

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.03.07	(73) Titular(es): NESTEC S.A.	
(30) Prioridade(s): 2006.03.07 EP 06110805	AVENUE NESTLÉ 55 1800 VEVEY	CH
(43) Data de publicação do pedido: 2008.11.26	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.10.21	MORGAN FRANÇOIS	FR
016/2016	NORBERT SPRENGER	CH
	RAFAEL BERROCAL	CH
	MARCEL BRAUN	CH
	CHRISTINE CHERBUT	CH
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO	
	RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MISTURA SIMBIÓTICA**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO REFERE-SE A UMA PREPARAÇÃO COMPREENDENDO UMA ESTIRPE BACTERIANA PROBIÓTICA E UMA MISTURA PREBIÓTICA COMPREENDENDO 5-70% EM PESO DE, PELO MENOS, UM OLIGOSSACÁRIDO N-ACETILADO SELECIONADO DO GRUPO COMPREENDENDO GALNACΑ1,3GALΒ1,4GLC E GALΒ1,6GANACΑ1,3GALΒ1,4GLC, 20-95% EM PESO DE, PELO MENOS, UM OLIGOSSACÁRIDO NEUTRO SELECIONADO DO GRUPO CONSISTINDO EM GALΒ1,6GAL, GALΒ1,6GALΒ1,4GLC GALΒ1,6GALΒ1,6GLC, GALΒ1,3GALΒ1,3GLC, GALΒ1,3GALΒ1,4GLC, GALΒ1,6GALΒ1,6GALΒ1,4GLC, GALΒ1,6GALΒ1,3GALΒ1,4GLC GALΒ1,3GALΒ1,6GALΒ1,4GLC E GALΒ1,3GALΒ1,3GALΒ1,4GLC E 2-50% EM PESO DE, PELO MENOS, UM OLIGOSSACÁRIDO SIALILADO SELECIONADO DO GRUPO CONSISTINDO EM NEUACΑ2,3GALΒ1,4GLC E NEUACΑ2,6GALΒ1,4GLC. A INVENÇÃO DIRIGE-SE A PRODUTOS ALIMENTARES COMPREENDENDO A REFERIDA PREPARAÇÃO E À UTILIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE INFEÇÕES.

RESUMO

"MISTURA SIMBIÓTICA"

Esta invenção refere-se a uma preparação compreendendo uma estirpe bacteriana probiótica e uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo compreendendo $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{Gal}\beta 1,6\text{GaNac}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$. A invenção dirige-se a produtos alimentares compreendendo a referida preparação e à utilização da preparação na prevenção e tratamento de infeções.

DESCRIÇÃO

"MISTURA SIMBIÓTICA"

Campo da invenção

Esta invenção refere-se a preparações compreendendo um probiótico e uma mistura prebiótica que é especificamente concebida para melhorar a eficiência e a eficácia do probiótico e a produtos alimentares compreendendo a referida preparação.

Antecedentes da invenção

O cólon humano é colonizado com uma vasta gama de bactérias que possuem efeitos positivos e negativos na fisiologia do intestino, assim como possui outras influências sistémicas. Os grupos predominantes de bactérias encontrados no cólon incluem bacteróides, bifidobactérias, eubactérias, clostridia e lactobacilos. As bactérias presentes possuem atividades variáveis em resposta à disponibilidade do substrato, potencial redox, pH, tensão de O₂ e distribuição no cólon. Em geral, as bactérias intestinais podem ser divididas em espécies que podem potencialmente exercer efeitos prejudiciais ou benéficos no hospedeiro. Os efeitos patogénicos (que podem ser provocados por clostridia ou bacteróides, por exemplo) incluem diarreia, infeções, danos no fígado, carcinogénese e putrefação intestinal. Os efeitos promotores de saúde podem ser provocados pela inibição de crescimento de, e colonização pelas, bactérias prejudiciais, estimulação de funções imunitárias, melhoria da

digestão e absorção de nutrientes essenciais e síntese de vitaminas. É desejável um aumento nos números e/ou atividades de espécies bacterianas, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* que podem possuir propriedades promotoras de saúde.

No passado recente, determinadas estirpes de bactérias atraíram atenção considerável devido a se ter verificado que apresentam propriedades valiosas para o homem, se ingeridas. Em particular, estirpes específicas do género *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* verificaram-se ser passíveis de colonizar, pelo menos transientemente, a mucosa intestinal, de reduzir a capacidade de bactérias patogénicas aderirem ao epitélio intestinal, de possuir efeitos imunomoduladores e de assistir na manutenção do bem-estar. Essas bactérias são normalmente designadas probióticos.

Foram realizados extensos estudos para identificar novas estirpes probióticas. Por exemplo, nos documentos EP 0199535, EP 0768375, WO 97/00078, EP 0577903 e WO 00/53200 divulgam-se estirpes específicas de lactobacilos e bifidobactérias e seus efeitos benéficos.

Um probiótico pode ser definido como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta beneficemente o animal hospedeiro melhorando o seu equilíbrio microbiano intestinal. Demonstrou-se que determinadas estirpes de Lactobacilos e Bífidobactérias, tais como, por exemplo, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Bifidobacterium lactis* BB12 ®, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 e *Bifidobacterium breve* M-16V ® possuem estas propriedades. Esses lactobacilos e bifidobactérias probióticos são, normalmente, adicionados a alimentos humanos, tais como

produtos lácteos fermentados. Sabe-se que probióticos possuem, geralmente, um efeito profilático e terapêutico em infecções patogénicas do trato gastrointestinal, tais como as provocadas pelas espécies *Clostridia* e *Salmonella*, por exemplo. No documento EP 904784 é proposto utilizar uma combinação de três tipos diferentes de probiótico para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. Mais recentemente, foi sugerido que algumas estirpes probióticas podem também ser eficazes na prevenção e tratamento de infecções do trato respiratório superior (British Medical Journal 2001, 322:1-5).

Tanto quanto se refere especificamente a bebés, imediatamente antes do nascimento, pensa-se que o trato gastrointestinal de um bebé é estéril. Durante o processo de nascimento, este encontra bactérias do trato digestivo e pele da mãe e começa a tornar-se colonizado. Existem grandes diferenças em relação à composição da microbiota intestinal em resposta à alimentação de lactentes. A flora fecal de lactentes amamentados inclui populações apreciáveis de bifidobactérias com alguns lactobacilos, enquanto lactentes alimentados com fórmula possuem microbiota mais complexa, com bifidobactérias, bacteróides, clostridia e estreptococos, todos normalmente presentes. Após o desmame, estabelece-se um padrão de microbiota intestinal que se assemelha ao padrão adulto.

O leite materno é recomendado para todos os lactentes. No entanto, em alguns casos, a amamentação é inadequada ou sem sucesso por razões médicas ou a mãe escolhe não amamentar. As fórmulas para lactentes foram desenvolvidas para estas situações.

Foi proposto adicionar probióticos a fórmulas para lactentes para encorajar a colonização intestinal a ocorrer e para promover a colonização com as bactérias "boas" - bifidobactérias e lactobacilos - em vez de com as bactérias prejudiciais - patogêneos, tais como clostridia, etc. Tipicamente, é adicionado um mínimo de 10^7 cfu/g de fórmula apesar de serem geralmente preferidas quantidades maiores, por exemplo, até 10^{12} cfu/g de fórmula.

Outra abordagem para promover os números e/ou atividades de bactérias benéficas no cólon é a adição de prebióticos a alimentos. Um prebiótico é um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro estimulando, seletivamente, o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon e, deste modo, melhora a saúde do hospedeiro. Esses ingredientes são não digeríveis no sentido em que não são quebrados e absorvidos no estômago ou intestino delgado e, deste modo, passam intactos para o cólon onde são seletivamente fermentados pelas bactérias benéficas. Exemplos de prebióticos incluem determinados oligossacáridos, tais como fructooligossacáridos (FOS) e galactooligossacáridos (GOS).

O leite humano é conhecido por conter uma quantidade maior de oligossacáridos indigestos do que muitos outros leites animais. De facto, os oligossacáridos indigestos representam o terceiro maior componente sólido (depois de lactose e lípidos) em leite materno, ocorrendo a uma concentração de 12-15 g/L em colostro e 5-78 g/L em leite maduro. Os oligossacáridos de leite humano são muito resistentes a hidrólise enzimática, indicando que estes oligossacáridos podem apresentar funções essenciais não diretamente relacionadas com o seu valor calórico.

À medida que a composição de leite humano se torna melhor compreendida, foi também proposto adicionar prebióticos a fórmula para lactentes. Estão comercialmente disponíveis várias fórmulas para lactentes suplementadas com prebióticos, tais como misturas de fructooligossacáridos e galactooligossacáridos, por exemplo. No entanto, essas misturas aproximam-se apenas grosseiramente da mistura de oligossacáridos no leite humano. Foram detetados mais de 100 componentes de oligossacáridos diferentes no leite humano, alguns dos quais não foram, até agora, detetados em leites animais, tal como leite bovino, de todo, ou foram detetados apenas em pequenas quantidades. Exemplos de classes de oligossacáridos de leite humano que estão presentes em leite bovino e colostro apenas em muito pequenas quantidades, ou não de todo, são oligossacáridos sialilados e fucosilados.

As fórmulas para lactentes contendo probióticos e prebióticos foram também propostas na procura constante para produzir fórmulas para lactentes que replicam, tão próximo quanto possível, a composição e eficácia de leite humano. Por exemplo, no documento WO 2005/039319 é proposto suplementar uma fórmula para lactentes com uma mistura de uma estirpe de *Bifidobacterium breve*, galactooligossacáridos e fructooligossacáridos (inulina). É reivindicado que esta mistura, que é descrita como um simbiótico, regula a população de *Bifidobacterium* no cólon de lactentes que consomem a fórmula suplementada para uma população mais do "tipo lactente" que é inferior em espécies *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* e *Bifidobacterium adolescentis* e superior em espécies *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium*

breve e *Bifidobacterium longum*. A mistura é também referida por ser útil para a prevenção ou tratamento de um estado imunitário.

No entanto, permanece a necessidade para preparações compreendendo um probiótico e uma mistura prebiótica especificamente concebida para melhorar a eficiência e a eficácia do probiótico.

Sumário da invenção

Verificou-se agora surpreendentemente que uma mistura prebiótica que compreende 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-90% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 5-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc é altamente eficaz no melhoramento dos efeitos benéficos e eficiência de bactérias probióticas coadministradas com a mistura prebiótica.

Como consequência, num primeiro aspeto, a presente invenção proporciona um produto alimentar que é uma fórmula para lactentes compreendendo uma preparação compreendendo uma estirpe bacteriana probiótica e uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e

Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, em que a estirpe bacteriana probiótica é uma estirpe *Lactobacillus* ou uma estirpe *Bifidobacterium*.

Num aspeto adicional, a presente invenção proporciona uma preparação compreendendo uma estirpe bacteriana probiótica e uma mistura prebiótica compreendendo 5-20% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 60-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-30% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, em que a estirpe bacteriana probiótica é uma estirpe *Lactobacillus* ou uma estirpe *Bifidobacterium*.

Ainda num aspeto adicional, a presente invenção proporciona a utilização de uma estirpe bacteriana probiótica e de uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do

grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc no fabrico de uma composição nutricional terapêutica ou medicamento para a prevenção e/ou tratamento de infeções patogénicas do trato gastrointestinal.

Ainda num aspeto adicional, a presente invenção proporciona a utilização de uma estirpe bacteriana probiótica e de uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc no fabrico de uma composição nutricional terapêutica ou medicamento para a prevenção ou tratamento de um estado imunitário.

Ainda num aspeto adicional, a presente invenção proporciona a utilização de uma estirpe bacteriana probiótica e de uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do

grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc no fabrico de uma composição nutricional terapêutica ou medicamento para a prevenção ou tratamento de infeções do trato respiratório superior.

Breve Descrição dos Desenhos

A **Figura 1** mostra o efeito protetor da preparação da invenção contra toxina A de *Clostridium difficile* comparado com o efeito protetor dado pelos componentes da preparação isolada;

A **Figura 2** mostra o efeito protetor contra toxina A de *Clostridium difficile* conferido pelas estirpes bacterianas probióticas utilizadas na Figura 1 em combinação com vários prebióticos diferentes conhecidos na técnica;

A **Figura 3** compara as contagens de *Bifidobacterium breve* no intestino delgado de ratinhos gnotobióticos alimentados por sonda com uma microbiota de lactentes humanos e alimentados com a preparação da invenção com as contagens de *Bifidobacterium breve* em ratinhos alimentados com os componentes da preparação isolada;

A **Figura 4** compara as contagens de *Staphylococci* nas fezes de ratinhos gnotobióticos alimentados por sonda com uma microbiota de lactentes humanos e alimentados com a preparação

da invenção com as contagens de *Staphylococci* em ratinhos alimentados com os componentes da preparação isolada;

A **Figura 5** compara as contagens de *Clostridium perfringens* no intestino delgado de ratinhos gnotobióticos alimentados por sonda com uma microbiota de lactentes humanos e alimentados com a preparação da invenção com as contagens de *Clostridium perfringens* nesses ratinhos alimentados com os componentes da preparação isolada; e

A Figura 6 compara a atividade metabólica relativa de *Bifidobacterium longum* residente ao longo de um período de duas semanas em ratinhos sem germes alimentados por sonda com uma microbiota de lactentes humanos e alimentados com a preparação da invenção com a atividade metabólica relativa de *Bifidobacterium longum* residente nesses ratinhos alimentados com os componentes da preparação isolada.

Descrição detalhada da invenção

Na presente descrição, as seguintes expressões dão uma definição que deve ser tida em conta ao ler e interpretar a descrição, exemplos e reivindicações:

"microbiota intestinal bifidogénica" significa para lactentes uma microbiota intestinal que é dominada por Bifidobactérias, tais como *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium longum* com a exclusão de populações apreciáveis dessas espécies como Bacteróides, Clostridia e Estreptococos e que é geralmente comparável com a encontrada em lactentes amamentados;

"lactente" significa uma criança com idade inferior a 12 meses;

"fórmula para lactentes" significa um alimento pretendido para a nutrição completa de lactentes durante os primeiros quatro a seis meses de vida e como complemento a outros alimentos até à idade de 12 meses;

"oligossacárido N-acetilado" significa um oligossacárido possuindo um resíduo N-acetil;

NCC designa Nestlé Culture Collection

"oligossacárido neutro" significa um oligossacárido que não possui carga e sem resíduo N-acetil;

"bactérias probióticas" significa preparações celulares microbianas ou componentes de células microbianas com um efeito benéfico na saúde ou bem-estar do hospedeiro. (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al. "Probiotics: how should they be defined" Trend Food Sci. Technol. 1999:10 107-10);

"prebiótico" significa um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro estimulando, seletivamente, o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon e, deste modo, melhora a saúde do hospedeiro. (Gibson e Roberfroid "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics" J. Nutr 125:1401 - 1412);

"oligossacárido" significa um hidrato de carbono possuindo um grau de polimerização (GP) que varia de 2 a 20 inclusive mas não incluindo lactose; e

"oligossacárido sialilado" significa um oligossacárido possuindo um resíduo de ácido siálico com carga associada

De um modo preferido, a mistura prebiótica compreende 10-70% em peso dos oligossacáridos N-acetilados, 20-80% em peso dos oligossacáridos neutros e 10-50% em peso dos oligossacáridos sialilados. De um modo mais preferido, a mistura prebiótica compreende 15-40% em peso dos oligossacáridos N-acetilados, 40-60% em peso dos oligossacáridos neutros e 15-30% em peso dos oligossacáridos sialilados. Uma mistura prebiótica particularmente preferida compreende 30% em peso dos oligossacáridos N-acetilados, 50% em peso dos oligossacáridos neutros e 20% em peso dos oligossacáridos sialilados.

Em alternativa, a mistura pode compreender, convenientemente, 5-20% em peso do(s) oligossacárido(s) N-acetilado(s) especificado(s), 60-95% em peso do(s) oligossacárido(s) neutro(s) especificado(s) e 2-30% em peso do(s) oligossacárido(s) sialilado(s) especificado(s).

A mistura prebiótica como compreendida ou utilizada nos aspetos da invenção pode ser preparada a partir de um ou mais leites animais. O leite pode ser obtido a partir de qualquer mamífero, em particular de vacas, cabras, búfalos, cavalos, elefantes, camelos ou ovelhas.

Em alternativa, a mistura prebiótica pode ser preparada comprando e misturando os componentes individuais. Por exemplo,

galactooligossacáridos sintetizados, tais como Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e suas misturas estão comercialmente disponíveis sob as marcas Vivinal® e Elix'or®. Outros fornecedores de oligossacáridos são Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH e Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Em alternativa, podem ser utilizadas glicosiltransferases específicas, tais como galactosiltransferases, para produzir oligossacáridos neutros.

Os oligossacáridos N-acetilados podem ser preparados pela ação de glucosaminidase e/ou galactosaminidase em N-acetil-glucose e/ou N-acetil galactose. Igualmente, podem ser utilizadas N-acetil-galactosiltransferases e/ou N-acetil-glicosiltransferases para esta finalidade. Os oligossacáridos N-acetilados podem também ser produzidos por tecnologia de fermentação utilizando os enzimas (recombinantes ou naturais) respetivos e/ou fermentação microbiana. No último caso, os micróbios podem expressar as suas enzimas e substratos naturais ou podem ser construídos para produzir os substratos e enzimas respetivos. Podem ser utilizadas culturas microbianas simples ou culturas mistas. A formação de oligossacáridos N-acetilados pode ser iniciada pelos substratos aceitadores começando de qualquer grau de polimerização (GP) de GP=1 em diante. Outra opção é a conversão química de ceto-hexoses (e. g., fructose) livre ou ligada a um oligossacárido (e. g., lactulose) em N-acetil-hexosamina ou um oligossacárido contendo N-acetil-hexosamina como descrito em Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* 38:827-828.

Os oligossacáridos sialilados 3'sialil-lactose e 6'sialil-lactose podem ser isolados por tecnologia cromatográfica ou de

filtração a partir de uma fonte natural, tal como leites animais. Em alternativa, estes podem também ser produzidos por biotecnologia utilizando sialiltransferases específicas por tecnologia de fermentação à base de enzimas (enzimas recombinantes ou naturais) ou por tecnologia de fermentação microbiana. No último caso, os micróbios podem expressar as suas enzimas e substratos naturais ou podem ser construídos para produzir os substratos e enzimas respetivos. Podem ser utilizadas culturas microbianas simples ou culturas mistas. A formação de oligossacáridos sialilados pode ser iniciada pelos substratos aceitadores começando de qualquer grau de polimerização (GP) de GP=1 em diante.

A estirpe bacteriana pode ser selecionada de qualquer estirpe que satisfaz a definição de um probiótico e possui tempo de vida aceitável para o produto no qual a preparação da invenção é para ser incorporada. Por exemplo, as fórmulas para lactentes devem permanecer estáveis e eficazes durante 36 meses. De facto, a preparação da invenção não necessita de ser incorporada noutro produto, tal como um produto alimentar, mas pode ser ingerida como tal ou misturada com um excipiente adequado na forma de um pó ou cápsula ou comprimida em comprimidos, por exemplo.

A estirpe bacteriana probiótica é um lactobacilos ou uma bifidobactéria. De um modo preferido, são utilizadas estirpes que produzem apenas ácido L(+) láctico. Exemplos de espécies *Lactobacillus* preferidas são *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus reuteri*. As estirpes particularmente preferidas são *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 e *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.

Exemplos de espécies *Bifidobacterium* preferidas são *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium longum*. As estirpes particularmente preferidas são a estirpe de *B. lactis* vendida pela empresa Christian Hansen da Dinamarca sob a marca Bb12 e *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 passível de obter de Morinaga Milk Industry Co. Ltd. do Japão sob a marca BB536.

A preparação da invenção pode proporcionar entre 10^2 e 10^{10} cfu de bactérias probióticas por cada grama da mistura prebiótica.

Num aspeto preferido da invenção, a preparação acima descrita é incorporada num produto alimentar. No contexto da presente invenção, a expressão "produto alimentar" pretende abranger qualquer matéria consumível. Assim, pode ser um produto pretendido para consumo por humanos, em particular fórmula para lactentes, leite de crescimento e semelhantes. No entanto, o consumo da preparação não é restrito a lactentes e crianças. Em particular, a preparação da invenção pode ser incorporada em leite desidratado ou misturas de cereais.

Se a preparação da invenção for para ser incorporada na fórmula para lactentes ou outra composição nutricional à base de leite, a composição pode ser preparada de qualquer modo adequado conhecido na técnica. Por exemplo, uma fórmula para lactentes pode ser preparada misturando em conjunto a fonte de proteína, quaisquer hidratos de carbono que não lactose e a fonte de gordura em proporções adequadas. Os emulsionantes podem ser adicionados se desejado. As vitaminas e minerais podem ser adicionados neste momento mas são, normalmente, adicionados depois para evitar degradação térmica. Quaisquer vitaminas

lipofílicas, emulsionantes, e semelhantes, podem ser dissolvidos na fonte de gordura antes de misturar. A água, de um modo preferido, água que foi submetida a osmose inversa, pode ser, em seguida, misturada para formar uma mistura líquida.

A mistura líquida pode ser, em seguida, tratada termicamente para reduzir cargas bacterianas. Por exemplo, a mistura líquida pode ser rapidamente aquecida a uma temperatura na gama de cerca de 80 °C a cerca de 110 °C durante cerca de 5 segundos a cerca de 5 minutos. Isto pode ser realizado por injeção de vapor ou por permutador de calor, e. g., um permutador de calor em placa.

A mistura líquida pode, em seguida, ser arrefecida para cerca de 60 °C a cerca de 85 °C, por exemplo, por arrefecimento rápido. A mistura líquida pode, em seguida, ser homogeneizada, por exemplo, em dois estágios, a cerca de 7 MPa a cerca de 40 MPa no primeiro estágio e cerca de 2 MPa a cerca de 14 MPa no segundo estágio. A mistura homogeneizada pode, em seguida, ser ainda arrefecida para adicionar quaisquer componentes sensíveis ao calor, tais como vitaminas e minerais. O pH e o teor de sólidos da mistura homogeneizada são convenientemente padronizados neste momento.

A mistura homogeneizada é transferida para um aparelho de secagem adequado, tais como um secador por pulverização ou secador por congelação, e convertida a pó. O pó deve possuir um teor de humidade de menos de cerca de 5% em peso.

A preparação da invenção pode ser feita com antecedência e adicionada diretamente à composição nutricional por mistura a seco. De um modo preferido, no entanto, os componentes

individuais da preparação são adicionados separadamente à composição nutricional no caso da mistura prebiótica ser, de um modo preferido, adicionada na fase líquida imediatamente antes da secagem e a estirpe bacteriana probiótica ser, de um modo preferido, adicionada à composição seca por mistura a seco.

A estirpe bacteriana probiótica selecionada pode ser cultivada de acordo com qualquer método adequado conhecido na técnica e preparada para adição à fórmula para lactentes por liofilização ou secagem por pulverização, por exemplo. Em alternativa, podem ser compradas estirpes bacterianas de fornecedores especialistas, tais como Christian Hansen e Morinaga já preparadas numa forma adequada para adição a produtos alimentares, tal como fórmula para lactentes.

Se a mistura prebiótica for preparada a partir de um leite animal, por exemplo, como descrito abaixo, e for pretendido adicioná-la a uma fórmula para lactentes, pode ser conveniente adicioná-la sem remover primeiro toda a lactose. Como a fórmula para lactentes contém um componente de hidrato de carbono o qual é, muitas vezes, total ou parcialmente, constituído por lactose, será evidente para o especialista na técnica que a quantidade de hidrato de carbono na fórmula para lactentes necessitará de ser ajustada para ter em conta o hidrato de carbono adicional que será adicionado com a mistura prebiótica. A concentração final da preparação inventiva no produto alimentar de bebé ou lactente ou fórmula é, de um modo preferido, 0,3 a 6,0%, de um modo preferido, 0,75 a 4,0% em peso de matéria seca. Isto corresponde a uma concentração desde 0,2 a 8 gramas por litro, de um modo preferido, 1 a 5 g/L de fórmula reconstituída. No entanto, estas quantidades não devem ser consideradas como limitativas e devem ser adaptadas à população alvo, por exemplo com base no peso e

idade ou saúde do bebê ou lactente. De um modo preferido, a fórmula ou alimento contendo a mistura de oligossacáridos da invenção é alimentada ao bebê a cada refeição.

Além da preparação da invenção, um produto alimentar, tal como uma fórmula para lactentes, pode compreender um ou mais oligossacáridos adicionais que são adicionados separadamente até um teor de oligossacáridos de 10 g/L de fórmula reconstituída ou líquida.

Embora seja preferido suplementar produtos alimentares especificamente direcionados à nutrição de lactentes ou bebês, pode ser benéfico suplementar produtos alimentares não especificamente direcionados ou direcionados à população adulta. Por exemplo, as misturas de oligossacáridos da invenção podem ser incorporadas em produtos nutricionais de saúde e produtos nutricionais para os idosos. Esses produtos alimentares podem incluir misturas para bebidas à base de leite, iogurtes, produtos fermentados à base de leite e gelados, assim como produtos à base de cereais, entre outros.

Surpreendentemente, verificou-se que a mistura prebiótica nas preparações da invenção melhora sinergicamente as propriedades anti-patogénicas e imunomodulares do probiótico para produzir um efeito terapêutico que é notavelmente superior à mistura, por exemplo, do mesmo probiótico com um único prebiótico. As preparações da invenção e produtos alimentares contendo-as são, deste modo, adequados para a prevenção e tratamento de infeções gastrointestinais provocadas por patogéneos, particularmente patogéneos bacterianos, assim como infeções do trato respiratório superior, tal como otite média. Os produtos alimentares contendo preparações de acordo com a

invenção são, deste modo, especialmente adequados para populações vulneráveis, tais como bebés e os idosos.

Mais, as preparações da invenção são adequadas para reforçar defesas imunitárias, por exemplo, melhorando a resposta a vacinas e reduzindo a duração e gravidade de infeções, assim como para a prevenção e tratamento de estados relacionados com o mau funcionamento do sistema imunitário em lactentes e crianças, tais como hipersensibilidade alimentar, eczema, renite alérgica, dermatite atópica e outras doenças atópicas.

Outra vantagem das preparações da invenção é que estas promovem o estabelecimento de uma microbiota intestinal bifidogénica em lactentes aumentando a atividade metabólica relativa das espécies Bifidobactérias que dominam essa microbiota intestinal em lactentes.

A invenção será agora ilustrada por referência aos seguintes exemplos.

Exemplo 1

200000 litros de um permeato de ultrafiltração de soro de leite são pré-concentrados a 22% (p/p) de sólidos totais (TS), pasteurizados a cerca de 75 °C durante cerca de 30 segundos e, em seguida, concentrados por evaporação a 60 °C para atingir um TS de 59% (p/p). O líquido é arrefecido num cristalizador a uma taxa de 2 °C por hora durante um período de 24 horas para cristalizar a lactose. A lactose cristalizada é lavada, em seguida, removida por um espremedor. O líquido remanescente é clarificado através de um decantador. Os 77000 litros a 17,7% de

TS obtidos a partir do clarificador são novamente concentrados por evaporação a 60 °C para atingir um TS de 55% (p/p) e submetidos a um segundo passo de cristalização de lactose sob as mesmas condições que anteriormente. Os 29000 litros a 20,5% de TS de licor obtidos, desse modo, são desmineralizados por uma combinação de eletrodialise e troca iônica num modo conhecido *per se* produzindo 28500 litros de um licor desmineralizado a 90% a 17,3% de TS. Este licor, que contém aproximadamente 1,5 gramas por litro de uma mistura de cerca de 30% em peso de GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 50% em peso de Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 20% em peso de NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc; dependendo do material de partida, pode ser adicionado diretamente a um produto alimentar, tal como uma fórmula para lactentes ou pode ser ainda concentrado num modo conhecido *per se* para os especialistas na técnica.

Por exemplo, a lactose remanescente no licor pode ser hidrolisada em glucose e galactose e estes monossacáridos podem ser removidos por nanofiltração ou, se desejado, a galactose pode ser, pelo menos parcialmente, polimerizada, por exemplo, pela ação de β -galactosidase para produzir galactooligossacáridos que serão também retidos pela membrana de nanofiltração.

Exemplo 2

100 kg de mistura prebiótica produzida de acordo com o Exemplo 1 a 50% de TS são aquecidos a 60 °C num tanque padrão e o pH é ajustado para 6 a 6,5. São adicionados 4,5 mg de Lactase F (Amano, Japão) por grama de TS e a mistura é mantida a

60 °C durante três horas. Em seguida, a temperatura é elevada para 110 °C durante 11 segundos por injeção direta de vapor para inativar a enzima. O líquido resultante contém, aproximadamente, 100 gramas por litro de uma mistura de cerca de 10% em peso de GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 87% em peso de Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 3% em peso de NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc. Pode ser adicionado diretamente a um produto alimentar, tal como uma fórmula para lactentes ou pode ser ainda concentrado como descrito acima.

Exemplo 3

Um exemplo da composição de uma fórmula para lactentes contendo uma preparação de acordo com a presente invenção é dada abaixo.

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energia (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Gordura (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linoleico (mg)	101	675
Lactose (g)	11,2	74,7
mistura OS do Exemplo 1 (g)	1,0	6,5
Minerais (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150

(continuação)

Nutriente	por 100 kcal	por litro
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (µg)	8	50
Se (µg)	2	13
Vitamina A (µg RE)	105	700
Vitamina D (µg)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (µg)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (µg)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100

(continuação)

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>L. rhamnosus</i> CGMCC 1.3724	2,3 x 10 ⁹ cfu/g de pó	

Exemplo 4

Foram realizadas experiências *in vitro* para comparar a eficácia de preparações de acordo com a invenção utilizando duas estirpes diferentes de bactérias probióticas com a eficácia de misturas das mesmas bactérias probióticas e outros prebióticos na prevenção de infecção patogénica. A toxina A de *Clostridium difficile* foi selecionada como uma toxina representativa de bactérias patogénicas.

Foram incubadas monocamadas de células T84 epiteliais intestinais crescidas em placas transpoço com (i) um probiótico isolado, (ii) um prebiótico isolado, ou (iii) uma combinação de probiótico e prebiótico. Após uma pré-incubação durante 2 h a 37 °C, CO₂ a 5%, as células T84 foram desafiadas com toxina A de *C. difficile* a uma concentração de 100 ng/mL. A resistência elétrica transepitelial (TER), que serviu como um marcador para avaliar a proteção contra a ação de toxina A, foi monitorizada a intervalos regulares até 24 h. Foi calculada uma classificação de proteção normalizada.

As estirpes bacterianas probióticas foram *L. paracasei* (CNCM I-2116) e *L. rhamnosus* (ATCC 53103). Ambas as estirpes foram utilizadas a concentrações finais de 10^8 cfu/L.

Os prebióticos utilizados foram a mistura prebiótica aqui descrita a 1 g/L; fructooligossacáridos (Raftilose P95, Orafti, Bélgica); galactooligossacáridos (Vivinal GOS, DOMO, Holanda) e sialil-lactose (Kyowa Hakko Kogyo, Japão) a 10 g/L.

Os resultados são mostrados nas Figuras 1 e 2. A Figura 1 compara os resultados obtidos com o probiótico isolado, a mistura prebiótica isolada e a preparação da invenção para duas estirpes probióticas. A Figura 2 compara os resultados obtidos com as mesmas estirpes probióticas como utilizadas na Figura 1 e fructooligossacáridos a 20 g/L; galactooligossacáridos a 20 g/L e sialil-lactose a 10 g/L. A lactose (Sigma) a 20 g/L foi utilizada como controlo.

A partir da Figura 1, pode ver-se que as preparações da invenção possuíam um efeito sinérgico significativo contra a toxina A de *C. difficile* em comparação com o proporcionado pelos componentes individuais (*i. e.*, mistura prebiótica e estirpe probiótica) isolados. A partir da Figura 2, pode ver-se que não foi atingido um efeito comparável quando foram testadas as mesmas estirpes bacterianas probióticas em combinação com fructooligossacáridos, galactooligossacáridos ou sialil-lactose, individualmente. Pode ver-se que foi conseguida proteção moderada utilizando *L. rhamnosus* em combinação com sialil-lactose, mas apenas a 10 g/L e não a 1 g/L como com a preparação da invenção.

Exemplo 5

Foram realizadas experiências *in vivo* para comparar os efeitos na microbiota intestinal de suplementação com a mistura prebiótica isolada, com um probiótico de *Bifidobacterium lactis* isolado e com uma preparação de acordo com a invenção num modelo animal gnotobiótico de microbiota de lactentes humanos.

Os ratinhos sem germes foram alimentados por sonda com um modelo de microbiota de lactentes humanos e deixou-se estabelecer a microbiota, ela própria, durante duas semanas. Os ratinhos foram, em seguida, divididos em quatro grupos: um primeiro grupo que recebeu 3% em peso da mistura prebiótica isolada na sua comida, um segundo grupo que recebeu *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) na sua água bebível, um terceiro grupo que recebeu a comida suplementada com prebiótico e a água suplementada com probiótico e um quarto grupo de controlo. A microbiota fecal foi monitorizada durante o decurso do estudo (duas semanas) no fim desse período os animais foram sacrificados e a microbiota de intestino delgado foi também investigada.

Os resultados são mostrados nas Figuras 3, 4 e 5. A partir destas Figuras, pode ver-se que uma microbiota intestinal bifidogénica, como evidenciada pelas contagens de *Bifidobacterium breve* no intestino delgado (Figura 3) e contagens de *Staphylococci* e *Clostridium perfringens* diminuídas nas fezes (Figuras 4 e 5) é sinergicamente promovida pela preparação de acordo com a invenção em comparação aos seus componentes individuais.

Exemplo 6

Foram realizadas experiências *in vivo* para comparar os efeitos no estabelecimento e atividade metabólica de *Bifidobacterium longum* no trato gastrointestinal de ratinhos sem germes de suplementação com a mistura prebiótica isolada, com uma estirpe de *Lactobacillus rhamnosus* probiótica isolada e com a preparação de acordo com a invenção.

Os ratinhos sem germes foram alimentados por sonda com um modelo de microbiota de lactentes humanos e o estabelecimento de microbiota foi monitorizado ao longo do tempo por uma contagem em placa e avaliação de níveis de ARNr 16S que indicam atividade metabólica. O ARNr 16S foi amplificado por reação de polimerase em cadeia, os produtos foram separados sobre um gel de gradiente desnaturante e quantificados em relação aos níveis de ARNr 16S constante de *E. coli* que serviram como padrão interno. Os seguintes tratamentos foram comparados:- dieta de controlo e bebida (água) de controlo; dieta de controlo suplementada com 3% da mistura prebiótica e água; dieta de controlo e *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (NCC 4007) na água bebível; dieta de controlo suplementada com 3% da mistura prebiótica e *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 na água bebível.

Os resultados são mostrados na Figura 6. A preparação de acordo com a invenção superou, sinergicamente, a atividade metabólica geral de *Bifidobacterium longum* residente durante o estabelecimento de uma microbiota de lactentes humanos num ratinho sem germes. A microbiota de lactentes humanos de contagens de *B. longum* residente estava em níveis semelhantes após 14 dias no grupo de controlo e nos grupos que receberam o probiótico e a mistura prebiótica isolada enquanto a atividade

metabólica relativa foi sinérgica e significativamente aumentada no grupo a que se deu a preparação de acordo com a invenção (Figura 6D em comparação a 6A, B, C).

Lisboa, 17 de dezembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Produto alimentar que é uma fórmula para lactentes compreendendo uma preparação compreendendo uma estirpe bacteriana probiótica e uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{Gal}\beta 1,6\text{GaNAC}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, em que a estirpe bacteriana probiótica é uma estirpe *Lactobacillus* ou uma estirpe *Bifidobacterium*.
2. Produto alimentar como reivindicado na reivindicação 1, em que a mistura prebiótica compreende 15-40% em peso dos oligossacáridos N-acetilados, 40-60% em peso dos oligossacáridos neutros e 15-30% em peso dos oligossacáridos sialilados.
3. Produto alimentar como reivindicado na Reivindicação 1 ou 2, em que a mistura de oligossacáridos compreende 30% em peso dos oligossacáridos N-acetilados, 50% em peso dos oligossacáridos neutros e 20% em peso dos oligossacáridos sialilados.

4. Produto alimentar como reivindicado na Reivindicação 1, em que a mistura de oligossacáridos compreende 5-20% em peso dos oligossacáridos N-acetilados, 60-95% em peso dos oligossacáridos neutros e 2-30% em peso dos oligossacáridos sialilados.
5. Preparação compreendendo uma estirpe bacteriana probiótica e uma mistura prebiótica compreendendo 5-20% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{Gal}\beta 1,6\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, 60-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e 2-30% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ e $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$, em que a estirpe bacteriana probiótica é uma estirpe *Lactobacillus* ou uma estirpe *Bifidobacterium*.
6. Produto alimentar como reivindicado em qualquer das Reivindicações 1 a 4 ou a preparação como reivindicada na Reivindicação 5, em que a estirpe *Lactobacillus* é uma *Lactobacillus rhamnosus*, uma *Lactobacillus paracasei* ou uma *Lactobacillus reuteri*.
7. Produto alimentar ou a preparação como reivindicada na Reivindicação 6, em que a estirpe *Lactobacillus* é *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (ATCC 53103).

8. Produto alimentar ou a preparação como reivindicada na Reivindicação 6, em que a estirpe *Lactobacillus* é *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.
9. Produto alimentar como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 4 ou a preparação como reivindicada na Reivindicação 5, em que a estirpe *Bifidobacterium* é uma *Bifidobacterium lactis*, uma *Bifidobacterium longum* ou uma *Bifidobacterium breve*.
10. Produto alimentar ou a preparação como reivindicada na Reivindicação 9, em que a estirpe *Bifidobacterium* é *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
11. Produto alimentar como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 4, 6 a 10 que compreende 0,3 a 4% em peso com base na matéria seca da preparação.
12. Utilização de uma estirpe bacteriana probiótica e de uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, no fabrico de uma composição nutricional terapêutica ou medicamento para a prevenção

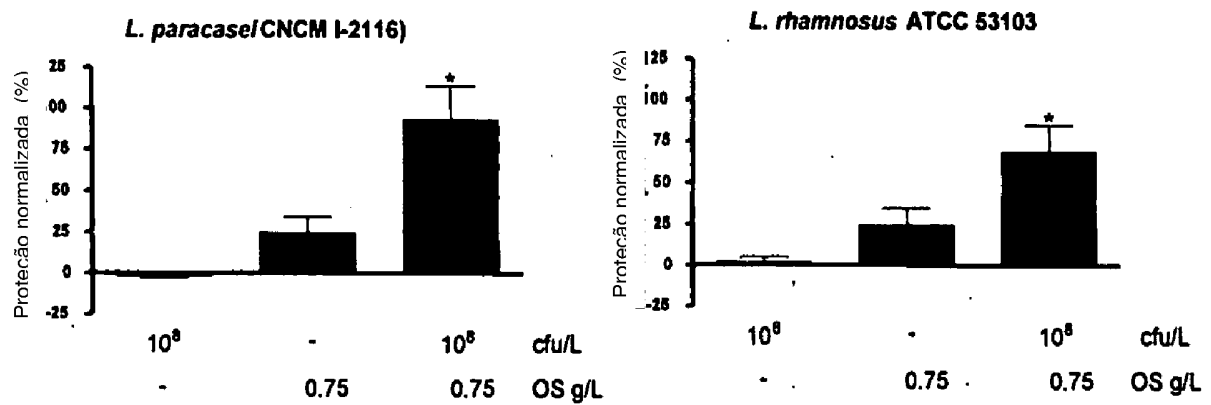
e/ou tratamento de infecções patogénicas do trato gastrointestinal.

13. Utilização de uma estirpe bacteriana probiótica e de uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, no fabrico de uma composição nutricional terapêutica ou medicamento para a prevenção ou tratamento de um estado imunitário.
14. Utilização de uma estirpe bacteriana probiótica e de uma mistura prebiótica compreendendo 5-70% em peso de, pelo menos, um oligossacárido N-acetilado selecionado do grupo consistindo em GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc e Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, 20-95% em peso de, pelo menos, um oligossacárido neutro selecionado do grupo consistindo em Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc e Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc e 2-50% em peso de, pelo menos, um oligossacárido sialilado selecionado do grupo consistindo em NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc e NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, no fabrico de uma composição

nutricional terapêutica ou medicamento para a prevenção ou tratamento de infeções do trato respiratório superior.

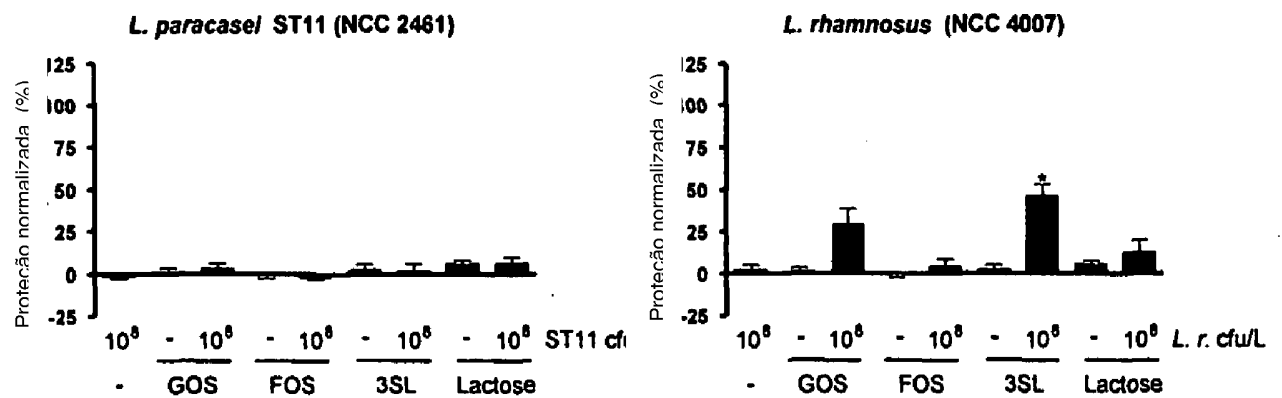
Lisboa, 17 de dezembro de 2015

Figura 1



Os dados mostrados representam a média $\pm$ EMP. * $p < 0,05$ (teste t) versus proteção cumulativa dada pela estirpe bacteriana probiótica e mistura prebiótica isolada

Figura 2



Os dados mostrados representam a média $\pm$ EMP. *p<0,05 (teste t) vs proteção cumulativa dada pelas bactérias isoladas + 3 SL isolada

Figura 3

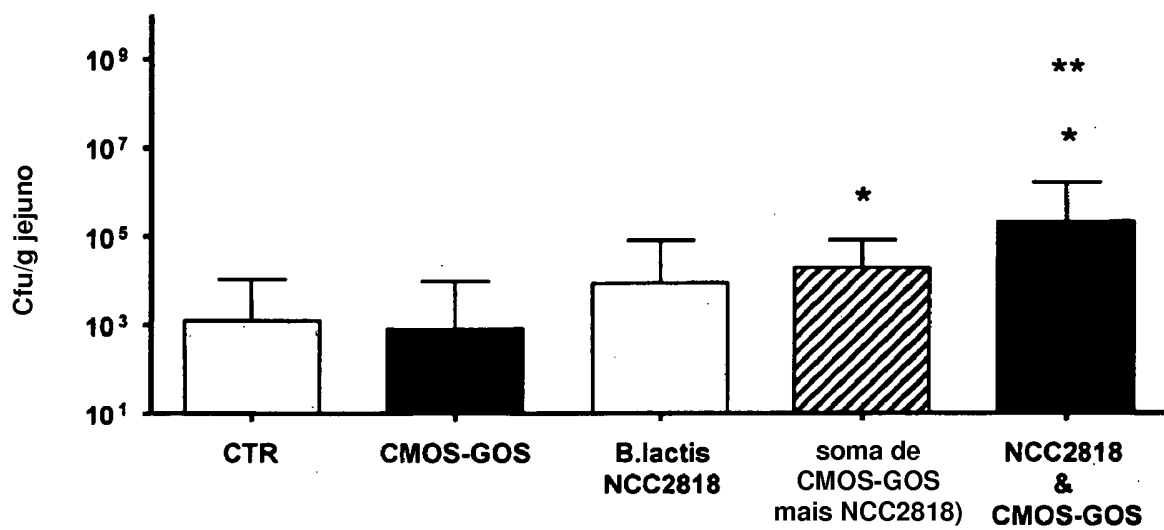


Figura 3. contagens de *B. breve* no intestino delgado (jejuno) após 2 semanas de tratamento com mistura prebiótica (CMOS-GOS) na dieta e *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) na água. A significância por teste t para amostras independentes ($p < 0,05$): * diferença significativa para grupo de controle (CTR); ** diferença significativa para soma de mistura prebiótica mais probiótica

Figura 4

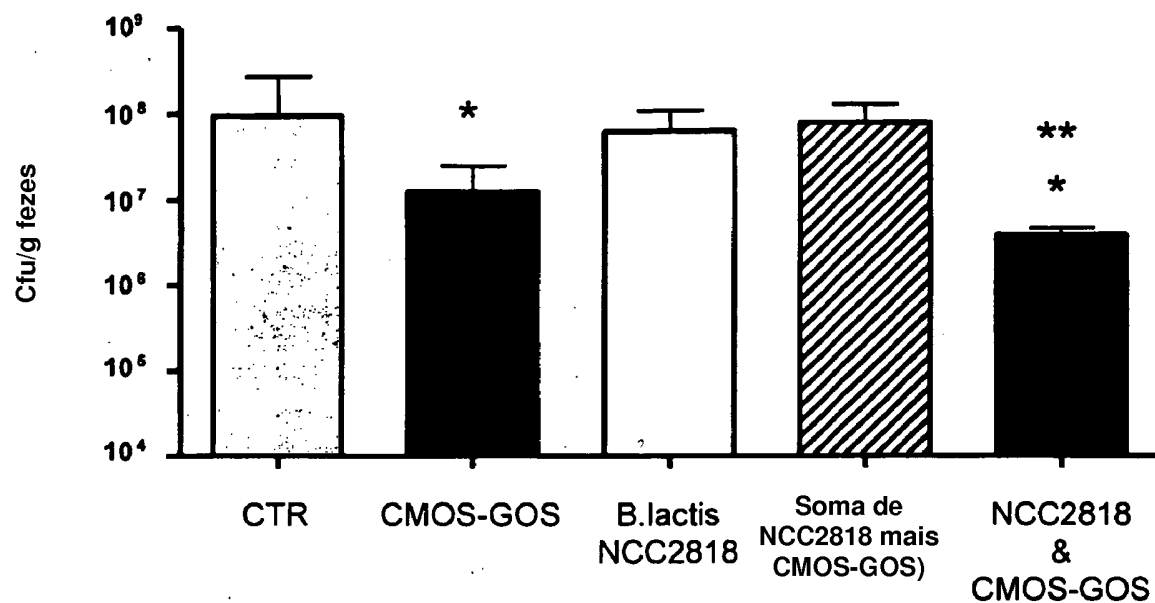


Figura 4. contagens de *Staphylococci* em fezes após 2 semanas de tratamento com mistura prebiótica (CMOS-GOS) na dieta e *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) na água. A significância por teste t para amostras independentes ($p < 0,05$): * diferença significativa para grupo de controle (CTR); ** diferença significativa para soma de mistura prebiótica mais probiótica

Figura 5

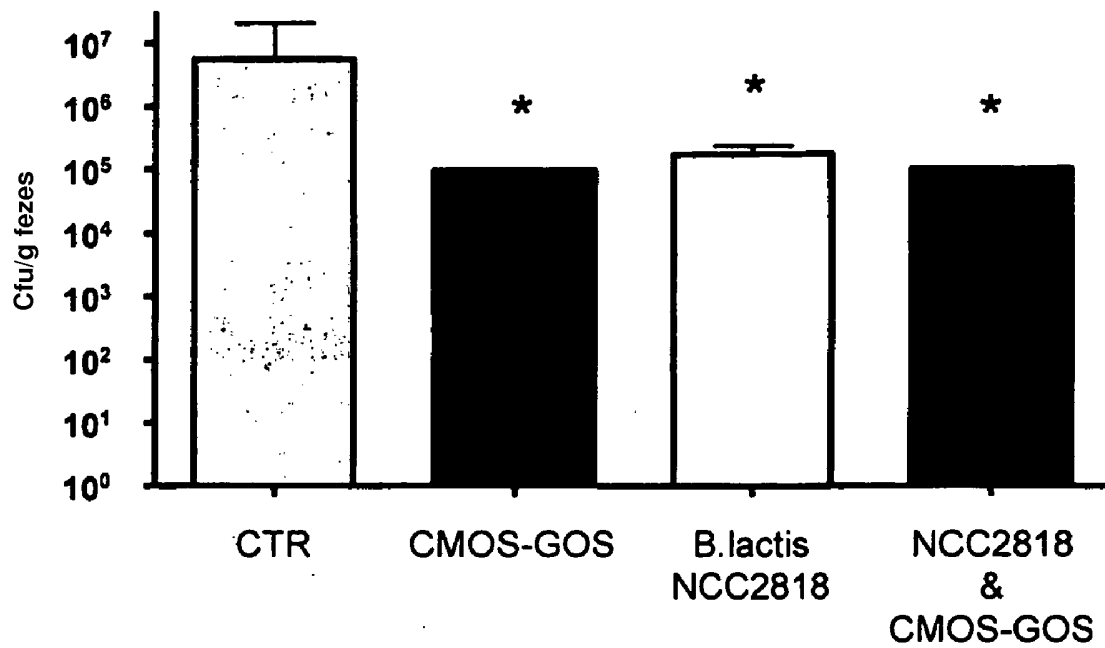


Figura 5. contagens de *Clostridium perfringens* em fezes após 2 semanas de tratamento com mistura prebiótica (CMOS-GOS) na dieta e *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) na água. A significância por teste t para amostras independentes ($p < 0,05$): * diferença significativa para grupo de controle (CTR).

Figura 6

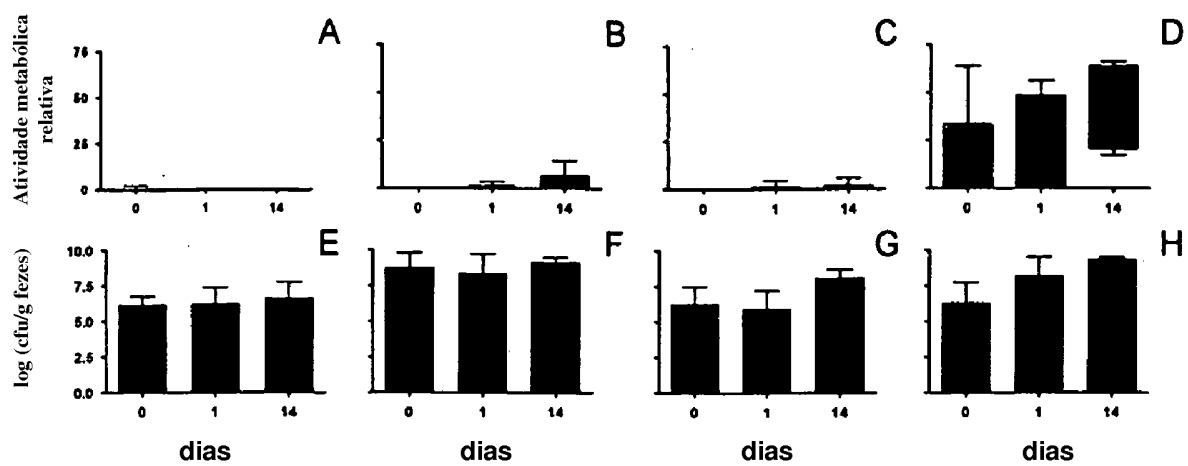


Figura 6. Atividade metabólica relativa com mediana e amplitude interquartil (A, B, C, D) e médias com desvio padrão (E, F, G, H) de *B. longum* residente ao longo do tempo de estabelecimento de microbiota. São representados o grupo de controle (A, E;), grupo com mistura prebiótica (B, F;), grupo com *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (NCC 4007) (C, G;) e grupo com preparação de acordo com a invenção (D, H;). (N = 9 a 10)