de potássio	7,797 kg
Mono- e Diglicerídeos	7,233 kg
Óleo de ácido araquidônico de célula única	6,486 kg
Fosfato de cálcio, Tribásico	4,185 kg
Ácido ascórbico	1,403,323 g
Ascorbato de sódio	1,168,402 g
Inositol	407,029 g
Taurina	402,962 g
Sólidos de xarope de milho	188,300 g
Niacinamida	89,857 g
Pantotenato de cálcio	42,443 g
Vitamina B ₁₂	23,613 g
Trituração de biotina	23,613 g
Tiamina HCl	8,022 g
Piridoxina HCl	6,176 g

Continuação

Ingrediente	Por 10.000 L
Ácido fólico	2,260 g
Concentrado de lecitina	3,694 kg
Óleo de ácido docosahexanóico de célula única	3,243 kg
Carrageenano	2,826 kg
Cloreto de cálcio	2,650 kg
Cloreto de sódio	1,410 kg
Maltodextrina	484,199 g
CMP, ácido livre	151,951 g
AMP, ácido livre	33,944 g
GMP, sal dissódico	18,347 g
UMP, sal dissódico	7,559 g
Sulfato ferroso	0,620 kg
Citrato de sódio	0,455 kg
Acetato de tocoferila, DL-Alfa	160,882 g
Óleo de soja	139,612 g
Palmitato de vitamina A	17,253 g
Concentrado de colecalciferol	5,715 g
Vitamina K, líquida Fitonadiona	0,538 g
Sulfato de zinco	214,225 g
Selenita de sódio	51,112 g
Sulfato cúprico	22,885 g
Lactose	12,659 g
Sulfato de manganês	3,119 g
Água, Desfluorada	10,311,900 kg

- LOS é gerado quando lactose é aquecida em uma temperatura elevada. Assim, nesta modalidade, o produto contém tanto LOS adicionado como inerente. O nível total de LOS no produto, incluindo tanto LOS adicionado como inerente, é de aproximadamente 2,6 g/L.

Exemplo 10

Este exemplo ilustra ainda outra modalidade de uma Fórmula infantil da presente invenção.

Tabela 7: Informação de nutrientes para a fórmula infantil

Ingrediente	Por 10,000 L
Sólidos de soro de leite desmineralizado	534,337 kg
Mistura de gorduras	339,695 kg
Sólidos de leite desnatado	191,234 kg
Lactose	119,321 kg
Xarope galactooligossacarídeo sólido	46,327 kg
Polidextrose	44,444 kg
Xarope lactulose sólido	20,706 kg
Citrato de potássio	7,797 kg
Mono- e Diglicerídeos	7,233 kg
Óleo de ácido araquidônico de célula única	6,486 kg
Fosfato de cálcio, tribásico	4,185 kg
Ácido ascórbico	1,403,323 g
Ascorbato de sódio	1,168,402 g
Inositol	407,029 g
Taurina	402,962 g
Xarope de milho sólido	188,300 g
Niacinamida	89,857 g
Pantotenato de cálcio	42,443 g
Vitamina B ₁₂	23,613 g
Trituração de biotina	23,613 g
Tiamina HCl	8,022 g
Piridoxina HCl	6,176 g
Ácido fólico	2,260 g
Concentrado de lecitina	3,694 kg
Óleo de ácido docosahexanóico de célula única	3,243 kg
Carrageenano	2,826 kg
Cloreto de cálcio	2,650 kg
Cloreto de sódio	1,410 kg
Maltodextrina	484,199 g
CMP, ácido livre	151,951 g
AMP, ácido livre	33,944 g
GMP, sal dissódico	18,347 g
UMP, sal dissódico	7,559 g
Sulfato ferroso	0,620 kg
Citrato de sódio	0,455 kg
Acetato de tocoferila, DL-Alfa	160,882 g
Óleo de soja	139,612 g
Palmitato de vitamina A	17,253 g
Concentrado de colecalciferol	5,715 g
Vitamina K, líquida Fitonadiona	0,538 g

Continuação

Ingrediente	Por 10,000 L
Sulfato de zinco	214,225 g
Selenita de sódio	51,112 g
Sulfato cúprico	22,885 g
Lactose	12,659 g
Sulfato de manganês	3,119 g
Água, Desfluorada	10.325,600 kg

LOS é gerado quando lactose é aquecida em uma temperatura elevada. Assim, nesta modalidade, o produto contém tanto LOS adicionado como inerente. O nível total de LOS no produto, incluindo tanto LOS adicionado como inerente, é de aproximadamente 3,6 g/L.

Todas as referências citadas neste relatório, incluindo sem limitação, todos os trabalhos, publicações, patentes, pedidos de patente, apresentações, textos, relatórios, manuscritos, brochuras, livros, postagens da internet, artigos de periódicos, periódicos, e outros, são aqui incorporados por referência neste relatório em suas totalidades. A discussão das referências aqui se destina apenas para reunir as afirmações feitas por seus autores e não se faz admissão de que qualquer referência constitui técnica anterior. As requerentes se reservam o direito de desafiar a precisão e pertinência das referências citadas.

Estas e outras modificações e variações à presente invenção podem ser praticadas pelos versados na técnica, sem sair do espírito e escopo da presente invenção que é mais particularmente especificada nas reivindicações anexas. Além disso, deve ser entendido que aspectos das várias modalidades podem ser trocadas tanto no topo como em parte. Além disso, os versados na técnica irão notar que a descrição acima é a título de exemplo apenas, e não se destina a limitar a invenção assim ainda descrita em tais reivindicações anexas. Assim, o espírito e escopo das reivindicações anexas não deve ser limitado à descrição das versões preferidas contidas ai.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de PDX na fabricação de um medicamento para produzir um perfil de SCFA em uma criança pequena alimentada com fórmula que é similar ao produzido em uma criança pequena alimentada no peito.
- 5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o perfil de SCFA compreende uma produção aumentada de acetato.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o perfil de SCFA compreende uma produção diminuída de butirato.
4. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade
10 terapeuticamente eficaz de PDX está entre cerca de 1,0 g/L e 10,0 g/L, administrada diariamente.
5. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade
 terapeuticamente eficaz de PDX está entre cerca de 2,0 g/L e 8,0 g/L de
 PDX, administrada diariamente.
- 15 6. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento
 adicionalmente compreende pelo menos um outro pré-biótico.
7. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento
 adicionalmente compreende GOS.
8. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que a relação de
20 PDX:GOS está entre cerca de 9:1 e 1:9.
9. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que a relação de
 PDX:GOS está entre cerca de 5:1 e 1:5.
10. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que a relação de
 PDX:GOS está entre cerca de 3:1 e 1:3.
- 25 11. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que a relação de
 PDX:GOS é cerca de 5:5.
12. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que a relação de
 PDX:GOS é cerca de 8:2.
13. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamen-
30 to adicionalmente compreende LOS.
14. Uso de acordo com a reivindicação 13, em que a relação de
 PDX:LOS está entre cerca de 9:1 e 1:9.

15. Uso de acordo com a reivindicação 13, em que a relação de PDX:LOS está entre cerca de 5:1 e 1:5.

16. Uso de acordo com a reivindicação 13, em que a relação de PDX:LOS está entre cerca de 3:1 e 1:3.

15 17. Uso de acordo com a reivindicação 13, em que a relação de PDX:LOS é cerca de 5:5.

18. Uso de acordo com a reivindicação 13, em que a relação de PDX:LOS é cerca de 8:2.

10 19. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento adicionalmente compreende GOS e LOS.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, em que a relação de PDX:GOS:LOS é cerca de 1:1:1.

21. Uso de acordo com a reivindicação 19, em que a relação de PDX:GOS:LOS é cerca de 50:33:17.

15 22. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento adicionalmente compreende pelo menos um LCPUFA.

23. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o LCPUFA compreende DHA ou ARA.

20 24. Uso de acordo com a reivindicação 23, em que o LCPUFA compreende DHA em uma quantidade de entre cerca de 3 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 150 mg por kg de peso corporal por dia.

25 25. Uso de acordo com a reivindicação 23, em que o LCPUFA compreende ARA em uma quantidade de entre cerca de 5 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 150 mg por kg de peso corporal por dia.

26. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o LCPUFA compreende DHA e ARA.

27. Uso de acordo com a reivindicação 26, em que a relação de ARA:DHA é de cerca de 1:3 a cerca de 9:1.

30 28. Uso de acordo com a reivindicação 26, em que a relação de ARA:DHA é de cerca de 2:3 a cerca de 2:1.

29. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento adicionalmente compreende pelo menos um probiótico.

30. Uso de acordo com a reivindicação 29, em que o probiótico é selecionado dentre o grupo consistindo em *Bifidobacteria* spp. e *Lactobacillus* spp.
- 5 LGG.
31. Uso de acordo com a reivindicação 29, em que o probiótico é
32. Uso de acordo com a reivindicação 29, em que o probiótico é Bb-12.
33. Uso de PDX na fabricação de um medicamento para diminuir a taxa e extensão de fermentação de pré-bióticos dentro do intestino de uma
- 10 criança pequena alimentada com fórmula.
34. Uso de acordo com a reivindicação 33, em que a produção de gás total no intestino da criança pequena é diminuída.
35. Uso de acordo com a reivindicação 33, em que a produção de dióxido de carbono no intestino da criança pequena é diminuída.
- 15 36. Uso de acordo com a reivindicação 33, em que o medicamento adicionalmente compreende pelo menos um outro pré-biótico.
37. Uso de acordo com a reivindicação 33, o medicamento adicionalmente compreendendo GOS.
38. Uso de acordo com a reivindicação 33, o medicamento adicionalmente compreendendo LOS.
- 20 39. Uso de acordo com a reivindicação 33, o medicamento adicionalmente compreendendo GOS e LOS.
40. Uso de PDX na fabricação de um medicamento para aumentar a população e espécie de bactérias benéficas no intestino de uma criança
- 25 pequena alimentada com fórmula.
41. Uso de acordo com a reivindicação 40, em que a população de *Lactobacillus* spp. é aumentada.
42. Uso de acordo com a reivindicação 40, em que a população de *Bifidobacteria* spp. é aumentada.
- 30 43. Uso de acordo com a reivindicação 40, em que o medicamento adicionalmente compreende pelo menos um outro pré-biótico.
44. Uso de acordo com a reivindicação 40, em que o medica-

mento adicionalmente compreende GOS.

45. Uso de acordo com a reivindicação 40, o medicamento adicionalmente compreendendo LOS.

46. Uso de acordo com a reivindicação 40, o medicamento adicionalmente compreendendo GOS e LOS.

47. Fórmula infantil compreendendo PDX em combinação com pelo menos um outro pré-biótico.

48. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 47, em que a quantidade de PDX na fórmula infantil é suficiente para liberar entre cerca de 1,0 g/L e 10,0 g/L de PDX para a criança pequena diariamente.

49. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 47, compreendendo PDX e GOS.

50. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 47, compreendendo PDX e LOS.

51. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 47, compreendendo PDX, GOS e LOS.

52. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 51, em que a quantidade de PDX presente na fórmula infantil é cerca de 2,0 g/L, a quantidade de GOS presente na fórmula infantil é cerca de 2,0 g/L e a quantidade de LOS presente na fórmula infantil é cerca de 2,0 g/L.

53. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 51, em que a quantidade de PDX presente na fórmula infantil é cerca de 2,0 g/L, a quantidade de GOS presente na fórmula infantil é cerca de 1,32 g/L e a quantidade de LOS presente na fórmula infantil é cerca de 2,6 g/L.

54. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 51, em que a quantidade de PDX presente na fórmula infantil é cerca de 4,0 g/L, a quantidade de GOS presente na fórmula infantil é cerca de 2,64 g/L e a quantidade de LOS presente na fórmula infantil é cerca de 3,6 g/L.

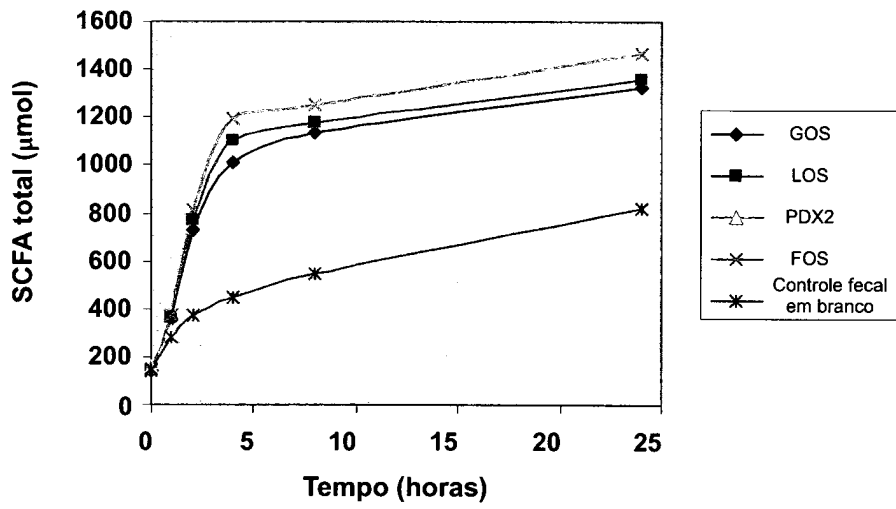


Fig. 1

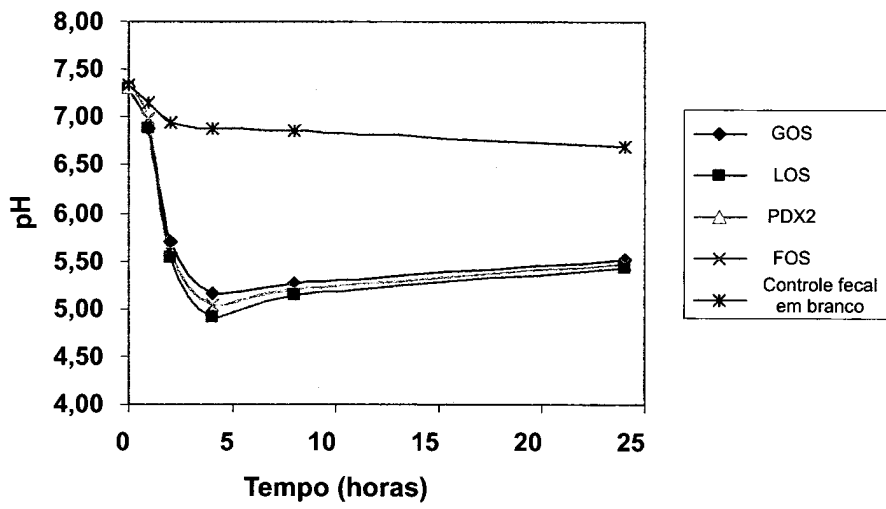
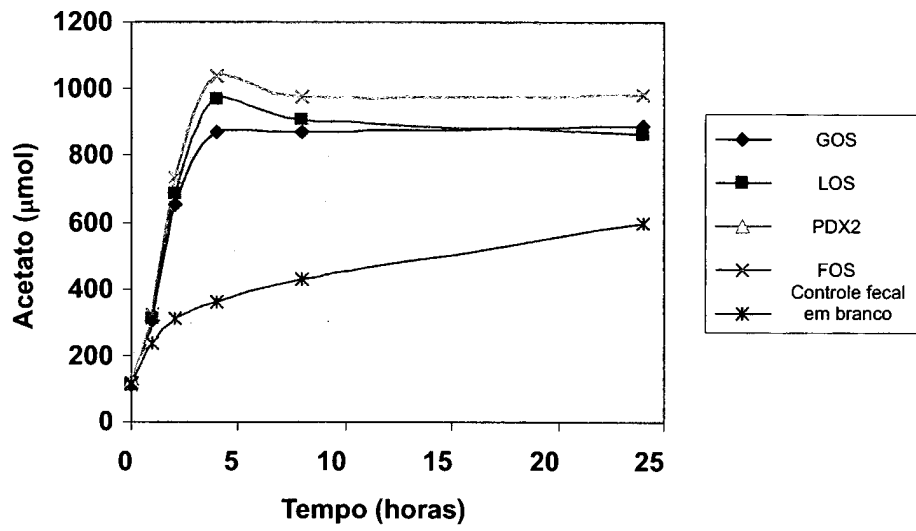
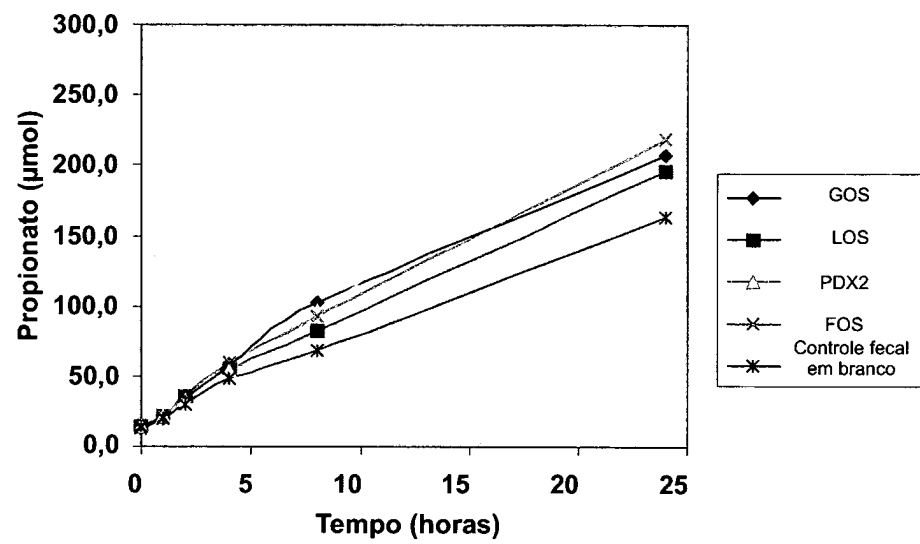
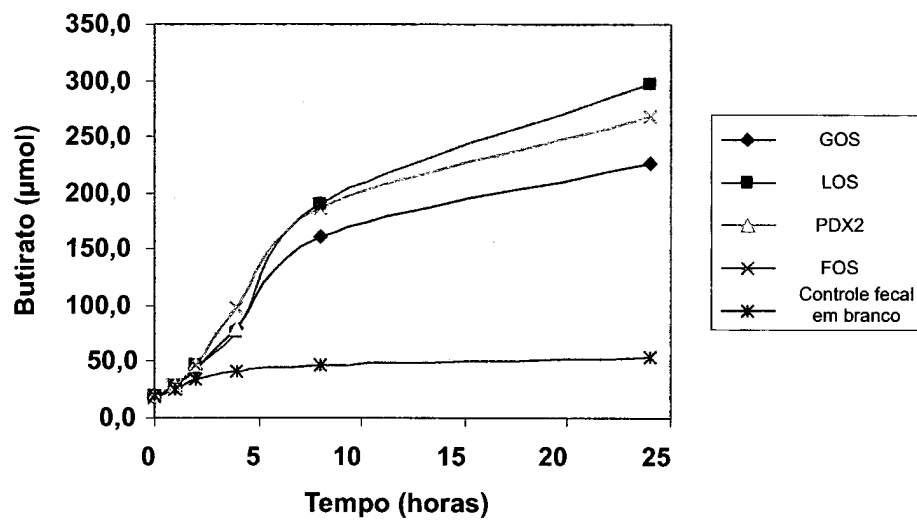


Fig. 2

**Fig. 3**

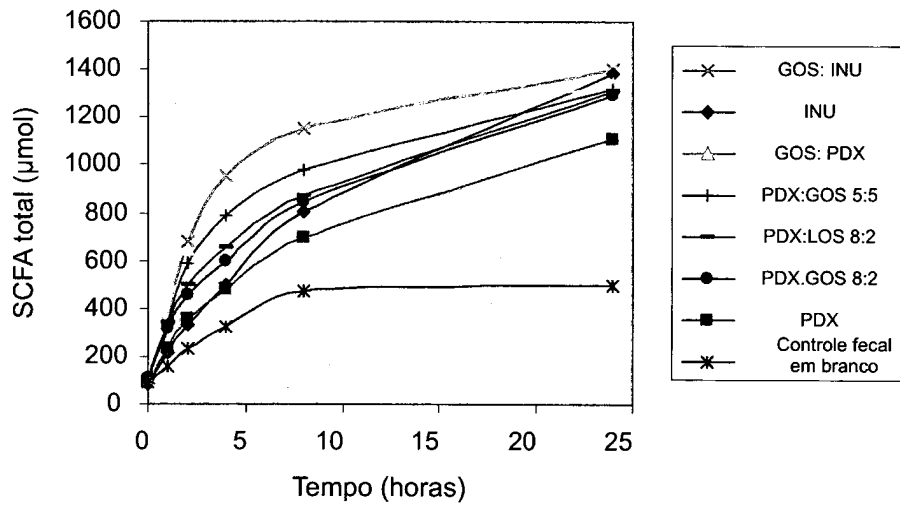
**Fig. 4**

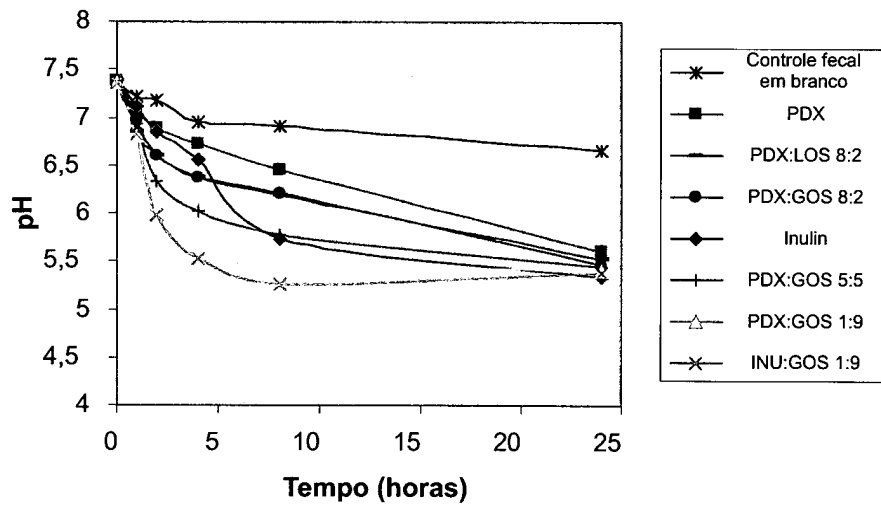
**Fig. 5**

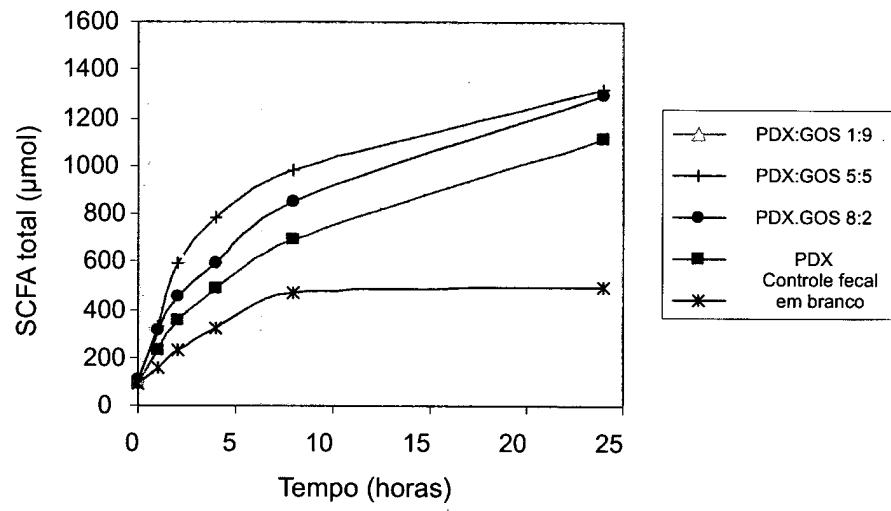
Proporções relativas de ácido acético, ácido propiônico, e ácido butírico e produção de SCFA total (média e desvio padrão) na fermentação de substratos do grupo 3

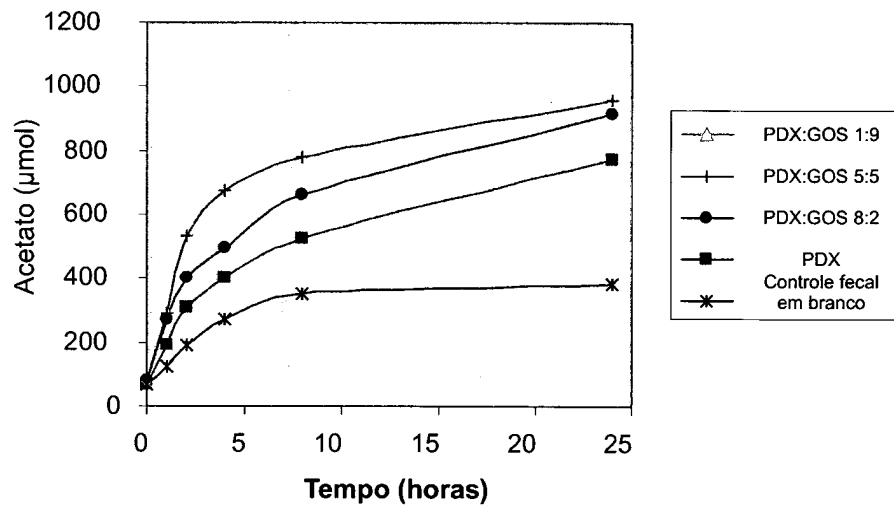
	Ácido acético %	Ácido Propiônico %	Ácido Butírico %	Média SCFA μmol
Tempo (horas) GOS				
0	79,3	8,6	12,1	144
1	86,5	5,6	7,8	354
2	89,5	4,6	5,9	727
4	86,3	5,7	8,0	1010
8	76,8	9,0	14,2	1134
24	67,1	15,7	17,2	1325
Tempo (horas) LOS				
0	76,7	9,6	13,7	143
1	85,9	6,0	8,1	365
2	89,2	4,7	6,1	770
4	88,0	5,0	7,0	1104
8	77,0	7,0	16,1	1181
24	63,7	14,5	21,9	1359
Tempo (horas) PDX2				
0	77,8	9,2	13,1	156
1	83,1	7,1	9,8	303
2	81,2	7,6	11,2	426
4	75,7	9,9	14,4	550
8	74,3	12,5	13,2	775
24	66,5	23,3	10,2	1128
Tempo (horas) FOS				
0	78,4	9,0	12,7	143
1	86,4	5,8	7,8	376
2	89,7	4,4	5,9	816
4	86,8	5,0	8,3	1195
8	77,7	7,4	15,0	1254
24	66,9	14,9	18,2	1470
Fecal				
Tempo (horas) blank				
0	78,3	9,0	12,7	151
1	83,3	7,3	9,3	280
2	82,7	8,1	9,2	373
4	80,1	10,7	9,2	450
8	78,8	12,5	8,8	548
24	73,4	20,0	6,6	817

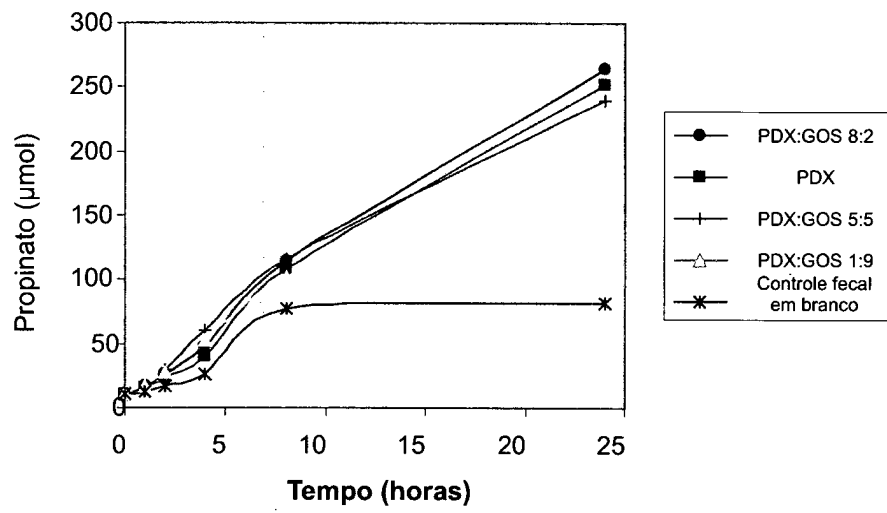
Fig. 6

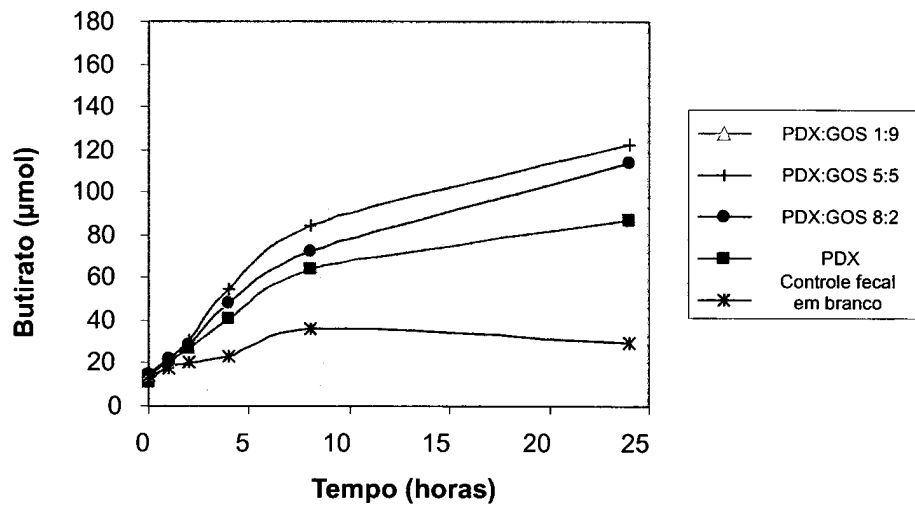
**Fig. 7**

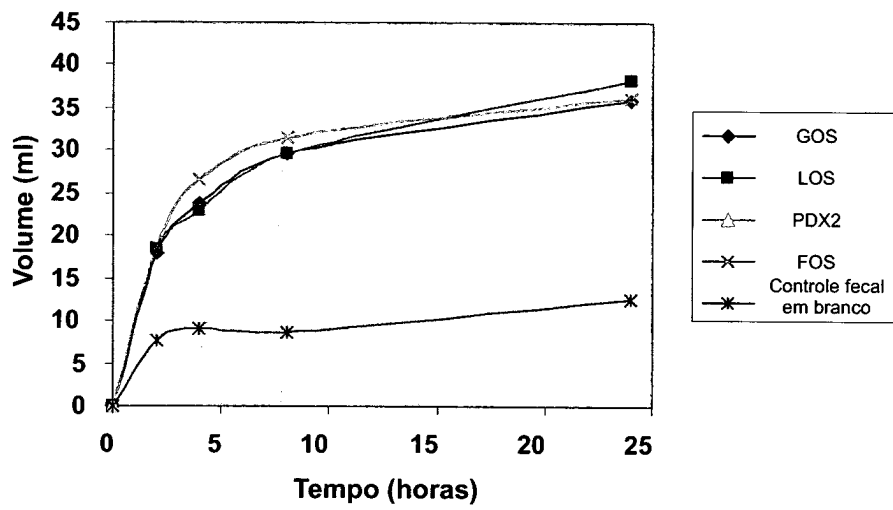
**Fig. 8**

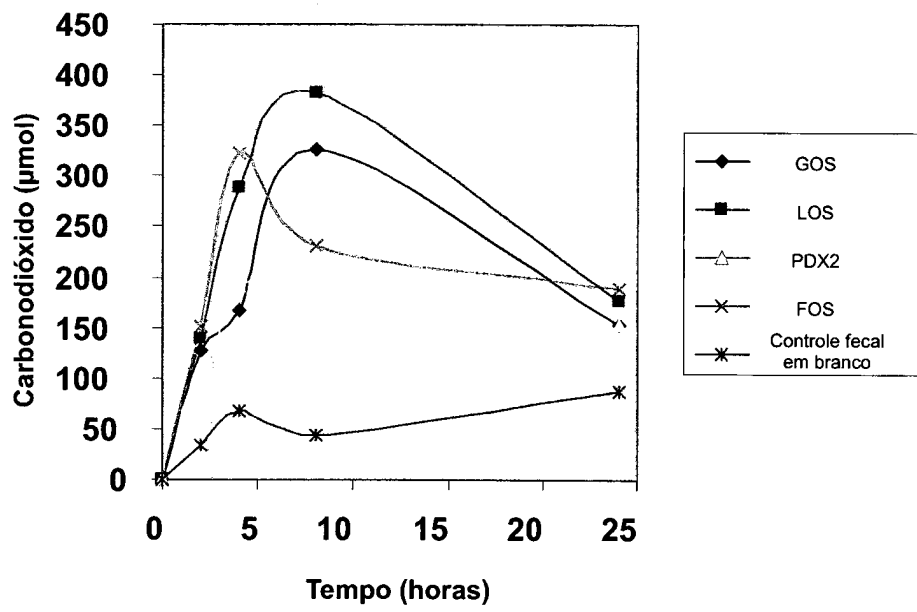
**Fig. 9**

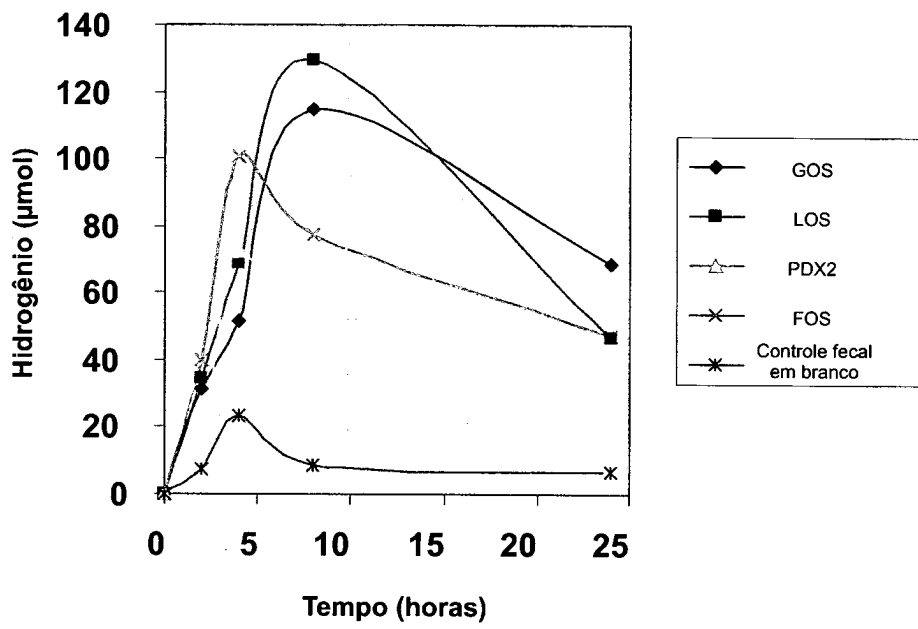
**Fig. 10**

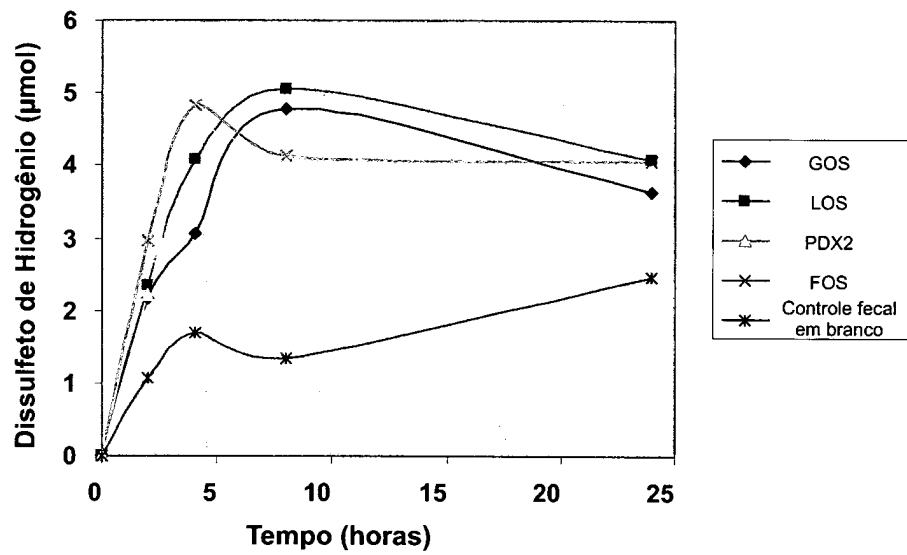
**Fig. 11**

**Fig. 12**

**Fig. 13**

**Fig. 14**

**Fig. 15**

**Fig. 16**

Sumário de efeitos prebióticos em microflora fecal

Prebiótico de Teste	Aumento de Log10 com prebiótico (T12-T6)									
	Bifidobacteria		Lactobacilli		Clostridia		Bacteroides			
	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V1	V2
Leite humano	1.34	2.13	1.66	1.87	1.00	2.55	0.09	0.12		
FOS	1.55	0.05	1.26	0.26	1.14	0.71	0.48	0.97		
LOS	0.50	0.28	0.70	1.19	0.11	1.22	0.59	0.20		
GOS	0.33	0.75	0.00	0.00	1.31	0.15	0.85	0.03		
PDX	0.23	0.17	1.35	0.55	1.79	0.88	1.64	1.79		
1:1 PDX:GOS	0.58	0.47	1.21	0.81	0.91	0.43	0.00	0.74		
1:1 PDX:LOS	0.32	0.33	0.57	0.25	0.22	0.10	0.12	0.41		
1:1 LOS:GOS	0.14	0.53	0.21	1.53	0.48	1.63	1.60	2.04		

Note: fermentação V1 a pH = 5,2, fermentação V2 a pH = 6,7

Fig. 17

RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE POLIDEXTROSE PARA ESTIMULAR OS ATRIBUTOS FUNCIONAIS DE OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO EM CRIANÇAS PEQUENAS ALIMENTADAS COM FÓRMULA"**.

- 5 A presente invenção refere-se a um novo uso de PDX na fabricação de um medicamento para aumentar a produção de acetato, diminuir a produção de butirato, aumentar a população e espécies de bactérias benéficas e retardar a taxa de fermentação de pré-bióticos dentro do intestino de uma criança pequena alimentada com fórmula.