



INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0813391-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0813391-3

(22) Data do Depósito: 13/06/2008

(43) Data da Publicação do Pedido: 18/12/2008

(51) Classificação Internacional: A23L 33/00; A23L 29/30; A23L 33/12; A23L 33/135; A23L 33/19; A61K 31/702; A61K 31/733; A61K 35/745; A61K 35/00.

(52) Classificação CPC: A23L 33/40; A23L 29/30; A23L 33/12; A23L 33/135; A23L 33/19; A61K 31/702; A61K 31/733; A61K 35/745; A61K 2035/115; A23Y 2300/29.

(30) Prioridade Unionista: NL PCT/NL2007/050290 de 15/06/2007.

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA LACTENTE E/ OU CRIANÇA NA PRIMEIRA INFÂNCIA COM OLIGOSSACARÍDEOS NÃO Digeríveis E BIFIDOBACTÉRIA NÃO VIÁVEL, E, USOS DA MESMA

(73) Titular: N.V. NUTRICIA, Companhia Holandesa. Endereço: Eerste Stationsstraat 186, NL- 2712 HM Zoetermeer, HOLANDA(NL)

(72) Inventor: SANDER HOUGEE; ADRIANUS JOHANNES MARIA VRIESEMA; JOHAN GARSEN; JAN KNOL.

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 11/12/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 11/12/2018

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“COMPOSIÇÃO PARA LACTENTE E/ OU CRIANÇA NA PRIMEIRA INFÂNCIA COM OLIGOSSACARÍDEOS NÃO DIGERÍVEIS E BIFIDOBACTÉRIA NÃO VIÁVEL, E, USOS DA MESMA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se ao campo de nutrição para lactente e criança na primeira infância. Em particular a presente invenção refere-se a uma nutrição para lactente e criança na primeira infância com oligossacarídeo não digerível e bifidobactérias não viáveis. Tal composição nutricional é vantajosamente usada para tratar ou prevenir alergia, preferivelmente alergia a alimentos, e/ou doenças atópicas incluindo dermatite atópica e/ou asma.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Um lactente humano alimentado com leite humano desenvolverá, após o nascimento, uma microbiota intestinal rica em bactérias produtoras de ácido lático. Isto ocorre devido à presença de sacarídeos não digeríveis no leite humano que são especificamente fermentados por bactérias produtoras de ácido lático, especificamente bifidobactérias.

[0003] Uma microbiota rica em bifidobactérias é benéfica uma vez que tem um efeito preventivo em infecções, diarreia, constipação, inflamação gastro-intestinal, maturação intestinal, alergia, em particular alergia a alimentos, doenças atópicas incluindo dermatite atópica, e asma e tem um efeito benéfico no sistema imune.

[0004] Fórmulas para crianças pequenas pode ser adaptada para imitar o efeito bifidogênico de leite humano. WO 2005039319 descreve o uso de *Bifidobacterium breve* viva e uma mistura de dois sacarídeos não digeríveis diferentes para melhorar a microbiota de crianças alimentadas com fórmulas. O documento descreve a relevância de bifidobactérias em um nível de gênero bem como em um nível de espécie. WO 20070046698 descreve o uso de uma composição compreendendo oligossacarídeo não digerível para a

fabricação de uma composição para administração enteral a uma criança cujo parto foi através de cesariana. Bactérias de ácido láctico vivas devem ser co-administradas para aumentar a diversidade e/ou a quantidade de microorganismos no intestino da criança de parto por cesariana. JP 01242532 descreve o uso de *B. breve* viável ou não viável como um imunopotenciador que estimula as placas de Peyer assim prevenindo a infecção de trato intra-intestinal e alergia. Este documento não descreve a fórmula nutricional para lactentes e/ou crianças na primeira infância.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0005] Sabe-se que células de *B. breve* vivas podem melhorar a microbiota e assim melhorar alergia. No entanto, o uso de *B. breve* não viável é preferido. Isto apresenta várias vantagens:

1) Um produto compreendendo *B. breve* não viável pode ser armazenado mais facilmente e com custos reduzidos, uma vez que nenhuma precaução especial foi tomada para manter a viabilidade de células *B. breve* em um nível aceitável. Este é especialmente o caso em produtos com uma atividade em água acima de 0,3.

2) Nenhuma pós-acidificação ocorre devido à ausência de capacidade fermentativa de *B. breve* em produtos armazenados com uma elevada atividade de água e/ou em fórmula para criança pequena no período após a reconstituição com água e antes do consumo.

3) Após a produção, a composição nutricional final com *B. breve* não viável pode ser pasteurizada e/ou esterilizada, conseqüentemente reduzindo a chance de contaminação com microorganismos prejudiciais, tais como *E. sakazakii*. Então a presente invenção possibilita que uma fórmula líquida pronta para uso compreendendo *B. breve* não viável seja preparada e armazenada a temperatura ambiente.

4) Um produto em pó com *B. breve* não viável pode ser reconstituído com água com uma temperatura acima de 37°C, se desejado.

5) A dose de células de *B. breve* recebida por cada lactente e/ou criança na primeira infância pode ser mais facilmente controlada, uma vez que nenhum outro cultivo em um produto líquido ocorre, nem cultivo no trato intestinal da criança. O último é um fator variável dependendo do meio intestinal do indivíduo, e assim conduzindo a variações na extensão de efeitos benéficos em lactentes individuais.

[0006] Os inventores surpreendentemente verificaram que a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo oligossacarídeos não digeríveis pode ser vantajosamente suplementada com células de *Bifidobacterium breve* não viável para ter um efeito preventivo e/ou curativo em alergia a alimentos e/ou outras doenças atópicas. O efeito de *Bifidobacterium breve* não viável em composições foi comparável a aquele de células *B. breve* viáveis. O efeito anti-alérgico observado de *B. breve* inativada não pode ser explicado por um efeito probiótico direto, tal como um efeito através de melhora da flora, uma vez que as células não estão mais vivas e portanto não aumentam o número de células *B. breve* na microbiota. Até agora, os efeitos benéficos de *B. breve* foram presumidos como sendo dependentes da presença de células vivas.

[0007] O efeito de células de *B. breve* não viáveis foi comparável, mas levemente menor do que aquele de *B. breve* viva. Os presentes inventores surpreendentemente verificaram que o efeito de *B. breve* não viável poderia ainda ser melhorado pela presença de oligossacarídeos não digeríveis. Isto é inesperado, uma vez que geralmente em preparações simbióticas, o presente oligossacarídeo não digerível estimula as bactérias probióticas presentes e assim mostram um efeito melhorado. Os inventores inesperadamente verificaram que também em preparações compreendendo *B. breve* inativada, que não é capaz de usar e beneficiar-se dos presentes oligossacarídeos não digeríveis, também um efeito melhorado foi verificado na combinação comparado com os compostos sozinhos.

[0008] Os oligossacarídeos não digeríveis estimulam a microbiota intestinal da lactente e/ou criança na primeira infância, especialmente a quantidade de bifidobactérias e/ou lactobacilos. A melhora simultânea da microbiota por oligossacarídeos não digeríveis de lactentes e/ou crianças na primeira infância alimentadas com fórmula, enquanto administrando *B. breve* não viável, resulta em um efeito aumentado em prevenção e/ou tratamento de distúrbios tais como um efeito preventivo em infecções, diarreia, constipação, inflamação gastro-intestinal, maturação intestinal, alergia, particularmente alergia a alimentos, dermatite atópica, e/ou asma.

DESCRIÇÃO DETALHADADA INVENÇÃO

[0009] A presente invenção refere-se a uma nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo um oligossacarídeo não digerível A e/ou B e uma quantidade de *Bifidobacterium breve* não viável equivalente a pelo menos 10^3 cfu por g de peso seco da nutrição para lactente e criança na primeira infância, e compreendendo uma quantidade de *Bifidobacterium breve* viável menor do que 10^3 cfu por g de peso seco da nutrição para lactente e criança na primeira infância.

[00010] Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um método para alimentar um lactente e/ou criança na primeira infância.

[00011] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para tratar e/ou prevenir alergia, preferivelmente alergia a alimentos, e/ou doenças atópicas incluindo eczema atópico e/ou asma, referido método compreendendo administrar a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância a um indivíduo.

[00012] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para tratar e/ou prevenir infecção, referido método compreendendo administrar a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância a um indivíduo.

[00013] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para tratar e/ou prevenir dermatite de fralda, referido método compreendendo administrar a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância a um indivíduo.

[00014] Em outras palavras, a presente invenção refere-se ao uso da presente nutrição para lactente e criança na primeira infância para a fabricação da composição ou nutrição para o tratamento e/ou prevenção de alergia, preferivelmente alergia a alimentos, doenças atópicas incluindo eczema atópico e/ou asma, ou, em outras palavras, a presente invenção refere-se à presente nutrição para lactente e criança na primeira infância para uso no tratamento e/ou prevenção de alergia, preferivelmente alergia a alimentos, eczema atópico e/ou asma.

[00015] Também alternativamente redigido, a presente invenção refere-se ao uso da presente nutrição para lactente e criança na primeira infância para a fabricação de uma composição ou nutrição para o tratamento e/ou prevenção de infecção, ou, em outras palavras, a presente invenção refere-se à presente nutrição para lactente e criança na primeira infância para uso no tratamento e/ou prevenção de infecção.

[00016] Também alternativamente redigido, a presente invenção refere-se ao uso da presente nutrição para lactente e criança na primeira infância para a fabricação de uma composição ou nutrição para o tratamento e/ou prevenção de dermatite de fralda, ou, em outras palavras, a presente invenção refere-se à presente nutrição para lactente e criança na primeira infância para uso no tratamento e/ou prevenção de dermatite de fralda.

Bifidobacterium breve

[00017] *Bifidobacterium breve* é uma bactéria em formato de bastão, ramificada, gram-positiva, anaeróbica. A presente *B. breve* preferivelmente tem pelo menos 95% de identidade com a sequência de rRNA

16 S quando comparada à cepa de tipo de *B. breve* ATCC 15700, mais preferivelmente pelo menos 97% de identidade (Stackebrandt & Goebel, 1994, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849). A *Bifidobacterium* incluída na composição e métodos e usos da presente invenção preferivelmente hibridiza com a sonda de *B. breve* e dá um sinal com o método de teste de nuclease de 5' como descrito em WO 2005039319.

[00018] Cepas de *B. breve* preferidas são aquelas isoladas das fezes de crianças saudáveis alimentadas com leite humano. Tipicamente, estas são comercialmente disponíveis a partir de produtores de bactérias de ácido láctico, mas elas podem ser diretamente isoladas das fezes, identificadas, caracterizadas e produzidas. De acordo com uma forma de realização preferida, a presente composição contém pelo menos uma *B. breve* selecionada dentre o grupo consistindo de *B. breve* Bb-03 (Rhodia/Danisco), *B. breve* M-16V (Morinaga), *B. breve* R0070 (Institute Rosell, Lallemand), *B. breve* BR03 (Probiotal), *B. breve* BR92) (Cell Biotech) DSM 20091, e LMG 11613. Mais preferivelmente, a *B. breve* não viável é *B. breve* não viável M-16V (Morinaga). Mais preferivelmente, a *B. breve* não viável é de cepa *B. breve* I-2219 depositada junto ao CNCM em Paris, França.

[00019] A presente composição compreende uma quantidade de *Bifidobacterium breve* não viável equivalente a pelo menos 10^3 cfu por g de peso seco da composição. A presente composição preferivelmente compreende *B. breve* não viável em uma equivalente de 10^3 a 10^{13} unidades formadoras de colônia (cfu) *B. breve* por grama de peso seco da presente composição, preferivelmente 10^4 a 10^{12} , mais preferivelmente 10^5 a 10^{11} , mais preferivelmente a equivalente de 10^5 a 10^{10} cfu *B. breve* por grama de peso seco da presente composição. Preferivelmente, a presente composição compreende *B. breve* não viável em um equivalente de 10^4 a 10^{13} , mais preferivelmente de 10^5 a 10^{12} , mais preferivelmente o equivalente de 10^6 a 5×10^{11} unidades formadoras de colônia (cfu) *B. breve* por g do total de

oligossacarídeo não digerível. A dose de *B. breve* não viável de acordo com a presente invenção é preferivelmente administrada em uma dose diária do equivalente de 10^4 a 10^{14} , mais preferivelmente de 10^5 a 10^{13} , ainda mais preferivelmente o equivalente de 10^6 a 10^{12} , mais preferivelmente 10^8 a 5×10^{11} unidades formadoras de colônia (cfu). Quando a composição é um líquido, a composição preferivelmente compreende o equivalente de 10^4 a 10^{14} unidades formadoras de colônia (cfu) de *B. breve* não viável por 100 ml da presente composição, preferivelmente 10^5 a 10^{13} , mais preferivelmente 10^6 a 10^{12} , mais preferivelmente o equivalente de 10^6 a 10^{11} cfu *B. breve* por 100 ml da presente composição.

[00020] Uma quantidade de *Bifidobacterium breve* não viável equivalente a pelo menos 10^3 cfu por grama de peso seco significa *Bifidobacterium breve* não viável em uma quantidade que é a equivalência de uma quantidade de pelo menos 10^3 cfu *B. breve* por grama de peso seco.

[00021] O equivalente de cfu pode ser determinado realizando o teste de nuclease de 5' com as sondas *B. breve* e iniciadores como descrito em WO 2005039319 no produto (isto é uma fórmula de lactente) compreendendo *B. breve* não viável e comparando com uma curva de calibração obtida a partir de um produto comparável (por exemplo uma fórmula para lactente padrão) em que quantidades conhecidas de cfu de *B. breve* viável secado foram adicionadas. As bifidobactérias viáveis secadas podem ser comercialmente obtidas como descrito acima. O valor de cfu na curva de calibração feito por *B. breve* viável ou viva que tem a mesma resposta de teste de nuclease de 5' como o produto compreendendo a *B. breve* inativada é considerado para ser a quantidade equivalente em cfu de *B. breve* não viável. Alternativamente, a quantidade de cfu por grama de peso seco pode ser determinada em uma composição logo antes da etapa de inativação.

[00022] A presença de uma elevada quantidade de bifidobactérias viáveis ainda resultaria em pós-acidificação e, fórmulas

líquidas para lactentes. A presente composição, portanto, compreende menos do que 10³ cfu de bifidobactérias viáveis, preferivelmente menos do que 10², mais preferivelmente menos do que 10 cfu por g de peso seco da composição. Quando na forma de um líquido, a presente composição compreende preferivelmente menos do que 10⁴ cfu de bifidobactérias viáveis, preferivelmente menos do que 10³, mais preferivelmente menos do que 10² cfu por 100 ml. As cfu de bifidobactérias viáveis podem apropriadamente ser determinadas como descrito em Ingham, S. C., 1999, J. Food Prot. 62 (1) p.77-80. Preferivelmente a composição não compreende cfu de *B. breve* viva possível de ser medida de qualquer modo. Ausência total de *B. breve* viva é, entretanto, difícil ou não pode ser determinada. De modo apropriado, a ausência de *B. breve* viva por métodos de laminação pode ser determinada como estando abaixo do limite de detecção. Este limite de detecção é de 10³ cfu/g de peso seco de composição.

[00023] *B. breve* não viável como no presente pedido refere-se a uma *B. breve* morta, *B. breve* não cultivável, *B. breve* não cultivada e/ou *B. breve* inativada (metabolicamente). Células de *B. breve* podem ser tornadas não viáveis por métodos conhecidos na técnica, incluindo etapas de tratamento a calor (incluindo esterilização, pasteurização, tratamento UHT), radiação (UV), tratamento com oxigênio, tratamento com bactericidas tais como etanol, sonicação, aplicação de pressão ultraelevada, homogeneização por pressão elevada e uso de um disruptor celular. Preferivelmente a *B. breve* é morta por calor.

[00024] A presença de *B. breve* não viável vantajosamente previne e/ou trata pelo menos um distúrbio selecionado dentre o grupo consistindo de infecções, diarreia, constipação, inflamação gastro-intestinal, distúrbios causados por maturação intestinal prejudicada, alergia (alimento), dermatite atópica, eczema, e asma, enquanto provendo muitos benefícios tecnológicos de produto, incluindo vida de prateleira aumentada, uma

incidência reduzida de contaminação bacteriana, pós-acidificação diminuída do produto, controle de dosagem melhorado e conveniência melhorada de reconstituição.

Oligossacarídeos não digeríveis

[00025] A presente composição compreende um oligossacarídeo não digerível A e/ou B. O oligossacarídeo não digerível A e/ou B preferivelmente estimula o crescimento das bactérias produzindo ácido láctico intestinal, particularmente bifidobactérias e/ou lactobacilos e, portanto, estimula a formação de uma microbiota intestinal saudável, e preferivelmente é fermentada em ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos formados estimulam a produção de muco e, portanto, ainda melhoram a função de barreira intestinal e/ou maturação em crianças. Por esta razão, a presença de oligossacarídeo não digerível A e/ou B tem um efeito vantajoso em infecções, alergia e/ou doenças atópicas. Vantajosamente, o oligossacarídeo não digerível A e/ou B é solúvel em água (de acordo com o método descrito em L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71: 1017-1023, 1988) e é um oligossacarídeo com um grau de polimerização (DP) de 2 a 200. O DP (médio) do oligossacarídeo não digerível A e/ou B está preferivelmente abaixo de 200, mais preferivelmente abaixo de 100, ainda mais preferivelmente abaixo de 60, mais preferivelmente abaixo de 40. O oligossacarídeo não digerível A e/ou B não é digerido no intestino pela ação de enzimas digestivas presentes no trato digestivo superior humano (intestino delgado e estômago). O oligossacarídeo não digerível A e/ou B é preferivelmente fermentado pela microbiota intestinal humana. Por exemplo, glicose, frutose, galactose, sacarose, lactose, maltose e as maltodextrinas são consideradas digeríveis. As matérias-primas de oligossacarídeo podem compreender monossacarídeos tais como glicose, frutose, fucose, galactose, ramnose, xilose, ácido glucurônico, GalNac etc., mas esses não são parte dos oligossacarídeos como na presente invenção.

[00026] O oligossacarídeo não digerível A e/ou B incluído

nas composições e métodos e usos de acordo com a presente invenção inclui uma mistura de oligossacarídeos não digeríveis. Esta é uma prática comum, devido ao uso de oligossacarídeo não digerível com, por exemplo, uma cadeia longa, ser muito caro. Preferivelmente o oligossacarídeo não digerível é selecionado dentre o grupo consistindo de fruto-oligossacarídeo (incluindo inulina), dextrina não digerível, galacto-oligossacarídeo (incluindo transgalacto-oligossacarídeo), xilo-oligossacarídeo, arabino-oligossacarídeo, arabinogalacto-oligossacarídeo, gluco-oligossacarídeo (incluindo gentio-oligossacarídeo e ciclodextrina), glucomano-oligossacarídeo, galactomano-oligossacarídeo, manano-oligossacarídeo, quito-oligossacarídeo, oligossacarídeo de ácido urônico, sialiloligossacarídeo (incluindo 3-SL, 6-SL, LSTa,b,c, DSLNT, S-LNH, DS-LNH) e fuco-oligossacarídeo (incluindo fucoidano OS (não) sulfatado, 2-FL, 3-FL, LNFP I, II, III, V, LNnFPI, LNDH) e misturas destes, mais preferivelmente fruto-oligossacarídeo (incluindo inulina), galacto-oligossacarídeo (incluindo transgalacto-oligossacarídeo, α e preferivelmente β ligados), oligossacarídeo de ácido urônico e fuco-oligossacarídeo e misturas destes, ainda mais preferivelmente transgalacto-oligossacarídeo e/ou inulina, mais preferivelmente transgalacto-oligossacarídeo. Quando o oligossacarídeo não digerível A e/ou B é uma mistura, as médias dos respectivos parâmetros são usadas para definir a presente invenção.

[00027] A presente invenção preferivelmente provê uma composição com dois oligossacarídeos não digeríveis diferentes, isto, é oligossacarídeo não digerível A e oligossacarídeo não digerível B. Oligossacarídeo não digerível A e oligossacarídeo não digerível B preferivelmente têm um tipo diferente de ligação glicosídica, um grau diferente de polimerização e/ou uma diferente composição de monossacarídeo.

[00028] De acordo com uma forma de realização preferida

da presente invenção, a porcentagem de um monossacarídeo particular em oligossacarídeo não digerível A é pelo menos 40 % maior em número do que a porcentagem do mesmo monossacarídeo em oligossacarídeo não digerível B, preferivelmente pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 75%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%. Uma diversidade aumentada de monossacarídeos estimula uma população mais ampla de bactérias intestinais benéficas. A porcentagem de um monossacarídeo no oligossacarídeo não digerível pode ser simplesmente calculada dividindo o número das respectivas unidades de monossacarídeo (por exemplo, glicose) no oligossacarídeo não digerível pelo número total das unidades de monossacarídeo naquele oligossacarídeo não digerível e multiplica-o por 100. Quando o oligossacarídeo não digerível é uma mistura de oligossacarídeo não digerível, a contribuição de cada unidade de monossacarídeo individual na mistura de oligossacarídeo não digerível deve ser considerada. A porcentagem de um monossacarídeo em uma mistura de oligossacarídeo não digerível pode simplesmente ser determinada hidrolisando completamente a mistura e determinando a porcentagem de número para cada monossacarídeo. Preferivelmente, o oligossacarídeo não digerível A contém pelo menos 40 % em número galactose, mais preferivelmente pelo menos 67% galactose, mais preferivelmente pelo menos 75% galactose. Preferivelmente oligossacarídeo não digerível B contém pelo menos 30 % em número frutose, mais preferivelmente pelo menos 67% frutose, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% frutose.

[00029] De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a DP média de oligossacarídeo não digerível A é pelo menos 5 unidades de monossacarídeo menor do que a DP média de oligossacarídeo não digerível B, preferivelmente pelo menos 10, ainda mais preferivelmente pelo menos 15. Preferivelmente, oligossacarídeo não digerível A tem um grau DP médio de 2-10, mais preferivelmente 3-5.

Preferivelmente oligossacarídeo não digerível B tem um grau DP médio abaixo de 200, mais preferivelmente 11-60, ainda mais preferivelmente 20-30. Incluindo um oligossacarídeo não digerível com um grau aumentado de polimerização reduz a carga osmótica, que é vantajosa para uma nutrição para lactente e/ou melhora estimulação prebiótica da microbiota intestinal também em partes mais distais do cólon. Os oligossacarídeos não digeríveis A e B com uma DP diferente pode ter a mesma ou diferente composição de monossacarídeo. Preferivelmente, oligossacarídeos não digeríveis A e B tem uma composição de monossacarídeo diferente e uma DP diferente.

[00030] Preferivelmente pelo menos 80 % em peso, mais preferivelmente pelo menos 95% em peso, mais preferivelmente pelo menos 98% em peso do peso cumulativo de oligossacarídeos não digeríveis A e B tem uma DP abaixo de 60, mais preferivelmente abaixo de 40, mais preferivelmente abaixo de 20. A menor DP vantajosamente reduz viscosidade e aumenta fermentabilidade dos oligossacarídeos não digeríveis. Preferivelmente pelo menos 50 % em peso, preferivelmente pelo menos 75 % em peso do peso cumulativo de oligossacarídeos não digeríveis A e B são oligossacarídeos não digeríveis com uma DP de 2-8. Usando uma mistura com uma porcentagem de peso elevada de pequenos oligossacarídeos não digeríveis a fermentabilidade e efeito estimulatório no crescimento das bactérias de ácido lático e bifidobactérias é aumentado.

[00031] Em uma outra forma de realização preferida da presente invenção, a porcentagem de pelo menos uma ligação glicosídica de oligossacarídeo não digerível A com base nas ligações glicosídicas totais de oligossacarídeo não digerível A é pelo menos 40% maior ou menor do que a porcentagem da mesma ligação glicosídica em oligossacarídeo B, preferivelmente pelo menos 50%, ainda mais preferivelmente pelo menos 75%. O termo “ligação glicosídica” como usado na presente invenção refere-se a uma ligação C-O-C formada entre os anéis de dois monossacarídeos

cíclicos pela eliminação de água. Uma diversidade aumentada em ligações glicosídicas estimula uma faixa mais ampla de bactérias benéficas. Ligações glicosídicas diferem em que elas covalentemente ligam átomos de carbono nas unidades de monossacarídeo em posições diferentemente numeradas, e/ou que elas formam ligações α ou β . Exemplos de ligações glicosídicas diferentes ocorrendo em sacarídeos não digeríveis são ligações $\beta(1,3)$, $\alpha(1,4)$, $\beta(2,1)$, $\alpha(1,2)$, e $\beta(1,4)$. Preferivelmente as ligações glicosídicas em oligossacarídeo não digerível a compreende pelo menos 40% de ligações glicosídicas $\beta(1,4)$ e/ou $\beta(1,6)$, mais preferivelmente pelo menos 75%. As ligações glicosídicas em oligossacarídeo não digerível B preferivelmente compreendem pelo menos 40% de ligações glicosídicas $\beta(2,1)$, mais preferivelmente pelo menos 75%. Preferivelmente, oligossacarídeos não digeríveis A e B diferem em composição de unidade de monossacarídeo e em tipo de ligação glicosídica. Preferivelmente, oligossacarídeos não digeríveis A e B diferem em tipo de ligação glicosídica e DP. Mais preferivelmente, oligossacarídeos não digeríveis a e b diferem em tipo de ligação glicosídica, composição de monossacarídeo e DP, a fim de otimamente melhorar a biodiversidade e estimular o crescimento de múltiplos organismos intestinais, especialmente espécies diferentes de *Bifidobacterium*.

[00032] Preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 75% ainda mais preferivelmente 90%, mais preferivelmente 98% das unidades de monossacarídeos totais de oligossacarídeos não digeríveis A e B são monossacarídeos selecionados dentre o grupo consistindo de galactose (gal), frutose (fru) e glicose (glu) monossacarídeos.

[00033] Oligossacarídeo não digerível A é preferivelmente um oligossacarídeo selecionados dentre o grupo consistindo de β -galacto-oligossacarídeo, α -galacto-oligossacarídeo, e galactano. De acordo com uma forma de realização mais preferida oligossacarídeo não digerível A é β -

galacto-oligossacarídeo ou transgalacto-oligossacarídeo. Preferivelmente oligossacarídeo não digerível A compreende galacto-oligossacarídeos com ligações glicosídicas $\beta(1,4)$ e/ou $\beta(1,6)$ e uma glicose terminal. Transgalacto-oligossacarídeo é por exemplo, disponível sob o nome comercial Vivinal®GOS (Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Holanda), Bi2muno (Clasado), Cup-oligo (Nissin Sugar) e Oligomate55 (Yakult).

[00034] Oligossacarídeo não digerível B é preferivelmente fruto-oligossacarídeo. Um fruto-oligossacarídeo pode em outro contexto ter nomes como frutopolissacarídeos, oligofrutose, polifrutose, polifrufructano, inulina, levano e frutano e podem referir-se a oligossacarídeos compreendendo unidades de fucose β ligadas, que são preferivelmente ligadas por ligações glicosídicas $\beta(2,1)$ e/ou $\beta(2,6)$, e uma DP preferível entre 2 e 200. Preferivelmente, o fruto-oligossacarídeo contém uma glicose ligada glicosídica $\beta(2,1)$ terminal. Preferivelmente, o fruto-oligossacarídeo contém pelo menos 7 unidades de frutose β ligadas. Em uma outra forma de realização preferida inulina é usada como oligossacarídeo não digerível B. Inulina é um tipo de fruto-oligossacarídeo onde pelo menos 75% das ligações glicosídicas são ligações $\beta(2,1)$. Tipicamente, inulina tem uma cadeia longa média entre 8 e 60 unidades de monossacarídeo. Um fruto-oligossacarídeo apropriado para uso nas composições da presente invenção é comercialmente disponível sob o nome comercial Raftiline®HP (Orafti). Outras fontes apropriadas são raftilose (Orafti), fibrulose e fibrulina (Cosucra) e Frutafit e frutalose (Sensus).

[00035] Mais preferido é transgalacto-oligossacarídeo com um grau DP médio abaixo de 10, preferivelmente abaixo de 6 como oligossacarídeo não digerível A e um fruto-oligossacarídeo com um grau DP médio acima de 7, preferivelmente acima de 11, ainda mais preferivelmente acima de 20, como oligossacarídeo não digerível B, uma vez que tal combinação foi verificada como sendo ótima para melhorar a microbiota

intestinal.

[00036] Se a composição compreende oligossacarídeos não digeríveis A e B, a relação em peso de oligossacarídeo não digerível A para oligossacarídeo não digerível B é preferivelmente de 1/99 a 99/1, mais preferivelmente de 1/19 a 19/1, ainda mais preferivelmente de 1 a 19/1. Esta relação em peso é particularmente vantajosa quando oligossacarídeo não digerível A tem um grau DP baixo e oligossacarídeo não digerível B tem um grau DP relativamente alto. Assegura-se um ótimo equilíbrio entre osmolalidade e fermentabilidade. Assegura-se também um efeito ótimo da diversidade em composição de monossacarídeo, ligações glicosídicas e/ou grau de polimerização. Preferivelmente oligossacarídeo A é um transgalacto-oligossacarídeo e oligossacarídeo B é um fruto-oligossacarídeo

[00037] Assim, acordo com uma forma de realização, a presente nutrição para lactente compreende oligossacarídeos não digeríveis A e B, onde oligossacarídeos não digeríveis A e B diferem quer:

i) na porcentagem de pelo menos um monossacarídeo de oligossacarídeo A com base nas unidades de monossacarídeo total de oligossacarídeo A, o monossacarídeo sendo pelo menos 40 % em número maior do que a porcentagem do mesmo monossacarídeo em oligossacarídeo B; e/ou

ii) na porcentagem de pelo menos uma ligação glicosídica de oligossacarídeo A com base nas ligações glicosídicas totais de oligossacarídeo A, a ligação glicosídica sendo pelo menos 40% maior do que a porcentagem da mesma ligação glicosídica em oligossacarídeo B; e/ou

iii) no grau de polimerização de oligossacarídeo A, grau de polimerização de oligossacarídeo A sendo pelo menos 5 unidades de monossacarídeo menor do que o grau de polimerização de oligossacarídeo B.

[00038] Em uma forma de realização preferida, a presente composição ainda compreende um oligossacarídeo não digerível C. O

oligossacarídeo não digerível C compreende oligossacarídeo de ácidos urônicos. O termo oligossacarídeo de ácido urônico como usado na presente invenção refere-se a um oligossacarídeo onde pelo menos 50 % em número das unidades de monossacarídeo presente no oligossacarídeo é um selecionado dentre o grupo consistindo de ácido gulurônico, ácido mannurônico, ácido galacturônico, ácido idurônico, ácido riburônico e ácido glucurônico. Em uma forma de realização preferida o oligossacarídeo de ácido urônico compreende pelo menos 50 % em número de ácido galacturônico com base em unidades de ácido urônico totais no oligossacarídeo de ácido urônico. O oligossacarídeo de ácidos urônicos usado na invenção é preferivelmente preparado a partir da degradação de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurônicos, heparina, heparano, carboidratos bacterianos, e/ou sialoglicanos, mais preferivelmente de pectina e/ou alginato, ainda mais preferivelmente de pectina, mais preferivelmente ácido poligalacturônico. Preferivelmente a pectina degradada é preparada por hidrólise e/ou beta-eliminação de pectinas de fruta e/ou vegetais, mais preferivelmente pectina de maçã, cítrico e/ou beterraba, ainda mais preferivelmente pectina de maçã, cítrico e/ou beterraba degradada por pelo menos uma liase.

[00039] Preferivelmente a presente composição compreende entre 25 e 100 % em peso, mais preferivelmente entre 50 e 100 % em peso oligossacarídeo de ácido urônico com um DP de 2 a 250 com base no peso total de oligossacarídeo de ácido urônico na composição, mais preferivelmente um DP de 2 a 100, ainda mais preferivelmente um DP de 2 a 50, mais preferivelmente um DP de 2 a 20 com base no peso total de oligossacarídeo de ácido urônico na composição.

[00040] Em uma forma de realização preferida, pelo menos uma das unidades de ácido hexurônico terminal do oligossacarídeo de ácido urônico tem uma ligação dupla. A ligação dupla efetivamente protege contra a

fixação de bactérias patogênicas nas células epiteliais intestinais. Isso é vantajoso para lactentes. Preferivelmente uma das unidades de ácido hexurônico terminal compreende a ligação dupla de C₄-C₅. A ligação dupla em unidade de ácido hexurônico terminal pode, por exemplo, ser obtida por hidrólise enzimática de pectina com liase.

[00041] O oligossacarídeo de ácido urônico pode ser derivado. O oligossacarídeo de ácido urônico pode ser metoxilado e/ou amidado. Em uma forma de realização o oligossacarídeo de ácidos urônicos são caracterizados por um grau de metoxilação acima de 20%, preferivelmente acima de 50% ainda mais preferivelmente acima de 70%. Como usado aqui, "grau de metoxilação" (também referido como DE ou "grau de esterificação") é pretendido para significar a extensão para que grupos de ácido carboxílicos livres contidos no oligossacarídeo de ácido urônico foram esterificados (por exemplo, por metilação).

[00042] Preferivelmente a composição compreende oligossacarídeos não digeríveis como transgalacto-oligossacarídeo, fruto-oligossacarídeo e um produto de degradação de pectina. A relação em peso transgalacto-oligossacarídeo : fruto-oligossacarídeo : produto de degradação de pectina é preferivelmente (20 a 2) : 1 : (1 a 3), mais preferivelmente (12 a 7) : 1 : (1 a 2).

[00043] A presente composição preferivelmente compreende 0,05 a 20 % em peso de oligossacarídeo não digerível (A + B + C), mais preferivelmente 0,5 a 15 % em peso, ainda mais preferivelmente 1 a 10 % em peso, mais preferivelmente 2,0 a 10 % em peso com base no peso seco da presente composição.

Fórmula

[00044] A presente nutrição para lactente e criança na primeira infância é preferivelmente administrada enteralmente, mais preferivelmente oralmente. A presente nutrição para lactente e criança na

primeira infância é preferivelmente usada como uma fórmula para lactentes. A presente nutrição para lactente e criança na primeira infância pode vantajosamente ser aplicada como uma nutrição completa para lactentes. Tal alimento preferivelmente compreende lipídeo, proteína e carboidrato e é preferivelmente administrado em forma líquida. Preferivelmente a composição é um alimento líquido pronto para uso, por exemplo, é em uma forma líquida pronta para consumo. Um alimento líquido pronto para uso envelopado vantajosamente envolve menos etapas para preparação que um pó para ser reconstituído e por essa razão uma chance reduzida em contaminação por microorganismos prejudiciais.

[00045] Por esta razão, a presente invenção também refere-se a uma nutrição para lactente e criança na primeira infância que preferivelmente compreende entre 5 e 50 en% de lipídeo, entre 5 e 50 en% de proteína, entre 15 e 90 en% de carboidrato e *B. breve* não viável e oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C. Preferivelmente a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende entre 35 e 50 % Em de lipídeo, entre 7,5 e 12,5 en% de proteína e entre 35 e 80 en% de carboidrato (en% é uma abreviatura para porcentagem de energia e representa a quantidade relativa que cada constituinte contribui para o valor calórico total da preparação).

[00046] Preferivelmente a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende lipídeos. Preferivelmente a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende lipídeos vegetais. Preferivelmente o componente de lipídeo é uma combinação de lipídeos vegetais e pelo menos um óleo selecionado dentre o grupo consistindo de óleo de peixe, animal, alga e bacteriano. Preferivelmente, o lipídeo compreende acima de 50 mg/100 kcal (preferivelmente acima de 1 % em peso com base em ácidos graxos totais) ácido α -linolênico (ALA). Preferivelmente a composição de lipídeo tem uma razão de peso/peso de ácido linoléico (LA) e

ALA entre 4 e 15, mais preferivelmente entre 5 e 8. Preferivelmente a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA), mais preferivelmente ácido eicosapentanóico (EPA) e/ou ácido docosahexanóico (DHA), e/ou ácido araquidônico (ARA). Preferivelmente a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende, com base em ácidos graxos totais, 0,03 a 0,8 % em peso, mais preferivelmente 0,12 a 0,4 % em peso DHA. Preferivelmente a composição compreende com base em ácidos graxos totais, 0,01 a 0,2 % em peso, mais preferivelmente 0,03 a 0,1 % em peso EPA. Preferivelmente a composição compreende 0,03 a 1,6 % em peso, mais preferivelmente 0,12 a 0,8 % em peso de ARA com base em ácidos graxos totais. A presença de LC-PUFA vantajosamente reduz a permeabilidade intestinal ou melhora o sistema imune ou ambos, assim manifestando um efeito sinérgico com os outros componentes da invenção com relação a um efeito contra alergia, dermatite atópica, infecções e semelhantes.

[00047] Preferivelmente a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende proteínas. As proteínas usadas na preparação nutricional são preferivelmente selecionadas dentre o grupo consistindo de proteínas provenientes de animais não humanos (tais como proteínas do leite, incluindo caseínas e proteínas do soro do leite, proteínas da carne e proteínas do ovo), proteínas vegetais (tais como proteínas de soja, proteína do soro do leite, proteína do arroz, proteína de batata e proteína de ervilha), hidrolisados (parcialmente e/ou extensivamente), aminoácidos livres e misturas destes. Fontes de nitrogênio derivada de leite de vaca, particularmente proteínas de leite de vaca tais como caseína e proteínas do soro do leite são particularmente preferidas, como a composição de aminoácido dessas proteínas é bem balanceada. Como a presente composição é apropriadamente usada para reduzir a reação alérgica em um lactente e/ou criança na primeira

infância, a proteína da nutrição para lactente é preferivelmente selecionada dentre o grupo consistindo de proteína do leite hidrolisada (por exemplo, caseína hidrolisada e/ou proteína do soro do leite hidrolisada), proteína vegetal hidrolisada e/ou aminoácidos. O uso destas proteínas ainda reduz as reações alérgicas da lactente e/ou criança na primeira infância e/ou aumenta a absorção de proteína. Preferivelmente a fonte de proteína é extensivamente e/ou parcialmente hidrolisada. Mais preferivelmente a fonte de proteína é extensivamente proteína do soro do leite hidrolisada derivada de leite de vaca.

[00048] Preferivelmente a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende carboidratos digeríveis. Os carboidratos digeríveis usados na preparação nutricional são preferivelmente selecionados dentre o grupo consistindo de sacarose, lactose, maltose, galactose, glicose, frutose, sólidos de xarope de milho, amido e maltodextrinas, e misturas destes, mais preferivelmente lactose.

[00049] A presente nutrição para lactente e criança na primeira infância preferivelmente compreende minerais, elementos traço e vitaminas, colina, taurina, carnitina, mio-inositol e/ou misturas destes. Preferivelmente a presente composição contém taurina, que reduz os sintomas de asma (*Adv. Exp. Med. Biol.* 2003 526:403-10). A taurina age sinergisticamente com os componentes na presente nutrição para lactente e criança na primeira infância. Preferivelmente a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende nucleotídeos. Preferivelmente, a composição compreende 5'-monofosfato de citidina, uridina 5'-monofosfato, 5'-monofosfato de adenosina, 5'-monofosfato de guanosina, e 5'-monofosfato de inosina. Preferivelmente a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende 0,005 a 0,07, mais preferivelmente 0,01 a 0,035 % em peso de nucleotídeos com base em peso seco. A presença de nucleotídeos vantajosamente afeta o sistema imune, barreira intestinal e/ou microbiota intestinal. Assim, nucleotídeos são esperados para manifestarem

um efeito sinérgico com os outros componentes da invenção referindo-se a um efeito contra alergia, dermatite atópica, infecções e semelhantes. Preferivelmente a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância compreende ambos, LC-PUFA e nucleotídeos.

[00050] Preferivelmente, a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância é uma composição não fermentada. Fermentação por microorganismos resulta em um abaixamento do pH, o que pode ser desvantajoso para os dentes recentemente formados. Preferivelmente, a composição tem um pH acima de 5,5, mais preferivelmente 6,0, ainda mais preferivelmente 6,5 a fim de reduzir dano aos dentes. Preferivelmente a nutrição para lactente e criança na primeira infância tem um pH entre 6 e 8.

[00051] Preferivelmente, a presente nutrição para lactente e criança na primeira infância é uma composição fermentada. Preferivelmente a presente nutrição compreende um produto fermentado derivado do leite por *Bifidobacterium breve*, de que as células são inativadas após fermentação. O produto derivado de leite que foi fermentado por *B. breve* compreende fragmentos ou/e produtos *B. breve excretada*, tais como glicoproteínas, glicolipídeos, peptidoglicano, ácido lipoteicóico (LTA), lipoproteínas, polissacarídeos capsulares, e/ou DNA. Essas moléculas imunogênicas induzem a tolerância do trato intestinal contra colonização com bactérias produzindo ácido láctico. Além disso, na fermentação e/ou outras interações de *B. breve* com os produtos derivados do leite, compostos bioativos adicionais podem ser formados, tais como peptídeos bioativos e/ou oligossacarídeos, que também estimulam o sistema imune e/ou estimulam a colonização da microbiota intestinal. O produto derivado de leite é preferivelmente selecionado dentre o grupo consistindo de leite, caseína, proteína de caseína, hidrolisado de proteína de caseína, peptídeos de caseína, soro do leite, proteína do soro do leite, hidrolisado de proteína do soro do leite, peptídeos de soro do leite, e lactose ou misturas destes. Leite pode ser leite integral, leite

semi-desnatado e/ou leite desnatado. Soro do leite pode ser soro do leite doce, e/ou soro do leite ácido. Preferivelmente o substrato aquoso a ser fermentado é leite desnatado.

[00052] Irregularidades de fezes (por exemplo, fezes duras, volume de fezes insuficiente, diarréia) é um problema importante em muitos bebês. Verificou-se que problemas de fezes podem ser reduzidos administrando a presente combinação de *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível em um alimento líquido que tem uma osmolalidade entre 50 e 500 mOsm/kg, mais preferivelmente entre 100 e 400 mOsm/kg.

[00053] Em vista do acima, é também importante que a composição de alimento líquido não tenha uma densidade calórica excessiva, entretanto ainda provê calorias suficientes para alimentar o sujeito. Por essa razão, o alimento líquido preferivelmente tem uma densidade calórica entre 0,1 e 2,5 kcal/ml, ainda mais preferivelmente uma densidade calórica de entre 0,4 e 1,2 kcal/ml, mais preferivelmente entre 0,55 e 0,75 kcal/ml.

[00054] A presente nutrição para lactente e criança na primeira infância preferivelmente tem uma viscosidade entre 1 e 60 mPa.s, preferivelmente entre 1 e 20 mPa.s, mais preferivelmente entre 1 e 10 mPa.s, mais preferivelmente entre 1 e 6 mPa.s. A baixa viscosidade assegura uma administração adequada do líquido, por exemplo uma passagem adequada através do buraco de um mamilo. Também essa viscosidade proximamente assemelha-se à viscosidade de leite humano. Além disso, uma baixa viscosidade resulta em um esvaziamento gástrico normal e uma melhor ingestão de energia, que é essencial para lactentes e/ou crianças na primeira infância que necessitam da energia para crescimento e desenvolvimento ótimos. A presente composição é preferivelmente preparada misturando uma composição em pó compreendendo com água. Normalmente a fórmula para lactentes é preparada de tal maneira. A presente invenção deste modo também

se refere a uma composição em pó envelopada onde referido envelope é provido com instruções para misturar o pó com uma quantidade apropriada de líquido, assim resultando em uma composição líquida com uma viscosidade entre 1 e 60 mPa.s.

[00055] A viscosidade do líquido é determinada usando um physical rheometer mcr 300 (physical messtechnik gmbh, ostfilden, alemanha) em taxa de corte de 95 s⁻¹ a 20 oc.

[00056] A inclusão *B. breve* não viável aumenta a vida útil na prateleira de nutrição para lactente e criança na primeira infância em particular comparada com a nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo *B. breve* viável. Isso é particularmente vantajoso para nutrição líquida para lactente e criança na primeira infância. Deste modo a nutrição para lactente e criança na primeira infância de acordo com a presente invenção preferivelmente é estável na prateleira a temperatura ambiente durante pelo menos 6 meses, preferivelmente pelo menos 12 meses, preferivelmente quando a nutrição para lactente e criança na primeira infância é em uma forma pronta para alimentar líquida.

Aplicações

[00057] A nutrição para lactente e criança na primeira infância de acordo com a presente invenção foi encontrada para ser particularmente útil como uma nutrição para bebês nascidos prematuramente, bebês nascidos maturamente (de parto vaginal bem como crianças de parto de parto cesariano), crianças que estão no período de adaptação a alimento sólido, lactentes e/ou crianças na primeira infância com um risco aumentado para ou sofrendo de alergia, e/ou lactentes e/ou crianças na primeira infância com um risco aumentado para infecções, tais como lactentes e/ou crianças na primeira infância atendidas em centros de cuidado diário, ou sofrendo de infecções. A invenção é particularmente vantajosa para crianças nascidas de parto vaginal. A invenção é particularmente vantajosa para crianças de parto

cesariano uma vez que estas crianças têm uma colonização microbiana prejudicada do intestino grosso.

[00058] Por essa razão, a presente invenção provê um método para prover nutrição a um lactente e/ou criança na primeira infância humana, referido método compreendendo administrar à lactente e/ou criança na primeira infância a presente composição. Preferivelmente a lactente e/ou criança na primeira infância tem uma idade entre 0 e 36 meses, ainda mais preferivelmente entre 0 e 18 meses, mais preferivelmente entre 0 e 12 meses. Em uma forma de realização preferida a presente invenção provê um método para prover uma nutrição a uma criança humana com a idade de 0-12 meses. Em uma forma de realização preferida a presente invenção provê um método para prover nutrição a uma criança humana entre um e três anos com a idade de 12-36 meses.

[00059] A presente invenção também provê um método para estimular a saúde de um lactente e/ou criança na primeira infância, compreendendo administrar uma composição compreendendo *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C à lactente e/ou criança na primeira infância.

[00060] A presente invenção assim também provê um método para estimular a saúde em um lactente e/ou criança na primeira infância compreendendo as etapas a) misturar i) em um líquido nutricionalmente ou farmacologicamente aceitável particular; e ii) uma composição seca, onde a composição seca II compreende *B. breve* e um oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C, e etapa b) administrar a composição obtida na etapa a) a um lactente e/ou criança na primeira infância.

[00061] Administração de uma nutrição para lactente compreendendo *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível vantajosamente resulta em melhora da microbiota intestinal aumentando os

números de bactérias produzindo ácido lático e/ou diminuindo os números de bactérias patogênicas e/ou por estimulação do sistema imune. Preferivelmente, uma nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo *B. breve* não viável e oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C é usada em um método para tratamento e/ou prevenção de distúrbios gastrointestinais e/ou distúrbios imune em lactentes e/ou crianças na primeira infância, referido método compreendendo administrar referida composição a um lactente e/ou criança na primeira infância.

[00062] Particularmente alergia (mais particularmente alergia a alimentos), rinite alérgica, hipersensitividade de alimento, dermatite atópica, isto é eczema alérgico ou atópico, particularmente pele sarmentada causada por dermatite, conjuntivite alérgica, asma, ofegância particularmente causada por asma, diarreia, inflamação intestinal, infecções, constipação, cólicas intestinais e/ou cólicas, podem ser apropriadamente tratados com a presente nutrição. Em uma forma de realização preferida, a presente invenção provê um método para o tratamento e/ou prevenção de (alimento) alergia, rinite alérgica, hipersensitividade de alimento, eczema (isto é dermatite atópica), asma, diarreia, inflamação intestinal, e/ou infecção. Preferivelmente a presente invenção provê um método para o tratamento e/ou prevenção de infecção e/ou diarreia. Em uma forma de realização preferida, a presente invenção provê um método para o tratamento e/ou prevenção de (alimento) alergia, asma e/ou dermatite atópica. A ocorrência reduzida dessas doenças é devido à microbiota melhorada, sistema imune melhorado e/ou translocação intestinal de alérgenos através da barreira de intestino. Em uma forma de realização a composição é usada para melhorar a pele e reduzir a coceira da pele em um lactente e/ou criança na primeira infância. Em uma forma de realização a composição é usada para reduzir ofegância em um lactente e/ou criança na primeira infância.

[00063] Além disso, a administração de uma nutrição para

lactente e criança na primeira infância compreendendo resistência à *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível ao sistema imune. Em uma forma de realização, uma nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C é usada em um método para tratamento ou prevenção de infecções sistêmica e/ou respiratórias e/ou inflamação em lactentes e/ou crianças na primeira infância, referido método compreendendo administrar referida nutrição para lactente a uma criança e/ou a criança entre um e três anos.

[00064] Preferivelmente uma nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C é usada em um método para tratamento ou prevenção de dermatite de fralda (ou erupções de fralda, assadura de fraldas, dermatite de fralda), em lactentes e/ou crianças na primeira infância, referido método compreendendo administrar referida nutrição para lactente a uma criança e/ou uma criança entre um e três anos.

[00065] Preferivelmente uma nutrição para lactente e criança na primeira infância compreendendo *B. breve* não viável e um oligossacarídeo não digerível A e/ou B e opcionalmente C é usada em um método para tratamento ou prevenção de cólica e/ou cólicas abdominais, inchaço abdominal, flatulência, dor abdominal, constipação, doença inflamatória intestinal, síndrome intestinal irritável, e/ou para melhora de mineralização de osso, e/ou prevenção de obesidade tardia em vida (particularmente obesidade central), em lactentes e/ou crianças na primeira infância, referido método compreendendo administrar referida nutrição para lactente a uma criança e/ou a criança entre um e três anos.

[00066] Neste documento e em suas reivindicações, o verbo "compreender" e suas conjugações é usado em seu sentido não limitante para significar que itens seguindo a palavra são incluídos, mas itens não

especificamente mencionados não são excluídos. Além disso, referência a um elemento pelo artigo indefinido "um" ou "um" não exclui a possibilidade de que mais do que um do elemento está presente, a menos que o contexto claramente dite a ocorrência de um ou apenas um dos elementos. O artigo indefinido "um" ou "uma" deste modo geralmente significa "pelo menos um".

EXEMPLOS

Exemplo 1: *B. breve* não viável tem um efeito anti-alérgico

[00067] Camundongos BALB/c machos (6-8 semanas) foram obtidos de Charles River (Someren, Holanda). Camundongos foram alojados individualmente em gaiolas de tipo II com alimento semi-sintético (AING93) com base na formulação de crescimento do American Institute of Nutrition (1993) e água ambos providos *ad libitum*. Os camundongos foram divididos nos grupos de tratamento diferentes A-D (N=6) e cada grupo foi dividido em dois grupos de 3 animais por grupo. O segundo grupo iniciou com um atraso de um dia.

[00068] Sensibilização ativa foi realizada por duas injeções intraperitoneais no dia 0 e dia 7. Os camundongos do grupo de controle negativo (grupo A) foram sensibilizados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 2,25 mg de hidróxido de alumínio e 2,25 de hidróxido de magnésio como adjuvante (Alum inject, Pierce) em um volume de 100 µl por injeção de i.p.. Camundongos de outros grupos foram sensibilizados com 10 µg de ovalbumina (OVA) em PBS (0,2 µm filtrada) contendo 2,25 mg de hidróxido de alumínio e 2,25 mg de hidróxido de magnésio (Alum Imject, Pierce) em um volume de 100 µl por injeção de i.p..

[00069] Quatro semanas após a última injeção (em dia 35, 38 e 41), os camundongos de grupos b, c, e d foram expostos durante 20 minutos a ovalbumina aerossolizada (10 mg/ml) (totalmente 3 vezes um aerossol por 20 minutos). Camundongos de grupo a foram expostos a solução salina aerossolizada. Os aerossóis foram gerados com um nebulizador a jato (pari is-

2, pari-werk gmbh, starnberg, alemanha, tamanho de partícula 2-3 microns) conectado a uma gaiola tipo macrolon em que os camundongos foram colocados.

[00070] Iniciando no dia 28 e terminando no dia 42, os camundongos foram tratados oralmente cada dia: camundongos de grupo a e b receberam 200 µL de nacl/dia. camundongos de grupo c receberam 109 cfu de *Bifidobacterium breve* m16-v em 200 µL de solução salina e camundongos de grupo d receberam a mesma quantidade de bactérias como em grupo c com a diferença que foi desativado por calor durante 10 minutos a 90°C. Composição c compreendeu menos do que 103 cfu *B. breve* viva por grama de peso seco (isto é abaixo do limite de detecção). Composição c compreendeu *B. breve* inativada em uma quantidade equivalente a 109 cfu *B. breve*.

[00071] No dia 41, a espessura de ouvido basal foi determinada usando um paquímetro carregado por mola (Mitutoyo, Veenendaal, Holanda). Subsequentemente, os camundongos foram desafiados injetando 20 µl de OVA (40 µg/ml em PBS) intracutaneamente na aurícula da orelha de ambos os ouvidos após animais serem anestesiados por isoflurano, O₂ e N₂O. Medições duplas de ambos os ouvidos foram tomadas antes e 1, 6 e 24 horas após o desafio de OVA sob anestesia dos animais

[00072] Os resultados são mostrados na tabela 1.

[00073] O controle negativo mostrou um aumento de espessura de ouvido de cerca de 20% comparado ao controle positivo, que foi configurado a 100%. Tratamento com *B. breve* viável mostrou apenas um aumento de 45% de espessura de ouvido. Isto indica uma redução da reação alérgica de cerca de 70% comparado ao controle positivo e negativo. *B. breve* não viável resultou em um aumento de 60 % de espessura de ouvido. Isto indica uma redução da reação alérgica de cerca de 52 % comparada ao controle positivo e negativo. Estes resultados são indicativos de um efeito de

melhora anti-alérgica e/ou imune com *B. breve* não viável em uma extensão comparável (cerca de 75%) de células *B. breve* viáveis. Isso é surpreendente uma vez que a *B. breve* inativada não é esperada para ter tal efeito uma vez que não pode ter um efeito através de melhora da flora.

Tabela 1: Porcentagem de aumento de espessura de ouvido devido à reação alérgica a ovalbumina em camundongos balb/c.

Grupo de tratamento de camundongos	Aumento relativo do ouvido em % (s.e.)	Redução relativa em reação alérgica em %
Grupo A, Controle negativo	20,49 (9,83)	100
Grupo B, Controle positivo	100 (6,86)	0
Grupo C, tratamento com <i>B. breve</i> viva	45,13 (8,64)*	69
Grupo D, tratado com <i>B. breve</i> não viável	58,60 (13,12)*	52

*p < 0,05 comparado a controle positivo.

Exemplo 2A combinação de *B. breve* não viável e oligossacarídeos não digeríveis tem um efeito anti-alérgico aumentado comparado aos componentes simples.

[00074] Camundongos CH3/HeOuJ (3-5 semanas) foram obtidos de Charles River. Camundongos foram alojados individualmente em gaiolas tipo II com alimento livre de proteína de leite de vaca semi-sintética e água ambas providas *ad libitum*. Os camundongos foram divididos nos grupos de tratamento diferentes A-E (N=6) por 2 semanas. Os grupos de tratamento diferentes A-E (N=6) foram um grupo de controle negativo (grupo A), um grupo de controle positivo (Grupo B), um grupo recebendo 2×10^9 CFU de *Bifidobacterium breve* M16-V, desativado por calor por 10 minutos a 90 °C, por g de dieta (grupo C), um grupo recebendo 20 mg de oligossacarídeos não digeríveis (TOS (derivado de Vivinal GOS, Borculo Domo) e lcFOS (Raftilin HP, Orafti) em uma relação em peso/peso de 9/1 por g de dieta (Grupo D), e um grupo recebendo tanto *B. breve* inativada por calor como oligossacarídeos não digeríveis (Grupo E). A dieta de grupo C e D compreende deste modo *B. breve* inativada em uma quantidade equivalente a 2×10^9 CFU por g de dieta. A composição compreende menos do que 1.10^3 cfu de *B. breve* viva/g de

dieta (que é abaixo do limite de detecção).

[00075] Sensibilização ativa foi realizada por sonda intragástrica no dia 14, 21, 28, 35, 42 e 49 com 0,5 ml de proteína de soro do leite (DMV International, Veghel, 40 mg de proteína do soro do leite /ml PBS, com toxina de cólera, 20 µg/ml de PBS, como um adjuvante.) Os camundongos do grupo de controle negativo (grupo A) foram sensibilizados com PBS (solução salina tamponada com fosfato) contendo toxina de cólera como adjuvante.

[00076] No Dia 54, Os Camundongos De Grupos A, B, C, D E E Foram Desafiados Com Injeção intradérmica de 20 µL de proteína de soro do leite (0,5 mg de proteína/ml pbs) na aurícula esquerda da orelha. No ouvido direito como uma pbs de controle foi injetada. Espessura De Ouvido Foi Medida Em Duplicata Usando Um Micrômetro Digital (Mitutoyo, Veendaal) a t=0 e t=1. a t=0 e ouvido direito de controle aumentando foi subtraído da espessura medida no ouvido esquerdo a t=1.

[00077] Os resultados são mostrados na tabela 2. O controle negativo mostrou um aumento de espessura de ouvido de 36,0 µm (configurado a 0%) comparado ao controle positivo, 159,9 µm, que foi configurado a 100%. Tratamento com *B. breve* não viável mostrou apenas um aumento de espessura de ouvido de 116,0 µm. Isso indica uma redução da reação alérgica de cerca de 35% comparado ao controle positivo e negativo. O uso de oligossacarídeos não digeríveis resultou em um aumento de 103,8 µm de espessura de ouvido. Isso indica uma redução da reação alérgica de cerca de 45 % comparado ao controle positivo e negativo. A combinação de *B. breve* não viável e oligossacarídeos não digeríveis resultaram em um aumento de espessura de ouvido de apenas 80,4. Isto indica uma redução melhorada inesperada de reação alérgica de 64% comparado ao controle positivo e negativo.

Tabela 2: Aumento médio de espessura de ouvido devido à reação alérgica a

proteína de soro do leite em camundongos.

Grupo de tratamento de camundongos	Aumento do ouvido em μm (s.e.)	Redução relativa em reação alérgica em %
Grupo A, Controle negativo	36,0 (5,7)*	100
Grupo B, Controle positivo	159,9 (12,2)	0
Grupo C, tratamento com <i>B. breve</i> não viável	116,0 (12,2)*	35
Grupo E, tratado com <i>B. breve</i> não viável e prebióticos	80,4 (10,8)*	64

* $p < 0,05$ comparado a controle positivo.

[00078] Estes resultados são indicativos de um efeito melhorado inesperado com a combinação de oligossacarídeos não digeríveis e *B. breve* não viável comparados aos componentes simples. Isso é inesperado, uma vez que a *B. breve* inativada não pode metabolizar os oligossacarídeos não digeríveis.

Exemplo 3: Leite líquido para criança entre um e três anos com *B. breve*

[00079] Um leite de crescimento líquido pronto para beber compreendendo por 100 ml:

- 67 kcal
- 1,9 g proteína (proteína de leite de vaca)
- 8,1 g carboidratos digeríveis (de que 7,8 g lactose)
- 3,0 g gordura
- 0,8 g oligossacarídeos não digeríveis:
 - 0,72 galacto-oligossacarídeos derivados de Vivival GOS
 - 0,08 g frutano derivado de RaftilinHP
- $5,10^9$ cfu equivalente de *Bifidobacterium breve* não viável

por aquecimento

pH cerca de 6,7

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância, caracterizada pelo fato de compreender:

-um oligossacarídeo não digerível A e um oligossacarídeo não digerível B, cada um tendo um grau de polimerização de 2 a 200, em que o um oligossacarídeo não digerível A é um transgalacto-oligossacarídeo e o oligossacarídeo não digerível B é um fruto-oligossacarídeo, e em que a razão em peso entre o oligossacarídeo não digerível A e B é de 19/1 a 1/19, e

-*Bifidobacterium breve* não viável selecionado da cepa M-16V e cepa I-2219 em uma quantidade equivalente a 10^5 a 10^{13} cfu de *B. breve* por g de peso seco da composição para lactente e/ou criança na primeira infância, e compreendendo uma quantidade de *Bifidobacterium breve* viável menor do que 10^3 cfu *B. breve* por g de peso seco da composição para lactente e/ou criança na primeira infância.

2. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de estar em uma forma líquida pronta para consumo.

3. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de ainda compreender uma fonte de proteína extensivamente e/ou parcialmente hidrolisada.

4. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ser uma composição não fermentada para lactente e/ou criança na primeira infância.

5. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o pH da composição está entre 6 e 8.

6. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância

de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o grau de polimerização do oligossacarídeo A é pelo menos 5 unidades de monossacarídeo menor do que o grau de polimerização do oligossacarídeo B.

7. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de compreender 0,5 a 10 % em peso de oligossacarídeo não digerível com base no peso seco da composição para lactente e/ou criança na primeira infância.

8. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ainda compreender ácido eicosapentanóico (EPA) e/ou ácido docosahexanóico (DHA), e/ou ácido araquidônico (ARA).

9. Composição para lactente e/ou criança na primeira infância de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ainda compreender entre 5 e 50 em % lipídeo, entre 5 e 50 em % proteína, entre 15 e 90 em % carboidrato.

10. Uso de um oligossacarídeo não-digerível e de bifidobactéria não viável, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma composição para lactente e/ou criança na primeira infância conforme definida em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a composição é para prover nutrição a um lactente e/ou criança na primeira infância.

11. Uso de uma composição para para lactente e/ou criança na primeira infância como definida em qualquer uma das reivindicações 1-9, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma composição para tratamento e/ou prevenção de alergia, preferivelmente alergia a alimentos e/ou doenças atópicas incluindo eczema e/ou asma.