



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1369432 E**

(51) Classificação Internacional:
C08B 30/18 (2006.01) **C12P 19/18** (2006.01)
A61M 1/28 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: 2003.06.03	(73) Titular(es): ROQUETTE FRÈRES F-62136 LESTREM	FR
(30) Prioridade(s): 2002.06.06 FR 0206952		
(43) Data de publicação do pedido: 2003.12.10	(72) Inventor(es): DANIEL BACKER MARIE-HÉLÈNE SANIEZ	FR FR
(45) Data e BPI da concessão: 2006.08.09 012/2006	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **POLÍMEROS SOLÚVEIS DE GLUCOSE ALTAMENTE RAMIFICADOS E O SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO**"POLÍMEROS SOLÚVEIS DE GLUCOSE ALTAMENTE RAMIFICADOS E O SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO"**

A invenção está relacionada com polímeros solúveis de glucose altamente ramificados que têm um teor de açúcares redutores inferior a 1%, caracterizados pelo facto de apresentarem uma taxa de ligações α -1,6 glucosídicas superior a 10%, de preferência compreendidas entre 12 e 30%, um Mw de um valor compreendido entre $0,35 \cdot 10^5$ e $2 \cdot 10^5$ daltons e uma osmolalidade de um valor compreendido entre 1 e 15 mOsm/kg. A invenção relaciona-se também com o seu processo de produção e com a sua aplicação nas indústrias de Papel-Cartão, Têxtil, Cosmética, e particularmente na indústria Farmacêutica e Alimentar, e ainda mais particularmente nos domínios da nutrição entérica e parentérica, na diálise peritoneal, como agente inibidor e/ou regulador da glicémia, como fornecedor energético em caso de actividades físicas e como agente regulador da digestão.

DESCRIÇÃO**"POLÍMEROS SOLÚVEIS DE GLUCOSE ALTAMENTE RAMIFICADOS E O SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO"**

A invenção está relacionada com polímeros solúveis de glucose altamente ramificados que têm um teor de açúcares redutores inferior a 1%, e que apresentam uma taxa de ligações glucosídicas α -1,6 marcadamente elevada, superior a 10%, para uma distribuição de peso molecular muito estreita, compreendida entre $0,3 \cdot 10^5$ e $2 \cdot 10^5$ daltons e uma osmolalidade muito baixa, compreendida entre 1 e 15mOsm/kg.

Estes polímeros solúveis de glucose ramificados apresentam além disso uma viscosidade baixa e uma ausência de retrogradação, mesmo após armazenagem a frio após períodos de tempo longos.

A invenção está igualmente relacionada com um processo para fabricar os referidos polímeros solúveis de glucose altamente ramificados.

Está relacionada ainda com composições que compreendem estes polímeros solúveis de glucose ramificados que podem ser utilizados em numerosas aplicações industriais, e em particular nas indústrias alimentares e sobretudo nas indústrias farmacêuticas.

Os polímeros de glucose classicamente acessíveis industrialmente são em particular preparados por hidrólise de amidos naturais ou híbridos e dos seus derivados.

Os hidrolisados de amido correntes são assim produzidos por hidrólise ácida ou enzimática de amido de cereais ou de tubérculos. São na realidade uma mistura de glucose e polímeros de glucose de pesos moleculares extremamente variado.

Estes hidrolisados de amido (dextrinas, maltodextrinas...) que são produzidos na indústria (com um certo Grau de Polimerização ou DP médio) consistem numa vasta distribuição de sacáridos que contêm estruturas lineares (ligações glucosídicas α -1,4) e estruturas ramificadas (ligações glucosídicas α -1,6).

Estes hidrolisados de amido, e em particular as maltodextrinas, são utilizados como transportador ou agente de enchimento, como agente texturante, como suporte de secagem por pulverização, como agentes substituinte de matéria gorada, como agente formador de película, como agente de controlo de congelação, agente anti-cristalizante ou pelo seu valor nutricional.

Além disso os especialistas na técnica sabem que a composição sacarídica das maltodextrinas determina as suas propriedades físicas e biológicas.

Assim, a sua higroscopicidade, a sua fermentabilidade em produtos alimentares, a sua viscosidade, o seu carácter edulcorante, a sua estabilidade, o seu carácter gelificante e a sua osmolalidade são os critérios que são classicamente determinados pelos seus diferentes domínios de aplicação.

O conhecimento básico do comportamento psicoquímico destes sacáridos leva assim a integrá-los por exemplo em bebidas para desportistas, bebidas líquidas com solubilidade limitada, líquidos parentéricos e entéricos ou em alimentos para diabéticos.

Como resultado, para estas aplicações diferentes, são requeridas várias propriedades físicas e biológicas.

É por exemplo sabido que a taxa de absorção destes sacáridos é determinada pela taxa de esvaziamento gástrico e pela taxa de absorção intestinal, cujo controlo é assegurado pela osmolalidade dos referidos sacáridos.

Ao nível intestinal, as maltodextrinas são hidrolisadas pela α -amilase pancreática, o que faz com que o seu tamanho seja reduzido para as dextrinas limite, e um certo número de enzimas ligadas à membrana mucosa intestinal (maltase, sucrase e α -dextrinase) continuam a hidrolisar os sacáridos lineares e ramificados em glucose.

Enquanto que a glucose atravessa facilmente a barreira intestinal (difusão passiva), o mesmo não é verdade em relação aos sacáridos com um DP baixo. Assim, os oligossacáridos lineares serão adsorvidos mais rapidamente do que os oligossacáridos ramificados, apesar de a maltose e a maltotriose serem absorvidas mais rapidamente do que a glucose.

As bactérias do cólon fermentarão todos os hidratos de carbono que não são adsorvidos pelo intestino delgado. A fermentação excessiva por estas bactérias resultará em desordens intestinais como caimbras e flatulência.

É também sabido que a osmolalidade influencia a taxa de absorção/secreção de água no intestino delgado. Quanto maior for a osmolalidade de um composto, mais ele induz a entrada de fluido no intestino e leva a perturbações graves do intestino (diarreia osmótica), com perda concomitante de fluidos e electrólitos.

A osmolalidade de uma solução é igual à quantidade de moles dissolvidos por kg de água, implicando que à mesma concentração em peso seco, a osmolalidade de uma maltodextrina clássica aumenta com o decréscimo do seu DP.

De um modo geral, as maltodextrinas são bem absorvidas pelo corpo humano, mas em condições físicas mais extremas, como exercício desportivo ou doença, deverá ser proporcionado um fornecimento melhor de hidratos de carbono.

Por exemplo, nos desportistas, uma bebida consumida durante a actividade física que requer um grande esforço deve proporcionar instantaneamente a energia e água necessárias para compensar a perda de fluido através da transpiração.

Resulta do que foi anteriormente referido acima que uma composição que seja equilibrada em hidratos de carbono é essencial a fim de obter um tal resultado.

Uma solução que é convencionalmente proposta para a bebida óptima é escolher oligossacáridos lineares curtos de DP 3 a 6, uma vez que são absorvidos à frequência mais elevada, mantendo a osmolalidade a um nível moderado, evitando assim a perda de fluidos e os efeitos secundários como diarreia e caimbras.

No entanto, estas composições têm a desvantagem de constituírem fontes de energia que são assimiladas pelo organismo de uma forma demasiada instantânea, o que resulta em dificuldades de manter um fornecimento energético constante durante períodos de tempo longos.

Assim, o pedido de patente WO 95/22 562 propõe novos derivados de amido destinados a fornecer energia para preparação de ou após um esforço físico.

Tratam-se de dextrinas, caracterizadas pelos seu

peso molecular compreendido entre $15 \cdot 10^3$ e 10^7 daltons e um grau de ramificação glucosídica 1,6 compreendido entre 2 e 8%, preferencialmente compreendido entre 3 e 7%, que asseguram uma renovação das reservas energéticas sob a forma de glicogénio.

Na sua forma líquida, estas dextrinas específicas passam no intestino delgado após um rápido esvaziamento gástrico. Esta via é além disso regulada pela osmolalidade das referidas dextrinas.

Uma osmolalidade elevada significa aqui que as substâncias de baixo peso molecular se ligam à água, o que torna difícil o transporte da água e dos nutrientes na célula. A osmolalidade do sangue é aproximadamente 300 mOsm/l, e com o objectivo de facilitar o transporte dos nutrientes, é desejável que a osmolalidade da substância seja consideravelmente abaixo deste valor.

Uma dextrina de acordo com o WO 95/22 562, com um peso molecular médio de cerca de 720 000 e um grau de ramificação de cerca de 4% está descrita como tendo uma osmolalidade de 20 mOsm/kg sol.

Além disso, estas dextrinas são preparadas por tratamento ácido do amido nativo, mais particularmente amido de batata, em condições de temperatura elevada, *i.e.*, 110 a 140°C, e num tempo reaccional de 1 a 15 horas, que leva a um grau de ramificação 1,6 que corresponde às ligações glucosídicas α -1,6 e β -1,6.

Estas ligações glucosídicas atípicas não são digeridas pelos sistemas enzimáticos do intestino, e podem conduzir à acumulação de resíduos não digeríveis que determinadas bactérias indesejáveis vão assimilar.

Em outra área de aplicação, as maltodextrinas são frequentemente adicionadas a bebidas a fim de aumentar a sua viscosidade. Porém, naquelas que contêm álcool, o fornecimento de MD com um DP elevado pode causar problemas de estabilidade da mistura.

Outra solução que consiste em adicionar maltose ou glucose, o que no entanto leva à adição de um sabor mais açucarado à mistura, o que nem sempre é desejado. Além disso, esses pequenos oligossacáridos podem servir de substratos de fermentação para microrganismos indesejáveis.

As maltodextrinas mais adaptadas a estas áreas de aplicação devem portanto combinar e equilibrar os parâmetros de "não serem açucaradas", viscosidade e estabilidade.

No domínio das soluções parentéricas, são concebidas soluções nutritivas para manter um doente em boa saúde e para lhe fornecer os nutrientes quando ele não pode ser alimentado através do seu sistema digestivo normal.

Uma vez que as soluções são directamente administradas pela via venosa, têm de ser isotónicas e o fornecimento de glucose é limitado.

Para proporcionar uma energia diária de 10 000 kJ, está descrito num artigo de *FOOD Science Technology* de 1999, pp. 345-355 de MARCHAL *et al.*, que seria necessário perfundir 14 litros de solução isotónica de glucose (5% em peso/volume de glucose), o que ultrapassa largamente as capacidades humanas.

O fornecimento de soluções de glucose ou fructose mais concentradas (10 a 20% em peso/volume) é possível, mas não durante períodos longos.

É possível administrar sacáridos lineares com um DP compreendido entre 2 e 5, uma vez que estes sacáridos são hidrolisados por maltases no rim, e a glucose libertada é então reabsorvida. É assim que a utilização de oligossacáridos lineares curtos permite fornecer energia suficiente numa solução isotónica, sem sobrehidratar o doente.

Além disso, sendo os oligossacáridos lineares com um DP inferior a 7 estáveis em solução durante períodos de tempo longos, escolhe-se convencionalmente variar o DP entre 2 e 7 para permitir fornecer constantemente aos doentes, durante períodos longos, toda a energia necessária.

Mas esta solução não é totalmente satisfatória, e só abrange a exploração de estruturas glucosídicas lineares.

Quanto à nutrição entérica, envolve as bebidas que podem ser ingeridas oralmente ou administradas através de um tubo no estômago ou intestino delgado.

Para estes fluidos entéricos, o maior problema é diarreia, devido a uma osmolalidade excessivamente elevada. Em princípio, a mesma solução do que a encontrada para os desportistas pode ser igualmente aqui aplicada.

Convencionalmente, as maltodextrinas que contêm uma mistura complexa de sacáridos lineares e ramificados, com um DE de 10 a 20 são utilizadas, mas sem proporcionar uma satisfação completa.

Os especialistas destas áreas de aplicação procuram a solução para estes problemas técnicos na produção de estruturas ramificadas derivadas de amido.

A amilopectina, principal constituinte do amido, organiza-se em torno de ligações α -1,4 lineares e de ligações α -1,6 que se ramificam. O conhecimento das microestruturas colocou em evidência o facto de estes dois tipos de ligações não se encontrarem repartidas de maneira uniforme, mas que coexistem regiões muito densas em ligações α -1,6 com regiões constituídas unicamente por ligações α -1,4.

Foi proposto, na patente US nº 4 840 807, ou no

pedido de patente JP 11/187,708, extrair apenas as regiões densas em ligações α -1,6 como fonte de glúcidos de absorção lenta, uma vez que as ligações α -1,6 são mais difíceis de degradar do que as ligações α -1,4.

Foram assim desenvolvidas duas famílias de produtos. A primeira envolve dextrinas limite preparadas pela degradação das zonas de ligações α -1,4 por uma α -amilase só, e as dextrinas preparadas pela degradação das zonas de ligações α -1,4 pela acção simultânea de uma α -amilase e de uma β -amilase.

A resistência destas dextrinas limite às enzimas digestivas humanas possibilita a sua utilização para regular a digestão, mas também para controlar glicémia (aplicação para dietas de diabéticos). Este efeito é atribuído ao abrandamento da taxa de adsorção digestiva.

No entanto, estes compostos têm a desvantagem de ter um peso molecular muito baixo (entre 10 000 e 55 000 daltons), o que limita a sua exploração em outras áreas de aplicação.

O EP 207 676 ensina que, para utilização em diálise peritoneal contínua e ambulatoria, são preferidos hidrolisados de amido que formem soluções límpidas e incolores a 10% em água, com um Mw de $5 \cdot 10^3$ a 10^6 daltons e um índice de polimolecularidade ou Ip baixo.

Isto traduz-se em composições que contêm predominantemente polímeros de glucose de elevado peso molecular compreendido entre $5 \cdot 10^3$ e $5 \cdot 10^5$ daltons), que não contêm ou contêm muito pouca glucose ou oligossacáridos com um DP inferior ou igual a 3 e nenhum ou muito poucos polímeros de glucose com um Mw superior a 10^6 daltons.

Poderá ser facilmente compreendido por este pedido que monómeros ou polímeros de baixo peso molecular atravessam rapidamente a parede peritoneal e por isso não têm um benefício duradouro para a criação de um gradiente de pressão osmótica, e que os polímeros de peso molecular muito elevado, que não têm poder osmótico, devem ser evitados e devem ser mesmo proibidos uma vez que são potencialmente perigosos se precipitarem a sua retrogradação.

A diálise peritoneal consiste em introduzir uma solução de diálise na cavidade peritoneal através de um cateter. Ao fim de um determinado período de tempo, ocorre uma troca de solutos entre o dialisado e o sangue. A utilização de um agente osmótico adequado permite a drenagem de água excessiva do sangue para o dialisado.

O método corrente em diálise peritoneal para remover o excesso de água (ultrafiltração) e de solutos do organismo em caso de deficiência renal consistia em utilizar uma solução de diálise que tinha sido tornada hipertónica em relação ao plasma através da adição de glucose como agente osmótico. O fluxo através de uma membrana semi-

permeável ideal é principalmente determinado pelo número total de partículas de soluto (osmolalidade) presentes na solução, independentemente do seu tamanho. Em contraste, no caso de uma membrana biológica como a membrana peritoneal, o fluxo depende apenas dos solutos não atravessarem ou apenas raramente atravessarem a membrana e por isso não está necessariamente ligado à osmolalidade total da solução. Adicionalmente, a capacidade dos solutos para atravessarem a membrana é caracterizada pela forma das moléculas e a sua carga iónica bem como pelo seu tamanho.

A escolha de um agente osmótico ideal é delicada: este último deve permitir um gradiente osmótico de forma a deslocar a água e as substâncias tóxicas do sangue para a solução de diálise através do peritoneu. Deve igualmente ser não tóxico e biologicamente inerte, e ser metabolizável pelo corpo, sendo uma sua porção assimilada no sangue. Não deve atravessar a membrana peritoneal demasiado rapidamente, de forma a manter duradouramente um gradiente de ultrafiltração sem acumular substâncias indesejáveis no sangue.

No EP 667 356, a companhia requerente propôs um processo para fabricar, a partir de amido "waxy", um hidrolisado de amido que é completamente solúvel em água e que tem um baixo índice de polimolecularidade, inferior a 2,8, tendo um Mw compreendido entre $5 \cdot 10^3$ e $1 \cdot 10^6$ daltons.

O processo consiste em hidrolisar, por via ácida, um leite de amido constituído exclusivamente de amilopecti-

na, em seguida completar esta hidrólise ácida por uma hidrólise enzimática com ajuda de α -amilase bacteriana, e cromatografar sobre resinas catiónicas fortes macroporosas sob forma alcalina ou alcalino-terrosa.

Deve ser referido que à época, a companhia requerente recomendou a utilização apenas de amidos compostos quase exclusivamente de amilopectina e comumente chamados amidos "waxy" ou amidos cerosos como matéria prima no referido processo, não sendo os amidos que contêm uma proporção não negligenciável de amilose considerados adequados.

Este hidrolisado de amido, também chamado icodextrina, permitiu uma diminuição significativa da absorção quotidiana de glucose previamente utilizada como agente osmótico em soluções para diálise, constituindo assim uma potencial vantagem para o tratamento de doentes diabéticos e obesos para quem o fornecimento de calorías é um factor crítico. Porém, isto poderia ser melhorado pela utilização de um agente osmótico menos glicémico, e cujo poder osmótico dure mais, o que permitiria aligeirar o procedimento do tratamento de diálise. Com efeito, uma vez melhorado o rendimento dos dialisados, a frequência de mudança de bolsas de diálise seria diminuída, o que constitui uma melhoria certa na qualidade de vida do doente.

Assim, o glúcido ideal em diálise peritoneal deveria:

- ser solúvel em água
- exercer uma pressão osmótica
- ter uma fraca viscosidade
- não retrogradar
- induzir uma cinética de surgimento de glucose fraca na circulação sistémica
- ser hidrolisado lentamente por amilase de forma a exercer uma pressão osmótica durável.

Com efeito, em relação ao último ponto, o destino dos agentes osmóticos administrados em solução na cavidade peritoneal em doentes com insuficiência renal, é determinado pela sua estabilidade no fluido peritoneal, pelo grau de absorção na circulação sistémica e pela rapidez de hidrólise pela amilase. Ora os agentes osmóticos da técnica anterior apresentam o inconveniente de serem rapidamente hidrolisados. Do mesmo modo, os amidos ditos resistentes foram propostos como agentes reguladores da glicémia. Ora estes não são geralmente estáveis nas composições, não podem ser esterilizados, o que causa em última instância uma perda de produto, e podem ser fermentados e por isso não fornecem a quantidade de calorías esperada.

A partir do texto anterior, é evidente que existe uma necessidade não satisfeita de ter polímeros de glucose que apresentem propriedades notáveis, em particular em termos de estabilidade, solubilidade e possivelmente viscosidade, e que confirmam aos produtos que os contêm maior capacidade de vida de prateleira, digestibilidade controlada, que permita a sua utilização em áreas tão variadas como diálise peritoneal, nutrição entérica ou parentérica, como inibidor e/ou regulador de glicémia, como fornecedor de energia durante actividades físicas e como regulador de digestão.

A Empresa Requerente teve o mérito de reconciliar todos estes objectivos que eram até agora considerados difíceis de reconciliar, imaginando e elaborando, após numerosas pesquisas, novos polímeros solúveis de glucose altamente ramificados.

Os polímeros solúveis de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção, que têm um conteúdo de açúcares redutores inferior a 1%, são assim caracterizados pelo facto de possuírem um nível de ligações glucosídicas α -1,6 superior a 10%, de preferência compreendida entre 12 e 30%, um Mw determinado por difusão da luz de um valor compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $2 \cdot 10^5$ daltons, e uma osmolaridade, determinada de acordo com um teste A, de um valor compreendido entre 1 e 15 mOsm/kg.

Os polímeros solúveis de glucose ramificados de

acordo com a invenção apresentam um baixo conteúdo de açúcares redutores.

A determinação do poder redutor dos polímeros de glucose ramificados de acordo com a invenção, por qualquer método conhecido pelos especialistas na técnica, conduz a valores inferiores a 1%.

O nível de ligações glucosídicas α -1,6 dos polímeros de glucose ramificados de acordo com a invenção é determinado por análise RMN do protão. O nível de ligação é então expresso em percentagem, correspondente à quantidade de sinal de protão levado pelo C1 de uma unidade anidro-glucose que se liga a outra unidade anidrogucose por uma ligação α -1,6, quando se deu um valor de 100 a todos os sinais dos protões levados por todos os átomos C1 dos resíduos glucose dos referidos polímeros de glucose.

Nestas condições, é determinado que os polímeros de glucose solúveis altamente ramificados de acordo com a invenção apresentam um conteúdo de ligações α -1,6 que é superior a 10%, de preferência compreendido entre 12% e 30%.

Este conteúdo de ligações α -1,6 confere a todos os polímeros de glucose altamente ramificados conforme a invenção uma estrutura particular, em termos de grau de ramificação e/ou de comprimentos de cadeias ramificadas em relação ao amido ou derivado de amido do qual são derivados.

Estes conteúdos particularmente elevado em ligações glucosídicas α -1,6 torna dificilmente digeríveis os polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção, o que contribui para que se possa utilizá-lo como agente redutor da digestão e como agente inibidor de glicemia, como acima referido.

Podem assim ser utilmente propostos aos diabéticos ou a indivíduos com predisposição para diabetes, como alimentos, bebidas ou adjuvantes de nutrição tendo por função inibir o aumento de glicemia.

Os polímeros solúveis de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção apresentam igualmente uma ausência de retrogradação em solução aquosa e uma estabilidade acentuada.

Esta propriedade faz com que os polímeros de glucose ramificados de acordo com a invenção sejam naturalmente destinados a composições que podem ser utilizadas na indústria alimentar, que apresentam então elevada estabilidade durante a armazenagem.

Outra vantagem da invenção é permitir a produção de um produto acabado que pode ser utilizado por exemplo como um ligante instantâneo nos produtos refrigerados ou sobrecongelados.

A determinação das massas moleculares dos polímeros solúveis de glucose ramificados de acordo com a invenção é realizada pela medida das massas moleculares médias em peso (M_w).

Este valor é obtido por cromatografia de exclusão estérica em colunas PSS SUPREMA 100 e PSS SUPREMA 1000 montadas em série e acopladas a um detector de difusão de luz.

Os polímeros de glucose ramificados de acordo com a invenção apresentam então um valor de M_w compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $2 \cdot 10^5$ daltons.

Os polímeros de glucose solúveis de acordo com a invenção apresentam igualmente uma osmolalidade marcadamente fraca.

O teste A consiste em determinar a osmolalidade de uma solução que contém 100 g numa base seca de polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção colocados em 1 kg de água.

A medição da osmolalidade desta solução é em seguida realizada num osmómetro MARK 3 de FISKE® ASSOCIATES, seguindo as especificações do fabricante.

Os polímeros de glucose ramificados de acordo com a invenção apresentam então um valor de osmolalidade marcadamente baixo compreendido entre 1 e 25 mOsm/kg.

Não existem, de acordo com o conhecimento da Empresa Requerente, polímeros de glucose que possuam um tal valor de osmolalidade, para produtos que apresentam por outro lado um nível de ramificação e um peso molecular como os definidos.

Com efeito, as medições comparativas efectuadas em maltodextrinas convencionais apresentam um equivalente dextrose (DE) compreendido entre 5 e 20 e mostram valores de osmolalidade compreendidos entre 25 a 85 mOsm/kg.

Outras medições, realizadas em dextrinas limite como as aqui anteriormente definidas por tratamento do amido liquidificado com α -amilase, comercializados sob o nome BLD 8 por SANMATSU, apresentam para um peso molecular compreendido entre 0,4 e 0,5. 10^5 daltons e um nível de ramificação α -1,6 compreendido entre 8 e 9%, um valor de osmolalidade superior a 35 mOsm/kg.

Este valor de osmolalidade muito baixo confere assim aos polímeros solúveis altamente ramificados de acordo com a invenção propriedades que lhes permitem serem utilizados em preparações destinadas a desportistas, para renovar as fontes de energia das quais necessitam para esforços físicos durante períodos longos.

Mas igualmente e acima de tudo, estas composições podem ser vantajosamente utilizadas para doentes que já não

podem alimentar-se normalmente, no quadro de nutrição entérica e parentérica.

Além disso, associadas a esta propriedade de fraca osmolalidade, a sua ausência de retrogradação, o seu perfil de peso molecular e o seu fraco índice de polidispersidade fazem destes polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção candidatos ideias como agentes osmóticos para aplicações em diálise peritoneal, como será aqui adiante exemplificado. A Requerente demonstrou ainda que estes polímeros de acordo com a invenção têm uma resistência a alfa amilase que traz vantagens significativas em relação aos polímeros da técnica anterior, para um peso molecular semelhante, uma vez que são menos glicémicos e têm um poder osmótico que dura mais tempo, permitindo assim a sua utilização em tratamentos de diálise de longa duração.

De uma forma vantajosa, os polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção podem ser classificados em três sub-famílias em função da sua osmolalidade.

A primeira sub-família cobre os polímeros altamente ramificados que apresentam, para um Mw determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,5 \cdot 10^5$ e $1,5 \cdot 10^5$ daltons, uma osmolalidade, determinada segundo o teste A, pelo menos igual a 1 e inferior a 2 mOsm/kg.

A segunda sub-família cobre os polímeros altamente ramificados que apresentam, para um Mw determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,5 \cdot 10^5$ e $0,8 \cdot 10^5$ daltons, uma osmolalidade, determinada segundo o teste A, pelo menos igual a 2 e inferior a 5mOsm/kg.

A Empresa Requerente encontrou adicionalmente polímeros de glucose ramificados que pertencem à estas duas sub-famílias que apresentam ainda uma taxa de ligação α -1/6 marcadamente elevada, *i.e.*, compreendida entre 15 e 30%.

A terceira sub-família cobre polímeros altamente ramificados que apresentam um Mw determinado por difusão da luz compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $0,7 \cdot 10^5$ daltons e uma osmolalidade, determinada segundo o teste A, pelo menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.

Para preparar os polímeros solúveis de glucose ramificados de acordo com a invenção, realiza-se a sucessão de passos seguintes que consistem em:

- a. preparar uma suspensão aquosa de amido ou uma solução de derivado de amido de uma forma seca pelo menos igual a 1% em peso, de preferência de 10 a 50% em peso,
- b. tratar a referida suspensão ou a referida solução com pelo menos uma enzima de ramificação a uma tem-

peratura compreendida entre 25 e 80°C durante desde 1 a 24 horas,

- c. fazer agir sobre a suspensão ou sobre a solução assim obtida pelo menos uma enzima escolhida do grupo constituído por α -amilase, β -amilase, amiloglucosidase e α -transglucosidase,
- d. efectuar um fraccionamento com ajuda de pelo menos uma técnica escolhida do grupo das separações ou cromatografias, de forma a recuperar as fracções de peso molecular mais elevado,
- e. recolher os polímeros de glucose ramificados assim obtidos.

O amido é introduzido em suspensão, ou os derivados de amido em solução aquosa, de uma forma seca pelo menos igual a 1% em peso, de preferência de 10 a 50% em peso.

A escolha de uma origem, ou de uma quantidade de amido ou dos seus derivados específicos, têm uma importância relativa.

Na realidade, a Empresa Requerente desenvolveu um novo processo, que torna possível obter os polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção, por exemplo aplicáveis em diálise peritoneal, que não necessita

de limitar-se a um tipo particular de amido, neste caso um amido rico em amilopectina.

É então possível escolher o amido natural ou híbrido obtido de batata, batata com um elevado conteúdo de amilopectina (amido "waxy"), ervilha, arroz, mandioca, trigo, milho, milho ou trigo rico em amilopectina (milho ou trigo "waxy"), milho com um conteúdo elevado de amilose, cortes ou fracções que podem ser preparados ou obtidos a partir de amidos, como amilose, amilopectina, as fracções do tamanho das partículas conhecidos por especialistas na técnica pelo termo amido de trigo "A" e amido de trigo "B", e as misturas de pelo menos dois dos produtos acima mencionados.

Os derivados de amido podem ser amidos modificados obtidos a partir de modificação enzimática, química e/ou física, em um ou dois passos, desse amido.

Os derivados de amido podem em particular ser amidos modificados por pelo menos uma das técnicas conhecidas de esterificação, eterificação, ligação cruzada, oxidação, tratamento alcalino, ácido e/ou hidrólise enzimática (responsável pelas maltodextrinas e dextrinas).

A Empresa Requerente verificou que os polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção são facilmente sintetizados a partir de amidos, ou a partir dos seus derivados, que apresentam já um nível de ramificação pelo menos igual a 1%.

Esta suspensão de amido, ou esta solução de derivados de amido, pode então ser opcionalmente submetida a um tratamento de cozedura particular, que consiste em ser tratado a uma temperatura superior a 130°C, preferencialmente uma temperatura compreendida entre 140 e 150°C, sob uma pressão de mais de 3,5 bar, de preferência compreendida entre 4 a 5 bar, durante 30 segundos a 15 minutos, de preferência durante 1 a 5 minutos.

Este tratamento é vantajosamente realizado num fogão tubular com envelope duplo aquecido por um fluido térmico, equipamento que pode ser facilmente obtido por especialistas na técnica.

O segundo passo do processo de acordo com a invenção consiste em tratar a referida suspensão ou a referida solução de derivado de amido com uma enzima de ramificação.

Vantajosamente, utiliza-se 50 000 to 500 000 U de enzima de ramificação purificada por 100 g numa base de amido seca ou derivado de amido, a uma temperatura entre 25 e 95°C, preferencialmente a uma temperatura entre 70 e 95°C, durante um período de 1 a 24 horas.

Tal como aqui utilizado, enzimas de ramificação são as enzimas de ramificação escolhidas entre o grupo constituído pelas enzimas de ramificação de glicogénio, as

enzimas de ramificação de amido e as misturas dessas enzimas.

Mais particularmente, estas enzimas de ramificação são extraídas e organismos e/ou de microrganismos escolhidos no grupo constituído pelas enzimas de ramificação do glicogénio, as enzimas de ramificação de amido e as misturas dessas enzimas.

A Empresa Requerente prefere, a fim de efectuar este tratamento com uma enzima de ramificação, seguiu o ensinamento do seu pedido de patente WO 00/18 893.

Este passo leva à produção de polímeros de glucose solúveis ramificados, mas com um conteúdo de ligações glucosídicas α -1,6 no seu melhor a 10%.

Para aumentar este valor e para conseguir níveis de ligações α -1,6 até 30%, a Empresa Requerente verificou que é necessário realizar um tratamento enzimático complementar, e é esse tratamento que constitui o terceiro passo do processo para produzir os polímeros de glucose solúveis altamente ramificados de acordo com a invenção.

Este terceiro passo consiste em fazer agir sobre a suspensão ou a solução tratada com uma enzima de ramificação assim obtida, pelo menos uma enzima escolhida entre o grupo constituído por α -amilase, β -amilase, amiloglucosidase e α -transglucosidase.

As condições para acção (temperatura e pH) das diferentes enzimas utilizadas no processo de acordo com a invenção são escolhidas entre as seguintes (as quantidades são fixadas em relação ao substrato considerado, como será aqui adiante exemplificado):

- α -amilase: do tipo LYSASE 2000 de GENENCOR, a uma temperatura de 55 a 65°C, pH de 6,5 a 6,7, durante 30 minutos a 1 hora;
- β -amilase: do tipo SPEZYME BBA de GENENCOR, a uma temperatura de 40°C, pH de 4,9 a 5, durante 1 h 30 minutos a 2 horas;
- amiloglucosidase: do tipo OPTIDEX L300 A de GENENCOR a uma temperatura de 55°C., pH de 4,7, ou do tipo A-7420 de SIGMA a uma temperatura de 50°C a 60°C, pH de 4,7 a 4,9; durante 1 h 30 min a 2 horas;
- α -transglucosidase: do tipo α -TGase de L-AMANO a uma temperatura de 55°C, pH de 5 a 5,2, durante 1 hora.

As enzimas utilizadas podem ser de origem bacteriana ou fúngica.

No final deste tratamento adicional, os polímeros

de glucose altamente ramificados solúveis são obtidos na forma de uma mistura com os seus produtos de degradação enzimática, maioritariamente constituídos por glucose, maltose e/ou isomaltose, como será aqui adiante exemplificado.

O quarto passo do processo consiste em realizar uma fraccionamento com a ajuda de uma técnica escolhida do grupo das separações sobre membrana e das cromatografias, de forma a recuperar as fracções de elevado peso molecular e as fracções de baixo peso molecular.

As fracções de elevado peso molecular correspondem aos polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção, enquanto que as fracções de baixo peso molecular permitem obter, com um excelente rendimento, composições enriquecidas em maltose e/ou isomaltose.

De uma forma vantajosa, escolhe-se uma técnica de fraccionamento dentro do grupo constituído pela técnica de separação sobre membrana de ultrafiltração e pela técnica de separação cromatográfica sobre suporte de tipo gel.

Numa primeira forma de realização deste quarto passo do processo, o fraccionamento é realizado utilizando uma técnica de separação sobre membrana de ultrafiltração, utilizando uma membrana com um corte pelo menos igual a 3000 daltons, preferencialmente pelo menos igual a 5000 daltons.

As fracções de elevado peso molecular correspondentes aos polímeros de glucose altamente ramificados, iguais ao retido de ultrafiltração, representam cerca de 60% da matéria seca utilizada.

Numa segunda forma de realização deste quarto passo do processo, o fraccionamento é realizado utilizando uma técnica de cromatografia realizada numa resina tipo gel.

Os perfis obtidos permitem a separação das fracções que contêm os polímeros de glucose altamente ramificados com um rendimento óptimo compreendido entre 40 e 45%.

Independentemente do método utilizado, os perfis obtidos permitem a separação da fracção polisacárida de elevado peso molecular correspondente aos polímeros de glucose ramificados solúveis de acordo com a invenção, de fracções de oligossacáridos de baixo peso molecular, constituídos essencialmente de glucose e de maltose e/ou de isomaltose.

A última etapa do processo de acordo com a invenção consiste em recolher por um lado as fracções de elevado peso molecular correspondentes aos polímeros de glucose altamente ramificados, e por outro lado as fracções de baixo peso molecular enriquecidas em glucose e isomaltose e/ou em maltose.

Os produtos de elevado peso molecular podem ser combinados como estão, ou precipitados com 3 volumes de etanol, purificados e secos sob vácuo durante 24 horas, ou ainda atomizados, por qualquer técnica conhecida pelo especialista na técnica.

Quanto às composições enriquecidas com maltose e/ou isomaltose, caracterizadas pelos facto de compreenderem as fracções de baixo peso molecular do passo d do processo de acordo com a invenção, podem ser utilizadas como estão, ou podem ser hidrogenadas por qualquer técnica de hidrogenação conhecida por um especialista na técnica.

As características fisicoquímicas particulares dos polímeros de acordo com a invenção permitem a sua utilização na indústria em particular nas indústrias de Papel-Cartão, Têxtil, Cosmética, e particularmente nas indústrias Farmacêutica e Alimentar, e ainda mais particularmente nas áreas da nutrição entérica e parentérica, diálise peritoneal como um agente osmótico, como agente inibidor de glicemia, como fonte de energia durante actividades físicas e como agente regulador da digestão.

Em relação à área particular da diálise peritoneal, o requerente verificou, utilizando um teste de resistência a alfa-amilase, que uma família de polímeros de acordo com a invenção era particularmente adaptada à preparação de soluções para diálise peritoneal, como será

exemplificado adiante. Estes polímeros são utilizados como agentes osmóticos.

A invenção tem então como objecto uma composição para diálise peritoneal, caracterizada pelo facto de compreender, como agente osmótico, pelo menos um polímero solúvel altamente ramificado com um conteúdo de açúcares redutores inferior a 1%, e que apresenta:

- um conteúdo de ligações glucosídicas α -1,6 superior a 8%, de preferência compreendido entre 10 e 30%,
- um M_w , determinado por difusão de luz, com um valor compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $2 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada segundo um teste A com um valor compreendido entre 1 e 15 mOsm/kg.

De acordo com uma variante preferida da invenção, o referido polímero tem:

- um M_w , determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $0,7 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada segundo um teste A, pelo menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.

A composição para análise peritoneal de acordo com a invenção pode adicionalmente compreender electrólitos

fisiologicamente aceitáveis, como sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloro, de forma a evitar a perda por transferência de electrólitos do soro para o peritoneu.

Esta composição pode ser proporcionada em forma sólida para preparação imediatamente antes da utilização ou em forma líquida, por exemplo como uma solução aquosa. No último caso, a solução obtida por dissolução na água dos polímeros altamente ramificados segundo a invenção deve ser límpida e incolor. Esta solução deve de preferência ser isenta de endotoxinas, de péptido-glucanos e de beta-glucanos, bem como de contaminantes azotados provenientes do material de partida, ou das preparações enzimáticas utilizadas para o seu fabrico.

Assim, os polímeros altamente ramificados utilizados na referida solução deverão ter sido submetidos a purificação a fim de remover qualquer cor ou qualquer contaminante indesejável como proteínas, bactérias, toxinas bacterianas, fibras, vestígios de metais e outros semelhantes.

Este passo de purificação pode ser realizado de acordo com as técnicas conhecidas pelo especialista na técnica.

A solução para diálise de acordo com a invenção pode compreender igualmente soluções tampão (lactato, acetato, gluconatos em particular) e outros aditivos como

aminoácidos, insulina, polióis, como, por exemplo, sorbitol eritritol, manitol, maltitol e xilitol.

A adição de polióis à composição, e preferencialmente polióis que são apirogénicos e isentos das impurezas descritas anteriormente (nomeadamente, endotoxinas e outros resíduos de origem bacteriana) torna possível aumentar a osmolaridade da solução de forma mais vantajosa que a glucose ou maltose devido ao seu valor calórico mais baixo, ao seu poder osmótico mais elevado, e porque não são redutores.

A composição para diálise de acordo com a invenção é vantajosa em relação aos produtos da técnica anterior uma vez que o agente osmótico que contém permite exercer uma pressão osmótica durável e induzir uma cinética de aparição de glucose fraca, estando ao mesmo tempo estável à retrogradação, satisfazendo assim os principais critérios acima definidos.

Outras características e vantagens da invenção surgirão através da leitura dos exemplos não limitativos abaixo descritos.

Exemplo 1

Prepara-se uma solução de derivados de amido com um conteúdo de matéria seca de 25% em peso por aquecimento até 80°C, com agitação lenta e contínua.

Utiliza-se neste caso duas maltodextrinas comercializadas pela Empresa Requerente sob os nomes de GLUCIDEX® 2 (substrato A) e GLUCIDEX® 6 (substrato B) a 250 g/l.

Esta solução é arrefecida até 30°C, e o pH é levado a 6,8 com NaOH 1 N.

Estas soluções são então tratadas com a enzima de ramificação de glicogénio purificada, extraída do microrganismo *B. stearothermophilus*.

A enzima de ramificação é adicionada numa quantidade de 1600 U/g de substrato, e a temperatura é gradualmente levada para 65°C.

A incubação é realizada sob agitação moderada durante 4 horas. A reacção é seguidamente parada pela redução do pH para um valor de 5 e por ebulição durante 6 minutos.

A Tabela I abaixo reúne, para ambos os substratos testados, os resultados obtidos em termos de conteúdo de ligações glucosídicas α -1,6, de valores de Mw, de conteúdos de açúcares redutores e de osmolalidade para os produtos obtidos (produto C a partir do substrato A e produto D a partir do substrato B).

Tabela I

	% de ligações α -1,6	Mw 10 ⁵ daltons	% em açúcares redutores	Osmolalidade mOsm/kg
A	5,9	4,88	2	16
C	8,7	1,19	1,5	12
B	5,4	0,9	3,8	25
D	8	0,61	4,3	25

O conteúdo em ligações glucosídicas α -1,6 é sensivelmente aumentado, mas não atinge ainda os valores desejados.

A Empresa Requerente verificou que deveria realizar-se um tratamento adicional, pela acção de enzimas que hidrolisam especificamente as ligações glucosídicas α -1,4 (como a α -amilase, β -amilase ou amiloglucosidase), ou pela utilização de enzimas que completam a ramificação em ligações α -1,6 (como a α -transglucosidase), da forma seguinte.

Para os tratamentos enzimáticos adicionais, as soluções das maltodextrinas ramificadas C e D são primeiro levadas à temperatura e ao pH da enzima escolhida.

- 1) Para o tratamento adicional com α -amilase (LYSASE 2000 a 2444 BRU/g de extracto enzimático), as referidas soluções de C ou D são levadas à temperatura de 60°C e ao pH de 6,5 a 6,7, e adiciona-se 6 U de α -amilase por grama de substrato. A incubação é

realizada durante 30 minutos, e a reacção é parada por ebulição durante 6 minutos.

- 2) Para o tratamento adicional com β -amilase (BBA SPE-ZYME de GENENCOR), as referidas soluções de C ou D são levadas à temperatura de 40°C e ao pH de 4,9 a 5, e adiciona-se 30 U de β -amilase por grama de substrato. A incubação é realizada durante 2 horas e a reacção é parada por ebulição durante 6 minutos.
- 3) Para o tratamento adicional com amiloglucosidase (AMG de SIGMA AA-7420 de *A. niger*, a 40 U/mg de proteínas), as referidas soluções de C e D são levadas à temperatura de 55°C e ao pH de 4,7 a 4,9, e adiciona-se 20 U de AMG por grama de substrato. A incubação é realizada com agitação moderada durante 2 horas, e a reacção é parada por ebulição durante 6 minutos.
- 4) Para o tratamento adicional com α -transglucosidase (α -TGase L-AMANO, actividade de 27,7 μ mol de glucose), as referidas soluções de C e D são levadas à temperatura de 55°C e ao pH de 5 a 5,2, e adiciona-se 2 U de α -TGase por grama de substrato. A incubação é realizada durante 1 hora, e a reacção é parada por ebulição durante 6 minutos.

Determinam-se em seguida as características físico-químicas:

- dos produtos E e F (obtidos por tratamento adicional com α -amilase dos produtos respectivamente C e D),
- dos produtos G e H (obtidos por tratamento adicional com β -amilase dos produtos respectivamente C e D),
- dos produtos I e J (obtidos por tratamento adicional com AMG dos produtos respectivamente C e D) e
- dos produtos K e L (obtidos por tratamento adicional com α -TGase dos produtos respectivamente C e D)

Tabela II

	% de ligações α -1,6	Mw 10 ⁵ daltons	% em açúcares redutores	Osmolalidade mOsm/kg
E	8,3	0,72	3,8	29
G	8,4	0,76	22,5	132
I	9	0,49	55	320
K	9,6	1,2	22	153
F	7,4	0,44	8,7	52
H	7,2	0,51	23,8	141
J	7,8	0,47	50,5	301
L	12	0,69	28	192

A osmolalidade e o conteúdo de açúcares redutores

que aumentam, traduzem aqui a produção concomitante principalmente de glucose, de DP2 (maltose e isomaltose) que tem de ser eliminada para obter polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção.

Escolhe-se utilizar fraccionamento por ultrafiltração sobre membrana com um corte de 5000 daltons (membrana 5K AMICON).

Os resultados obtidos para os produtos de ultrafiltração M, O, Q, S dos compostos E, G, I e K, respectivamente, por um lado (que são derivados de GLUCIDEX® 2), e os produtos de ultrafiltração N, P, R, T dos compostos F, H, J e L, respectivamente, (que são derivados de GLUCIDEX® 6), estão apresentados na Tabela III seguinte.

Tabela III

	% de ligações α -1,6	Mw 10 ⁵ daltons	% em açúcares redutores	Osmolalidade mOsm/kg
M	10,2	0,89	0,42	1
O	15	0,75	0,3	1
Q	18,8	0,57	0,37	2
S	12,1	1,22	0,33	1
N	10,9	0,69	0,54	2
P	14,4	0,51	0,8	3
R	18,1	0,55	0,5	5
T	12,2	0,72	0,6	3

Estes resultados traduzem o facto que os polí-

meros de glucose altamente ramificados assim obtidos apresentam equilíbrio perfeito entre a taxa de ligações glucosídicas α -1,6 notavelmente elevada (até 18%) para produtos que apresentam um valor de Mw e um valor de osmolalidade tão baixos.

Estes polímeros de glucose altamente ramificados podem ser facilmente misturados com outros electrólitos para proporcionar agentes osmóticos que são extremamente eficientes em diálise peritoneal, ou serem utilizados sós em composições destinadas a regular a digestão, para nutrição parentérica e entérica, para composições destinadas a diabéticos, ou em bebidas líquidas a fim de reconstituir as reservas de energia para desportistas durante um esforço físico longo.

Deverá ser referido que para além destes polímeros de glucose altamente ramificados, o processo possibilita também agrupar as fracções ricas em maltose e/ou isomaltose.

Por exemplo, no caso da preparação dos produtos T e S (obtidos pelo tratamento combinado com a enzima de ramificação e com α -TGase), isomaltose e glucose são os únicos co-produtos fabricados (às concentrações respectivas de 25 a 30 g/l e 75 a 80 g/l).

Do mesmo modo, no caso da preparação dos produtos O e P (obtidos pelo tratamento combinado com a enzima de

ramificação e β -amilase), maltose é o único co-produto fabricado (à concentração de 130 g/l).

Estas fracções de baixo peso molecular podem então constituir fontes vantajosas de composições ricas em maltose e/ou isomaltose.

Exemplo 2

Os polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção podem igualmente ser preparados a partir de amido de milho corrente. Para isso, 110 g de uma base seca de amido são suspensas num litro de água à temperatura ambiente com agitação lenta e contínua.

Leva-se o pH de 6,8 a 7 e deixa-se o meio nestas condições durante 15 minutos, ajustando o pH se necessário. Adiciona-se a enzima de ramificação de glicogénio purificada de *B. stearothermophilus* numa quantidade de 4000 U/g de substrato, e a temperatura é levada gradualmente até 72 a 75°C.

A incubação é então realizada com agitação moderada durante 30 minutos, seguida por arrefecimento para uma temperatura de 65 a 68°C. A reacção enzimática é realizada durante 4 horas. A reacção é então parada pela redução do pH para um valor de 4,5 a 5, o meio é aquecido à temperatura de ebulição durante 6 minutos.

Como no exemplo 1, a reacção é completada por tratamento com β -amilase ou amiloglucosidase, seguido por um passo de ultrafiltração sobre membrana de um corte de 5000 daltons nas condições dadas no exemplo 1.

A tabela IV reúne os resultados obtidos.

O amido de milho corrente é referenciado como U; o produto de tratamento com enzima de ramificação V, os tratados adicionalmente com β -amilase: W, por AMG: X; os produtos finais ultrafiltrados: Y e Z.

Tabela IV

	% de ligações α -1,6	Mw 10 ⁵ daltons	% em açúcares redutores	Osmolalidade mOsm/kg
U	3,6	110	<0,01	Nd
V	8,8	1,75	0,2	2
W	8,9	1,31	20,5	117
Y	16,3	1,38	0,1	2
X	7,9	0,55	55	357
Z	24,2	0,45	0,4	2

Os produtos Y e Z obtidos apresentam os mesmos perfis equilibrados dos produtos descritos no Exemplo 1, e podem por isso ser vantajosamente utilizados nas mesmas áreas de aplicação.

Exemplo 3

Preparam-se dois outros polímeros de glucose altamente ramificados a partir de duas variedades de amido rico em amilopectina, em condições industriais. São duas amostras de amido de milho "waxy" fluidificado ácido com um nível de fluidificação WF de cerca de 90, comercializadas igualmente pela Empresa Requerente sob o nome de marca CLEARGUM® CB 90.

A tabela V apresenta as condições operatórias utilizadas para obter os polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção.

Tabela V

Base	CLEARGUM CB90	CLEARGUM CB90
Solubilização	Fogão de laboratório contínuo com 25% MS	Fogão de laboratório contínuo com 25% MS
1ª enzima	Enzima de ramificação 50000 U/ml-1mL/100gsec	Enzima de ramificação 50000 U/ml-1mL/100gsec
1º tratamento enzimático	70°C pH 6,8 22h em seguida desactivação 1 h a 90-95°C	70°C pH 6,8 22h em seguida desactivação 1 h a 90-95°C
2ª enzima	Amiloglucosidase OPTIDEX L300A 0,08 mL/100gsec + 0,08 mL/100 g sec após 1h30	β-amilase SEPZYME BBA 0,2 mL/100g sec
2º tratamento enzimático	55°C pH 4,7- 2 h e 3 h mais desactivação 1 h a 90-95°C	40°C pH 5 2 h mais desactivação 1 h a 90-95°C

(continuação)

Base	CLEARGUM CB90	CLEARGUM CB90
Purificação	Filtração sobre 8 em seguida 0,22 µm- ultrafiltração sobre membranas PCl Membrane Systems ES209 (9000Da)- Tratamento carvão NORIT SX + 5% c/s pH 5 70°C 1h - ajustamento do pH a 5,8 e filtração sobre 8 em seguida 0,22 µm	Ajustamento do pH a 3,5 durante 18 h - centrifugação 5000 tr/min 10 min - filtração sobre terra filtrante em seguida 8 µm - ultrafiltração sobre membranas PCl Membrane Systems ES209 (9000Da) - tratamento carvão NORIT SX + 5% c/s pH5 70°C 1 h - filtração sobre 8 em seguida 0,22 µm
Recuperação	Concentração a seco no evaporador rotativo sob vácuo	Concentração a seco no evaporador rotativo sob vácuo

A Tabela VI apresenta os resultados obtidos em termos de conteúdo de ligações glucosídicas α -1,6, de valores de Mw, de conteúdo de açúcares redutores e de osmolalidade para os produtos obtidos:

- "a" diz respeito ao produto obtido de CLEARGUM® CB 90 após tratamento com a enzima de ramificação e amiloglucosidase e
- "b" diz respeito ao produto obtido de CLEARGUM® CB 90, após tratamento com a enzima de ramificação e β -amilase.

Tabela VI

	% de ligações α -1,6	Mp 10 ⁵ daltons	% em açúcares redutores	Osmolalidade mOsm/kg
"a"	19,4	0,33	1	12
"b"	14,3	0,68	0,7	6

Estes resultados mostram bem que o processo utilizado possibilita a obtenção de polímeros de glucose altamente ramificados de acordo com a invenção independentemente da base amido ou derivado de amido escolhida.

Exemplo 4

Prepara-se soluções aquosas de polímeros altamente ramificados de acordo com a invenção, que se colocam em contacto com uma amilase de origem pancreática. A hidrólise amilásica é monitorizada no tempo por medição dos açúcares redutores formados e pela medição da glucose que aparece no meio reaccional. Este teste torna possível avaliar a resistência dos polímeros à hidrólise de amilase, que é um critério essencial na escolha de um agente osmótico para uma solução para diálise.

São testados vários polímeros de acordo com a invenção em comparação com icodextrina (agente osmótico da técnica anterior). Os polímeros são escolhidos de forma a terem um peso molecular próximo do último:

Os produtos A e B como preparados de acordo com o Exemplo 3 e o produto Z como preparado de acordo com o Exemplo 2.

A icodextrina é fabricada de acordo com a patente EP 667 356 citada na descrição.

Prepara-se um controlo de maltose a fim de validar o modelo *in vitro* de digestão enzimática.

As condições operativas para a digestão amilásica são as seguintes:

- Pesar com precisão cerca de 0,6 g do produto a ser testado,
- Adicionar 150 mL de tampão maleato de Na pH 7 a 0,1 mol/L
- Agitar até à dissolução do produto,
- Remover 1,5 mL da solução obtida (solução inicial = si)
- Colocar os frascos em banho-maria durante 15 minutos, para que a temperatura da solução seja de 37°C,

- Adicionar 0,15 g de pancreatina de porco (α -amilase de origem animal),
- Incubar a 37°C num banho termostato sob agitação durante 300 minutos à temperatura ambiente,
- Recolher as amostras de 1,5 mL nos tempos: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 minutos,
- Parar a reacção enzimática através da colocação das amostras num banho até à secura a 100°C durante 10 minutos,
- Ensaiar a glucose nas amostras, a fim de simular o impacto do produto estudado em glicemia,
- Ensaiar os açúcares redutores nas amostras, a fim de estudar a taxa de hidrólise.

Para o ensaio de glucose, utiliza-se um método colorimétrico, realizado numa máquina HITACHI 704 automática (ROCHE). O reagente utilizado é um reagente que contém as enzimas GOD/PAP (glucose oxidase/peroxidase). O volume do reagente utilizado é 500 microlitros, o volume da amostra é 5 microlitros e a temperatura reaccional é 30°C.

O método utilizado para ensaiar os açúcares redutores é o método SOMOGYI NELSON. Introduce-se 200

microlitros de amostra num tubo rolhado, e adiciona-se 200 microlitros de solução de trabalho (reagentes tartarato de sódio e sulfato de cobre). O meio é aquecido até à temperatura de ebulição, e adiciona-se reagente arsenomolibdico após arrefecimento, seguido por água. A solução obtida é depositada numa microplaca, e então lê-se a absorvência utilizando um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 520 nanometros.

Os resultados são apresentados nas tabelas seguintes:

1. Cinética de aparecimento de glucose (em % libertada em seco)

Tempo (em min)	MALTOSE	A	B	Z	ICODEXTRINA
si	0,26	3,35	0,00	0,53	0,28
0	0,26	4,75	0,93	1,19	1,96
15	0,79	5,31	1,59	-	3,07
30	1,06	5,68	1,96	2,11	3,63
45	1,59	5,86	2,24	-	3,91
60	2,12	6,14	2,52	2,37	4,19
90	2,65	6,52	2,89	-	4,75
120	3,44	6,61	3,17	2,90	5,31
180	5,03	7,26	4,76	3,43	6,15
240	6,35	8,10	-	3,96	6,99
300	7,68	8,38	5,41	4,22	7,82

2. Cinética de aparecimento de açúcares redutores (em % numa base seca)

Tempo (em min)	MALTOSE	A	B	Z	ICODEXTRINA
Si	51,01	5,76	0,88	1,45	2,74
0	49,82	18,34	18,04	8,92	31,07
15	47,94	19,33	18,96	-	30,39
30	48,29	20,00	19,04	11,00	32,53
45	48,55	20,25	19,78	-	32,46
60	48,84	19,92	20,80	11,10	32,95
90	49,42	20,37	19,42	-	34,16
120	47,15	21,68	21,04	12,16	34,40
180	48,87	22,46	21,79	12,22	36,64
240	50,90	23,05	23,11	12,29	37,03
300	52,20	22,67	22,88	13,64	37,06

3. Síntese dos resultados

PRODUTOS TESTADOS	% de glucose libertada a 300 min.	% de açúcares redutores formados a 300 min.	Taxa de ligações α -1,6 em %	Massa Molar (daltons)
MALTOSE	7,41	52,20 0	0	342
A	5,03	16,91	19,4	33000
B	5,41	22,88	14,3	68000
Z	3,69	12,19	24,2	45000
ICODEXTRINA	7,54	34,32	6,5-8	12000-20000

A partir dos resultados obtidos observa-se que

quanto mais aumenta o nível de ramificação (nível de ligações α -1,6), mais diminui a hidrólise amilásica.

Esta última é geralmente dependente do peso molecular. Assim, quanto mais elevado é o nível de ramificação e mais baixo é o peso molecular, menos a molécula é atacada por amilase.

Para uma utilização em diálise intraperitoneal, os produtos A e Z são particularmente adaptados e apresentam uma resistência marcadamente superior à icodextrina, o que significa que estes produtos apresentam uma vantagem evidente em termos de duração e poder osmótico e de poder glicémico, para um peso molecular semelhante.

Exemplo 5

Preparam-se soluções aquosas de polímeros altamente ramificados de acordo com a invenção, e estes são colocados em contacto com uma amilase de origem pancreática e com amiloglucosidase intestinal (pó acetónico de intestino). A hidrólise é monitorizada ao longo do tempo através da medição de glucose que aparece no meio reaccional. Este ensaio possibilita a avaliação da resistência dos polímeros à hidrólise pelas enzimas envolvidas na digestão de hidratos de carbono alimentares, o que é um critério essencial na escolha de um ingrediente alimentar para entrar na composição de formulações para utilização

por desportistas ou destinadas a nutrição entérica e parentérica.

Vários polímeros de acordo com a invenção são testados em comparação com icodextrina, glicogénio e uma maltodextrina corrente.

Os polímeros escolhidos são os seguintes:

Os produtos A tal como preparados de acordo com o exemplo 3, o produto X tal como preparado de acordo com o exemplo 2, e o produto Y' tal como preparado de acordo com o exemplo 2 a partir de um amido rico em amilopectina tratado com a enzima de ramificação e ultrafiltrado.

A icodextrina é fabricada de acordo com a patente EP 667 356 citada da descrição. O glicogénio é um glicogénio de fígado de bovino fornecido pela empresa SIGMA-ALDRICH.

Prepara-se um controlo de maltodextrina corrente a fim de validar o modelo *in vitro* de digestão enzimática.

As condições operativas para a digestão enzimática são as seguintes:

Pesar com precisão cerca de 0,6 g do produto a ser testado.

Adicionar 150 mL de tampão maleato de sódio pH 7 a 0,1 mol/L.

Agitar até à dissolução do produto.

Remover 1,5 mL da solução obtida.

Colocar os frascos num banho de água durante 15 minutos, para que a temperatura da solução atinja 37°C.

Adicionar 0,15 g de pancreatina de porco.

Incubar a 37°C em banho com termostato sob agitação durante 30 minutos.

Recolher amostras de 1,5 mL nos tempos: 0 min a 30 minutos.

Parar a reacção enzimática através da colocação das amostras num banho seco a 100°C durante 10 minutos.

Adicionar 0,15 g de mucosa intestinal de rato.

Incubar durante 5 h 30 a 37°C em banho com termostato sob agitação.

Recolher amostras de 1,5 mL a cada 60 minutos nos tempos 60; 120; 180; 240; 300; 330 e 360 minutos.

Parar a reacção enzimática através da colocação das amostras num banho seco a 100°C durante 10 minutos.

Ensaiar a glucose nas amostras a fim de calcular a percentagem de hidrólise do produto estudado.

Para o ensaio de glucose, utiliza-se o mesmo método do Exemplo 4.

Os resultados são apresentados nos quadros abaixo:

1. Cinética de aparição de glucose (em % libertação a seco)

	Tempo (em min)	MALTOD corrente	GLICOGÉNIO	A	Y	Y'	ICODEX- TRINA
Amilase pancreática	0	0	0	0	0	0	0
	15	0,79	2,87	2,61	2,17	3,90	3,35
	30	1,06	3,30	2,70	2,71	4,74	3,63
Amilase intestinal	60	20,88	12,62	9,77	13,71	16,31	15,09
	90	38,59	22,81	16,66	23,34	28,29	26,96
	120	52,07	41,41	23,17	32,17	40,28	37,86
	150	62,90	39,45	28,66	39,22	48,64	47,22
	180	70,83	46,04	32,75	44,52	57,84	55,88
	210	78,76	51,50	37,03	49,00	64,53	63,01
	240	83,78	56,09	39,64	52,39	68,71	69,01
	270	88,81	59,96	42,62	54,56	72,33	72,09
	300	91,18	62,40	45,50	57,27	75,96	76,28
	330	93,03	64,26	47,27	58,63	79,44	78,37
	360	94,36	65,84	51,64	60,80	81,11	80,89

2. Síntese dos resultados

PRODUTOS TESTADOS	% de glucose libertada 360 min.	Taxa de ligações α-1,6 em %	Massa Molar (daltons)
MALTODEXTRINA	94,36	0	3000-5000
GLICOGÉNIO	65,84	10	10^6 - 10^7
A	51,64	19,4	33000
Y	60,80	16,3	138000
Y'	81,11	7,9	133000
ICODEXTRINA	80,89	6,5-8	12000-20000

As maltodextrinas de acordo com a invenção são particularmente adequadas para utilização em nutrição para atletas ou de um modo mais geral para regular glicemia. Os produtos A e Y de acordo com a invenção tornam possível obter uma percentagem de libertação de glucose entre 50 a 70%, que é uma resistência à hidrólise marcadamente superior do que as maltodextrinas convencionais e comparável a glicogénio, o que significa que estes produtos apresentam uma evidente vantagem em termos de poder glicémico e podem assim constituir vantajosamente um substituto de glicogénio uma vez que apresentam características de digestão semelhantes.

Lisboa, 23 de Outubro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Polímeros solúveis de glucose altamente ramificados com um conteúdo de açúcares redutores inferior a 1%, caracterizados pelo facto de apresentarem:

- uma taxa de ligações glucosídicas α -1,6 superior a 10%, de preferência compreendida entre 12 e 30%,
- um M_w , determinado por difusão de luz, de um valor compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $2 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada segundo um teste A de um valor compreendido entre 1 e 15 mOsm/kg, consistindo o teste A na determinação da osmolalidade de uma solução que contém 10 g secos dos referidos polímeros de glucose altamente ramificados colocados em 1 kg de água, com a ajuda de um osmómetro MARK 3 de FISKE® ASSOCIATES.

2. Polímeros de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo facto de apresentarem:

- um M_w determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,5 \cdot 10^5$ e $1,5 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada de acordo com o teste A igual a 1 e inferior a 2 mOsm/kg.

3. Polímeros de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo facto de apresentarem:

- um Mw determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,5 \cdot 10^5$ e $1,8 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada de acordo com o teste A pelo menos igual a 2 e inferior a 5 mOsm/kg.

4. Polímeros solúveis de glucose altamente ramificados segundo qualquer das reivindicações 2 e 3, caracterizados pelo facto de apresentarem entre 15 a 30% de ligações glucosídicas α -1,6.

5. Polímeros de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo facto de apresentarem:

- um Mw determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $0,7 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada de acordo com o teste A pelo menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.

6. Processo para preparar os polímeros de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, que compreende os passos seguintes:

- preparar uma suspensão aquosa de amido ou uma solu-

ção de derivado de amido de uma matéria seca pelo menos igual a 1% em peso, de preferência de 10 a 50% em peso,

- tratar a referida suspensão ou a referida solução com pelo menos uma enzima de ramificação a uma temperatura compreendida entre 25 e 80°C durante uma período de 1 a 24 horas.
- fazer agir sobre a suspensão ou sobre a solução assim obtida pelo menos uma enzima escolhida do grupo constituído por α -amilase, β -amilase, amiloglucosidase e α -transglucosidase,
- efectuar um fraccionamento por pelo menos uma técnica seleccionada do grupo que consiste em separações de membranas e cromatografias, de forma a recuperar as fracções de elevado peso molecular e as fracções de baixo peso molecular,
- recolher os polímeros de glucose altamente ramificados correspondentes às fracções de elevado peso molecular assim obtidas.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de que a enzima de ramificação é escolhida entre o grupo constituído pelas enzimas de ramificação do glicogénio, as enzimas de ramificação do amido e quaisquer misturas destas enzimas.

8. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 6 e 7, caracterizado pelo facto de que a técnica de fraccionamento é escolhida do grupo constituído pela técnica de separação sobre membrana de ultrafiltração e pela técnica de separação cromatográfica sobre suporte tipo gel.

9. Utilização de polímeros de glucose altamente ramificados segundo qualquer das reivindicações 1 a 5 ou susceptíveis de serem obtidos pelo processo segundo uma das reivindicações 6 a 8, para preparar composições destinadas a serem utilizadas nas indústrias, nomeadamente indústrias de Papel-Cartão, Têxtil, Cosmética, e em particular nas indústrias Farmacêutica e Alimentar.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 9, na qual as composições são destinadas a serem utilizadas nas áreas da nutrição entérica e parentérica, como agente inibidor e regulador da glicemia, como fornecimento energético em caso de actividades físicas e como agentes reguladores da digestão.

11. Utilização das fracção de baixo peso molecular do passo de fraccionamento do processo segundo uma das reivindicações 6 a 8 para a preparação de composições enriquecidas em maltose e/ou isomaltose.

12. Solução para diálise peritoneal caracteri-

zada pelo facto de compreender como agente osmótico pelo menos um polímero altamente ramificado de acordo com a reivindicação 1.

13. Solução para diálise de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo facto que o referido polímero solúvel altamente ramificado apresenta:

- um Mw determinado por difusão de luz de um valor compreendido entre $0,3 \cdot 10^5$ e $0,7 \cdot 10^5$ daltons,
- uma osmolalidade, determinada de acordo com o teste A pelo menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.

14. Solução para diálise peritoneal segundo qualquer uma das reivindicações 12 e 13, caracterizada pelo facto de compreender adicionalmente um poliol escolhido do grupo constituído por sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, eritritol.

15. Solução de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo facto de compreender adicionalmente soluções tampão como sais de lactato, acetato, gluconato.

Lisboa, 23 de Outubro de 2006