



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

(11) PI 0818723-1 B1

(22) Data do Depósito: 02/11/2008

(45) Data de Concessão: 27/02/2020



* B R P I O 8 1 8 7 2 3 B 1 *

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA NUTRIÇÃO INFANTIL

(51) Int.Cl.: A23L 33/115; A23L 33/12; A23L 33/00; A61K 31/225; A61K 31/683; (...).

(52) CPC: A23L 33/115; A23L 33/12; A23L 33/40; A61K 31/225; A61K 31/683; (...).

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2007 US 60/996,109.

(73) Titular(es): ENZYMOTEC LTD..

(72) Inventor(es): FABIANA BAR YOSEF; DORI PELLED; ARIEL KATZ.

(86) Pedido PCT: PCT IL2008001437 de 02/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/057121 de 07/05/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO PARA NUTRIÇÃO INFANTIL O objeto da invenção assim provê uma composição compreendendo pelo menos um triglicerídeo, pelo menos um fosfolípido e pelo menos um ácido graxo poli-insaturado (LC-PUFA); em que pelo menos cerca de 1% do LC-PUFA na composição é conjugado a referido pelo menos um fosfolípido e usos do mesmo.

COMPOSIÇÃO PARA NUTRIÇÃO INFANTIL

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] Esta invenção refere-se ao campo de nutrição infantil.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A quantidade e qualidade de fornecimento de nutrientes durante a infância têm consequências imediatas em crescimento, composição corporal, saúde, e bem-estar e têm importantes consequências a longo prazo em desenvolvimento e função de órgãos, riscos de doenças, bem como habilidade cognitiva mais tarde na vida.

[0003] Em leite materno (HBM), cerca de 50% das calorias da dieta são supridas como gordura de leite. Gordura de leite humano (HMF) é composta de cerca de 30-40g/L lipídios. Daqueles, aproximadamente 98% são triglicerídeos, 0,3-1% fosfolipídios, e 0,4% colesterol [WO05/051091, WO 06/114791].

[0004] Lipídios (de dieta), tais como aqueles encontrados em HBM, são indispensáveis para, por exemplo, crescimento e desenvolvimento normal como principais blocos de construção de membranas celulares e tecidos, e são, por exemplo, importantes em processos de transdução de sinal e em uma variedade de vias bioquímicas e biossintéticas. Muitos lipídios, e especialmente triglicerídeos, fazem parte da nutrição humana em uma base diária.

[0005] Gorduras de triglicerídeo, ou triglicerídeos, são a principal fonte de energia de bebês recém-nascidos (Hamosh et al, Pediatrics 1985, 75 (suppl): 146-150). Além de prover 40% a 50% das calorias totais em leite humano ou fórmula, triglicerídeos são essenciais para desenvolvimento normal uma vez que eles fornecem os ácidos graxos necessários para desenvolvimento do cérebro, são uma parte integral de membranas celulares, e são um veículo para vitamina solúvel de gordura e hormônios em leite. Além disso, estes triglicerídeos ricos em energia podem ser armazenados no

corpo em quantidades quase ilimitadas em contraste à capacidade de armazenamento limitada para carboidratos e proteínas.

[0006] A composição de triglicerídeo de HMF é única em sua composição e distribuição de ácido graxo. HMF é caracterizado em um teor de ácido palmítico total (C16:0) de cerca de 17- 25%, cujos cerca de 70% são posicionados na posição *sn*-2 de triglicerídeos [WO 05/051091]. Adicionalmente, posições *sn*-1 e *sn*-3 são ricas em ácidos graxos insaturados, especialmente ácidos graxos mono-insaturados, tal como ácido oléico (C18:1), que é de grande importância para a nutrição e desenvolvimento do bebê.

[0007] As posições *sn*-1 e *sn*3 de gorduras vegetais são ricas em ácidos graxos saturados e não são, deste modo, apropriadas para nutrição de bebês. Por esta razão, fórmulas avançadas de bebês incluem gorduras estruturadas produzidas para imitar a estrutura única e características de HMF.

[0008] Fosfolipídios são um componente nutricional essencial de HBM. Embora composição de fosfolipídio permaneça constante e não seja influenciada por uma dieta da mãe, o nível de fosfolipídios em HBM varia com a idade do bebê.

[0009] Fosfolipídios são compostos de cinco porções maiores: esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), e fosfatidilinositol (PI). [TJwmpkinson DK. *et al. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety* 6:79-102 (2007)].

[0010] Alguns fosfolipídios, e especialmente aqueles extraídos de soja, são usados como suplementos alimentares e uma variedade de benefícios de saúde são associados com sua ingestão. Estes benefícios incluem a melhoria de funções cognitivas, melhoria de memória e concentração, manutenção de composição de membrana celular, e contribuição para bem-estar geral. Fosfolipídios e lecitinas são uma fonte de colina e eles melhoram a biodisponibilidade de outros nutrientes e terapêuticas.

[0011] Níveis de ácido graxo poli-insaturado (PUFA) em HBM variam amplamente dependendo do tipo de gordura consumida por uma mãe. Todavia, comparado a gordura de leite de vaca, um espectro bastante amplo de ácidos graxos e um teor elevado de ácidos graxos insaturados, particularmente ácido linoléico, estão presentes em HBM. Em fórmulas à base de leite de vaca por outro lado, misturas de óleo vegetal são adicionadas para prover uma quantidade apropriada de PUFA's, incluindo ácido linoléico e outros.

[0012] Também glicerofosfolipídios, esfingomielina, colesterol e seus derivados, mesmo que eles sejam encontrados em quantidades relativamente pequenas em HBM, desempenham um importante papel em nutrição de bebês em desenvolvimento, e desempenham papéis essenciais em todos dos sistemas fisiológicos e ciclos do corpo humano.

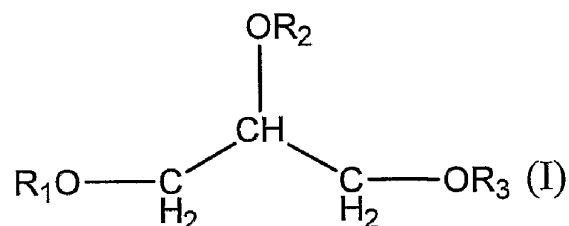
[0013] Bebês que não podem ser alimentadas no seio ou que não devem receber HBM, ou para que HBM não está disponível, requerem substitutos de leite de materno. As alternativas mais apropriadas para leite humano são fórmulas infantis. Tais fórmulas industrialmente preparadas são baseadas em leite bovino ou são derivadas de uma fonte vegetariana tal como sojas, e tentar similar a composição e as propriedades biológicas de HBM. Este substitutos conhecidos tentam imitar o teor de triglicerídeos de HBM.

[0014] É um objeto da presente invenção prover uma composição de leite humano substituta melhorada compreendendo os blocos de construção imperativos encontrados em HMF compreendendo triglicerídeos, fosfolipídios e ácidos graxos, tendo benefícios associados com desenvolvimento mental e físico de um bebê junto com benefícios associados com desenvolvimento intestinal e função de um bebê.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

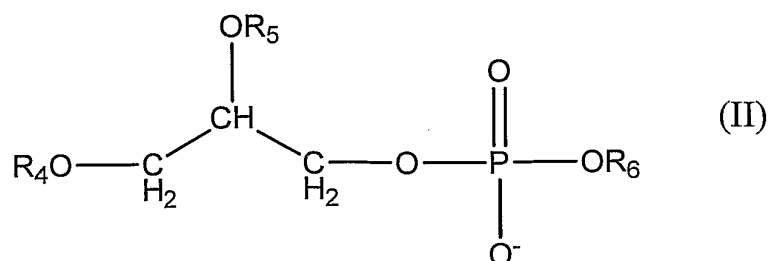
[0015] A presente invenção deste modo provê uma composição compreendendo pelo menos um triglicerídeo, pelo menos um fosfolipídio e

seguinte fórmula I:



em que R_1 , R_2 e R_3 podem ser idênticos ou diferentes e cada um é independentemente selecionado a partir de H ou um grupo acila, onde o grupo acila é selecionado dentre resíduos de ácido graxo saturado, ácido graxo mono-insaturado e ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LC-PUFA);

referido pelo menos um fosfolipídio sendo um composto da seguinte fórmula II:



em que R_4 e R_5 são cada um substituinte tendo independentemente os significados de R_1 , R_2 , R_3 ; e cujo

R_6 é selecionado de colina, inositol, etanolamina e serina; e onde pelo menos cerca de 1% do LC-PUFA na composição são conjugados a referido pelo menos um fosfolipídio.

[0018] Uma composição (mistura) da invenção tipicamente compreende uma mistura de referidos triglicerídeos de fórmula I, referidos fosfolipídios de fórmula II e LC-PUFAs (em forma livre e em forma conjugada). Uma mistura da invenção tipicamente compreende dois ou mais triglicerídeos de fórmula I, dois ou mais fosfolipídios de fórmula II e LC-PUFAs, onde a mistura tipicamente compreende (i) LC-PUFAs livres, (ii) LC-PUFAs conjugados aos triglicerídeos (R_1 e/ou R_2 e/ou R_3) e (iii) LC-

PUFAs conjugados aos fosfolipídios (R_4 e/ou R_5).

[0019] Em uma forma de realização, referido LC-PUFA é um ou ambos de um ácido graxo ômega-3 ou um ômega-6. Em uma forma de realização específica, referido LC-PUFA compreende ácido docosa-hexaenóico (DFIA) e/ou ácido araquidônico (AA).

[0020] Em uma forma de realização, o teor de peso de AA é maior que aquele de DHA. Em uma outra forma de realização, a razão de teor de peso entre AA e DHA é pelo menos cerca de 1,1. Em uma outra forma de realização, a razão de teor de peso entre AA e DHA é pelo menos cerca de 1,3. Em ainda outra forma de realização, a razão de teor de peso entre AA e DHA é pelo menos cerca de 1,5. Em uma outra forma de realização, a razão de teor de peso entre AA e DHA é pelo menos cerca de 2. Em ainda outra forma de realização, a razão de teor de peso entre AA e DHA é pelo menos cerca de 3. Em outra forma de realização, a razão de teor de peso entre AA e DHA é pelo menos cerca de 10.

[0021] Em uma outra forma de realização, R_5 é um resíduo de LC-PUFA. Em outra forma de realização, referido resíduo de LC-PUFA é um resíduo de ácido graxo ômega-3 ou um ômega-6. Em uma forma de realização específica, referido LC-PUFA é DHA ou AA.

[0022] Em ainda outra forma de realização, R_4 é um resíduo de LC-PUFA. Em outra forma de realização, referido resíduo de LC-PUFA é um resíduo de ácido graxo ômega-3 ou um ômega-6. Em uma outra forma de realização específica, referido LC-PUFA é DHA ou AA.

[0023] Em uma forma de realização específica, pelo menos cerca de 2% (peso/peso) do teor de LC-PUFA da formulação são conjugados a pelo menos um fosfolipídio. Em ainda outra forma de realização pelo menos cerca de 5% (peso/peso) do teor de LC-PUFA da formulação são conjugados a pelo menos um fosfolipídio. Em ainda outra forma de realização pelo menos cerca de 10% (peso/peso) do teor de LC-PUFA da formulação são conjugados a

pelo menos um fosfolipídio. Em outra forma de realização pelo menos cerca de 20% (peso/peso) do teor de LC-PUFA da formulação são conjugados a pelo menos um fosfolipídio. Em ainda outra forma de realização pelo menos cerca de 50% (peso/peso) do teor de LC-PUFA da formulação são conjugados a pelo menos um fosfolipídio.

[0024] Em uma forma de realização, pelo menos 1% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídios. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 2% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio. Em outra forma de realização, pelo menos cerca de 33% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 40% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio. Em ainda outra forma de realização, pelo menos cerca de 45% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio. Em outra forma de realização, pelo menos cerca de 50% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio. Em ainda outra forma de realização, pelo menos cerca de 60% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio. Em outra forma de realização, pelo menos cerca de 70% do LC-PUFA conjugado é conjugado em posição *sn*-2 de referido pelo menos um fosfolipídio.

[0025] Em outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 0,1%. Em outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 0,5%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 1%. Em outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 2%. Em outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios

na composição é pelo menos cerca de 5%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 7%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 10%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 15%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 20%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 35%. Em uma outra forma de realização, a quantidade total de fosfolipídios na composição é pelo menos cerca de 50%.

[0026] Em uma outra forma de realização, referido triglicerídeo e/ou referido fosfolipídio são derivados a partir de pelo menos um material de lecitina bruto selecionado do grupo consistindo de organismo vegetal, marinho ou de aquacultura.

[0027] Em um aspecto da presente invenção, provê-se uma composição farmacêutica compreendendo uma composição da presente invenção.

[0028] Vias de administração apropriadas para as composições da presente invenção são administração oral, bucal, sublingual, através de tubo de alimentação, tópica, transdérmica, ou parenteral (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Em uma forma de realização específica, os compostos podem ser administrados oralmente.

[0029] A dose e regime de administração exatos da composição necessariamente serão dependentes do efeito terapêutico ou nutricional a ser realizado e pode variar com a fórmula particular, a via de administração, e a idade e condição do sujeito individual ao qual a composição se destina a ser administrada.

[0030] A presente invenção deste modo também provê composições farmacêuticas da invenção em mistura com auxiliares farmaceuticamente

aceitáveis, e opcionalmente outros agentes terapêuticos. Os auxiliares devem ser "aceitáveis" no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da composição e não prejudiciais aos beneficiários da mesma.

[0031] Em uma forma de realização, a composição farmacêutica ainda compreende pelo menos um agente farmaceuticamente ativo.

[0032] As composições da invenção podem ser preparadas por qualquer método bem conhecido na técnica de farmácia. Tais métodos incluem a etapa de conduzir em associação os ingredientes com qualquer agente auxiliar. O(s) agente(s) auxiliar(s), também nomeados ingrediente(s) acessório(s), incluem aqueles convencionais na técnica, tais como carreadores, cargas, aglutinantes, diluentes, desintegrantes, lubrificantes, colorantes, agentes aromatizantes, anti-oxidantes, e agentes umectantes.

[0033] Composições farmacêuticas apropriadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades de dosagem discretas tais como pílulas, comprimidos, drágeas ou cápsulas, ou como um pó ou grânulos, ou como um solução ou suspensão.

[0034] Para administração parenteral, composições apropriadas incluem injeção estéril aquosa e não aquosa. As composições podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multi-dose, por exemplo frascos selados e ampolas, e podem ser armazenadas em uma condição de secado por congelamento (liofilizado) requerendo apenas a adição de veículo líquido estéril, por exemplo água, antes de uso. Para administração transdérmica, por exemplo géis, emplastros adesivos ou pulverizadores podem ser contemplados.

[0035] A invenção ainda provê um embalagem comercial para preparar um fórmula compreendendo: (a) a composição de acordo com a invenção que em administração a um indivíduo por exemplo, melhora, mantém ou trata condições associadas com desenvolvimento mental e físico de um bebê, (b) opcionalmente pelo menos um dente proteína

fisiologicamente aceitável, carboidrato, vitamina, mineral, aminoácido, nucleotídeo e aditivo ativo ou não ativo; (c) opcionalmente pelo menos um veículo fisiologicamente aceitável ou diluente para transportar os constituintes definidos em (a) e (b); (d) meios e receptáculos para misturar os constituintes definidos em (a), (b) e/ou (c); e (e) instruções para uso tais como, mas não limitadas a, prazos de armazenamento, instruções para preparação da fórmula para administração, diluições requeridas, dosagens, frequência de administração e semelhantes.

[0036] A embalagem comercial de acordo com a invenção pode também conter uma composição da invenção em uma forma pronta para uso, junto com instruções para uso. Dosagens são geralmente determinadas de acordo com a idade, peso, sexo e condição do indivíduo, de acordo com boa prática médica conhecida para o médico atendente e outros agentes de saúde.

[0037] A fim de obter uma fórmula da invenção desejada, a composição da invenção pode ser misturada com outros componentes tais como, mas não limitados a uma fonte de proteína, uma fonte de carboidrato, minerais, vitaminas, nucleotídeos, aminoácidos e opcionalmente pelo menos uma dentre um veículo, diluente, aditivo ou excipiente, todos sendo apropriados para consumo e/ou administração para mamíferos e farmaceuticamente aceitáveis.

[0038] Em um aspecto da presente invenção provê-se uma composição nutracêutica compreendendo uma composição da invenção.

[0039] Uma composição nutricional como usado aqui pode ser qualquer composição nutricional incluindo, mas não limitada a, substituto de gordura de leite humano, fórmula infantil, produto lácteo, sorvete, biscoito, produto de soja, padaria, pão e produtos afins, molho, sopa, alimento preparado, alimento congelado, condimento, confeitos, óleos e gordura, margarina, pastas, recheio, cereal, produto instantâneo, alimento de bebê, alimento de crianças de 1 a 3 anos, barra, petisco, bala e produto de chocolate.

[0040] Em outro aspecto da invenção, provê-se uma composição nutracêutica compreendendo uma composição da invenção.

[0041] Uma composição nutracêutica, como descrito aqui, pode ser qualquer substância que pode ser considerada um alimento ou parte de um alimento e proporcione benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças. Tais composições nutricionais incluem, mas não estão limitados a, um aditivo de alimento, um suplemento alimentar, um suplemento dietético, alimentos geneticamente engenheirados tais como por exemplo vegetais, produtos à base de plantas, e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas e alimento funcional estimulante e alimentos farmacêuticos.

[0042] Em ainda um outro aspecto da invenção, provê-se um alimento funcional compreendendo uma composição de acordo com a invenção.

[0043] Um alimento funcional como usado aqui pode ser qualquer alimento funcional, incluindo, mas não limitados a, produto lácteo, sorvete, biscoito, produto de soja, padaria, pão e produtos afins, molho, sopa, alimento preparado, alimento congelado, condimento, confeitos, óleos e gordura, margarina, comida, recheio, cereal, produto instantâneo, bebidas e bebida batida, alimento de bebê, alimento de criança de 1 a 3 anos, barra, petisco, bala e produto de chocolate.

[0044] Em um outro aspecto da invenção provê-se uma fórmula infantil compreendendo uma composição da invenção.

[0045] Um bebê como usado aqui significa englobar um bebê humano ou qualquer bebê mamífero não humano. Um bebê como usado aqui significa englobar qualquer bebê, tal como, mas não limitados a, um recém-nascido, um bebê prematuro ou não, bebês prematuros pequenos, bebês com peso de nascimento muito baixo (VLBW) ou peso de nascimento extremamente baixo (ELBW) particularmente aqueles com imaturidade geral, por exemplo do trato gastrointestinal ou com quaisquer outros riscos de saúde conhecidos para um

versado na técnica.

[0046] Em outro aspecto da invenção provê-se um método para melhorar, promover ou manter o desenvolvimento de funções cognitivas em um bebê compreendendo administrar a referido bebê uma composição da invenção.

[0047] A frase "melhorando, promovendo ou mantendo" como usado aqui significa englobar aumentar, avançar, ajudar, progredir, reter, manter, preservar ou sustentar qualquer função de desenvolvimento desejada em um bebê mamífero. Tais funções de desenvolvimento incluem, mas não estão limitados a, desenvolvimento de funções cognitivas em um bebê, desenvolvimento de cérebro e retina em um bebê, desenvolvimento de acuidades visuais em um bebê, redução de peroxidação de lipídio em um bebê, qualidade de crescimento de um bebê, desenvolvimento de sistema nervoso central (SNC) em um bebê e assim por diante.

[0048] O termo "desenvolvimento de funções cognitivas em um bebê" como usado aqui significa englobar o desenvolvimento de uma faixa de funções e habilidades tais como, mas não limitadas a, inteligência, criatividade (gerar e se abrir para novas idéias, perceber novos relacionamentos), memória (codificação, armazenamento, recuperação), funções executivas (lidar com novidade, planejamento e implementação, desempenho de monitoramento, vigilância, inibição de informação irrelevante de tarefa), recursos cognitivos (velocidade de processamento de informação, capacidade de memória trabalhar, capacidade de atenção), atenção, aprendizagem, percepção, ação, planejamento, resolução de problema e imaginações mentais.

[0049] Um método bem conhecido de avaliar desenvolvimento cognitivo em um bebê é uma avaliação do índice de desenvolvimento mental do bebê (MDI) de acordo com as escalas de neuro-desenvolvimento de Bayley (*Bayley, N. The Bayley Scales of Infant Development II. New York:*

New York Psychological Corp., 1993).

[0050] Em um outro aspecto da invenção, provê-se um método para melhorar, promover ou manter o desenvolvimento de cérebro e retina em um bebê compreendendo administrar a referido bebê um composição da invenção.

[0051] O termo "desenvolvimento de cérebro e retina em um bebê" como usado aqui significa englobar processos tais como, mas não limitados a, aqueles resultando em progressão do cérebro e retina sobre tempo, a partir de sua formação para a estrutura madura. O resultado de desenvolvimento do cérebro é responsável para a coordenação e controle de atividades corporais e a interpretação de informação a partir dos sentidos (tais como por exemplo visão, audição, olfato, etc.).

[0052] Em outro aspecto da invenção, provê-se um método para melhorar, promover ou manter o desenvolvimento de acuidades visuais em um bebê compreendendo administrar a referido bebê uma composição da invenção.

[0053] O termo "desenvolvimento de acuidades visuais em um bebê" como usado aqui significa englobar a habilidade do olho para resolver pequenos detalhes ou pequenas distâncias, como medido por quaisquer meios apropriados na técnica, incluindo eletro-retinografia. "Acuidade visual melhorada" refere-se a qualquer melhoria na habilidade do olho para resolver pequenos detalhes ou pequenas distâncias, como medido por quaisquer meios apropriados na técnica.

[0054] Por outro de seus aspectos, a presente invenção provê um método para reduzir peroxidação de lipídios em um bebê compreendendo administrar a referido bebê uma composição da invenção.

[0055] O termo "reduzir peroxidação de lipídios em um bebê" como usado aqui significa englobar a melhoria, prevenção, diminuição da deterioração oxidativa de lipídios contendo qualquer número de ligações

duplas carbono-carbono e prevenir inflamação.

[0056] Por um outro aspecto da invenção, provê-se um método para melhorar, promover ou manter a qualidade de crescimento de um bebê administrando a referido bebê uma composição da invenção.

[0057] O termo "qualidade de crescimento de um bebê" como usado aqui significa englobar ganho de peso, mudanças no comprimento e circunferência da cabeça, e outro desenvolvimento fisiológico adicional como dado em dados de referências de crescimento e procedimentos de exames físicos conhecidos para uma pessoa versada na técnica.

[0058] Em outro aspecto da invenção, provê-se um método para melhorar, promover ou manter o desenvolvimento de sistema nervoso central (SNC) em um bebê compreendendo administrar a referido bebê uma composição da invenção.

[0059] O termo "desenvolvimento de SNC em um bebê" como usado aqui significa englobar quaisquer processos tais como, mas não limitados a, aqueles resultando na progressão do sistema nervoso central sobre tempo, a partir de sua formação para a estrutura madura e função.

[0060] Em ainda um outro aspecto da invenção, provê-se um método para aumentar absorção intestinal de ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6 em bebês saudáveis, não saudáveis e prematuras compreendendo administrar a referido bebê a composição da invenção

[0061] O termo "melhorar absorção intestinal de ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6" como usado aqui significa englobar melhorar e aumentar processos tais como, mas não limitados a, aquele pelos quais ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6 de nutrientes são absorvidos a partir dos conteúdos do intestino.

[0062] Em outro aspecto da invenção provê-se um método para melhorar, promover ou manter maturidade intestinal em bebês compreendendo administrar a referido bebê a composição da invenção.

[0063] O termo "melhorar, promover ou manter maturidade intestinal em bebês" como usado aqui significa englobar por exemplo promoção de crescimento normal e maturação do trato gastro-intestinal, recuperar ou manter função gastrointestinal, promover crescimento viloso, promover proliferação do intestino delgado e grosso em um mamífero saudável, por exemplo, para possibilitar absorção aumentada de nutrientes.

[0064] A invenção ainda engloba um uso de uma composição da invenção, para preparação de uma composição farmacêutica ou nutracêutica para tratamento de bebês.

[0065] Em uma forma de realização, a composição da invenção é preparada a partir de uma fonte natural, sintética ou semi-sintética. Em uma outra forma de realização específica, referida fonte natural é qualquer uma de fonte de planta, animal ou micro-organismo. Em ainda outra forma de realização, a produção de referida composição de lipídio envolve uma catálise enzimática.

[0066] Em outra forma de realização, uma composição da invenção pode ser sintetizada por extração polar a partir de uma fonte marinha, uma planta, animal ou micro-organismos. Vias sintéticas apropriadas para sintetizar uma composição da invenção são descritas em "*Lecithins: Sources Manufacture and uses*" Bernard F. Szuhaj Ed.(1989) que é aqui incorporada por referência.

[0067] Em uma forma de realização da invenção, as composições farmacêuticas ou nutricionais estão em uma forma de liberação de dosagem.

[0068] Em uma forma de realização, uma composição da presente invenção ainda compreende pelo menos um triglicerídeo de fórmula I, tendo pelo menos 30% (peso/peso) de ácido palmítico total conjugado na posição *sn*-2.

[0069] Em outra forma de realização, uma composição da presente invenção ainda compreende (é misturada com) pelo menos um triglicerídeo de

fórmula I tendo o seguinte perfil de ácido graxo conjugado:

- 0-10% C8:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 0-10% C 10:0 ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 0-22% C12:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 0-15% C14:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 15-55% C16:0 ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais

cujos pelo menos 30% é conjugado na posição *sn*-2 de triglicerídeo;

- 1-7% C18:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 20-75% C18:1 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 2-40% C18:2 ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
- 0-8% C18:3 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais; e
- outros ácidos graxos presentes em níveis menores que 8% dos

ácidos graxos totais.

[0070] Como usado aqui, o termo "grupo acila" refere-se a um radical orgânico denotado $-C(=O)R$, onde R é selecionado de resíduo de ácido graxo saturado, mono-insaturado e poli-insaturado.

[0071] Como usado aqui, o termo "ácido graxo" significa englobar um ácido carboxílico com uma cauda (cadeia) alifática não ramificada tipicamente tendo entre 4 e 28 átomos de carbono, que é que saturada ou insaturada tendo uma ligação insaturada (ácidos graxos mono-insaturados) ou duas ou mais ligações insaturadas (ácidos graxos poli-insaturados). Deve ser notado que quando pelo menos uma ligação insaturada de um ácido graxo insaturado é pelo menos uma ligação dupla, referida pelo menos uma ligação dupla pode estar quer na configuração *cis* quer na configuração *trans*.

[0072] Exemplos não limitativos de ácidos graxos saturados que podem ser usados nesta invenção incluem: ácido butírico (ácido butanóico, C4:0), ácido capróico (ácido hexanóico, C6:0), ácido caprílico (ácido octanóico, C8:0), ácido cáprico (ácido decanóico, C10:0), ácido láurico (ácido dodecanóico, C12:0), ácido mirístico (ácido tetradecanóico, C14:0), ácido

palmítico (ácido hexadecanóico, C16:0), ácido esteárico (ácido octadecanóico, C18:0), Arachidic acid (ácido eicosanóico, C20:0), ácido beênico (ácido docosanóico C22:0).

[0073] Exemplos não limitativos de ácido graxo mono-insaturados que podem ser usados nesta invenção incluem: ácido miristoléico (ω -5, C14:1), ácido palmitoléico (ω -7, C16:1), Ácido oléico (ω -9, C18:1) e ácido erúcico (ω -9, C22:1).

[0074] O termo "ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LC-PUFA)" como usado aqui significa englobar ácidos graxos com cadeia alifática ramificada tendo pelo menos 18 átomos de carbono e pelo menos duas ligações insaturadas.

[0075] Exemplos não limitativos de LC-PUFA são ácido alfa-linoléico (ALA, ω -3, C18:3), ácido eicosapentaenóico (EPA, ω -3, C20:5), ácido docosa-hexaenóico (DHA, ω -3, C22:6), ácido docosapentaenóico (DPA, ω -3, 22:5), ácido linoléico (LA, ω -6, C18:2), ácido araquidônico (AA, ω -6, C20:4).

[0076] O termo "ácido graxo ômega-3" como usado aqui significa englobar um ácido carboxílico com uma cadeia alifática ramificada longa que é poli-insaturada, onde a primeira ligação dupla carbono-carbono é localizada na posição ω -3 (isto é no terceiro carbono a partir da extremidade da cadeia alifática). Exemplos não limitativos de ácidos graxos ômega-3 que podem ser usados na composição da invenção incluem: ácido alfa-linoléico (ALA, ω -3, C18:3), ácido eicosapentaenóico (EPA, ω -3, C20:5), ácido docosa-hexaenóico (DHA, ω -3, C22:6) e ácido docosapentaenóico (DPA, ω -3, 22:5).

[0077] O termo "ácido graxo ômega-6" como usado aqui significa englobar um ácido carboxílico com uma cadeia alifática ramificada longa que é poli-insaturada, onde a primeira ligação dupla carbono-carbono está localizada na posição ω -6 (isto é no sexto carbono a partir da extremidade da cadeia alifática). Exemplos não limitativos de ácidos graxos ômega-6 que

podem ser usados na composição da invenção incluem: ácido linoléico (LA, ω -6, C18:2) e ácido araquidônico (AA, ω -6, C20:4).

[0078] A invenção é ainda descrita nos seguintes exemplos, que não são de qualquer forma destinados a limitar o escopo da invenção como reivindicado.

EXEMPLOS

[0079] **Exemplo 1:** Preparação de frações de lipídio usadas para a preparação de composições (misturas) da invenção.

Fração de lipídio 1: extração de biomassa enriquecida com ácido araquidônico

[0080] *Mortierella Alpina*, cepa ATCC32222 foi cultivada em meios de cultura de 1 litro em um frasco de bebida batida de 2 litros. Meios de cultura de crescimento foram baseados em glicose (30 g/l) como fonte de carbono e extrato de levedura (15 g/l) como fonte de nitrogênio. Além disso, os seguintes componentes foram adicionados: fosfato de di-hidrogênio de potássio KH_2PO_4 (7 g/l), fosfato de hidrogênio de dissódio Na_2HPO_4 (2 g/l), sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8mg/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1mg/l), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mg/l), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mg/l). Após 8 dias de fermentação a 28°C, a biomassa foi filtrada, lavada com água DI e secada em um forno à vácuo a 25°C para obter 18g de biomassa seca.

Fração de lipídio 2: enriquecimento de fração de lipídio 1

[0081] A biomassa seca de fração de lipídio 1 foi submetida a um procedimento de extração misturando com 100 ml de mistura de hexano e etanol (80:20 em volume) por 2 horas a 40°C em uma incubadora agitadora a 200RPM. Biomassa foi filtrada e lavada. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida para obter 5,1 g de fração de lipídio.

Fração de lipídio 3: Purificação de fosfolipídios enriquecidos com ARA

[0082] Óleo essencialmente como produzido em fração de lipídio 2, foi usado como material de partida para obter uma fração de fosfolipídio pura.

10 g de óleo foram dissolvidos em 30 ml de etanol absoluto e carregados em uma coluna de vidro envelopada com 200g de sílica (Merck 60). Cerca de 1 litro de etanol absoluto foi passado através da coluna e a saída foi analisada continuamente por TLC até que uma fração de fosfolipídio pura começou a eluir. Outra lavagem da coluna foi feita com cerca de 3 litros de etanol 96% (4% água) aumentando temperatura para 60°C a fim de remover mais da fração de fosfolipídios. Esta fração foi coletada separadamente, evaporada sob pressão reduzida para obter cerca de 0,3g de fosfolipídios puros.

Fração de lipídio 4: extração de fração de lipídio a partir de biomassa de *Schizochytrium* sp

[0083] 50g de biomassa da micro alga *Schizochytrium* sp foram submetidos a um procedimento de extração misturando com 250ml de etanol 96% (4% de teor de água) por 2 horas a 40°C em uma incubadora agitadora a 200RPM. Biomassa foi filtrada e lavada. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida para obter 8,7g de óleo.

Fração de lipídio 5: extração seletiva de fração de lipídio com elevado teor de triglicerídeo

[0084] 20g biomassa da micro alga *Schizochytrium* sp foram submetidos a um procedimento de extração misturando com 100 ml de acetona por 2 horas em temperatura ambiente com um agitador magnético. Biomassa foi filtrada e lavada. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida para obter 7,7 g de óleo.

Fração de lipídio 6: extração seletiva de fração de lipídio com elevado teor de fosfolipídio

[0085] A biomassa obtida após produção de fração de lipídio 5 por extração de acetona foi submetida a uma extração adicional usando 100ml de hexano: mistura solvente de etanol (80:20 em volume) a temperatura de 40°C por 2 horas em uma incubadora agitadora a 200RPM. Após filtração e evaporação do filtrado, 0,6 g de material tipo pasta foi obtido.

Fração de lipídio 7: Purificação de fosfolipídios enriquecidos com DHA

[0086] 10 g de material tipo pasta essencialmente como produzido em fração de lipídio 6, foi usado como um material de partida para processo de purificação de fosfolipídio como descrito a fim de produzir fração de lipídio 3. A partir de 10 g de alimento 0,6 g de fração de fosfolipídio pura foi obtido.

Fração de lipídio 8: produção industrial de fração de lipídio enriquecida com fosfolipídios

[0087] 1.000 kg de farinha de peixe de fonte de arenque foram extraídos usando 4.000 litros de mistura de etanol:água (80:20 em volume) por 2 horas a 40°C em um reator de 5.000 litros equipado com um agitador tipo âncora. Biomassa foi filtrada em uma centrifuga de cesta de 1,5 m de diâmetro e lavada. O filtrado foi evaporado sob vácuo usando água quente na camisa, em um evaporador de partida de 3.000 equipado com um agitador tipo hélice. O material tipo pasta obtido foi dissolvido novamente em hexano, filtrado novamente através de um filtro de bolsa e evaporado no mesmo evaporador sob as mesmas condições para obter 46kg de uma fração de lipídio altamente viscosa.

Métodos para determinação do teor das frações de lipídio:

1. Determinação e quantificação de composição de ácido graxo:

[0088] Ésteres de metila de ácido graxo foram preparados por metilação básica na presença de metóxido de sódio dissolvido em metanol e extraído por hexano. Composição de ácido graxo foi analisada por injeção dos ésteres de metila em instrumento cromatógrafo por gás equipado com uma coluna capilar e detector de ionização de chama.

[0089] O instrumento GC (HP) foi programado sob as seguintes condições:

- FORNO- Temp inicial -110 °C , Temp final -250 °C, Tempo de ciclo– 41,50min

- ENTRADA FRONTAL- Temp inicial- 350 °C , Pressão –

0,97 kg/cm² (13,83 psi), Razão de divisão – 24,988:1, Fluxo dividido— 39.8 ml/min, Fluxo total— 43,4 ml/min, Tipo de gás - nitrogênio

- DETECTOR FRONTAL- Temp. - 250 °C , Fluxo de hidrogênio - 40,0 ml/min, - Fluxo de ar - 400,0 ml/min

[0090] A quantificação dos ésteres de metila foi realizada contra padrão interno de C23:0,2.

2. Determinação e quantificação de teor de fosfolipídio

[0091] Teor de fosfolipídio foi medido que por ³¹P-NMR ou por HPTLC.

[0092] ³¹P-NMR é um método aceito e amplamente usado para medir teor de fosfolipídio (Analytical Biochemistry Volume 232, Issue 1, November 1995, Pages 1-6; Journal of Lipid Research Volume 27, 1986, 386).

[0093] Método HPTLC consiste em aplicar uma amostra contendo fosfolipídios em placa de Sílica, revelar a placa em mistura solvente (clorofórmio: acetona: metanol: ácido acético e água =11:6.4:5:2.4:1 (em volume)). Após a revelação, a placa é secada e colorida com mistura de CuSO₄ ácido. A quantificação é realizada por varredura da placa a 274nm contra mistura de teor de fosfolipídio conhecido.

3. Determinação e Quantificação de teor de Triglicerídeo

[0094] A quantificação do teor de triglicerídeo foi realizada por injeção da amostra no instrumento GC equipado com uma coluna capilar e detector de ionização de chama. O GC é equipado com coluna Agilent modelo J&W DB-IHT e programado sob as seguintes condições:

- FORNO- Temp inicial-160 c, Tem final-350 c, Tempo de ciclo— 29,50min

- ENTRADA FRONTAL- temp inicial-350 c, Pressão – 0,97 kg/cm² (13,83 psi), Razão de divisão – 24,988:1, Fluxo dividido — 39,8 mL/min, Fluxo total – 43,4 mL/min, Tipo de gás - nitrogênio

- DETECTOR FRONTAL- Temp. - 350 c, Fluxo de

hidrogênio - 40,0 mL/min, - Fluxo de ar - 400,0mL/min

4. Análise de composição de fosfolipídios de ácido graxo

[0095] Composição de ácido graxo esterificada para os fosfolipídios foi analisada por processo de duas etapas. Os fosfolipídios analisados foram purificados na placa de cromatografia de camada fina (TLC) (pela mesma mistura solvente de método 2), depurados a partir de sílica com tolueno e transformados para metil ésteres seguindo procedimento número 1.

5. Análise posicional de ácido graxo

[0096] Análise da distribuição posicional de ácido graxo de fosfolipídio foi efetuado por um procedimento multi-estágio iniciando com uma hidrólise seletiva do ácido graxo de *sn*-2 por fosfolipase A2 (PLA2). A fração de 2-liso-fosfolipídio resultante foi purificada em uma placa de sílica, transformada em ésteres de metila e analisada pelo GC conforme procedimento previamente descrito.

Tabela 1 detalha a composição de várias preparações de lipídio, compreendendo triglicerídeos e fosfolipídios para uso na preparação de composições da presente invenção.

Tabela 1: frações de lipídio

	Fração lipídio 2	Fração lipídio 3	Fração lipídio 4	Fração lipídio 5	Fração lipídio 6	Fração lipídio 7	Fração lipídio 8
% Fosfolipídios	5,2	>95	1,8	<5	12,0	>95	45
% Triglicerídeos	83,0	<5	NM	96,0	NM	<5	NM
Ácido graxo (% p/p) de ácidos graxos total							
C14	1,1	0,4	6,6	6,0	2,8	1,3	
C16	13,8	9,6	25,1	25,2	14,9	16,6	
C18	9,1	2,4	0,6	0,6	0,3	0,3	1,3
C18:1n9	12,8	8,9	1,0			0,2	3,9
C18:2n6	5,6	8,4	1,0			0,4	1,0
C18:3n3	3,9	6,1	0,4	0,4			0,2
C20:3n6	4,1	2,1	2,5			0,4	
C20:4n6	41,2	21,3	1,3	1,3	0,9	1,2	0,5

C20:5n3			3,4	3,2	2,7	4,9	5,7
C22:5n3			16,3	17,7	10,4	12,3	
C22:6n3			36,4	38,7	22,7	26,4	16,3
Ácido graxo (% de ácido graxo esterificado a fosfolipídios)							
C14	0,5	0,5	1,4		1,8	1,8	2,2
C16	13,7	13,7	21,7		23,7	23,7	29,8
C18	3,4	3,4	0,4		0,4	0,4	2,2
C18:1n9	12,7	12,7	1,2		0,2	0,2	18,0
C18:2n6	12,1	12,1	3,1		0,6	0,6	
C18:3n3	8,8	8,8					
C20:3n6	3,1	3,1	0,8		0,6	0,6	
C20:4n6	30,4	30,4	2,1		1,7	1,7	
C20:5n3			6,4		7,0	7,0	12,0
C22:5n3			19,7		17,5	17,5	
C22:6n3			32,2		37,7	37,7	31,0
LC-PUFA							
LC-PUFA total % p/p	54,8	38,0	61,2	61,3	36,7	45,5	23,8
% LC-PUFA em PL de LC-PUFA total	3,6	>95	1,3		14,9	>95	56,9
% LC-PUFA a sn-2 de PL de LC-PUFA total de PL	>50	>50	>50		>50	>50	82,9

NM = não medido

% Total de LC-PUFA representa soma de % peso/peso de ácidos graxos C18:2, C18:3, C20:3, C20:4, C20:5 e C22:6.

% de LC-PUFA em PL de LC-PUFA total é calculada por (LC-PUFA em PL como % peso/peso)/(LC-PUFA Total como % peso/peso)* 100,

% de LC-PUFA em *sn*-2 de fosfolipídios de LC-PUFA total em fosfolipídios é calculada por (% LC-PUFA em *sn*-2 de ácidos graxos posicionados *sn*-2) / (LC- PUFA total em fosfolipídios)* 100,

% LC-PUFA em *sn*-2 de fosfolipídios de LC-PUFA total em fosfolipídios >50 não é baseada em um valor de medição mas em um valor estimado.

[0097] Composições (misturas) da invenção compreendendo óleos enriquecidos com LC-PUFA (Tabela 2) foram preparadas misturando frações de lipídio 2-8 (Tabela 1) entre si.

[0098] Misturas da invenção podem ainda opcionalmente ser misturadas com uma mistura de gordura tal como, mas não limitados a, uma mistura de gordura enriquecida de ácido palmítico de *sn*-2 como descrito em PCT/IL2008/001311 (Tabela 5).

[0099] Opcionalmente componentes de frações de lipídio 4 e 6 são passados através de uma sequência de estágios de refino incluindo, degomagem, alveamento e desodorização antes de uso no procedimento de mistura.

Tabela 2: Composições enriquecidas LC-PUFA (misturas)

	Mistura 1	Mistura 2	Mistura 3	Mistura 4	Mistura 5	Mistura 6	Mistura 7	Mistura 8	Mistura 9
Fração lipídio misturada (%)									
Fração lipídio 2	50,0	43,5	54,5	73,2	28,6	90,1	50,0	47,6	40,0
Fração lipídio 3		13,0	5,5	7,3	28,6			47,6	
Fração lipídio 4							50,0		
Fração lipídio 5			36,4	7,3	28,6	9,0		4,8	
Fração lipídio 6		43,5	0,0	7,3		0,9			
Fração lipídio 7	50,0		3,6	4,9					60,0
Fração lipídio 8					14,3				
% Fosfolípidios	52,6	20,5	11,9	16,9	36,5	4,8	3,5	50,1	62,1
% Triglicerídeos	41,5	NC	80,2	NC	NC	NC	NC	44,1	33,2
Ácido graxo (% p/p) de ácidos graxos total									
C14	1,2	1,7	2,8	1,5	2,1	1,5	3,9	1,0	1,2
C16	15,2	13,7	17,8	14,5	13,9	14,8	19,4	12,3	15,4
C18	4,7	4,4	5,3	6,9	3,7	8,3	4,9	5,5	3,8
C18:1n9	6,5	6,7	7,5	10,0	6,8	11,6	6,9	10,3	5,2
C18:2 n6	3,0	3,5	3,5	4,7	4,2	5,0	3,3	6,7	2,5
C18:3 n3	1,9	2,5	2,6	3,3	3,0	3,5	2,1	4,8	1,5
C20:3n6	2,3	2,1	2,4	3,2	1,8	3,7	3,3	3,0	1,9
C20:4n6	21,2	21,1	24,1	31,9	18,3	37,2	21,2	29,8	17,2
C20:5n3	2,4	1,2	1,3	0,7	1,7	0,3	1,7	0,2	2,9
C22:5n3	6,1	4,5	6,9	2,7	5,1	1,7	8,2	0,8	7,4
C22:6n3	13,2	9,9	15,1	5,8	13,4	3,7	18,2	1,8	15,8
Ácido graxo (% de ácido									

graxo esterificado a fosfolipídios)									
C14	1,2	1,1	0,4	0,6	0,6	0,5	1,0	0,5	1,3
C16	18,7	18,0	9,0	13,9	12,1	12,5	17,7	13,0	19,7
C18	1,9	2,1	2,0	2,8	2,2	3,0	1,9	3,2	1,6
C18:1n9	6,5	7,3	7,6	10,3	9,8	11,5	7,0	12,1	5,2
C18:2 n6	6,3	7,1	7,3	9,8	6,9	10,9	7,6	11,5	5,2
C18:3 n3	4,4	5,0	5,3	7,1	5,0	7,9	4,4	8,4	3,5
C20:3n6	1,8	2,0	1,9	2,5	1,7	2,8	1,9	2,9	1,6
C20:4n6	16,0	17,9	18,3	24,7	17,4	27,4	16,3	29,0	13,2
C20:5n3	3,5	3,0	0,3	0,9	1,7	0,1	3,2	0,0	4,2
C22:5n3	8,8	7,6	0,6	2,1	0,0	0,2	9,9	0,0	10,5
C22:6n3	18,9	16,4	1,4	4,6	4,4	0,3	16,1	0,0	22,6
LC-PUFA									
LC-PUFA total % p/p	50,2	44,7	55,9	52,3	47,4	55,2	58,0	47,1	49,2
% LC-PUFA em PL de LC-PUFA total	43,8	18,9	5,2	11,7	20,0	3,0	2,5	38,5	53,6
% LC-PUFA a Sn-2 de PL de LC-PUFA total de PL	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
AA:DHA	1,6	2,1	1,6	5,5	1,4	10,1	1,2	16,2	1,1

NC = não calculado

% de LC-PUFA total representa soma de % peso/peso de ácidos graxos de C18:2, C18:3, C20:3, C20:4, C20:5 e C22:6.

% LC-PUFA em PL de LC-PUFA total é calculado por (LC-PUFA em PL como % em peso)/(LC-PUFA Total como % em peso)*100,

% LC-PUFA em *sn*-2 de fosfolipídios de LC-PUFA total em fosfolipídios é calculada por (% de LC-PUFA em ácidos graxos posicionados *sn*-2 total) / (LC-PUFA total em fosfolipídios)* 100,

[00100] Razão ARA:DHA é calculada como C20:4 (% peso/peso de ácidos graxos totais) / C22:6 (% peso/peso de ácidos graxos totais).

Exemplo 2: Fórmula infantil

[00101] Tabela 3 provê exemplos de composições de gordura conhecidas de fórmula infantil (primeiras duas colunas de tabela 3), e um exemplo de uma composição de gordura de fórmula infantil de acordo com a invenção (terceira coluna de tabela 3).

[00102] Tabela 4 provê exemplos de conhecidas composições de gordura de fórmula infantil (primeiras duas colunas de tabela 4), e um outro exemplo de uma composição de gordura de fórmula infantil de acordo com a invenção (terceira coluna de tabela 4); Esta composição de gordura da invenção é preparada por exemplo misturando mistura 5 de tabela 2 com um mistura de gordura enriquecida de ácido palmítico de *sn-2* como descrito em PCT/IL2008/001311.

[00103] Tabela 5 provê o perfil de ácido graxo de composições (misturas) da invenção (Tabela 2) misturadas com uma mistura de gordura enriquecida de ácido palmítico de *sn-2* como descrito em PCT/IL2008/001311.

[00104] Tabela 6 provê fórmula infantil à base de leite de acordo com a invenção; e Tabela 7 provê fórmulas infantis baseada em soja de acordo com a presente invenção.

[00105] Essas composições de fórmula infantil foram formuladas de acordo com:

1. Koletzko B. et al. Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41 (5): 584-599 (2005).

2. Alles M. et al. Current trends in the infant composition milk formulae. *Current Paediatrics* 14 (1): 51-63 (2004).

3. Mathews A. Comparison of triglycerides and phospholipids as Supplemental Sources of Dietary Long-Chain polyunsaturated fatty acids in Piglets. *J Nutr.* 132:3081-3089 (2002).

[00106] Uma fórmula infantil é deste modo preparada, compreendendo proteínas, carboidratos, gordura, minerais, vitaminas, etc. para dar um produto alimentar alimentando um bebê com os principais nutrientes também encontrados em leite humano. 1 litro de água de osmose reversa (RO) é

adicionado a um misturador de alto cisalhamento e aquecido para 70°C. Misturador é ligado em alta velocidade e 480g de lactose são adicionados gradualmente. Velocidade de misturador é reduzida e 250g de uma mistura de gordura (por exemplo uma mistura de gordura essencialmente como descrito em PCT/IL2008/001311) são adicionados. A seguir, 140g de leite desnatado, 90 g de proteína do soro do leite concentrada e 20 g de uma mistura de minerais, vitaminas e elementos traço são adicionados. Para a mistura obtida, 20g de uma composição de lipídio enriquecida de LC-PUFA da invenção, (Tabela 2) são adicionados. A mistura resultante é passada através de um homogeneizador de pressão e então secada por pulverizador para obter por volta de 1 Kg de pó seco. Uma vez que a mistura de gordura da fórmula infantil é ainda misturada com uma composição de mistura enriquecida de LC-PUFA da invenção, a composição de ácidos graxos na fórmula infantil resulta da combinação da composição de ácidos graxos composição de ambas mistura de gordura e da composição de mistura enriquecida de LC-PUFA da invenção.

Tabela 3: Composição de gordura em fórmula infantil:

Ácido graxo (% de gordura total)	Fórmula convencional	Fórmula complementada com TG como fontes de AA e DHA	Fórmula de acordo com a invenção complementada com TG e PL como fontes de AA e DHA
C12:0	8±0,8	8±0,8	8±0,8
C14:0	3±0,3	3±0,3	3±0,3
C16:0	21±4	21±4	21±4
C18:0	3±0,3	3±0,3	3±0,3
C18:1n-9	46±6	44±6	44±6
C18:2n-6	16±1,6	15±1,5	15±1,5
C18:3n-3	1,5±0,15	1,2±0,12	1,2±0,12
C20:4n-6		0,6	0,6
C22:6n-3		0,3	0,3
Fosfolipídios (g/100g)			
Total	ND	ND	1,35
PC	ND	ND	0,95
PE	ND	ND	0,25
PI	ND	ND	0,05

PA	ND	ND	0,1
OS	ND	ND	>0,1

TG = triglicerídeo

PL = fosfolipídios

ND = não detectado

Tabela 4: Composição de gordura na fórmula infantil:

Ácido graxo % p/p	Fórmula convencional	Fórmula complementada com TG como fontes de AA e DHA	Fórmula de acordo com a invenção complementada com TG e PL como fontes de AA e DHA
C12	8,7	8,7	8,4
C14	3,5	3,5	3,4
C16	21,0	21,0	20,7
C18	2,7	2,7	2,7
C18:1n9	44,4	44,4	42,9
C18:2 n6	16,4	16,4	15,9
C18:3 n3	1,5	1,5	1,6
C20:3n6			0,1
C20:4n6		0,7	0,7
C20:5n3			0,1
C22:5n3			0,2
C22:6n3		0,5	0,5
% Fosfolipídios	ND	ND	1,5

ND = não detectado

[00107] Tabela 5 descreve frações de gordura compreendendo misturas de gordura de tabela 2. Gorduras 1-6 de Tabela 5 são derivadas de misturas 1, 2, 4, 5, 8 e 9 de Tabela 2 e ainda compreendem pelo menos um triglicerídeo de fórmula I que tem o seguinte perfil de ácido graxo conjugado:

0-10% C8:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;

0-10% C10:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;

0-22% C12:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;

0-15% C14:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;

15-55% C16:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais

dos quais pelo menos 30% são conjugados na posição *sn*-2 de triglicerídeo;

1-7% C18:0 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;

20-75% C18:1 ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
 2-40% C 18 :2 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais;
 0-8% C18:3 de ácidos graxos dentre os ácidos graxos totais; e
 outros ácidos graxos presentes em níveis menores que 8% dos
 ácidos graxos totais.

Tabela 5

	Gordura 1	Gordura 2	Gordura 3	Gordura 4	Gordura 5	Gordura 6
mistura de gordura enriquecida com ácido sn-2 palmítico com (%)	95	93,4	96,5	96	97	95
Mistura 1 (%)	5,0					
Mistura 2 (%)		6,6				
Mistura 4 (%)			3,5			
Mistura 5 (%)				4,0		
Mistura 8 (%)					3,0	
Mistura 9 (%)						5
% Fosfolípidios	2,6	1,4	0,6	1,5	1,5	3,1
% Triglicerídeos	97,1	NC	NC	NC	98,3	96,7
Ácido graxo % p/p de ácidos graxos total						
C12	8,3	8,1	8,4	8,4	8,4	8,3
C14	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
C16	20,7	20,5	20,8	20,7	20,7	20,7
C18	2,8	2,8	2,8	2,7	2,8	2,8
C18:1n9	42,5	41,9	43,2	42,9	43,4	42,4
C18:2 n6	15,7	15,6	16	15,9	16,1	15,7
C18:3 n3	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5
C20:3n6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:4n6	1,1	1,4	1,1	0,7	0,9	0,9
C20:5n3	0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1
C22:5n3	0,3	0,3	0,1	0,2	<0,1	0,4
C22:6n3	0,7	0,7	0,2	0,5	0,1	0,8
LC-PUFA						
LC-PUFA total % p/p	19,5	19,7	19,1	19,1	18,8	19,5
% LC-PUFA esterificado para PL de LC-PUFA total	5,6	2,8	1,1	2	2,9	6,8
AA:DHA	1,6	2,1	5,5	1,4	16,2	1,6

NC= não calculado

Tabela 6: Composição de fórmula infantil à base de leite:

	Unidade	Pó (100gr)
Geral:		
Proteína	grama	11,1
Gordura	grama	25,9
Lactose	grama	55,5
Água	grama	2,5
Cinza	grama	2,06
Vitaminas:		
Vitamina A	IU	1500
Vitamina D	IU	300
Vitamina E	mg	6
Vitamina K	µg	15
Vitamina B1	µg	350
Vitamina B2	µg	450
Vitamina B6	µg	222
Vitamina B12	µg	0,66
Niacina	mg	2
Ácido fólico	µg	45
Cálcio	mg	4,44
Pantotenato	mg	3
Biotina	µg	11
Vitamina C	mg	45
Minerais		
Cálcio	mg	326
Fósforo	mg	219
Magnésio	mg	37
Ferro	mg	7,4
Sódio	mg	120,7
Potássio	mg	373
Relação Ca/P		1,49
Perfil de aminoácido		
Alanina	mg	522
Arginina	mg	368
Ácido aspártico	mg	11,1
Cisteína	mg	191
Ácido glutâmico	mg	1423
Glicina	mg	244

Histidina	mg	262
Isoleucina	mg	761
Leucina	mg	12,2
Lisina	mg	10
Metionina	mg	270
Fenilalanina	mg	461
Prolina	mg	962
Serina	mg	681
Perfil de aminoácido		
Taurina	mg	37
Treonina	mg	686
Triptofano	mg	180
Tirosina	mg	463
Valina	mg	775

Tabela 7: Fórmula infantil à base de soja:

	Unidade	Pó (100gr)
Geral:		
Proteína	g	15
Gordura	g	27,54
Carboidrato	g	51,5
Ácido linoléico	g	4,5
Vitaminas:		
Vitamina A	IU	1500
Vitamina D	IU	300
Vitamina E	IU	10
Vitamina C	mg	65
Vitamina K	µg	77
Vitamina B1	µg	345
Vitamina B2	µg	445
Vitamina B6	µg	327
Vitamina B12	µg	1,5
Niacina	mg	7
Ácido fólico	µg	76
Ácido pantotênico	µg	4,5
Biotina	µg	25
Colina	mg	58
Minerais		
Cálcio	mg	500
Fósforo	mg	300

Magnésio	mg	45
Ferro	mg	9,2
Zinco	mg	4
Manganês	µg	150
Cobre	µg	400
Iodo	µg	77
Sódio	mg	200
Potássio	mg	546
Cloro	mg	400
Inositol	mg	25
Carnitina	mg	10
Minerais		
Relação Ca/P		1,67
Perfil de aminoácido		
Alanina	mg	640
Arginina	mg	497
Ácido aspártico	mg	1385
Cisteína	mg	242
Ácido glutâmico	mg	3065
Glicina	mg	300
Histidina	mg	382
Isoleucina	mg	893
Leucina	mg	1600
Lisina	mg	1360
Metionina	mg	406
Fenilalanina	mg	650
Prolina	mg	1113
Serina	mg	737
Taurina	mg	51
Treonina	mg	460
Tirosina	mg	621
Valina	mg	947

[00108] Fórmulas infantis projetadas para imitar os diferentes períodos de lactação podem ser preparadas controlando os níveis de mistura de gordura e de composição de mistura enriquecida de LC-PUFA da invenção .

EXEMPLO 3: Efeito de fosfolipídios de DHA e AA em fórmula infantil em desenvolvimento cognitivo e acuidade visual

[00109] O estudo inclui três grupos de bebês alimentados com três

fórmulas infantis que diferem apenas em seu teor de gordura de LC-PUFA (Tabela 3). Grupo I recebe fórmula infantil padrão sem suplementação de DHA e AA.

[00110] Grupo II recebe fórmula infantil suplementada com suplementação de DHA e AA padrão (isto é, DHA e AA conjugados a triglicerídeos apenas).

[00111] Grupo III recebe fórmula infantil suplementada de acordo com a presente invenção, particularmente com DHA e AA conjugados a triglicerídeos e fosfolipídios (isto é, uma mistura de DHA e AA conjugados a triglicerídeos e a fosfolipídios, considerando que a razão dos triglicerídeos e fosfolipídios conjugados é 1:1).

[00112] O desenvolvimento cognitivo dos bebês é medido pelo teste de escalas de Bayley (essencialmente como descrito em Pinelli J et al. *Adv Neonatal Care* 3(2):76-87 (2003)). A acuidade visual dos bebês é medida pelo teste de acuidade desperta visual (essencialmente como descrito em Innis SM. *J Pediatr.* 139(4):532-8 (2001)). Ambos testes são adaptados à idade dos bebês. Durante os 6 meses de alimentação com a fórmula, os testes são realizados em linha de base e durante o estudo aproximadamente cada um a dois meses. Os bebês no terceiro grupo (alimentados com fórmula infantil compreendendo os DHA e AA conjugados a triglicerídeos e fosfolipídios de acordo com a invenção) demonstram melhor desenvolvimento cognitivo e acuidade visual como comparado aos bebês nos outros dois grupos.

EXEMPLO 4: Efeito de DHA e AA conjugado a fosfolipídios dentro da dieta em função do desenvolvimento cognitivo em um modelo animal.

[00113] O ácido graxo (FA) ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22: 6n-3) é altamente enriquecido em fosfolipídios de membrana do sistema nervoso central e retina. Vias neuronais, tais como aquelas envolvidas em aprendizagem, memória, aprendizagem espacial, etc. indicam desenvolvimento de função cognitiva. Neste estudo, uma avaliação

sistemática de neurodesenvolvimento e marcos cognitivos é realizada em filhotes de animais. As análises incluem medições de crescimento físico e maturação e avaliação de reflexos neurológicos.

Projeto de estudo

[00114] Animais são alimentados com diferentes dietas e aparição de reflexos neurais e desempenho de reflexo é examinado após nascimento. Projeto de estudo é efetuado de acordo com Kiss et al, Development of Neurological Reflexes and Motor Coordination in Rats Neonatally Treated with Monosodium Glutamate, *Neurotoxicity Research*, 2005, VOL. 8(3,4). pp. 235-244.

Dietas

[00115] Os animais receberam dietas essencialmente como descrito em Tabela 3 ou Tabela 4:

Grupo I: dieta de referência, ração normal.

Grupo II: uma dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados para triglicerídeos (TG) apenas.

Grupo III: dieta sintética: fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados para triglicerídeos (TG) e fosfolípidios (PL) (por exemplo, misturas de gordura 1-9, Tabela 2).

Crescimento

[00116] Peso é registrado cada dia até 3 semanas de idade, então semanalmente. Comprimento corporal (comprimento nasoanal) é medido semanalmente.

Sinais neurológicos e reflexos

[00117] Exames de desenvolvimento neurocomportamental são iniciadas no primeiro dia pós-natal e efetuadas diariamente até dia 21 pós-natal. Inspeções são efetuadas para maturação de características físicas tais como abertura de olho, erupção de incisivos e desdobramento da orelha.

[00118] Filhotes são testados para os seguintes sinais neurológicos e

reflexos:

1. *Reflexo de endireitamento*: ratos são colocados em posição de supino e o tempo em segundos para virarem sob a posição prona e colocar todas as quatro patas em contato com a superfície é registrado.

2. *Geotaxia negativa*: animais são colocados de cabeça para baixo em uma prancha inclinada (45°C) de 30 cm. Os membros traseiros dos filhotes são colocados no meio da prancha. O dia em que eles começam a virar em volta e escalar a prancha e com seus membros precedentes alcançando a borda superior é observado. A partir do dia do aparecimento de geotaxia negativa, o tempo em segundos para alcançar a extremidade superior da prancha é registrado diariamente.

3. *Reflexos sensoriais*: a orelha e a pálpebra são gentilmente tocados com uma haste flexível e o primeiro dia do reflexo de contração de orelha e a contração da pálpebra são registrados.

4. *Colocação de membros*: a parte de trás da pata dianteira e traseira é tocada com a extremidade da bancada com o animal suspenso, e o primeiro dia de levantamento e colocação das patas na mesa é anotado.

5. *Agarramento pelo membro*: os membros dianteiros e traseiros são tocados com uma vareta fina, e o primeiro dia de agarramento na vareta é registrado.

6. *Andadura*: os animais são colocados no centro de um círculo de papel de 13 cm em diâmetro, e o dia que eles começam a mover-se para fora do círculo com ambos membros precedentes é registrado. A partir do dia da aparição, o tempo em segundo para mover-se do círculo é registrado diariamente.

7. *Sobressalto auditivo*: o primeiro dia de resposta de sobressalto a um som de palmas é observado.

[00119] Em conclusão, o resultados mostram que alimentar animais com dieta enriquecida com uma composição da invenção aumenta o

desenvolvimento de sistema neural.

Exemplo 5: Efeito de DHA e AA conjugados a fosfolipídios dentro de dieta em retina de um modelo animal.

[00120] O ácido graxo (FA) ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22: 6n-3) é altamente enriquecido em fosfolipídios de membrana do sistema nervoso central e retina. Transdução de sinal de receptor acoplado de proteína G (GPCR) é um motivo de sinalização comum em vias neuronais, tais como aquelas envolvidas em aprendizagem, memória, discriminação baseada em olfato, aprendizagem espacial, e acuidade visual.

[00121] Projeto de estudo é de acordo com Niu et al, 2004, Reduced G Protein-coupled Signaling Efficiency in Retinal Rod Outer Segments in Response to n-3 Fatty Acid Deficiency, J. Biol. Chem., Vol. 279, Issue 30, 31098-31104.

Projeto de estudo

[00122] Animais são obtidos em desmame (3 semanas de idade). Fêmeas de desmame são aleatoriamente divididas em grupos de dieta com uma limitação que ambos grupos tiveram o mesmo peso corporal médio; os animais são divididos para grupos de modo que o peso médio dos animais em ambos grupos é similar. As fêmeas em ambos grupos de dietas são acasaladas, os filhotes são separados, e as fêmeas com crias são mantidas em suas respectivos dietas durante lactação. Na idade de 21 dias, os filhotes são adaptados a escuro durante a noite e sacrificados por decapitação sob luz vermelha fosca.

Dietas

[00123] Os animais receberam dietas essencialmente como descrito em Tabela 3 ou Tabela 4:

Grupo I: dieta de referência, ração normal.

Grupo II: uma dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) apenas.

Grupo III: dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) e fosfolipídios (PL) (por exemplo, ver tabela 2, misturas de gordura 1-9).

Retina

[00124] Receptor copulado a proteína G (GPCR) sinalizando em membranas de segmento exterior de haste de retina (ROS) isoladas de ratos alimentados com as diferentes dietas é estudado. Sinalização GPCR é avaliada em diferentes etapas: ativação da rodopsina, copulação rodopsina-transducina, atividade de cGMP fosfodiesterase, e formação de metarodopsina II (Mil) e o complexo MII-G_t.

[00125] Além disso, composição de ácido graxo em retina é medida.

[00126] Alimentar animais com dieta enriquecida com uma composição da invenção resulta em maior sinalização em segmento exterior de haste de retina e em maior teor de LC-PUFA em retina.

Exemplo 6: Efeito de DHA e AA conjugados a fosfolipídios dentro de dieta em retina e acuidade visual em um modelo animal.

[00127] Eletro-retinografia mede respostas elétricas de vários tipos celular na retina, incluindo os fotoreceptores (hastes e cones), células de retina interiores (células bipolar e amácrina), e as células ganglionares. Durante um registro, os olhos são expostos a estímulo padronizado e o sinal resultante é exibido mostrando o curso de tempo da amplitude do sinal (voltagem).

[00128] Projeto de estudo é de acordo com to Kraft et al, 1987, The Rat Electroretinogram in Combined Zinc and Vitamin A Deficiency, Investigative Ophthalmology & Visual Science.

Projeto de estudo

[00129] Para avaliar a função retinal, animais são criados em iluminação fosca com diferentes dietas e eletroretinogramas Scotopic (ERGs) é realizado.

Dietas

[00130] Os animais receberam dietas essencialmente como descrito em Tabela 3 ou Tabela 4:

Grupo I: dieta de referência, ração normal.

Grupo II: uma dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) apenas.

Grupo III: dieta sintética de cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) e fosfolípidios (PL) (por exemplo, ver tabela 2, misturas de gordura 1-9).

Eletro-retinografia

[00131] ERGs 'Scotopic' são medidos em animais em intervalos regulares durante o curso do experimento. Antes dos ERGs, animais são adaptados ao escuro por um período mínimo de 12 h. Um eletrodo de agulha de EEG padrão (Eletroencefalograma) é colocado na câmara anterior do olho e um eletrodo de referência é colocado subcutaneamente na pele da cabeça próximo à pálpebra superior para registrar a ERG. O olho é submetido a clarões de estímulo simples de intensidade aumentada. O ERG é exibido em um osciloscópio e registrado em fita magnético.

[00132] Animais em grupo III, que recebem dieta enriquecida com uma composição da invenção demonstram maior sensibilidade retinal.

Exemplo 7: Efeito de fosfolípidios conjugados de DHA e AA dentro da dieta em crescimento e cérebro e desenvolvimento de SNC em um modelo animal.

[00133] O cérebro de mamífero é particularmente rico em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA), especialmente ácido docosa-hexaenóico (DHA) [22:6(n-3)] e ácido araquidônico (AA) [20:4(n-6)]. Efeito de DHA e AA de dieta maternal na composição de mielina de filho de rato é examinado em um modelo animal. Lipídios de dieta desempenham um importante papel em síntese de mielina, particularmente durante o período de mielinização máximo. Os estudos são conduzidos durante o período de

mielinização máximo, que coincide com o começo de audição em grupos de ratos.

[00134] Projeto de estudo é de acordo com Haubner et al, 2007, The Effects of Maternal Dietary docosahexaenoic Acid Intake on Rat Pup Myelin and the Auditory Startle Response, Dev Neurosci 29:460-67.

Projeto de estudo:

[00135] Fêmeas com crias de gravidez programada são recebidas no dia 2 de gestação. Na chegada, as fêmeas com crias são designadas para serem alimentadas com diferentes dietas, com livre acesso a dietas e água. Dieta fresca é provida a fêmeas com cria durante toda gravidez e lactação. O dia de nascimento é designado como dia pós-natal (PND) 0, fêmeas de cada grupo de dieta e suas ninhadas aleatórias são avaliadas para o estudo. Os filhotes são desmamados em PND 21 e então alimentados com as dietas maternas correspondentes até PND 24 quando eles são assassinados por decapitação. Cérebro e cerebelo são removidos de filhotes por grupo de dieta para análise de ácidos graxos.

Dietas

[00136] Os animais receberam dietas essencialmente como descrito em Tabela 3 ou Tabela 4:

Grupo I: dieta de referência, ração de rato normal

Grupo II: uma dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) apenas.

Grupo III: dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) e fosfolipídios (PL) (por exemplo, ver tabela 2, misturas de gordura 1-9).

Análises bioquímicas

[00137] A composição de ácido graxo de extrato de lipídios totais preparados de dietas é determinada por cromatografia líquida de gás. Homogenizados de tecido de cérebro obtidos a partir de todos filhotes em PND

24 são preparados e mielina é isolada. A composição de ácido graxo de mielina é medida em extrato de lipídio total preparado a partir dos cérebros.

[00138] Grupo III, que recebem dieta enriquecida com uma composição da invenção demonstram maiores níveis de DHA e AA em mielina de filhote.

Exemplo 8: Efeito de fosfolipídios conjugados de DHA e AA dentro da dieta em composição de ácido graxo no sangue e o cérebro de um modelo animal

[00139] Dado que membros das famílias (n-3) e (n-6) competem pela mesmas enzimas desaturase, os efeitos da suplementação de PUFA de uma família no depósito de tecido do PUFA da outra família pode ser um fato importante a considerar quando determinando que composição de PUFA de dieta é ótima para desenvolvimento neuronal. Portanto, usar o modelo de criação artificial para diretamente alimentar ratos bebê com fórmulas experimentais durante o período de rápido desenvolvimento do cérebro, permite o controle preciso de ambas as quantidades relativa e absoluta de PUFA nas dietas específicas. Além disso, este método permite a liberação direta na dieta aos filhotes durante um período de desenvolvimento de cérebro que aproximadamente compara-se ao terceiro trimestre e período pós-natal precoce em humanos ou infância precoce no bebê prematuro.

[00140] Projeto de estudo foi feito de acordo com Ward et al, 1998, Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Levels in Formulae Influence Deposition of Docosahexanoic Acid and Arachidonic Acid in Brain and Red Blood Cells of Artificially Reared Neonatal Rats, The Journal of Nutrition Vol. 128 No. 12 December, pp. 2473-2487.

Projeto de estudo

[00141] As fêmeas grávidas são obtidas em 10-12 dias de gestação e alojadas individualmente com acesso livre a dieta e água de torneira. Prole de animais grávidos cronometrados é separada, quando necessário, dentro de 24 h de nascimento, e aproximadamente números iguais de prole de machos e

fêmeas são selecionados como indivíduos. Filhotes são avaliados aleatoriamente para grupos de dieta. Substitutos de leite com ou sem DHA e/ou AA, são dados a partir de dias 5-18 de vida, que é o período de rápido desenvolvimento do cérebro.

Dietas

[00142] Os animais receberam dietas essencialmente como descrito em Tabela 3 ou Tabela 4:

Grupo I: dieta de referência, ração de rato normal.

Grupo II: uma dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) apenas.

Grupo III: dieta sintética cuja fonte de gordura é enriquecida com DHA e AA esterificados a triglicerídeos (TG) e fosfolipídios (PL) (por exemplo, ver tabela 2, misturas de gordura 1-9).

Procedimento de criação artificial

[00143] No dia 27 após a concepção (aproximadamente dia 5 após nascimento), filhotes são anestesiados, e um tubo de gastrostomia é inserido na boca, abaixo do esôfago, e através da parede do estômago. Filhotes são alojados individualmente e alimentados com uma das dietas experimentais através de tubo. Cada dia, todos filhotes são pesados para avaliar o crescimento. Filhotes de controle amamentados não são gastrostomizados, mas são criados pelas fêmeas por amamentação no dia da gastrostomia. No dia 40 após-concepção (aproximadamente dia 18 pós nascimento), animais são sacrificados, sangue é removido por punção cardíaca, e cérebros são removidos e divididos em FB e CB.

Análise bioquímica

[00144] Composição de ácido graxo é avaliada em ambos o sangue e o cérebro para estudar o relacionamento entre cérebro e composição de glóbulos vermelhos (RBC). O cérebro é subdividido em prosencéfalo (FB) e cerebelo (CB) porque, em ratos, eventos de desenvolvimento que ocorrem pré-

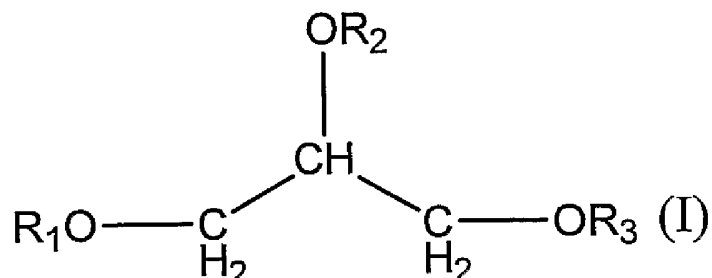
natalmente no FB ocorrem para uma grande extensão pós-natalmente no CB. Portanto, efeitos de dietas que têm efeitos específicos no desenvolvimento rápido de tecido devem, durante o período pós-natal inicial em ratos, produzir maiores efeitos no CB do que em FB.

[00145] Grupo III, que recebem dieta enriquecida com uma composição da invenção demonstram maiores níveis de DHA e AA no sangue e cérebro, significando melhor absorção intestinal.

REIVINDICAÇÕES

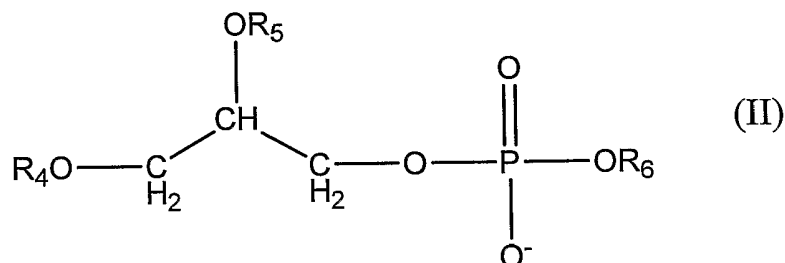
1. Composição para nutrição infantil, caracterizada pelo fato de compreender

(i) pelo menos dois triglicerídeos de fórmula I:



em que R₁, R₂ e R₃ podem ser idênticos ou diferentes, e cada um é independentemente selecionado de resíduos de ácido graxo saturado, ácido graxo mono-insaturado e ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LC- PUFA); e em que um LC-PUFA é conjugado aos triglicerídeos (R₁ e/ou R₂ e/ou R₃)

(ii) pelo menos dois fosfolipídios de fórmula II:



em que R₄ e R₅ são cada um substituinte tendo independentemente os significados de R₁, R₂, R₃; em que um LC-Pufa é conjugado aos fosfolipídios (R₄ e/ou R₅), e em que

R₆ é selecionado de colina, inositol, etanolamina e serina;

(iii) LC-PUFAs livres

e em que pelo menos 1% do LC-PUFA na composição é conjugado aos referidos pelo menos dois fosfolipídios; e

os LC-PUFAs presentes na composição como LC-PUFAs livres, conjugados aos triglicerídeos e aos fosfolipídios compreendem ácido docosahexanóico (DHA) e ácido aracdônico (AA).

2. Composição de acordo com reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que em que pelo menos 2% do conteúdo de LC-PUFA na composição é conjugado aos referidos pelo menos dois fosfolipídios.

3. Composição de acordo com reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a razão do teor em peso entre AA e DHA é de pelo menos 1.1.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que R₅ é DHA ou AA.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que R₄ é DHA ou AA.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a quantidade total de fosfolipídios é pelo menos 0,1%.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que os referidos triglicerídeos e os referidos fosfolipídios são derivados de pelo menos um material cru de lecitina selecionado do grupo constituído por organismos vegetais, marinhos e de aquacultura.

8. Composição compreendendo a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a composição é uma composição selecionada do grupo consistindo de uma composição farmacêutica, composição nutracêutica, alimento funcional e fórmula infantil.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente pelo menos um triglicerídeo de fórmula I, tendo pelo menos 30% (p/p) de ácido palmítico total conjugado na posição sn-2.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente

pelo menos um triglicerídeo de fórmula I tendo o seguinte perfil de ácido graxo conjugado

- 0-10% de ácidos graxos C8:0 dentre os ácidos graxos totais;
- 0-10% de ácidos graxos C10:0 dentre os ácidos graxos totais;
- 0-22% de ácidos graxos C12:0 dentre os ácidos graxos totais;
- 0-15% de ácidos graxos C14:0 dentre os ácidos graxos totais;
- 15-55% de ácidos graxos C16:0 dentre os ácidos graxos totais

dos quais pelo menos 30% são conjugados na posição *sn*-2 do triglicerídeo;

- 1-7% de ácidos graxos C18:0 dentre os ácidos graxos totais;
- 20-75% de ácidos graxos C18:1 dentre os ácidos graxos totais;
- 2-40% de ácidos graxos C18:2 dentre os ácidos graxos totais;
- 0-8% de ácidos graxos C18:3 dentre os ácidos graxos totais; e
- outros ácidos graxos presentes em níveis menores que 8% do

total de ácidos graxos.