



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014008954-3

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: BR 102014008954-3

(22) Data do Depósito: 14/04/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 30/10/2018

(51) Classificação Internacional: C07K 16/04; C07K 1/14; A61K 39/395; A23C 9/14; A61P 31/04; A61P 31/12.

(66) Prioridade Interna: BR102013027393-7 de 24/10/2013.

(54) Título: PROCESSO PARA A RECUPERAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE COLOSTRO BOVINO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua João Negrão, 280 2º andar, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80010-200

(72) Inventor: CARLOS RICARDO SOCCOL; LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDERBERGHE; CAROLINE TIEMI YAMAGUISHI.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 14/04/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 22/02/2022

Assinado digitalmente por:

Flávia Elias Trigueiro

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

PROCESSO PARA A RECUPERAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE COLOSTRO BOVINO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção descreve um processo para a recuperação, encapsulação e estabilização de imunoglobulinas recuperadas de colostro bovino mediante uma etapa de concentração e desidratação. O pó obtido poderá ser usado como suplemento alimentar em humanos e animais, promovendo uma melhora no sistema imune de pacientes imunodeprimidos, melhora no desempenho físico de atletas, bem como, no tratamento e/ou prevenção de doenças gastrointestinais.

Histórico da Invenção

[002]. O colostro é uma secreção glandular amarelada obtida depois do parto. Este líquido possui viscosidade maior que o leite e é constituído por secreções lácteas e componentes do soro sanguíneo, como as imunoglobulinas. O início da produção do colostro ocorre algumas semanas antes do parto sob a influência de hormônios lactogênicos, como a prolactina, e é interrompida após o parto.

[003]. O colostro é constituído basicamente por nutrientes (Tabela 1) e importantes substâncias como as imunoglobulinas (A, G e M), leucócitos, fatores de crescimento (*Insulin-like growth factors* – IGF, *Transforming growth factor* – TGF, *Epidermal growth factor* – EGF), hormônios (*Growth hormone*), citocinas e fatores antimicrobianos não específicos. Ele também é rico em vitamina A e possui concentrações relativamente altas de caseínas e albuminas. Já o conteúdo de lactose encontrada no colostro é menor que o do leite. De uma forma geral, as maiores concentrações desses componentes bioativos ocorrem nas primeiras ordenhas, e vão diminuindo ao longo das próximas ordenhas, apresentando baixas concentrações no leite.

Tabela 1

Parâmetro	Colostro bovino	Transição do leite pós-parto		
	1	2	3	6
Número de ordenha após o parto				
Gravidade específica	1,056	1,040	1,035	1,032
Sólidos totais (%)	23,9	17,9	14,1	12,9
Lipídios (%)	6,7	5,4	3,9	4,0
Proteína total (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
Caseína (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
Albumina (%)	6,0	4,2	2,4	0,5
Imunoglobulinas (%)	6,0	4,2	2,4	0,09
IgG (g/100 mL)	3,2	2,5	1,5	0,06
Lactose (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
IGF-1 (µg/L)	341	242	144	15
Insulina (µg/L)	65,9	34,8	15,8	1,1
Cinzas (%)	1,11	0,95	0,87	0,74
Cálcio (%)	0,26	0,15	0,15	0,13
Magnésio (%)	0,04	0,01	0,01	0,01
Zinco (mg/100 mL)	1,22	-	0,62	0,3
Manganês (mg/100 mL)	0,02	-	0,01	0,004
Ferro (mg/ 100g)	0,20	-	-	0,05
Cobalto (µg/100g)	0,5	-	-	0,10
Vitamina A (µg/100 mL)	295	190	113	34
Vitamina E (µg/g de lipídio)	84	76	56	15
Riboflavina (µg/mL)	4,83	2,71	1,85	1,47
Vitamina B ₁₂ (µg/100 mL)	4,9	-	2,5	0,6
Ácido fólico (µg/100 mL)	0,8	-	0,2	0,2

Fonte: FOLEY e OTTERBY, *Journal of Dairy Science*, v. 61, p. 1033-1060, 1978.

[004].A tabela 2 apresenta resultados analíticos da transição do colostro para o leite no qual observa-se importante diminuição no conteúdo de gordura, proteína total, proteínas do soro e minerais, e um aumento significativo na concentração da lactose. A concentração das

proteínas do soro como a imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA), α -lactalbumina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg), albumina de soro bovino (BSA), lactoferrina (Lf) e lactoperoxidase (Lp) diminuí significativamente pós-parto (Tabela 3).

Tabela 2

Componentes (%)	Colostro bovino (tempo pós-parto)		
	3 horas	72 horas	Leite bovino
Gordura	6,80	3,72	3,50
Proteína total	9,42	4,68	3,20
Proteínas do soro	8,50	1,60	0,50
Caseínas	0,92	3,18	2,73
Lactose	2,38	4,27	4,60
Cinza	1,02	0,74	0,70
Sólidos totais	19,62	13,41	12,00

FONTE: HENG, *Food for Health in the Pacific Rim*, USA: Food and Nutrition Press, p.405-411, 1999.

Tabela 3

Tempo pós-parto (horas)	Concentração (mg/mL)						
	IgG	IgA	α -La	β -Lg	BSA	Lf	Lp
3	45,00	7,08	5,97	40,50	5,07	3,06	3,46
12	61,50	9,55	8,40	39,88	5,21	4,28	4,29
24	40,00	6,98	8,56	26,54	1,97	1,77	2,45
36	5,00	3,17	6,42	18,47	1,20	n.d.	1,00
48	3,60	0,56	8,12	19,42	1,15	0,94	n.d.
60	5,80	0,56	8,12	19,42	1,15	0,94	n.d.
72	6,00	0,12	2,36	6,18	0,44	n.d.	n.d.
Leite	0,50	0,09	2,00	4,00	0,28	0,02-0,35	0,03

FONTE: HENG, *Food for Health in the Pacific Rim*, USA: Food and Nutrition Press, p.405-411, 1999.

[005].O colostro é a primeira fonte de imunoglobulina materna. As imunoglobulinas são anticorpos sintetizados pela glândula mamária em

resposta a estímulos imunogênicos ou antigênicos, como por exemplo, bactérias e vírus. Esse grupo de proteínas globulares exerce atividade protetora sobre a mucosa intestinal protegendo-a contra microrganismos patogênicos. A transferência passiva e absorção das imunoglobulinas no intestino delgado ocorrem durante as primeiras 24 horas após o nascimento dos bezerros, protegendo-os contra organismos causadores de doenças letais para os recém-nascidos. Outros compostos antimicrobianos importantes incluem a lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase.

[006].No colostro bovino as imunoglobulinas estão divididas em Imunoglobulina G (IgG), Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina A (IgA), sendo que a Imunoglobulina E (IgE) e D (IgD) também estão presentes. As IgGs representam 85 a 90% das imunoglobulinas totais, sendo que IgM e IgA representam 7% e 5%, respectivamente. As IgGs ainda se dividem em subclasses como a imunoglobulina G1 (IgG1) e G2 (IgG2), as quais correspondem a 80-90% e 10-20% do total de IgGs, respectivamente (LARSON, B. L.; HEARY, H. L. Jr; DEVERY, J. E., *Journal of Dairy Science*, v. 63, p. 665–671, 1980). A IgG1 é derivada principalmente do sangue e transportada pelas células alveolares mamárias mediadas por um mecanismo receptor ativo. Já a imunoglobulina G2 (IgG2) pode ser derivada do sangue ou sintetizada pelo plasma ou por células epiteliais da glândula mamária, sendo transferida às células mamárias secretórias. Tanto a IgA como a IgM são também sintetizadas pelo plasma ou células epiteliais da glândula mamária (LARSON, B. L., *Advanced Dairy Chemistry*, London, Elsevier, pp. 231–254, 1992).

[007].No que diz respeito à estrutura, a IgG é uma glicoproteína monomérica que consiste basicamente de 2 cadeias curtas de polipeptídios (com peso molecular de aproximadamente 25 kDa) e 2 cadeias longas (com peso molecular entre 50 a 70 kDa) ligada por

pontes de dissulfeto. Essa cadeia possui uma região constante (Fc) e outra variável (Fab), a qual possui sítios de ligação a antígenos na região Fab N-terminal (STANFIELD, R. L. *et al.*, *Science*, v. 248, p. 712-719, 1990). Os genes que codificam a região Fc dominante são os primeiros determinantes que caracterizam a classe de imunoglobulina, promovendo o aparecimento de subclasses como a IgG1 e IgG2 (OYENIYI, O. O.; HUNTER, A. G., *Journal of Dairy Science*, v. 61, p. 44-48, 1978).

[008].O setor produtivo de leite no Brasil é uma das maiores cadeias alimentares brasileiras que se encontra em plena expansão, com uma produção de 22,3 bilhões de litros em 2012. O leite no estado *in natura* e em pó representou um faturamento superior a U\$ 55 bilhões em 2012 (<http://www.ibge.gov.br>). No mesmo ano, a nível mundial o Brasil ocupou o sexto lugar na produção de leite, ficando atrás da União Européia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia (<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/5t34sj56t/s1784m292/h989r3734/dairy-market-07-12-2012.pdf>). Entre os estados brasileiros, o Paraná foi o terceiro maior produtor com uma produção de aproximadamente 680 milhões de litros em 2012 (<http://www.ibge.gov.br>).

[009].Considerando que, o colostro bovino faz parte da cadeia produtiva do leite e que, atualmente, existe nas propriedades rurais um excedente de colostro produzido por bovinos em lactação, consumido apenas parcialmente pelos bezerros, foi proposta nesta invenção uma tecnologia que inclui o processamento dessa matéria-prima rica em compostos bioativos (como as imunoglobulinas G) para a elaboração de um produto de alto valor biológico, com interessante aplicação no mercado de alimentos nutracêuticos e funcionais.

[010].A produção de alimentos funcionais e nutracêuticos é uma tendência crescente na atualidade. Os alimentos funcionais são reconhecidos por trazerem benefícios à saúde do consumidor através da melhora geral das condições fisiológicas e redução do risco de algumas doenças. Outras definições descrevem os alimentos funcionais como alimentos aparentemente similares aos convencionais consumidos como parte da dieta, porém que tenham sofrido alguma modificação a fim de oferecer funções fisiológicas além de providenciar a nutrição básica (ROBERFROID, M.B., *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 1039–1041, 1999). O termo alimento nutracêutico foi introduzido por Stephen DeFelice em 1989 e refere-se a alimentos ou partes de alimentos que proporcionam benefícios medicinais ou à saúde e podem atuar na prevenção e tratamento de várias doenças (VASCONCELOS, F. de A. G. de, *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 935-945, 2010).

[011].O colostro bovino tem demonstrado ser uma fonte de probióticos (LINDNER, J.D.D. *et al.*, *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, p. 364-368, 2011). Os alimentos probióticos também podem ser classificados como alimentos funcionais. O uso desse tipo de alimento é cada vez maior já que o mesmo pode ser consumido como parte da dieta e ser usado na prevenção de doenças que afetam diferentes faixas etárias. A FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*, 2001) (http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf) define os probióticos como 'microrganismos vivos os quais, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício terapêutico ou à saúde do hospedeiro.' Os microrganismos mais empregados na elaboração de alimentos probióticos são as bactérias ácido lácticas e as bifidobactérias, sendo os gêneros *Bacillus*, *Aspergillus* e *Saccharomyces*

menos comuns. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são frequentemente utilizados na indústria de laticínios, carnes fermentadas, refrigerantes, vegetais e cereais. Já *Enterococcus*, *Bacillus*, *Aspergillus* e *Saccharomyces* são mais utilizados em rações animais. Dentre os benefícios à saúde conferidos pelo consumo dos probióticos estão a prevenção de doenças inflamatórias, infecções e alergias, redução do colesterol, prevenção de distúrbios gastrointestinais e de alguns tipos de câncer (SOCCOL, C.R. *et al.*, *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010).

[012].Nos últimos anos, métodos e tecnologias usadas para o isolamento, extração, concentração e purificação de proteínas específicas, como as imunoglobulinas, provenientes do leite/colostró foram desenvolvidas, mas sem êxito para a produção em larga escala. Métodos físicos de separação de imunoglobulinas são baseados no peso molecular, ponto isoelétrico, mobilidade eletroforética e solubilidade.

[013].Processos tecnológicos como tratamentos térmicos, filtração e secagem vêm sendo utilizados com o objetivo de reduzir a carga microbiana e isolar as frações bioativas do colostro bovino, no entanto, podem degradar e afetar o estado funcional destas moléculas. Informações sobre a estabilidade destes componentes durante e após o processamento são limitadas, mas necessárias para o estudo e desenvolvimento de tecnologias apropriadas ao escalonamento industrial.

[014].A manutenção da atividade biológica das imunoglobulinas pode ser alcançada com o uso de técnicas de microencapsulação e secagem por liofilização. A microencapsulação consiste em incorporar proteínas ou compostos bioativos numa matriz ou em sistema de revestimento, os quais permitem a sua liberação mediante

determinadas condições do meio a uma velocidade específica. Os materiais usados para a microencapsulação são lipídios, proteínas e polímeros. Exemplos de polímeros biodegradáveis naturais que podem ser usados na microencapsulação são alginatos, gelatinas, albumina, caseína e colágeno, sendo que maltodextrina e inulina também vêm sendo utilizadas (SAÉNZ *et al.*, *Food Chemistry*, v. 114, p. 616-622, 2009).

[015]. Já a secagem por congelamento (*freeze-drying*) ou liofilização é um processo largamente utilizado na indústria e consiste em remover a água do produto congelado por sublimação e dessorção a vácuo. No entanto, o emprego dessa técnica ocasiona estresse às moléculas sensíveis às etapas de congelamento e secagem, já que o congelamento promove uma fase de separação em gelo e solução crioconcentrada. Essa solução concentrada pode induzir a uma agregação de partículas e a cristalização do gelo pode levar a danos mecânicos. A liofilização é sugerida nesta invenção como forma de estabilização da imunoglobulina G e outros compostos bioativos presentes no produto. No entanto, sua aplicação é mais efetiva juntamente com o uso de crioprotetores (protetores contra o congelamento) ou lioprotetores (protetores contra a secagem). Excipientes comumente usados na indústria farmacêutica/alimentícia incluem agentes espessantes (amido, trealose, manitol, lactose), tampões (fosfato, citrato), estabilizadores (sacarose, sorbitol, dextrana, trealose, lactose, glicose), reguladores de tonicidade (manitol, sacarose, glicina, cloreto de sódio) e modificadores de temperatura de colapso (dextrana, polietilenoglicol, ciclodextrina). Alternativamente, outros métodos de desidratação poderiam ser utilizados como secagem por atomização (*spray drying*) ou a vácuo.

[016]. As imunoglobulinas derivadas do leite e do colostro já vêm sendo utilizadas em suplementos infantis e outros alimentos. Os produtos de

colostro que contêm as imunoglobulinas são geralmente provenientes de bovinos imunizados ou não imunizados. O colostro é coletado, desnatado, pasteurizado e secado em condições que mantenham a sua atividade biológica. Os produtos estão disponíveis na forma de pós liofilizados ou secos em spray dryer e soro de colostro líquido filtrado ou concentrado. Dentro dos produtos secos estão incluídos pós de colostro, pós desnatados, concentrado de proteína de colostro desnatado e concentrado de soro de colostro. Exemplos de produtos de colostro comercializados a nível mundial são: Intact™ (Numico RA, Austrália), Gastrogard R™ (Northfield Laboratories, Austrália), Pro-immune 99 (GalaGen Inc., Estados Unidos), Lactimmunoglobulin Biotest (Biotest Pharm GmbH, Alemanha) e Colostrum Gold™ (Kirkman, Estados Unidos), MT. Capra Wholefood Nutritionals (Estados Unidos), Caprilac & Information Age LTd. (Austrália). As imunoglobulinas podem também ser incorporadas nas formulações de alimentos vendidos em saches, cápsulas, tabletes de mascar e soro de colostro líquido.

[017].Existem poucas formulações a base de colostro bovino que são comercializadas na Austrália, Estados Unidos e Alemanha. Algumas das funções conferidas pelo uso destas formulações são a ação imunopotencializadora, suplemento para aumentar o desempenho atlético e auxílio na prevenção da diarreia viral em pacientes infantis e imunodeprimidos. No Brasil estas formulações ainda não foram desenvolvidas com eficácia, provavelmente porque a obtenção dos componentes bioativos e funcionais do colostro envolvem grandes desafios em termos de processamento e estabilidade dos componentes bioativos. A presente invenção propõe um processo para obtenção de um produto à base de colostro bovino, com manutenção da atividade biológica dos seus compostos bioativos.

Estado da Arte

[018].O colostro bovino já foi utilizado como suplemento na alimentação humana. Estudos indicaram uma melhora em pacientes com diarreia, que sofriam de síndrome da imunodeficiência, colite inflamatória induzida por medicamentos e respostas de fase aguda a cirurgias (HE, F. *et al.*, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 31, p. 93–96, 2001). Alguns estudos relataram certas funções conferidas às proteínas do soro bovino dentre as quais podem-se citar sua ação imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, anticâncer, antiúlcera, ação protetora ao sistema cardiovascular, trazendo benefícios também à atividade esportiva e podendo ser aplicadas como fator de crescimento.

[019].Shimazaki *et al.* (2001, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, p. 1136–1139) verificaram que a administração de leite obtido de vacas imunizadas inibiu significativamente a recolonização de *Streptococcus mutans* na saliva e nas placas dentárias comparado ao grupo controle. Foi relatado que a incidência de infecções respiratórias pode ser reduzida com a administração oral do produto comercial Intact TM, onde o seu efeito é atribuído a fatores de crescimento endógenos presentes no colostro (BRINKWORTH, G. D.; BUCKLEY, J. D., *European Journal of Nutrition*, v. 42, p. 228-232, 2003). A ingestão de imunoglobulinas de colostro de vacas imunizadas também demonstrou ser efetiva na prevenção de infecções por rotavírus e *E. coli* enterotoxigênica em crianças e adultos (DOSKA, S., *The Japanese Society for Food Science and Technology*, v. 41, p. 523–528, 1994).

[020].Tratamentos utilizando imunoglobulinas específicas provenientes do colostro têm demonstrado reduzir o grau de inflamação e colonização da bactéria *Helicobacter* em ratos (MAMILA, P. *et al.*, *Helicobacter*, v. 8, p. 192–201, 2003) e o grau de inflamação em

crianças (OONA, M. *et al.*, *Alpe Adria Microbiology Journal*, v. 6, p. 49–57, 1997). Ensaios clínicos com anticorpos específicos de leite bovino mostraram-se efetivos no tratamento contra *Cryptosporidium*, rotavírus e *Shigella flexneri*.

[021].A eficácia da administração oral já foi bem documentada em modelos animais e ensaios clínicos em humanos. A suplementação oral com colostro bovino limitou os efeitos imunodepressivos, melhorando o sistema de defesa em indivíduos que sofreram estresse por exercícios prolongados (4 semanas) (DAVISON, G.; DIMENT, B. C., *British Journal of Nutrition*, v. 103, p. 1425-1432, 2010). Também foi demonstrado que a sua administração poderia ser preventiva na diminuição da glicose no sangue, colesterol total e triglicérides em humanos (KIM, J. H. *et al.*, *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.20, p. 298-303, 2009).

[022].A patente PI1102588-3 reivindicou o uso de colostro/soro de colostro bovino e/ou caprino como ingrediente funcional em produtos lácteos fermentados. A invenção descreve técnicas convencionais para a obtenção do soro e posterior incorporação do mesmo em produtos lácteos a serem fermentados por bactérias ácido lácticas. A presente invenção também propõe um método para a obtenção do soro de colostro, no entanto o foco é direcionado à concentração/isolamento de imunoglobulinas G e posterior formulação de um produto funcional com o uso de EPS de bactérias lácticas e leveduras.

[023].Algumas técnicas que podem ser aplicadas na produção de imunoglobulinas de leite ou colostro são a precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e processos com membranas. O uso de membranas em tubos de aço inoxidável providenciou a recuperação de 90% de imunoglobulinas biologicamente ativas (THOMAS, R. L. *et al.*, *Journal of Food Science*, v. 57, p. 1002–1005, 1992).

O uso da gel filtração também mostrou ser eficiente na recuperação de imunoglobulinas. Van Oss (1982, *Separation and Purification Reviews*, v. 11, p. 131-176) alcançou um rendimento de 90% utilizando a gel filtração para o isolamento de imunoglobulinas. Rendimentos superiores a este (99% de IgG) foram alcançados por Al Mashikhi e Nakai (1987, *Journal of Dairy Science*, v. 70, p. 2486-2492) que utilizaram a precipitação por sulfato de amônio e uma coluna de Sephacryl S-300.

[024]. Métodos de separação por membranas utilizando diferença de pressão vêm sendo utilizados para concentrar, fracionar e/ou purificar soluções. O isolamento de frações protéicas (peso de 10-1.000 kDa ou dimensão de 2 a 10 nm) pode ser realizado com o uso de membranas de microfiltração, diafiltração e ultrafiltração. A microfiltração utiliza membranas com poros de 0,1 a 10 μm (100 a 10.000 nm). A ultrafiltração é recomendada para proteínas menores já que utiliza membranas com poros na faixa entre 1 e 100 nm. A diafiltração consiste no uso de membranas de microfiltração ou ultrafiltração com uma alimentação contínua de solvente em vazão equivalente à do permeado (filtrado). Um exemplo da separação de proteínas por este método foi relatado por Sokolowska *et al.* (2008, *International Dairy Journal*, v. 18, p. 204-109) que utilizaram uma coluna de diafiltração de 10 kDa e uma etapa de cromatografia líquida de fase reversa (coluna C18) para a recuperação de proteínas de baixo peso molecular ricas em prolina (20% de colostro) e aminoácidos ácidos (18%).

[025]. Com o objetivo de obter uma fração da imunoglobulina G de colostro bovino, Piot *et al.* (2004, *Lait*, v. 84, p. 333-341) testaram dois processos: microfiltração (porosidade da membrana 0,1 μm) seguido pela ultrafiltração (membrana de 100 kDa). Esses métodos resultaram na recuperação de 80% das IgGs no microfiltrado, e mais de 90% na ultrafiltração (fração do retentado), levando a uma recuperação

global de 64% das IgGs. Stott e Lucas (1989, Patente U.S. No. 4,834,974) estudaram dois processos para a recuperação das imunoglobulinas a partir de leite e soro de queijo. No primeiro processo, eles realizaram ultrafiltração do soro em membrana de 10 kDa, para a remoção da lactose, minerais e sais, e membrana de 100 kDa, para a remoção da albumina e outras proteínas menores. No segundo processo eles utilizaram as mesmas membranas (10 e 100 kDa), e uma cromatografia de troca iônica. A fração utilizada foi o retentado da ultrafiltração. Os produtos obtidos do retentado e fração passada em coluna de cromatografia apresentaram 8% e 50% de imunoglobulinas, respectivamente. A presente invenção utilizou membranas microfiltração de 0,22 µm e também alcançou altos rendimentos de 85% a partir do soro de colostro.

[026].A patente CN1557837A propõe um método em várias etapas para a recuperação de substâncias biologicamente ativas de colostro bovino. O método prevê a separação de fatores de crescimento semelhantes à insulina, imunoglobulinas e polipeptídeos de ácido fosfórico. Com relação à etapa de recuperação das imunoglobulinas, o método contempla as etapas de desnatamento, acidificação e o uso de membranas de 8.000 a 20.000 MW (*molecular weight*), sendo que a fração retida é neutralizada e passada em membranas de ultrafiltração de 80.000 a 160.000 MW. A fração concentrada retida na membrana é desidratada em *spray drying* é enriquecida em imunoglobulinas bovinas. Nessa patente foi proposto um método para a recuperação de vários compostos bioativos de colostro bovino, incluindo as imunoglobulinas. Já na presente invenção foi proposto um processo para obtenção de um produto de colostro com técnicas que diferem da citada acima, em relação ao processo de separação da caseína (maior fração proteica) e secagem por liofilização. Além disso, a

presente invenção utilizou um lioprotetor com alto valor biológico e obteve um alto rendimento em imunoglobulinas G bovinas ($78 \pm 2\%$).

[027]. Stephen *et al.* (2003, Patente U.S. No. 6592905) utilizaram trocadores catiônicos (pH 2,5-4,5) para produzir uma fração proteica enriquecida com imunoglobulinas. O processo foi mais efetivo quando se utilizou o retentado obtido pela ultrafiltração do soro de colostro em membranas de 5 a 50 kDa. O rendimento em imunoglobulinas para o soro doce foi de 40-60% e para o soro ácido foi de 50-80%. Já a patente US2005092684 propôs um método e um sistema para isolar peptídeos e proteínas de fluidos mamários como o colostro bovino. A recuperação das imunoglobulinas baseou-se em dois métodos consecutivos: o uso de trocadores iônicos (catiônicos ou aniônicos) para isolar proteínas globulares de 10 a 500 kDa. O uso de eluente com pH ajustado, posterior diafiltração para remoção dos sais, e secagem (por liofilização ou *spray dryer*); e o uso da fração retida na coluna de troca iônica, com ajuste do pH e posterior microfiltração (porosidade menor que 0,3 μm) ou ultrafiltração (porosidade menor que 20 kDa), sendo que a fração retida teve o pH ajustado (maior que 5,0) pelo eluente, e foi posteriormente diafiltrada e desidratada (por liofilização ou *spray dryer*). A segunda etapa da invenção possui processos semelhantes aos dessa invenção, no entanto, a formulação do produto final não contempla o uso de agentes protetores como os EPS (exopolissacarídeos), não caracterizando a formulação de um produto a ser comercializado. O produto dessa invenção é caracterizado por um alto conteúdo de proteínas, especificamente as imunoglobulinas provenientes de colostro bovino.

[028]. Xie (2006, patente CN 1883505-A) propôs um novo método para viabilizar o processo de recuperação de substâncias bioativas do colostro bovino (como lactoferrina e Imunoglobulinas G). Nesta

invenção, o uso de uma resina de troca catiônica para lactoferrina e aniônica para as IgGs promoveu uma recuperação de mais de 300% comparado ao gel de troca iônica. Isso porque o equipamento proposto trabalha com 3 regiões da resina, na qual uma delas possui um alto grau de saturação, o que fez o sistema ter um bom custo efetivo. A presente invenção reivindica um processo simples que envolve a microfiltração para produção de um produto à base de colostro composto por uma fração enriquecida em imunoglobulinas G.

[029].A aplicação de mais de uma técnica de purificação mostrou ser bastante efetiva na recuperação das imunoglobulinas. Raymond *et al.* (1986, Patente U.S. No. 4582580) testaram o fracionamento do soro de colostro bovino através de eletroforese líquida, obtendo uma fração rica em imunoglobulinas (70-80%). Essa fração foi passada em uma coluna de troca iônica e a solução obtida apresentou 98-100% de imunoglobulinas.

[030].O colostro *in natura* pode ser uma fonte de organismos infecciosos como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, conhecido como Map; *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. A pasteurização é o tratamento térmico que vem sendo largamente utilizado para a eliminação dos micro-organismos patogênicos, e tem demonstrado ser efetiva na manutenção da estabilidade das imunoglobulinas de colostro bovino. Godden *et al.* (2006, *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 3476-3483) demonstraram que a pasteurização do colostro a 60°C por 30 minutos foi suficiente para a eliminação de microrganismos como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* e *M. bovis*. Hayes, Hughes e Greene (2012, *Journal of Food Science*, v. 77, n. 7, p. M359-M363) identificaram majoritariamente espécies de *Bacillus* e em menor

quantidade, espécies de *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Kocuria* e *Enterococcus* em amostras de colostro e soro de colostro desidratado.

[031].No entanto, além de provocar alterações na estrutura das imunoglobulinas, a pasteurização pode afetar as características físicas do colostro bovino. Alguns estudos têm demonstrado que pasteurização pode levar a um aumento na viscosidade do colostro (McMARTIN, S. *et al.*, *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2110-2118, 2006) e desnaturação das imunoglobulinas (GODDEN, S. *et al.*, *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1503-1512, 2003).

[032].A recuperação das imunoglobulinas varia entre 25 e 70% em relação aos níveis iniciais, conforme os métodos utilizados. Tratamentos térmicos para a redução da microflora presente no leite e colostro, por exemplo, influenciaram na conformação espacial das Igs e sua atividade biológica (MAINER, G. *et al.*, *Journal of Dairy Research*, v. 66, p. 131-137, 1999). Tratamentos a 72°C por 15 segundos resultaram em perdas de 10 a 30% da atividade das Igs (LI-CHAN, E. *et al.*, *Food Research International*, v. 28, p. 9-16, 1995). Tratamentos UHT (138°C durante 4 segundos) resultaram na inativação total das IgGs (KUMMER, A. *et al.*, *Food and Agricultural Immunology*, v. 4, p.93-102, 1992).

[033].Contudo, alguns estudos revelaram que a sensibilidade ao calor parece ser dependente da espécie. Diferenças na sensibilidade térmica das IgGs bovina, caprina e ovina (LAW, A. J. R., *Milchwissenschaft*, v. 50, p. 384–388, 1995) e entre isótopos de imunoglobulina G, A e M bovina foram observados (MAINER, G. *et al.*, *Journal of Food Science*, v. 62, p. 1034–1038, 1997). Foi constatado que a termoestabilidade da IgG é maior que da IgA, e ambos são mais estáveis que a IgM.

[034].Técnicas quantitativas vêm sendo empregadas no estudo da estabilidade térmica das imunoglobulinas e se baseiam em métodos cromatográficos, calorimetria diferencial de varredura (*Differential*

Scanning Calorimetry) e métodos imunológicos. Esses métodos estimam os parâmetros cinéticos e termodinâmicos do processo de desnaturação. Especificamente, os métodos imunológicos medem o grau de desnaturação pela perda da imunoreatividade das imunoglobulinas, ocasionada por alterações na região antígeno ligante. A aplicação desse método, no entanto, requer o uso de anticorpos específicos às imunoglobulinas a serem testadas.

[035]. Diversos estudos têm sido realizados a fim de assegurar a manutenção da atividade biológica das IgGs de leite ou colostro bovino. Tais estudos avaliaram a estabilidade das IgGs a condições de estresse ao calor, pH e pressão durante etapas de purificação, processamento e estocagem. A estabilidade das imunoglobulinas de colostro bovino ao processo de secagem também foi avaliada (CHELACK, B. J.; MORLEY, P. S., HAINES, D. M., *Canadian Veterinary Journal*, v. 34, p. 407-412, 1993; KLOBASA, F.; GOEL, M. C.; WERHAHN, E., *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 923-926, 1998) bem como o uso de protetores (CHEN, C.C.; CHANG, H-M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 3570–3576, 1998; CHEN, C-C.; TU, Y-Y.; CHANG, H-M., *Journal of Food Science*, v.65, p. 188-193, 2000).

[036]. Efstrand *et al.* (2002, *International Dairy Journal*, v. 12, p. 879-887) estudaram a influência do processo de filtração, pasteurização e secagem por liofilização sobre o conteúdo de IgGs do soro de colostro e obtiveram um rendimento de 75% das imunoglobulinas. Chelack, Morley e Haines (1993, *Canadian Veterinary Journal*, v. 34, p. 407-412) compararam técnicas de desidratação do colostro e verificaram uma perda na atividade biológica das imunoglobulinas de 20% na evaporação a vácuo em microondas, 10% na liofilização e 5% na secagem em *spray dryer*. Na presente invenção não foram observadas diferenças significativas nas concentrações das Imunoglobulinas G

totais pelo uso da pasteurização e da liofilização com o uso de um agente protetor.

[037].A patente CN101357941A propôs um produto de imunoglobulina resistente ao calor bem como o processo para a sua obtenção. Nessa patente, o soro de colostro bovino obtido foi concentrado em membrana de ultrafiltração de 100 kDa, misturado a agentes protetores como oligofrutose, sorbitol, maltose oligomérica e glicina e desidratado por *spray drying* a baixas temperaturas (entrada 130-140°C, saída 60-65°C). A presente invenção também prevê uma etapa de concentração mediante o uso de uma membrana de microfiltração (0,22 µm). No entanto, a técnica de secagem foi realizada por liofilização, já que esta causa menor perda biológica dos compostos bioativos do colostro. Além disso, o rendimento da presente invenção é maior (78±2%) se comparado à invenção anteriormente citada que foi de 40%, e o uso do agente protetor (exopolissacarídeos) pode ser considerado de maior valor biológico, agregando apelo funcional e nutracêutico ao produto.

[038].Já a patente CN1116898C propôs um método para a formulação de uma imunoglobulina bovina a ser administrada via oral. A primeira etapa de remoção da gordura é similar a esta invenção, no entanto a remoção da maior fração proteica (caseína) é realizada pela filtração com uma membrana de 20 µm, não com o uso de coagulantes, como da presente invenção. A fração resultante também é passada em membrana de 0,22 µm como nesta invenção, porém a fração a ser desidratada é a filtrada e não a retida, como na presente invenção. A presente invenção usa a etapa de coagulação da caseína, o que resulta na clarificação do colostro, ou seja, remoção da maior fração de proteínas, as quais comprometem o fluxo e diminuem a efetividade do processo de ultrafiltração. Também, a patente CN1116898C não faz

a adição de agentes protetores previamente à etapa de liofilização, o que pode ter comprometido o seu rendimento final (10-36% em imunoglobulinas), em comparação com a presente invenção que fez o uso de EPS e alcançou um rendimento final de $78\pm 2\%$.

[039]. Alguns estudos demonstraram a importância do processo de encapsulação. Kelly *et al.* (1997, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 236–241) verificou que a encapsulação com gelatina promoveu a manutenção das propriedades biológicas das IgGs. Já Wang, Chua e Wang (2004, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 271, p. 92–101) observaram que a encapsulação da imunoglobulina G humana por *freeze-drying* reteve 85% da imunotividade da Ig, sendo que esta foi aumentada para 92% e 95% quando manitol e trealose foram usados como agentes protetores.

[040]. Polissacarídeos são biopolímeros produzidos por animais, plantas, fungos e bactérias. Já os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros excretados para o meio extracelular. Os EPS são polissacarídeos de cadeias longas com ramificações que consistem em repetidas unidades de açúcar e seus derivados. O grupo de bactérias lácticas excreta EPS de alto peso molecular, geralmente heteropolissacarídeos (compostos por vários tipos de monossacarídeos), que apresentam propriedades físicas e reológicas de interesse para a indústria como agentes estabilizadores, gelificadores, emulsificadores ou melhoradores da viscosidade. Nesta invenção fez-se o uso de exopolissacarídeos (EPS) produzido por bactérias lácticas e leveduras durante processo de liofilização do produto de colostro, visto que este EPS pode apresentar um efeito protetor sobre as imunoglobulinas e ainda potencializar o valor terapêutico e nutracêutico do produto.

[041]. Polissacarídeos de *Lactobacillus* sp. têm demonstrado efeitos benéficos à saúde. Kefiran é o polissacarídeo produzido pelo

Lactobacillus kefiranofaciens no interior dos grãos de kefir. Quando esse polissacarídeo foi administrado em ratos numa dose de 100-300mg/kg observou-se uma redução na pressão sanguínea, colesterol e taxa de glicose no sangue (MAEDA *et al.*, *Biofactors*, v. 22, p.197–200, 2004). Outras propriedades desse polissacarídeo também foram relatadas como a atividade anti-inflamatória, antitumoral e estimulação da secreção de imunoglobulinas (RODRIGUES; CARVALHO; SCHEEDORF, *Inflammopharmacology*, v. 13, p. 485-492, 2005; VINDEROLA *et al.*, *Cytokine*, v. 36, p. 254-260, 2006). Também o EPS produzido por *L. rhamnosus* atuou na melhora da secreção do fator da necrose tumoral (DE VUYST; DE VIN, *Comprehensive Glycoscience*, v. 2. Oxford, Elsevier, 2007, p. 477–518).

[042].Pesquisas demonstram que o colostro bovino pode ser administrado em humanos e outros mamíferos já que existe uma compatibilidade dos componentes bioativos com outras espécies (ELFSTRAND *et al.*, 2009, Patente U.S. No. 20090311333). Alguns autores relataram que a atividade imunológica da imunoglobulina G de bovinos imunizados contra específicos patógenos de origem humana foram similares à de imunoglobulinas G de leite humano (FACON, M.; SKURA, B. J.; NAKAI, S., *Food and Agricultural Immunology*, v. 5, p. 85-91, 1993; MEHRA, R.; MARNILA, P.; KORHONEN, H., *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1262-1271, 2006).

[043].Kothe *et al.* (1987, Patente U.S. No. 4,644,056) propôs o uso de uma solução de imunoglobulinas à base de leite e colostro bovino coletado até 30 horas após o parto. Segundo esses autores 1 litro da solução de imunoglobulinas 5%, filtrada sob fluxo cruzado em membranas de poros medindo de 0,1 a 1,2 μm e 5 a 80 kDa, seria apropriada para o tratamento de infecções intestinais bacterianas e virais em humanos e

animais. Essa solução poderia ser administrada via oral em crianças prematuras e/ou com infecção intestinal.

[044].A administração oral de imunoglobulinas de colostro e leite de vacas imunizadas também providenciou uma proteção efetiva contra infecções causadas por *E. coli* enterotoxigênica (TACKET, C. O. *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, v. 12, p.1240-1243, 1988; MIETENS, C.; KEINHORST, H., *European. Journal of Pediatrics*, v. 132, p.239-252, 1989) e *Cryptosporidium* spp. (PLETTENBERG, A. *et al.*, *The Clinical Investigator*, v. 81, p.42-45, 1993) em crianças e adultos, e na prevenção da infecção por rotavírus em animais e crianças (DAVIDSON, G. P., *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*, v. 23, p. 207-212, 1996).

[045].A presente invenção propõe a administração oral de um produto desidratado para atletas, pacientes imunodeprimidos e na prevenção de doenças gastrointestinais em crianças devido ao seu potencial biológico já que contém componentes bioativos e nutracêuticos, como as imunoglobulinas e outros compostos antimicrobianos. Alternativamente, o produto poderá ser ingerido por indivíduos saudáveis de forma a atuar na melhora do sistema imune e outras funções vitais, protegendo-os contra organismos que possam representar riscos à saúde.

Descrição Resumida da Invenção

[046].A presente invenção visa utilizar o excedente de colostro bovino das fazendas leiteiras para desenvolver produtos de alto valor biológico de interesse para a indústria alimentícia/nutracêutica. A invenção baseia-se na recuperação de compostos bioativos, na maior parte, imunoglobulinas G, obtidas a partir de soro de colostro bovino, mediante técnicas de purificação, como a ultrafiltração, e posterior encapsulação com exopolissacarídeos e estabilização, através da

desidratação por liofilização, disponibilizando o produto final na forma de pó. Na presente invenção é recomendada a administração oral de 1 a 5 gramas por dia do produto em pó. O consumo do produto pode ser efetivo na melhora do desempenho de exercícios físicos para atletas, melhora do sistema imune em pacientes imunodeprimidos e na prevenção de doenças gastrointestinais, especialmente em crianças.

Citação das Figuras

[047].As figuras em anexo proporcionam um melhor entendimento do processo para a recuperação e estabilização das imunoglobulinas de colostro bovino.

[048].A Figura 1 ilustra as etapas de processamento do soro de colostro bovino e a elaboração do produto contendo imunoglobulinas G. O colostro total foi primeiramente separado da gordura e posteriormente da caseína, obtendo-se o soro de colostro. Este passou por etapa de diálise e em seguida, foi submetido a etapas de microfiltração e ultrafiltração. O soro de colostro dialisado foi filtrado em membrana de porosidade 0,22 µm, e recuperaram-se as frações do retentado e do filtrado. A fração filtrada em 0,22 µm foi passada em membrana de 300 kDa, e recuperaram-se as frações do retentado e do filtrado. A fração filtrada em 300 kDa foi então passada em membrana de 100 kDa, e novamente as frações do retentado e do filtrado foram recuperadas. Para a elaboração do produto em pó, reservou-se a fração do retentado de 0,22 µm, e adicionou-se uma solução de exopolissacarídeo 1% (massa/volume), produzido a partir de uma cultura de kefir, que funcionou como agente crioprotetor e encapsulante, procedendo-se à pasteurização dessa mistura a 60°C por 45 minutos. A mistura foi liofilizada e obteve-se o produto em pó com um teor de 78±2% de imunoglobulinas G.

[049].A Figura 2 ilustra todas as etapas envolvidas no processo de recuperação das imunoglobulinas G, demonstrando o rendimento obtido em cada etapa. Legenda: IgG = imunoglobulina G, P = proteína total.

[050].A Figura 3 ilustra o perfil eletroforético do colostro e frações obtidas a partir das técnicas de purificação. Legenda: 1 – colostro total; 2 – soro de colostro dialisado; 3 – fração do retentado em membrana de 0,22 µm; 4 – fração do filtrado em membrana de 0,22 µm; 5 – filtrado em carvão ativado 141S 6x12; 6 – precipitado por sulfato de amônio; 7 – filtrado em coluna de gel filtração; P – padrão de peso molecular.

[051].A Figura 4 ilustra que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na massa de IgG, quando o produto em pó foi armazenado por 0, 15 e 30 dias a temperatura ambiente (15-25°C).

Descrição Detalhada da Invenção

[052].A presente invenção consiste em um processo para a recuperação, encapsulação e estabilização de imunoglobulinas de colostro bovino para obtenção de um produto à base de colostro bovino, rico em compostos bioativos como a imunoglobulina G encapsulado com uma solução de exopolissacarídeo produzido a partir de uma cultura de kefir. O produto poderá ser disponibilizado na forma desidratada, devendo ser conservado a temperatura abaixo de 4°C ou temperatura ambiente. O produto em pó poderá ser comercializado em cápsulas contendo 0,5 gramas (2 a 10 cápsulas) ou sachês de 1 a 5 gramas, devendo o consumo ser realizado de forma diária.

[053].Diferentes volumes de colostro bovino foram coletados e misturados. Os bovinos pertenciam à raça Holandesa e tinham de 2 a 8 anos, e uma produção média 40 litros de leite por dia. Os animais não estavam em tratamento com antibióticos. A assepsia dos tetos foi

realizada com solução sanitizante (detergente) e de iodo. O colostro foi coletado por ordenha mecânica 2 horas após o parto, sendo realizadas 2 ordenhas diárias (manhã e tarde) até o quinto dia pós-parto. Após a ordenha, o colostro foi imediatamente mantido sob refrigeração (2-4°C) ou congelado a -20°C. O descongelamento foi realizado a 4°C.

[054]. Para a produção do soro, centrifugou-se o colostro a 3500-5000 rpm a 2°C por 10 a 20 minutos, preferencialmente a 4700 rpm por 15 minutos. A fração lipídica localizada na parte superior foi removida. O colostro desnatado foi então submetido a uma coagulação enzimática através da adição do coalho comercial Christian Hansen (ou similar), o qual foi diluído 1:20000 em água esterilizada. A mistura foi incubada a 30-35°C por 30-60 minutos, preferencialmente a 32°C por 30 minutos. A massa coagulada foi então separada do soro mediante uma centrifugação entre 3500 e 7000 rpm por 10-20 minutos a 4°C, preferencialmente a 5000 rpm por 15 minutos. O soro de colostro, localizado na parte superior (sobrenadante) foi processado a fim de obter uma rica fração dos compostos bioativos. Essa metodologia foi baseada em Elfstrand *et al.* (2002, *International Dairy Journal*, v. 12, p. 879-887). A desnatagem foi realizada para a remoção da fração lipídica (gordura) e a coagulação para a remoção da caseína. Todo o processo para a obtenção do soro é mostrado na Figura 1.

[055]. O soro de colostro foi primeiramente dialisado em membrana de celulose (Sigma-Aldrich) de 76 mm e peso molecular de 12,4 kDa. A solução de diálise foi o tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline* – PBS). As trocas de tampão foram realizadas a cada 12 horas durante 3-5 dias a 4°C. A finalidade da etapa de diálise foi remover a fração de açúcares (lactose) do soro, considerando que a membrana de 12,4 kDa utilizada possuía uma porosidade maior que as moléculas de lactose

(0,34 kDa), permitindo sua passagem pelos poros da membrana, e retendo proteínas maiores como as imunoglobulinas G.

[056]. O sistema de microfiltração e ultrafiltração utilizado foi o Quixstand Benchtop System (GE Healthcare). Alternativamente, para o processamento de volumes maiores poderia ser utilizado o sistema Pellicon® 2 (Millipore). Os cartuchos utilizados mediram 0,22 µm, 300 kDa e 100 kDa de porosidade. Alternativamente, poderiam ser utilizados cartuchos de 750 e 500 kDa após a membrana de 0,22 µm e a membrana de 300 kDa. Membranas de 0,1 a 10 µm também poderiam ser empregadas. As condições de operação foram 60-80 rpm, pressão de 5-15 psi e fluxo inicial de 1,3-2,5 mL/min. Antes da recuperação das frações foram descartados 15 mL de volume morto. Nesse sistema, o soro de colostro dialisado foi passado em membrana de porosidade 0,22 µm, sendo recuperadas as frações do retentado (fração retida na membrana) e do filtrado ou permeado (fração que passa através da membrana). A fração filtrada em 0,22 µm foi passada em membrana de 300 kDa, sendo recuperadas as frações do retentado e do filtrado. A fração filtrada em 300 kDa também foi passada em membrana de 100 kDa, e novamente as frações do retentado e do filtrado foram recuperadas, como mostra a Figura 1. Todas as frações foram analisadas quanto ao teor de IgG total e proteína total. A quantificação das imunoglobulinas G totais (IgG1 e IgG2) foi realizada pelo método de imunodifusão radial (RID), segundo Mancini, Carbonara e Heremans (1985, *Immunochemistry*, v. 2, p. 235-254, 1965). As amostras foram colocadas em placas de agarose contendo anti-IgG bovina (Kit VMRD, Inc., Kit Kent Laboratories), que foram posteriormente incubadas a 20-25°C por 24-48 horas. Os diâmetros dos halos de precipitação foram medidos através de uma escala em milímetros (Finescale Comparator, VMRD, Inc.) e correlacionados com a concentração de IgG total em

mg/dL. Quando necessário, realizou-se a diluição das amostras 1:1, 1:2, 1:5 ou 1:10 (volume/volume). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-276).

[057].O produto líquido foi obtido do retentado recuperado da membrana de 0,22 μm , o qual apresentou um rendimento de 45% de imunoglobulinas G totais em relação ao conteúdo inicial presente no colostro bovino. O produto líquido pode ser pasteurizado a 60-75°C por 15s a 45min, preferencialmente a 60°C por 45min ou acondicionado sob refrigeração a 4°C para posterior uso. O tratamento térmico também poderia ser feito em placas com trocadores de calor a 72-75°C por 15-20 segundos, porém essas condições de temperatura/tempo podem ocasionar perdas significativas na atividade biológica das IgGs.

[058].Alternativamente, outros processos para a recuperação das IgGs a partir do soro poderiam ser utilizados como a precipitação por solução saturada de sulfato de amônio e uso da cromatografia de exclusão por tamanho em coluna de gel filtração.[059].A presente invenção propõe um processo econômico para a recuperação das imunoglobulinas G e outros compostos bioativos de colostro de bovinos imunizados ou não. Esta invenção possibilita o processamento do colostro bovino, o qual atualmente apresenta baixo valor econômico. Esta invenção poderá agregar valor à cadeia produtiva do leite e diversificar o mercado de alimentos funcionais e nutracêuticos, os quais têm apresentado expressivo crescimento no mercado mundial.

[060].A fim de minimizar as reações químicas decorrentes das condições de acondicionamento e promover a manutenção da atividade biológica das imunoglobulinas G e outros compostos bioativos, realizou-se uma etapa de secagem do produto líquido. O produto obtido do retentado da membrana de 0,22 μm foi liofilizado. Antes da secagem,

no entanto, adicionou-se, sob constante agitação, uma solução de exopolissacarídeo 1% (massa/volume, m/v), produzido a partir de uma cultura de bactérias ácido lácticas e leveduras (*kefir*). A produção do EPS foi em soro de leite desnatado suplementado com glicose (15-45% m/v), peptona bacteriológica (1-3% m/v), citrato de sódio dihidratado (3-6% m/v) e fosfato de potássio monobásico (3-6% m/v). O meio foi pasteurizado a 60-65°C por 30-45 min e inoculado com 4-8% (m/v) de uma cultura de *kefir* com 10^6 a 10^8 UFC/g. A fermentação foi realizada a 37°C por 48h. Centrifugou-se a 10.000g a 4°C por 30 min. Adicionou-se ao sobrenadante ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugou-se nas mesmas condições. Adicionou-se ao sobrenadante etanol absoluto (1:3) e deixou-se em repouso por 24h. Após, centrifugou-se nas mesmas condições anteriormente citadas. Recuperou-se o precipitado e adicionou-se água destilada, e a mistura foi dialisada em membrana de 10-12 kDa por 72h. Procedeu-se ao congelamento e liofilização. O EPS foi armazenado a temperatura ambiente (15-25°C).

[061].O exopolissacarídeo foi utilizado como agente protetor, encapsulante e estabilizante, com o objetivo de diminuir o estresse causado pelo congelamento e secagem, preservando, dessa forma, as proteínas bioativas. Exemplos de outros agentes que também poderiam ser usados para esta finalidade são amido, trealose, fosfato, citrato, sacarose, sorbitol, dextrana, polietilenoglicol, ciclodextrina. Alternativamente, outras técnicas de secagem incluem a secagem por atomização (*spray drying*), por microondas ou a vácuo.

[062].Uma variação do produto pode ser feita incluindo-se na formulação culturas probióticas como *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*,

B. infantis, *B. longum*, *B. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *S. salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus clausii*. Essas culturas podem ser adicionadas na concentração de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL), segundo a recomendação da FAO (Food and Agriculture Organization) e da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO), ou 10^6 a 10^8 UFC/g. A incorporação dessas culturas na formulação pode ser feita juntamente com a adição da solução de EPS (exopolissacarídeo) ou após a etapa de liofilização. No primeiro caso, o cultivo das cepas probióticas pode ser feito previamente em leite ou meio sintético, inoculando-se no produto uma concentração final de 10^8 UFC/mL. Quando as cepas probióticas estiverem na forma liofilizada (pó), estas devem ser adicionadas após a secagem do produto contendo EPS, de forma a alcançar a mesma concentração final de 10^8 UFC/mL.

[063].O produto final (em pó) foi então embalado em sachês de 1-10 gramas cada, preferencialmente 2 gramas, e acondicionado ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Alternativamente, o produto pode ser armazenado a 2 a 4°C. Ingredientes alimentares também podem ser adicionados com o objetivo de realçar os aspectos sensoriais do pó, melhorando a apresentação do produto. Exemplos de aditivos que poderiam ser usados são aromatizantes (aromas naturais ou artificiais), corantes (naturais ou artificiais), conservantes (ácido benzóico, ácido sórbico), estabilizantes (citrato de sódio, fosfato dissódico, tartarato de sódio) entre outros permitidos pela legislação vigente.

[064].Segundo dados da literatura (BUCKLEY, J. D. *et al.*, *Nutrients*, v. 1, p. 224–234, 2009; AHMADI-VINCU, M.; AHMADI, T.; AHMADI, J., *Scientific Researches: Agroalimentary Processes and Technologies*, v. XI, p. 33-40, 2005) e informações disponíveis na base de dados online

(www.colostruminfo.com/basic_info.html) a dose recomendada de ingestão diária de colostro bovino está entre 20 e 60 gramas. Intact® (Numico Research Australia) é um produto de colostro comercializado no mundo todo, cuja eficácia já foi relatada em estudos clínicos que demonstraram a melhora na performance e recuperação de atletas. Este produto contém 75% de proteínas, sendo que a IgG representa 15% das proteínas totais. Logo, o produto desta invenção demanda a ingestão de uma menor dose diária de pó, já que contém em sua composição 78±2% de IgG bovina. Isso facilita a sua disponibilização em embalagens menores (sachês ou cápsulas), tornando-se mais atrativo para ser consumido como suplemento alimentar como parte da dieta diária. É importante ressaltar, no entanto, que o estabelecimento da dose diária é dependente da quantidade necessária para se obter o efeito desejado, como no caso do tratamento de infecções e/ou melhora do sistema imune.

Exemplo 1: (Balanço de massa da Imunoglobulina G)

[065].Uma mistura de colostro bovino de primeira (2 horas pós-parto), segunda (12 horas pós-parto), e terceira ordenha (24 horas pós-parto), foi centrifugada a 4700 rpm por 15 minutos a 2°C. A fração lipídica localizada na parte superior foi removida. Diluiu-se o coalho em pó (Christian Hansen) na proporção de 1:20000 em água esterilizada e adicionou-se ao colostro desnatado. Incubou-se a 32°C por 30 minutos. A massa coagulada foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em membrana de celulose (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato salino a 4°C, sendo as trocas de tampão realizadas a cada 12 horas durante 3 dias. O soro dialisado foi então, submetido a 3 tratamentos: microfiltração e ultrafiltração em membrana de 0,22 µm, 300 kDa e 100 kDa no equipamento Quixstand Benchtop System (GE

Healthcare), extração de glicoproteínas seguida pela precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de gel filtração com a resina Sephacryl S100-HR (GE Healthcare). As etapas bem como o rendimento de cada processo são mostrados na Figura 2.

[066]. Os 3 tratamentos testados apresentaram diferentes rendimentos em relação ao teor de IgG presente no colostro. Um volume de 10 litros de colostro apresentou uma massa de 1.214,3g de IgG. As etapas de desnatamento e coagulação levaram a uma redução de 48,3%, resultando numa massa de 627,4g de IgGs no soro de colostro. A etapa de diálise provocou um incremento de 8% na massa de IgG total em relação à etapa de coagulação, resultando em 677,5g de IgGs. Comparando-se o rendimento de cada processo observou-se que os melhores rendimentos de IgG foram observados no retentado de 0,22 μm (576,3g), o que representou uma recuperação de 45,5% da massa de IgG inicial. Já processos como a precipitação com sulfato de amônio e gel filtração apresentaram baixos rendimentos resultando na recuperação de aproximadamente 14% e 4% de IgG (170,7g e 48,4g, respectivamente). Considerando que o maior rendimento foi obtido no retentado de 0,22 μm , selecionou-se este processo para a elaboração do produto à base de colostro bovino.

Exemplo 2: (Avaliação do grau de purificação dos processos)

[067]. O grau de purificação das proteínas do soro de colostro submetidas a vários tratamentos foi analisado mediante uma eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, U. K., *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970). Amostras foram diluídas até a quantidade de 5 μg em tampão da amostra com beta-mercaptoetanol (reduzidor). As condições de corrida foram a 100V, 0,015A por aproximadamente 2 horas. O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue 1% por 24 horas e

descolorado até o aparecimento das bandas. O colostro total (não tratado) foi comparado ao soro de colostro após o processo de diálise, às frações da ultrafiltração em membrana de 0,22 µm (retentado e filtrado), ao filtrado em coluna de carvão ativado, ao precipitado por sulfato de amônio e ao filtrado em coluna de gel filtração.

[068]. De acordo com a Figura 3 foi verificado que perfil do soro de colostro foi similar ao das amostras tratadas. O soro dialisado, a fração do retentado de 0,22 µm, o filtrado em carvão e o filtrado passado em coluna de gel filtração apresentaram perfis bem semelhantes com destaque de 3 bandas principais (50, 25 e abaixo de 15 kDa). Foi observado que a etapa de produção do soro de colostro dialisado removeu uma banda entre 30 e 25 kDa. Já na fração do filtrado em membrana de 0,22 µm foi verificada a presença de uma banda não visualizada nas outras amostras, de peso molecular abaixo de 15 kDa. Essa banda poderia ser atribuída a proteínas menores como a a-lactoalbumina com peso de 14,175 kDa (BREW *et al.*, 1970), que estariam em maior concentração nessa fração, ou resíduos de aminoácidos decorrentes do processo de redução com beta-mercaptoetanol. A precipitação com sulfato de amônio removeu bandas abaixo de 15 kDa, demonstrando a recuperação das bandas de 25 e 50 kDa as quais compõem a molécula de IgG. No entanto, o rendimento alcançado por essa técnica é baixo (14%), inviabilizando, portanto, o seu uso na produção de suplementos alimentares. A fração do retentado de 0,22 µm, de interesse nesta invenção, mostrou a preservação das bandas principais (50 e 25 kDa) que compõem a molécula de imunoglobulina G, demonstrando que o processo utilizado manteve os compostos bioativos do colostro bovino.

Exemplo 3: (Formulação de produto em pó à base de colostro bovino)

[069]. Uma mistura de colostro bovino de primeira (2 horas pós-parto), segunda (12 horas pós-parto), e terceira ordenha (24 horas pós-parto), foi centrifugada a 4700 rpm por 15 minutos a 2°C. A fração lipídica localizada na parte superior foi removida. Diluiu-se o coalho em pó (Christian Hansen) na proporção de 1:20000 em água esterilizada e adicionou-se ao colostro desnatado. Incubou-se a 32°C por 30 minutos. A massa coagulada foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em membrana de celulose (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato salino a 4°C, sendo as trocas de tampão realizadas a cada 12 horas durante 3 dias. O soro dialisado foi, então, submetido a microfiltração em membrana de 0,22 µm no equipamento Quixstand Benchtop System (GE Healthcare). As condições de operação foram 60-80 rpm, pressão de 5-15 psi e fluxo inicial de 1,3-2,5 mL/min. Um volume morto de 15 mL foi descartado no início da operação do sistema. Recuperou-se a fração retida na membrana (retentado). Adicionou-se ao retentado (1:1) uma solução de EPS 1% (massa/volume) produzida a partir de uma cultura de kefir sob constante agitação. A mistura foi pasteurizada a 60°C por 45 minutos, e posteriormente liofilizada. Foi adicionado a essa mistura 0,2% de uma cultura probiótica liofilizada de *Saccharomyces boulardii* e uma mistura *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. lactis*, *Bifidobacterium longum*, *L. plantarum* e *L. paracasei*. Antes e após a liofilização do produto, determinaram-se as concentrações de IgG total, proteína total e açúcares totais, como mostra a Tabela 4.

TABELA 4

Produto	Proteína total	IgG total	Açúcar total
Líquido (g/L)	91,79 ± 6,08	70,85 ± 3,35	1,43 ± 0,01
Líquido (em 1g de	0,96 ± 0,06	0,74 ± 0,04	0,02 ± 0,00

produto seco - estimativa)

Pó (em 1g de produto)	1,01 ± 0,03	0,78 ± 0,11	0,05 ± 0,00
-----------------------	-------------	-------------	-------------

[070].A concentração de IgG no produto líquido antes da liofilização foi de $70,85 \pm 3,35$ g/L. Considerando que o produto líquido apresentou 9,58% de sólidos totais, estimou-se que o teor de IgG em 1 g de produto seco seria de $0,74 \pm 0,04$ g de IgG (análise teórica). Na análise experimental, o produto liofilizado apresentou $0,78 \pm 0,11$ g de IgG em 1 g de produto seco, o que confirmou que o processo de liofilização não alterou a concentração de IgGs. O conteúdo final de IgG no produto em pó foi de 78%, o que o classifica como uma rica fonte IgG bovina.

[071].Formulações à base de colostro bovino ou imunoglobulinas de colostro bovino já foram relatadas na literatura. Anderson *et al.* (1998) propôs um suplemento a base de colostro bovino (25%) contendo peróxido de magnésio, vitamina C, bioflavonóides e succinato de magnésio. O suplemento apresentou 55% de proteína, sendo que 27% do conteúdo proteico foi composto pelas imunoglobulinas. Dessa forma, a porcentagem de imunoglobulinas no produto final foi de 14,85%. Já o produto desenvolvido nesta invenção apresentou 78% de IgGs no produto final, o que o torna de alto valor para o mercado, já que possui um alto teor de IgG, quando comparado a outras formulações propostas e disponíveis no mercado que apresentam em torno de 10-15% de IgG no produto final.

Exemplo 4: (Estabelecimento da dose diária recomendada)

[072].Uma sugestão de dose diária recomendada é feita nesta invenção, considerando que a ingestão diária de colostro bovino está estabelecida em 20 a 60 gramas. Considerando uma concentração de 3 a 10% de IgG no colostro bovino, a quantidade de IgG no colostro

estaria entre 1,3 e 3,9 gramas, a qual seria a dose diária recomendada. No caso do produto Intact® (comercial), essa dose seria alcançada com a ingestão de 11 a 35 gramas de produto. Já, para o produto dessa invenção, o qual apresenta $78\pm 2\%$ de IgGs, seriam necessários apenas 1,7 a 5 gramas de produto em pó para suprir a dose diária recomendada. Dessa forma, o produto desenvolvido poderá ser disponibilizado em cápsulas ou sachês de 2-10 gramas cada, dependendo do público-alvo e da sua funcionalidade.

Exemplo 5: (Estabilidade de produto em pó à base de colostro bovino)

[073].Avaliando-se a estabilidade ao longo de 30 dias de armazenamento a 20-25°C, na ausência de luz, não foram observadas alterações no teor de IgG total (Figura 3). A massa de IgG em 1 g de produto variou de 0,78 a 0,84g. Não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) no tempo 0, 15 e 30 dias de armazenamento.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA A RECUPERAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE COLOSTRO BOVINO, caracterizado pelo uso de colostro de bovinos de diversas raças, preferencialmente da raça Holandesa, cuja ordenha tenha sido realizada entre 2 e 144 horas após o parto, na elaboração de produtos contendo compostos bioativos, imunológicos, antimicrobianos, funcionais e nutracêuticos, realizado nas seguintes etapas:

- desnatamento,
- coagulação,
- diálise em membrana de 10 a 15 kDa,
- tratamento do soro por meio de técnicas de microfiltração e ultrafiltração,
- adição de uma solução de polissacarídeos encapsulantes e protetores provenientes do kefir,
- tratamento térmico,
- secagem/desidratação,
- acondicionamento.

2. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa de microfiltração com o uso de membranas entre 0,1 e 10 μ m, preferencialmente de 0,22 μ m.

3. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa de ultrafiltração com o uso de membranas entre 100 e 750 kDa, preferencialmente entre 100 e 300 kDa.

4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela recuperação opcional das imunoglobulinas G de

colostro bovino por meio de técnicas de precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração.

5. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela recuperação da fração retida (retentado) na membrana de 0,22 µm e posterior adição de agente encapsulante e protetor à base de polissacarídeos produzidos a partir de uma cultura de kefir, na proporção de 0,5 a 10% (m/v), preferencialmente 1% (m/v).

6. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização do tratamento térmico a 60-75°C por 15s a 45min, preferencialmente a 60°C por 45min.

7. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização de secagem até uma umidade final de 5%, por meio de estufa a vácuo, liofilização ou atomização (*spray drying*), preferencialmente utilizando-se a liofilização.

8. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo acondicionamento do produto seco a 10-25°C ou a temperatura abaixo de 4°C.

FIGURAS

Figura 1

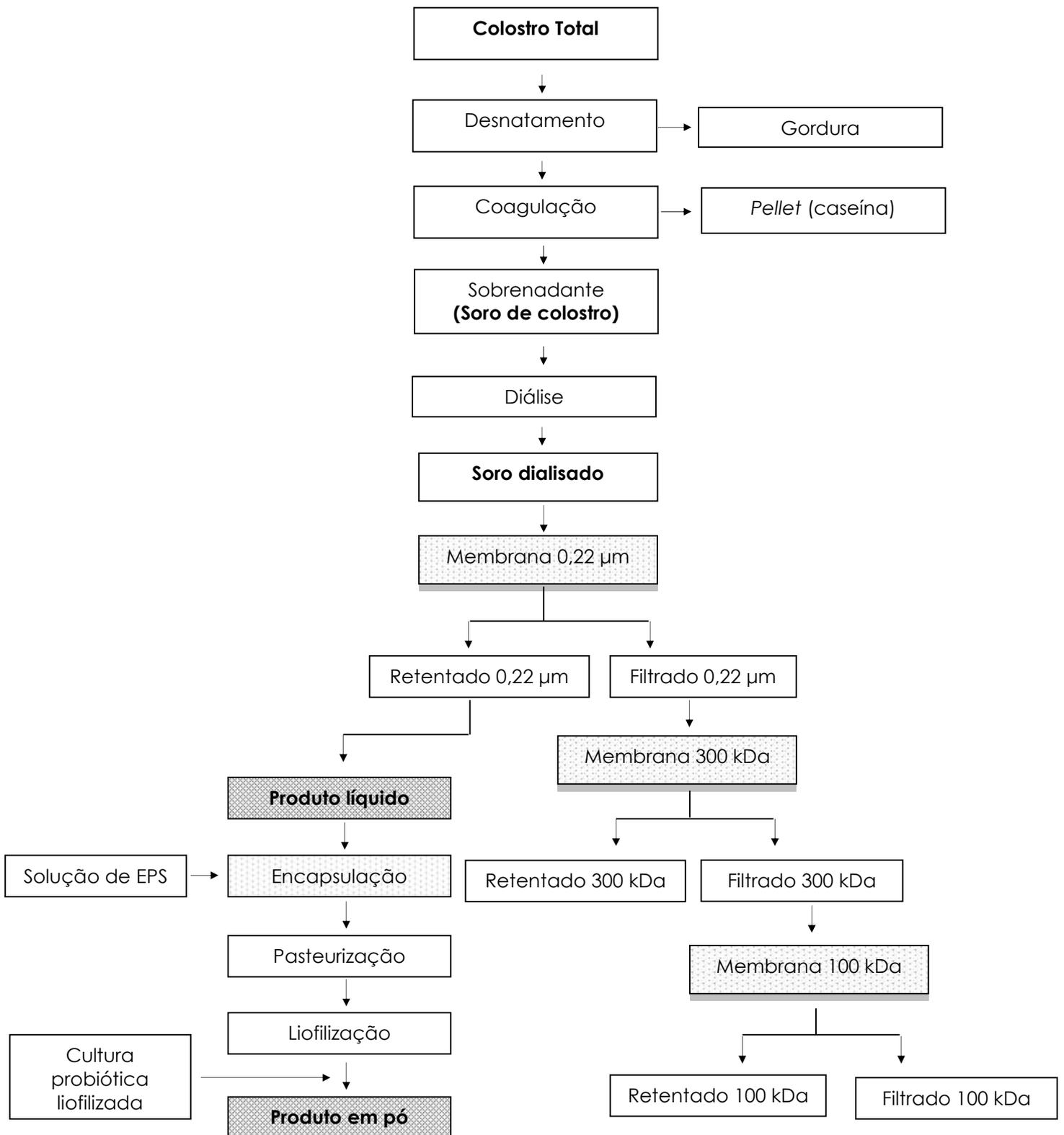


Figura 2

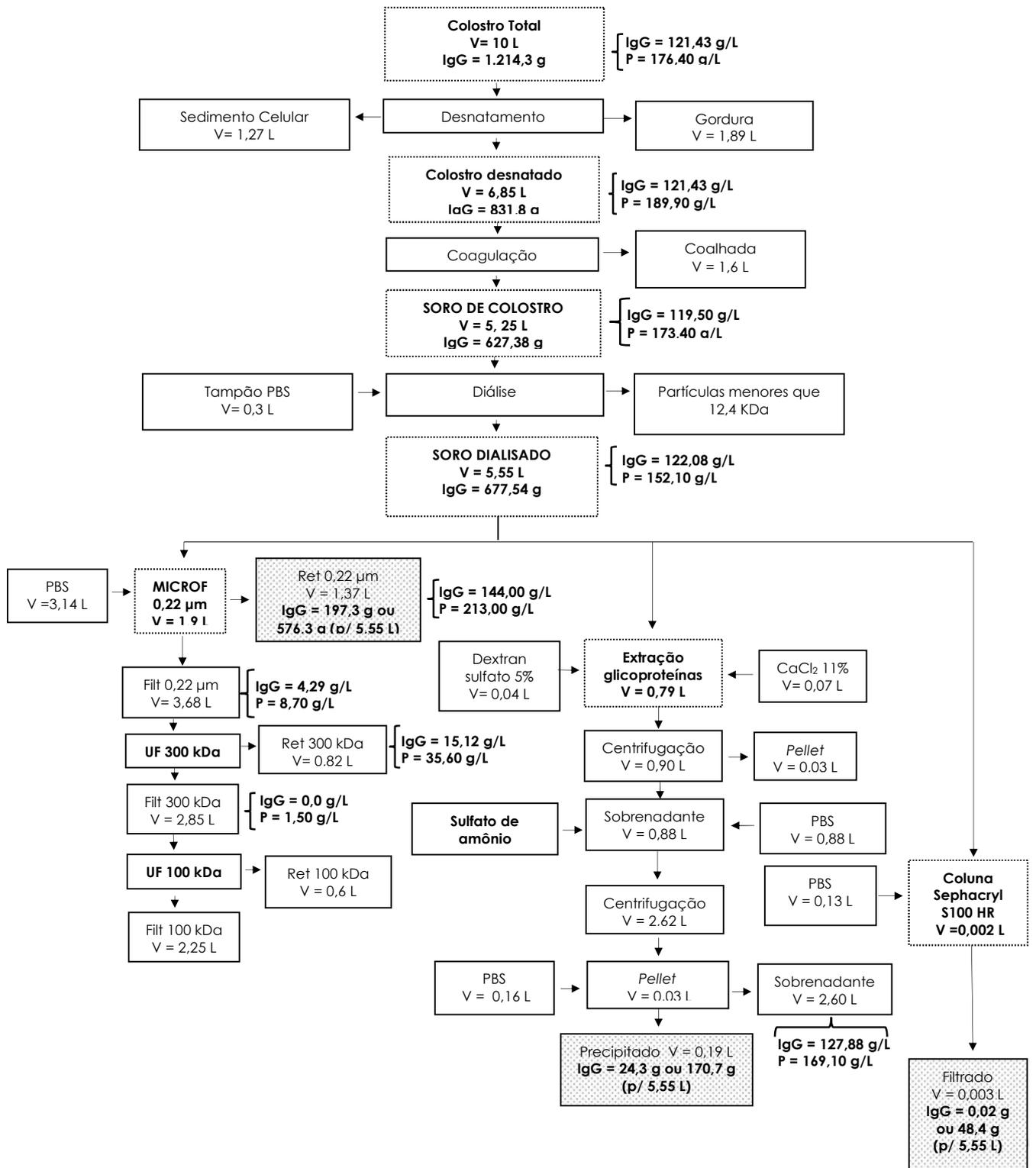


Figura 3

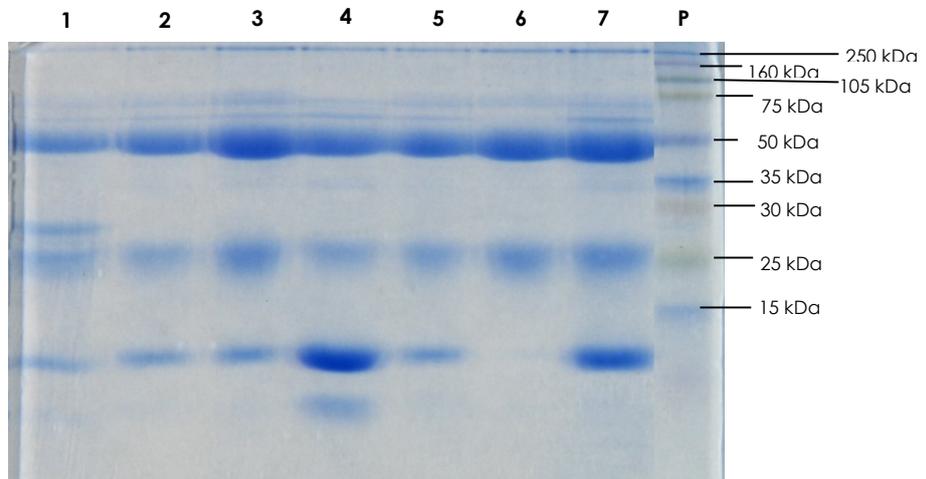


Figura 4

