

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 816**

51 Int. Cl.:

A23L 1/0562 (2006.01)
A23J 3/08 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C09D 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2012 E 12722748 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2693893**

54 Título: **Hidrogeles tixotrópicos a base de α -lactalbúmina, método de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

08.04.2011 FR 1153077

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.01.2016

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (50.0%)
25 Rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"
75015 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FORGE, VINCENT;
MATHEVON, CAROLE y
PIGNON, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 556 816 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles tixotrópicos a base de α -lactalbúmina, método de preparación y uso de los mismos

5 La presente invención se refiere a la preparación de hidrogeles que presentan propiedades ventajosas utilizando un subproducto de la industria láctea: la α -lactalbúmina, a los hidrogeles así obtenidos y a su utilización, especialmente para la preparación de biomateriales.

Los hidrogeles producidos en el marco de la presente invención presentan características reológicas particulares que los hacen interesantes para ciertas aplicaciones; en efecto, se trata de geles tixotrópicos capaces, bajo una suficiente sollicitación, de desestructurarse hasta un estado líquido y reestructurarse después una vez que se quedan en reposo.

10 La proteína utilizada para producir los hidrogeles es la α -lactoalbúmina (designada en lo que sigue a-La, en particular la a-La bovina. Esta proteína láctea se encuentra más particularmente en el lactosuero o suero de la leche. Por lo tanto, presenta el interés de ser una proteína natural y disponible en grandes cantidades en la industria quesera, siendo realizada la fabricación de queso a partir del "cuajo" de la leche (caseínas precipitadas y separadas del lactosuero).

15 Un gel se compone de una molécula que, en presencia de un disolvente apropiado, se auto-ensambla por vía de interacciones químicas o físicas y se organiza en una red. Los procedimientos específicos que conducen a la formación de geles dependen de las propiedades físico-químicas y de las interacciones de los componentes del gel. Cuando el disolvente es agua, se trata de hidrogel.

20 Un hidrogel es una red de cadenas polímeras inicialmente solubles en agua, pero que se vuelven insolubles después de su reticulación. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos superabsorbentes (pueden contener más de 99% de agua). Poseen también un grado de flexibilidad muy similar al de los tejidos naturales a causa de su importante contenido de agua. Sus características físicas, su permeabilidad, así como su biocompatibilidad los hace excelentes candidatos como materiales biológicos utilizados para aplicaciones médicas, incluyendo la liberación de moléculas, así como la ingeniería tisular. En función de la naturaleza de las uniones transversales, los hidrogeles se dividen en dos categorías: los geles químicos procedentes de métodos tradicionales de reticulación o "crosslinking" (enlaces cruzados) con enlaces covalentes, y los geles físicos que resultan del autoensamblaje de macromoléculas (por ejemplo glucídica o proteica) y constituyen redes que se mantienen unidas por marañas moleculares y/o por uniones débiles (uniones hidrófugas, iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals); las interacciones moleculares de estos geles físicos pueden ser perturbados por cambios ambientales tales como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la luz o incluso una molécula biológica dada. La gelificación es por lo tanto reversible en respuesta a uno o varios de estos estímulos.

35 La preparación de hidrogeles a partir de proteínas de la leche ya es conocida. Las proteínas de la leche son los vehículos naturales para las moléculas bioactivas gracias a sus propiedades estructurales y fisicoquímica como su capacidad para ligar iones y pequeñas moléculas, y también por sus propiedades de autoensamblaje y de gelificación. A pesar de la cantidad de materiales a base de proteínas de la leche (caseínas o proteínas del lactosuero) ya utilizadas en diversas industrias, continúan numerosos estudios sobre estas proteínas y apuntan al desarrollo de nuevos nano-objetos innovadores: tales como películas alimentarias comestibles y biodegradables realizadas a partir de proteínas de la leche combinadas con otros biopolímeros naturales (Chen 1995; Le Tien, Vachon et al. 2001); coacervados o nano-vesículas de caseínas o de otras proteínas de la leche que fueron desarrolladas especialmente como sistemas de liberación (Audic, Chafeur et al. 2003; Semo, Kesselman et al. 2007; Livney 2010); o también geles de proteínas de la leche.

45 Entre los geles de proteínas de la leche se puede citar primeramente la gelificación de las caseínas que se pueden obtener bajo diferentes condiciones: por la acidez a pH 4,6; por la acción del cuajo, cuyo principio activo es la quimocina, enzima que efectúa una escisión proteolítica que provoca la agregación de las micelas y que se utiliza para la encapsulación de bacterias probióticas (Heidebach, Forst et al. 2009a); por la acción de la transglutaminasa, enzima que enlaza entre sí ciertos aminoácidos (esencialmente ácido glutámico y lisina) contribuyendo a la polimerización de las proteínas y utilizada igualmente para la microencapsulación de células probióticas (Heidebach, Forst et al. 2009b); por la acción de la genipina, agente reticulante natural de las proteínas, para la liberación controlada de moléculas a nivel intestinal (contracción del hidrogel a pH ácido (estómago), después hinchamiento a pH neutro y, por lo tanto, liberación del principio activo (intestino)) (Song, Zhang et al. 2009).

55 Se conoce igualmente el inducir la gelificación de las proteínas del lactosuero por elevación de la temperatura (Paulsson, Hegg et al. 1986). Como otros hidrogeles, los geles realizados a partir de proteínas de lactosuero presentan un comportamiento de hinchamiento sensible al pH y utilizable para la liberación dirigida de moléculas (Gunasekaran, Ko et al. 2007). Los geles de β -lactoglobulina, igualmente inducidos por la temperatura, son muy estudiados y fueron caracterizados con ayuda de diversas técnicas tales como TEM (microscopía electrónica de transmisión), WAXS (wide angle X-ray scattering) (dispersión gran angular de rayos X) y FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier) (Kavanagh, Clark et al. 2000). La desnaturalización de las proteínas puede ocasionar interacciones hidrófugas entre ellas, sobre todo la β -

lactoglobulina) (b-Lg) y la sueroalbúmina bovina (BSA), que poseen tioles libres y, por lo tanto, pueden intercambiar puentes disulfuro: por ejemplo, nanoesferas de BSA fueron realizadas con una partícula magnética y/o un fotosensibilizador y son utilizables en los tratamientos de cáncer (Rodrigues, Simioni et al. 2009). Recientemente fue desarrollado un procedimiento de gelificación en frío y los geles así obtenidos los hace potencialmente interesantes para la liberación de moléculas. El interés de estos geles reside en el hecho de que los bioactivos termosensibles pueden ser añadidos después del tratamiento térmico de los lactosueros, pero antes de la gelificación que es inducida a continuación por adición de sales (calcio preferentemente) o por disminución del pH.

Se efectuaron numerosas mediciones de reometría sobre geles de β -lactoglobulina sola (Gosal, Clark et al. 2004b) o mezclada con α -lactalbúmina (Kavanagh, Clark et al. 2000). Éstas permitieron determinar los factores, pH y fuerza iónica, que afectan las características físicas de los geles (Loveday, Rao et al. 2009). Los geles de β -lactoglobulina (b-Lg) inducidos por una exposición prolongada a temperaturas elevadas (80°C) se forman en dos tiempos y serían esencialmente compuestos de polipéptidos de β -lactoglobulina parcialmente degradada (Akkermans, Venema et al. 2008; Oboroceanu, Wang et al. 2010). Los geles de b-Lg se pueden obtener también por disolución de la proteína en una mezcla particular de agua/alcohol. Las características reológicas y estructurales de estos geles son diferentes (Gosal, Clark et al. 2004a); (Gosal, Clark et al. 2004c); Loveday, Rao et al. 2009).

Otros tipos de geles conocidos y realizados a partir de proteínas de la leche están formados a partir de nanotubos de α -lactalbúmina (Ibsen, Otte et al. 2001). Estos nanotubos se forman por autoensamblaje de fragmentos de α -lactalbúmina y bajo ciertas condiciones (concentración mínima de proteína y relación proteína/calcio) (Graveland-Bikker, Ipsen et al. 2004; Ipsen y Otte 2007). La particularidad de estas fibras es que no se obtienen más que en presencia de calcio y con una proteína que ha sufrido previamente una proteólisis provocada por una serinproteasa particular, extraída de *Bacillus licheniformis* (Ipsen y Otte 2007).

La formación de geles a partir de α -lactalbúmina intacta, e inducida por fuertes temperaturas (80°C) se puso de manifiesto a pH neutro en dos artículos que estudian especialmente la influencia de la α -lactalbúmina en la gelificación de la β -lactoglobulina (Hines y Foegeding 1993; Kavanagh, Clark et al. 2000). Más particularmente, el equipo de Kavanagh *et al.* ha seguido las gelificaciones a 80°C en diferentes relaciones de concentración entre la b-Lg y la a-La, así como de las proteínas solas, que constituyen sus testigos. El testigo que corresponde a la a-La sola presenta a pH 7 un tiempo de gelificación 10 veces más lento que el observado en la b-Lg sola. Estos geles de a-La no han atraído la atención de los investigadores y, por lo tanto, no fueron caracterizados desde un punto de vista estructural y reológico. Un gel de a-La preparado según las condiciones descritas por Kavanagh *et al.* fue preparado por la firma solicitante (véase ejemplo 3); presenta características macroscópicas diferentes a las de los hidrogeles puestos a punto por la firma solicitante; es duro, elástico e irreversible (no cambia de forma cuando se le somete a una sollicitación).

Finalmente, la tesis de C. Blanchet ("Repliegamiento de las proteínas y formación de fibras amiloides. El caso de la α -lactalbúmina"), sostenida el 23/06/2008, describe un procedimiento para la preparación de una suspensión de α -lactalbúmina a 40°C, a pH 2, a diferentes concentraciones de sal (NaCl de 0 a 150 mM), sin embargo, estos procedimientos no se han utilizado todavía con el fin específico de preparar geles, sino para caracterizar el comportamiento de la α -lactalbúmina.

Sin embargo, los geles obtenidos con NaCl 150 mM fueron caracterizados, tienen un comportamiento reofluidificante; no se ha sugerido en esta tesis que tales geles descritos puedan presentar un comportamiento tixotrópico y que un comportamiento tal no se puede deducir de los ensayos presentados en esta tesis.

La firma solicitante ha reproducido el procedimiento de preparación de hidrogel de α -lactalbúmina tal como se describe en esta tesis y pudo confirmar experimentalmente que los geles así obtenidos no son tixotrópicos (véase el ejemplo 4 a continuación).

Un fluido reofluidificante (o pseudoplástico) es un fluido cuya viscosidad disminuye si la sollicitación de cizalladura o la velocidad de deformación, que se le aplica, aumenta (véase preámbulo del ejemplo 2).

Conviene precisar que los fluidos reofluidificantes no son necesariamente tixotrópicos, este es el caso, por ejemplo, de los geles de carbopol (Piau 2007; Tokpavi, Jay et al. 2009).

En el marco de estos trabajos, la firma solicitante ha decidido poner a punto hidrogeles de α -lactalbúmina reofluidificantes, con umbral y tixotrópicos.

La definición de la tixotropía comúnmente admitida (Mewis 1979; Pignon, Magnin et al. 1998) es la siguiente: un material se denomina comúnmente tixotrópico, si partiendo de un estado de reposo durante un periodo suficientemente largo, su viscosidad decrece con el tiempo y su estructura se modifica cuando se le aplica un gradiente de cizalladura constante. De manera reversible, si la cizalladura se interrumpe, la viscosidad crece de nuevo, el material recobra entonces gradualmente la consistencia y estructura que tenía en reposo (Figura 1).

Esta característica es muy buscada especialmente para la extensión y aplicación de numerosos productos alimentarios (geles de proteínas de la leche o de soja, documento WO2008/130252), en pinturas o productos cosméticos. También puede ser muy útil como método no invasivo de inyección *in situ* de hidrogeles, en la liberación

dirigida de moléculas o para la reconstrucción tisular. Un artículo aparecido en Nature, Nanotechnology, muestra que los geles tixotrópicos compuestos, por ejemplo, por PEG-sílice se pueden utilizar y presentan diversas ventajas para el cultivo celular 3D (Peck, Wan et al. 2008).

5 Los hidrogeles según la invención se denominan con umbral, puesto que se debe aplicar una sollicitación mínima para permitir que el material fluya más allá de una deformación, denominada deformación crítica γ_c que, en el marco de la presente invención, tiene un valor superior a 0,1, preferentemente comprendido entre 0,1 y 1. La deformación crítica se alcanza cuando una sollicitación suficientemente elevada (sollicitación umbral) se aplica a un hidrogel completamente en reposo para que dicho hidrogel comience a fuir; se identifica gráficamente por la intersección de la curva del módulo de almacenamiento G' y la del módulo de pérdida G'' (véase el ejemplo 2 y la Figura 6).

10 Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un hidrogel de α -lactalbúmina a partir de una suspensión acuosa de α -lactalbúmina a una concentración C_{a-La} comprendida entre 5 y 60 mg/mL, que comprende las siguientes etapas:

15 a) suspensión de α -lactalbúmina en una solución acuosa ácida que tiene una fuerza iónica inferior o igual a 60 mM, preferentemente inferior a 50 mM y, de modo más preferente, que tiene un valor de 30 mM; consistiendo dicha suspensión en:

(a1) la preparación de una solución acuosa ácida que tenga una concentración de protones expresada en mM, determinada por la suma: (valor numérico de C_{a-La} expresado en g/L) + 10;

(a2) la suspensión de la α -lactalbúmina en dicha solución acuosa ácida; y

20 (a3) si fuera necesario, el ajuste del pH a un valor comprendido entre 1,5 y 2,5, preferentemente entre 1,8 y 2,2 y más preferentemente, el pH vale 2,0.;

b) la formación del gel a partir de dicha suspensión de α -lactalbúmina obtenida al final de la etapa a); realizándose dicha formación del gel en las condiciones siguientes:

- a una temperatura inferior a 60°C, comprendida preferentemente entre 35 y 55°C;

25 - bajo una agitación que tenga una intensidad definida por un número de Reynolds comprendido entre 37 y 1000, preferentemente entre 300 y 500;

- durante 10 horas a 1 semana (168 horas), especialmente entre 48 y 96 horas, y

- en ausencia de evaporación de agua de dicha suspensión de α -lactalbúmina.

En lo que sigue, la suspensión acuosa de α -lactalbúmina se puede designar igualmente solución.

30 De manera sorprendente, la firma solicitante ha constatado que a pesar de una fuerza iónica débil o nula de la solución acuosa utilizada para la preparación del hidrogel de a-La, también era posible obtener un gel tixotrópico, y que este hidrogel presentaba una estabilidad satisfactoria en el tiempo; en efecto, la firma solicitante observó que los hidrogeles con débil fuerza iónica son más estables en el tiempo que aquellos obtenidos con fuerza iónica (>60 mM), que se vuelven viscosos con el tiempo. Además, la preparación de un hidrogel que tenga un contenido de sal muy débil es ventajosa, por ejemplo para utilizaciones como texturante alimentario.

35 La α -lactalbúmina es una pequeña metalproteína globular de 14 kDa que posee 4 puentes disulfuro, es estructuralmente homóloga a la lisozima y necesita la presencia de calcio para una estructura funcional. Es la proteína más abundante del lactosuero humano y la segunda proteína después de la b-Lg en el lactosuero bovino. Forma parte de las proteínas modelo en los estudios de repliegamiento, puesto que en condiciones precisas es capaz de adoptar un estado particular parcialmente replegado: el estado "molten globule" (glóbulo fundido) (MG) (Permyakov y Berliner 2000).

La a-La es la proteína de la leche menos alergénica (Restani, Ballabio et al. 2009) y a pesar de cierta resistencia a las enzimas digestivas en presencia de otras proteínas de la leche, los péptidos liberados por la acción de diferentes proteasas sobre la a-La son estudiados ampliamente.

45 A escala industrial se utilizan numerosos procedimientos para el enriquecimiento en a-La del lactosuero o para la purificación de a-La: filtración por membranas; cromatografía en columnas (IEX, SEC, HIC); hidrólisis enzimática para degradar las caseínas o la b-Lg, combinada con la filtración por membrana o también precipitación isoeléctrica combinada con un tratamiento térmico para precipitar la a-La (Kamau, Cheison et al. 2010).

50 El procedimiento según la invención se puede realizar con cualquier α -lactalbúmina; según un modo de realización particular, se trata de α -lactalbúmina originada por la industria quesera procedente de leche de vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, yegua...

En el marco de la realización del procedimiento según la invención, la fuente de α -lactalbúmina utilizada presenta de preferencia una pureza de al menos 85%, preferentemente de al menos 90%. Es igualmente posible realizar el procedimiento según la invención con lactosuero enriquecido en α -lactalbúmina y que tenga un contenido de la menos 45% en peso de α -lactalbúmina.

5 De preferencia, la suspensión de α -lactalbúmina obtenida al final de la etapa a) se filtra. Esta filtración se puede realizar con un filtro que tenga un umbral de corte tal que deje pasar los objetos que tengan un peso molecular inferior o igual a 20 kDa, como las proteínas de a-La, pero que retienen los microorganismos y otros contaminantes; así, se pueden utilizar filtros con umbral de corte inferior o igual a 0,5 μ m, por ejemplo los filtros comerciales de 0,22 μ m.

10 La ejecución de la etapa b) de formación del gel se realiza a una temperatura homogénea del conjunto de la suspensión de α -lactalbúmina.

La agitación de la suspensión de α -lactalbúmina que se realiza en el transcurso de esta etapa b) debe ser igualmente homogénea en todo el recipiente de agitación.

15 Con el fin de caracterizar la intensidad de la agitación, que debe ser débil pero no nula, independientemente de la geometría y del tamaño del recipiente y del agitador, la firma solicitante ha determinado una gama de valores del número de Reynolds adaptada a la realización del procedimiento según la invención; así, el número de Reynolds debe estar comprendido entre 37 y 1000, preferentemente entre 300 y 500. Las modalidades de determinación del número de Reynolds se detallan en el ejemplo 1 siguiente.

20 Como ejemplo, cuando el procedimiento se realiza a escala de laboratorio (volumen de suspensión de α -lactalbúmina comprendido entre 1 ml y 100 ml), la agitación se puede efectuar con ayuda de plato rotatorio o bien con una barrita magnética, cuya longitud esté comprendida entre 70 y 90% del diámetro de dicho recipiente; en estos casos, la velocidad de agitación está comprendida entre 10 y 300 revoluciones por minuto (rpm).

25 Los geles de a-La se forman a pH ácido, favorable a la forma MG y, por lo tanto, a la fibrilación de la proteína. El valor del pH es extremadamente importante para la formación de los geles, puesto que ésta es imposible a pH 3 (Kavanagh, Clark et al. 2000).

Durante la ejecución de la etapa (a1) del procedimiento según la invención, el contenido de protones que permite obtener el pH ácido necesario para la formación del hidrogel se puede obtener con un ácido fuerte, por ejemplo HCl.

Es esencial realizar la acidificación según la etapa (a1) antes de la etapa (a2) de suspensión de la a-La.

30 La fuerza iónica que se emplea para la preparación del hidrogel según la invención, y que está comprendida entre 0 y 60 mM, se obtiene por adición eventual de sal, pudiendo elegirse entre los halogenuros de metal alcalino o alcalinotérreo, tales como por ejemplo NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂...; los carbonatos de metal alcalino o alcalinotérreo o sus mezclas; los fosfatos, tales como por ejemplo el fosfato de sodio o de potasio o también los sulfatos tales como, por ejemplo, el sulfato de sodio o de magnesio...

35 La concentración de sal de la solución acuosa de a-La se determina clásicamente por el experto en la materia en función de la fuerza iónica deseada.

Según una variante particular de realización del procedimiento según la invención, éste se ejecuta sin adición de sal.

El ejemplo 2 siguiente muestra la caracterización reológica de los hidrogeles de a-La obtenidos por el procedimiento según la invención.

40 La presente invención se refiere igualmente a los hidrogeles de α -lactalbúmina capaces de ser obtenidos según el procedimiento de la invención.

Se trata más específicamente de hidrogeles que tienen un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL; un pH comprendido entre 1,5 y 2,5, preferentemente entre 1,8 y 2,2 y más preferentemente, el pH vale 2,0; una fuerza iónica inferior o igual a 60 mM, preferentemente inferior a 50 mM y, más preferentemente, que tenga un valor de 30 mM.

45 Estos hidrogeles se caracterizan por un comportamiento de fluido reofluidizante, con umbral de sollicitación (una fluencia tiene lugar cuando se aplica una deformación crítica comprendida entre 0,1 y 1) y tixotrópico; la viscosidad de estos hidrogeles disminuye si la sollicitación de cizalladura o la velocidad de deformación que se les aplica aumenta, además, estos hidrogeles se desestructuran bajo la influencia de la cizalladura (liquefacción) y se reestructuran cuando cesa la cizalladura (solidificación).

50 Producidos a partir de fuentes naturales tales como leche o lactosuero, los hidrogeles de α -lactalbúmina según la invención se inscriben en el marco del desarrollo sostenible. El producto es natural y, por lo tanto, biodegradable, biocompatible, no tóxico y considerado como GRAS (generally recognized as safe) (generalmente reconocido como

seguro). Además, el procedimiento de producción es compatible con los procedimientos de la química verde, es decir química suave que preserva el medioambiente puesto que no utiliza disolventes, ni agentes de reticulación.

Las proteínas de la leche, y en particular la α -lactalbúmina, presentan propiedades notables:

- 5 - sus propiedades físico-químicas son bien conocidas: estructura, estabilidad, solubilidad, afinidad por los metales, hidrofugosidad...
- el autoensamblaje de las proteínas se hace en forma de fibras, uno de los fundamentos de la nanotecnología;
- tienen elevados valores nutricionales;
- 10 - presentan diversos efectos biológicos observados sobre todo a partir de los péptidos derivados de su proteólisis (Madureira, Pereira et al. 2007).

Además, la utilización de estas proteínas a escala industrial está adaptada, puesto que:

- su fuente, el lactosuero, tiene un bajo coste;
- los procedimientos de purificación de las proteínas del lactosuero a escala industrial son ya conocidos;
- 15 - las cantidades disponibles son considerables; por una parte por el hecho de la cantidad de a-La contenida en el lactosuero (más de 1 g/L en el lactosuero bovino) y, por otra parte por el hecho de las cantidades de lactosuero disponibles como subproducto de la industria quesera y, por lo tanto, material a revalorizar.

El lactosuero o suero de la leche es el desecho principal de las queserías y de las caseinerías. Las principales proteínas del lactosuero son la β -lactoglobulina (b-Lg), la α -lactalbúmina (a-La), las inmunoglobulinas, el suero de albúmina bovino (SAB) y la lactoferrina (Lf).

20 Las cantidades de lactosuero disponibles en el mundo son considerables. En Francia, 15 mil millones de litros de lactosuero se generan cada año por la producción de quesos de vaca. En ausencia de soluciones de revalorización, el lactosuero no autoconsumido por el ganado se vierte a los ríos o se expande en el campo, con consecuencias nefastas para el medio natural: polución de las corrientes de agua, lagos y capas freáticas y molestias olfativas. Esta polución se debe principalmente a la fermentación de las materias orgánicas del lactosuero (lactosa y materias nitrogenadas) y a la disminución del contenido de oxígeno disuelto en el agua por debajo de un umbral aceptable.

25 En efecto, las demandas química y biológica de oxígeno (DCO y DBO) de este desecho son grandes (DCO de 50 a 70 g/L) y constituyen un material gravemente polucionante. La utilización de dispositivos económicamente aceptables, que apuntan a recoger y revalorizar el lactosuero es hoy en día obligatoria para reducir estos ataques al medioambiente.

30 El gran valor nutricional, funcional y biológico de la a-La justifica su interés en los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético. La utilización de los hidrogeles de a-La según la invención puede ser considerada evidentemente en forma de hidrogeles como tales, pero también en forma de películas por extensión (spin-coating) (revestimiento por rotación), después secado de los geles, o también en forma de hebras por extrusión o electrorotación de los geles.

35 La firma solicitante ha puesto de manifiesto que los hidrogeles de a-La que tienen un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL y que fueron preparados a pH ácido, es decir comprendido entre 1,5 y 2,5, de preferencia entre 1,8 y 2,2 y más preferentemente a pH 2,0, cualquiera que sea su fuerza iónica, son reofluidificantes, con umbral y tixotrópicos.

40 Aunque estos hidrogeles presentan un pH ácido al final de su preparación, es posible aumentar su pH con el fin de adaptarlos para utilizaciones que se deseen hacer de dichos hidrogeles, preservando siempre sus propiedades reológicas.

Así, según otro de sus objetos, la presente invención se refiere a hidrogeles tixotrópicos que tienen un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL y que fueron restaurados a un pH ácido, pero cuyo pH puede ser aumentado a continuación, para una utilización en la cual sus propiedades reológicas resulten ventajosas.

45 Compuestos de productos comestibles, los hidrogeles de a-La encuentran en particular numerosas aplicaciones en el sector agro-alimentario.

Así, la presente invención se refiere a un producto alimentario que comprende un hidrogel tixotrópico de α -lactalbúmina, el cual tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, y a la utilización de un hidrogel de este tipo de α -lactalbúmina como agente texturante alimentario. Según un modo de realización particular, la fuerza iónica de dichos hidrogeles está comprendida entre 0 y 60 mM, de preferencia es inferior a 50 mM y, más preferentemente, tiene un valor de 30 mM.

50

Según la consistencia deseada del producto alimentario, éste podrá contener entre 0,5 y 98% en peso de hidrogel tixotrópico de α -lactalbúmina, en relación al peso total de dicho producto alimentario.

5 En cuanto a las propiedades de la α -lactalbúmina recordadas anteriormente, los hidrogeles según la invención están particularmente adaptados para la preparación de biomateriales. Por "biomateriales" se entienden materiales destinados a estar en contacto temporal o permanente con diferentes tejidos, órganos o fluidos de un ser vivo, para un fin diagnóstico, preventivo o terapéutico; los biomateriales comprenden igualmente los materiales destinados a ser implantados en un organismo vivo.

10 Así, la presente invención se refiere igualmente a los hidrogeles tixotrópicos de α -lactalbúmina que tienen un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, para una utilización como producto utilizado para el tratamiento y/o la cicatrización de heridas; en particular, estos hidrogeles tienen una fuerza iónica comprendida entre 0 y 60 mM. En efecto, los hidrogeles de α -lactalbúmina responden a criterios generalmente considerados para la preparación de apósitos: biocompatibilidad y ausencia de citotoxicidad; prevención de la deshidratación de la herida con el mantenimiento de un entorno húmedo; protección contra el polvo y las bacterias; mantenimiento de los intercambios gaseosos; aplicación fácil sobre la herida y facilidad para desprenderlos después de la cicatrización.

15 Además, con el fin de mejorar su eficacia, los hidrogeles podrán comprender igualmente uno o varios compuestos activos tales como los compuestos capaces de promover la cicatrización cutánea, por ejemplo favoreciendo la epitelización liberando moléculas activas específicas (ejemplo: EGF) o compuestos antimicrobianos.

20 Así, la presente invención se refiere a un apósito compuesto por al menos un hidrogel tixotrópico de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL; según una variante particular, estos hidrogeles tienen una fuerza iónica comprendida entre 0 y 60 mM, de preferencia inferior a 50 mM, y más preferentemente tienen un valor de 30 mM. Opcionalmente, dicho apósito comprende, además, al menos un compuesto activo tal como un agente cicatrizante o un agente antimicrobiano.

25 Según una variante, el apósito según la invención comprende una película externa permeable al aire e impermeable a los líquidos y a los microorganismos; una película de este tipo puede estar compuesta, por ejemplo por poliuretano.

30 Según otro de sus objetos, la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende al menos un hidrogel tixotrópico de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, y a la utilización de al menos un hidrogel tixotrópico de α -lactalbúmina de este tipo para la preparación de una composición cosmética, en particular como agente hidratante de la piel en composiciones destinadas al cuidado de la piel (gel, crema, loción..) o como agente tensoactivo (productos de limpieza, champús...); según una variante particular, estos hidrogeles tienen una fuerza iónica comprendida entre 0 y 60 mM, de preferencia inferior a 50 mM y más preferentemente tienen un valor de 30 mM.

35 Por último, en cuanto a su comportamiento tixotrópico, los hidrogeles que tienen un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL se utilizan ventajosamente para la preparación de pinturas, en particular industriales. En efecto, los hidrogeles permiten que estas pinturas permanezcan sólidas durante su transporte y su almacenamiento evitando así una fluidez indeseable permitiendo al mismo tiempo una extensión fácil en su utilización. Además, los hidrogeles permiten mejorar la estabilidad y la conservación de las pinturas industriales que se utilizan habitualmente en los depósitos permanentemente agitados. Por una agitación realizada únicamente en el momento de su utilización, permiten realizar, además, un ahorro energético.

40 Así, la presente invención se refiere también a la utilización de un hidrogel tixotrópico de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, para la preparación de pinturas, en particular, industriales, y pinturas que comprenden un hidrogel de este tipo; según una variante particular, estos hidrogeles tienen una fuerza iónica comprendida entre 0 y 60 mM, de preferencia inferior a 50 mM y más preferentemente tienen un valor de 30 mM.

45 Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones que surgirán de la descripción siguiente, que se refieren a ejemplos de ejecución de la presente invención, así como a las figuras anexas, las cuales:

Figuras

50 La **Figura 1** ilustra el comportamiento de los fluidos tixotrópicos cuya viscosidad decrece con el tiempo cuando se les aplica un gradiente de cizalladura constante y que, de manera reversible, crece de nuevo si se interrumpe la cizalladura.

55 La **Figura 2** representa el seguimiento de la desestructuración y de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de α -La de 20 mg/mL y 30 mM de NaCl con pequeñas deformaciones de cizalladura armónica. Se aplicaron diferentes procedimientos de seguimiento de la evolución de los módulos elásticos G' (círculo lleno) y viscoso G'' (círculo vacío) en función del tiempo y de la deformación impuesta (cruz); las sollicitaciones aplicadas en cada etapa se detallan a continuación en el ejemplo 2.

La **Figura 3** representa el seguimiento de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La de 20 mg/mL y 30 mM de NaCl después de una desestructuración con gran deformación con un gradiente de cizalladura de 10 s^{-1} ; el módulo elástico G' se representa con círculo lleno y el módulo viscoso G'' , en círculo vacío.

5 La **Figura 4** ilustra el fin del seguimiento de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La de 20 mg/mL y 30 mM de NaCl después de una desestructuración con gran deformación con un gradiente de cizalladura de 10 s^{-1} (etapa 6), después la etapa 7 de desestructuración con cizalladura armónica con amplitud de deformación creciente y, por último, la etapa 8 de seguimiento de la recuperación de la consistencia con pequeña deformación.

10 La **Figura 5** es una comparación de la cinética de reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La de 20 mg/mL y 30 mM de NaCl (etapa 6) después de una desestructuración con gran deformación con un gradiente de cizalladura de 10 s^{-1} , (G' se representa con triángulo lleno y G'' con triángulo vacío) y (etapa 8) después de una desestructuración con pequeñas deformaciones de cizalladura armónica con amplitud de deformación creciente (G' se representa con círculo lleno y G'' con círculo vacío).

15 La **Figura 6** representa el seguimiento de la desestructuración con cizalladura armónica con amplitud de deformación creciente a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La de 20 mg/mL y NaCl 30 mM: identificación de la deformación crítica γ_c de aproximadamente 0,2 a partir de la cual comienza a aparecer la transición sol-gel (etapa 7).

La **Figura 7** representa el seguimiento de la desestructuración y de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La con pequeñas deformaciones de cizalladura armónica; 20 mg/mL – NaCl 0 mM.

20 La **Figura 8** representa el seguimiento de la desestructuración y de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La con pequeñas deformaciones de cizalladura armónica; 20 mg/mL – NaCl 60 mM.

La **Figura 9** representa el seguimiento de la desestructuración y de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de un hidrogel de a-La con pequeñas deformaciones de cizalladura armónica; 40 mg/mL - NaCl 60 mM.

25 La **Figura 10** compara los niveles de los módulos viscoelásticos G' y G'' en función de la fuerza iónica de NaCl y de la concentración de a-La: el módulo G' para un hidrogel de 20 mg/mL se representa por discos llenos, el módulo G'' para un hidrogel de 20 mg/mL de a-La se representa por discos vacíos, el módulo G' para un hidrogel de 40 mg/mL de a-La se representa por triángulos llenos, el módulo G'' para un hidrogel de 40 mg/mL de a-La se representa por triángulos vacíos. Los niveles se compararon con el mismo tiempo de reestructuración de 500 s de la etapa 3, correspondiente a la zona de reestructuración de cinética lenta.

30 La **Figura 11** es una gráfica que compara los niveles de deformación crítica γ_c en función de la fuerza iónica de NaCl y de la concentración de a-La (discos vacíos para una concentración de a-La de 20 mg/mL y discos llenos para una concentración de a-La de 40 mg/mL). Para cada condición, el fenómeno de desestructuración es muy reproducible, lo que demuestra la gran capacidad del sistema para sufrir diversas sollicitaciones de cizalladura sin sufrir modificaciones fisicoquímicas o de desnaturalización, cualesquiera.

35 La **Figura 12** representa el seguimiento de la desestructuración y de la reestructuración a 15°C en el transcurso del tiempo de dos hidrogeles de a-La de 20 mg/mL y NaCl 0 mM (el uno preparado a partir de a-La purificada, el segundo a partir de lactosuero enriquecido al 45% de a-La) con pequeñas deformaciones de cizalladura armónica. Se aplicaron diferentes procedimientos de seguimiento de la evolución de los módulos elásticos G' (círculo lleno para el hidrogel preparado a partir de a-La purificada; triángulo lleno para el hidrogel preparado a partir de lactosuero enriquecido al 45% de a-La) y viscoso G'' (círculo vacío para el hidrogel preparado a partir de a-La purificada; triángulo vacío para el hidrogel preparado a partir de lactosuero enriquecido al 45% de a-La) en función del tiempo y de la deformación impuesta (cruz); las sollicitaciones aplicadas en el transcurso de las etapas 1 a 3 se detallan a continuación en el ejemplo 2.

45 La **Figura 13** comprende dos clichés de tubos Ependorf que comprenden, de una parte un gel realizado según el protocolo de la tesis de C. Blanchet (B) y, de otra parte un hidrogel según la invención (A). El cliché de la izquierda muestra estos dos hidrogeles después de su preparación (los dos están en el extremo cónico de los tubos); el cliché de la derecha muestra estos dos hidrogeles después de la agitación, el hidrogel (A) según la invención está en la parte baja del tubo Ependorf mientras que el hidrogel (B) permanece en la parte superior (extremo cónico).

50 **Ejemplo 1 – determinación de la gama de valores del número de Reynolds de la intensidad de agitación para la ejecución del procedimiento según la invención**

El número de Reynolds representa la intensidad de la agitación; en un reactor agitado, es igual a $Re = \frac{\rho v d}{\mu}$

en donde:

- ρ es la masa volúmica del fluido mezclado, en Kg.m^{-3} ,

- v es la velocidad de rotación de la barra magnética, en (m/s),
- μ es la viscosidad del fluido mezclado, en (Pa.s) y
- d es la dimensión del útil en agitación (por ejemplo, la longitud para el caso de una barra magnética) (en m).

5 La velocidad de rotación N de la barra magnética se define por la velocidad impuesta por el agitador. Para una gama de velocidades que va de 0 a 300 rpm.

La relación entre la velocidad V en m/s y la velocidad de rotación N en rpm es la siguiente:

$$V = \frac{\pi d}{30} N$$

O sea, se puede evaluar un número de Reynolds : $Re = \frac{\rho \pi d^2}{30 \mu} N$

10 Los fluidos mezclados (polvo de α -lactalbúmina + suspensión acuosa) tienen una viscosidad muy próxima a la del agua, puesto que la concentración de α -lactalbúmina en polvo es lo suficientemente baja para que no modifique fuertemente la viscosidad de la suspensión durante su introducción en agua: por consiguiente, durante la mezclado inicial de la suspensión, la viscosidad y la masa volúmica de la suspensión en agitación se tomará igual a la del agua, es decir: $\rho = 1000 \text{ Kg/m}^3$, $\mu = 10^{-3} \text{ Pa.s}$

15 El tamaño de la barra magnética utilizada es $d = 6 \times 10^{-3} \text{ m}$ de longitud.

La tabla inferior reúne ejemplos de valores de números de Reynolds adaptados a la mezcla recomendada para obtener geles tixotrópicos a partir de suspensiones de α -lactalbúmina :

$$Re = \frac{1000 \cdot \pi \cdot (6 \cdot 10^{-3})^2}{30 \cdot 10^{-3}} N = 1.2 \pi N$$

N (rpm)	V (m/s) = $(2 \times 10^{-4} \pi) \times N$	Re = $1,2 \pi N$
10	$2 \pi \times 10^{-3}$	$12 \pi = 37,699$
100	$2 \pi \times 10^{-2}$	$120 \pi = 376,99$
300	$2 \pi \times 0,03$	$360 \pi = 1130,973$

20 **Ejemplo 2 – preparación de hidrogeles de α -lactalbúmina según la invención**

2.1. Hidrogel preparado a partir de a-La purificada

La proteína purificada, “ α -lactalbúmina de leche bovina tipo III, empobrecida en calcio $\geq 85\%$ ” vendido bajo la referencia de catálogo “L6010” comercializada por Sigma y liofilizada, se vuelve a suspender en una solución acuosa de HCl que contiene o no NaCl.

25 La concentración de HCl depende de la concentración final de a-La. Se calcula en mM añadiendo 10 al valor numérico de la concentración deseada de a-La.

Por ejemplo, si se desea disponer de a-La a 40 mg/mL, la concentración de HCl para volverla a suspender será $40 + 10 = 50 \text{ mM}$.

30 Primeramente, hay que preparar la solución de HCl a la concentración determinada, después añadirle NaCl entre 0 y 60 mM. A continuación, hay que pesar la cantidad de a-La necesaria. Esta cantidad depende de la concentración final de proteína y del volumen de gel a preparar. Las concentraciones de a-La utilizadas se extienden desde 5 a 60 mg/mL.

35 La proteína se disuelve en el volumen definido de solución de HCl, después se ajusta el pH a $2,0 \pm 0,1$ con algunos microlitros de HCl 1M. La solución se dispone en agitación magnética con ayuda de una barra imantada y se incuba durante una noche a una temperatura que puede alcanzar desde 37 a 45°C. Al día siguiente, es decir aproximadamente 16h más tarde, se ha formado el gel.

2.2. Hidrogel preparado a partir de lactosuero enriquecido al 45% de a-La

Se reproduce el protocolo precedente utilizando un lactosuero enriquecido al 45% en peso de a-La, suministrado por la Sociedad Armor Protéines.

Ejemplo 3 – Determinación de las características viscoelásticas de los hidrogeles de a-La por reología

5 Nociones de reología

La reología es una rama de la física que estudia la fluencia o la deformación de los cuerpos bajo el efecto de las sollicitaciones que se les aplican, teniendo en cuenta la velocidad de aplicación de estas sollicitaciones o más generalmente de su variación en el transcurso del tiempo.

10 A elevada concentración de α -lactalbúmina, la formación de fibras amiloides va acompañada de un aumento de la viscosidad de la solución. Cuando se han formado las fibras, éstas interactúan entre sí para formar un gel. Este aumento de viscosidad es seguido por reometría. La muestra colocada en el reómetro va a ser sometida a una cierta sollicitación (r) dependiente de la velocidad de cizalladura ($\dot{\gamma}$) aplicada. La sollicitación r varía con la tasa de cizalladura $\dot{\gamma}$ y la relación entre las dos permite determinar la viscosidad (η) del fluido estudiado. Cuando r es proporcional a $\dot{\gamma}$, entonces η es una constante y el fluido es Newtoniano, mientras que si r no es proporcional a $\dot{\gamma}$, entonces el fluido no es Newtoniano y puede ser de diferentes naturalezas:

- si la viscosidad η disminuye cuando r e $\dot{\gamma}$ aumentan, entonces se tiene un fluido reofluidizante;
- a la inversa, si η aumenta cuando r e $\dot{\gamma}$ aumentan, entonces se tiene un fluido reoespesante.

20 Los fluidos tixotrópicos son reofluidizantes, su viscosidad disminuye bajo una misma sollicitación en el transcurso del tiempo a causa de una desestructuración del material. Estos fluidos son reversibles porque cuando la sollicitación se detiene, el material se vuelve a estructurar para reencontrar sus características viscoelásticas iniciales.

25 Las características viscoelásticas de un material se obtienen por la determinación de los módulos dinámicos de viscosidad según la ley de Hooke: $r = G \dot{\gamma}$, en donde G posee dos componentes, G' y G'' , que sirven para cuantificar el comportamiento viscoso o elástico de los materiales. G' es el módulo de almacenamiento (elástico) y G'' es el módulo de pérdida (viscoso). Cuando domina el carácter elástico, $G' \gg G''$ y a la inversa, cuando domina el carácter viscoso, $G' \ll G''$.

Comportamiento reométrico de los geles

3.1. Mediciones reométricas

30 La caracterización del comportamiento a la cizalladura bajo fluencia de los geles de a-La se efectuó con reometría rotativa. Las mediciones se realizaron con ayuda de un reómetro rotativo de par impuesta (ARG2, TA Instrument, 78 Guyancourt, Francia). Las geometrías utilizadas son geometrías de cono-placa de titanio (ángulo 4°, diámetro 20 mm, truncamiento 113 μ m). Para evitar la evaporación de la muestra en el transcurso de las mediciones, la atmósfera alrededor de la muestra se saturó de agua. Para las mediciones en cizalladura armónica, un estudio preliminar permitió definir los niveles de deformación y de frecuencia óptimos para las cuales las mediciones pertenecían al sector de régimen lineal. En este sector, la sollicitación de cizalladura armónica impuesta no modifica el comportamiento reológico de las suspensiones, no hace más que sondear los módulos viscoelásticos de los geles sin perturbarlos. La frecuencia de 0,1 Hz fue definida como perteneciente al régimen lineal cualquiera que sea la deformación impuesta y el tiempo de reestructuración de las muestras. El conjunto de mediciones en cizalladura armónica se efectuará por lo tanto a esta frecuencia de 0,1 Hz. En el seguimiento de la reestructuración, una deformación γ de 0,01 fue definida también como no perturbadora de la medición de G' y G'' , y se utilizará sistemáticamente para seguir la reestructuración de las muestras.

3.2. Seguimiento temporal de desestructuración – reestructuración de los geles bajo cizalladura

3.2.1. Comportamiento a pequeñas deformaciones

Se dispuso un procedimiento para el seguimiento de la consistencia por cizalladura armónica y se utilizó de manera sistemática para diferentes muestras en condiciones de concentración y fuerza iónica dadas.

45 La **Figura 2** presenta una sucesión de cizalladuras armónicas para un gel de a-La (20 mg/mL de a-La – NaCl 30 mM) según las condiciones de amplitud de deformación indicadas en la Tabla I inferior:

Etapa	γ'
1- Seguimiento temporal de la reestructuración después de la disposición del gel en el entrehierro de los útiles.	0,01

Etapa	γ'
2- Rampa de deformación para desestructurar el gel	0,01 a 10
3- Seguimiento temporal de la reestructuración	0,01
4- Rampa de deformación para desestructurar el gel	0,01 a 10
5- Seguimiento temporal de la reestructuración	0,01

Tabla I: Condiciones de deformación aplicadas durante el procedimiento de desestructuración-reestructuración de geles de a-La a cizalladura armónica.

5 Durante las etapas 1, 3 y 5 con amplitud de deformación constante, se puede comprobar la reposición de la consistencia del gel, correspondiente a su reestructuración.

10 Durante las etapas 2 y 4, el aumento progresivo de la amplitud de deformación permite seguir la desestructuración del gel ocasionada por la cizalladura precedente. A amplitud de deformación creciente, los módulos elásticos G' y viscoso G'' disminuyen regularmente hasta una deformación crítica γ_c , más allá de la cual los niveles caen fuertemente, lo que pone de manifiesto la desestructuración del gel y el paso de un comportamiento elástico a un comportamiento viscoso (G' resulta inferior a G'').

15 La reposición de la consistencia al comienzo de las etapa 3 y 5, caracterizada por el aumento de G' y G'' en el curso del tiempo, manifiesta claramente el comportamiento tixotrópico del gel. Durante la reestructuración, se puede advertir que existe un tiempo corto Tr_1 de reestructuración con una fuerte reposición de la consistencia del orden de 300 s, seguido de un tiempo más largo Tr_2 en el curso del cual los aumentos de G' y G'' siguen una cinética más lenta.

Las mismas observaciones se pueden hacer aplicando las tres primeras etapas descritas anteriormente al hidrogel preparado a partir de lactosuero enriquecido al 45% en peso de a-La; por lo tanto, el gel obtenido es también tixotrópico.

3.2.2. Comportamiento a grandes deformaciones

20 Con el fin de poner de manifiesto el comportamiento tixotrópico a deformaciones de mayores amplitudes, se impuso una cizalladura simple de gran deformación, seguido por una cizalladura armónica de pequeñas deformaciones para seguir la reposición de la consistencia del gel en el transcurso del tiempo. Con el fin de poner de manifiesto el efecto de la tasa de cizalladura sobre el nivel de desestructuración alcanzado, así como sobre la cinética de la reestructuración, se aplicaron diferentes gradientes de cizalladura a gran deformación.

Etapa	γ'
6 - Seguimiento temporal de la reestructuración después de una desestructuración de gran deformación de 10 s^{-1}	0,01
7 - Rampa de deformación para desestructurar el gel	0,01 a 10
8 - Seguimiento temporal de la reestructuración	0,01

25 Tabla II: Condiciones de deformación aplicadas durante los procedimientos de desestructuración a gran deformación y de seguimiento de la reestructuración de geles de a-La a cizalladura armónica.

30 En la **Figura 3** se representa la reposición de la consistencia (etapa 6) después de un cizalladura de gran deformación con un gradiente de cizalladura de 10 s^{-1} durante 300 s. De nuevo se puede ver que existe un primer periodo Tr_1 en el cual los módulos elásticos y viscosos crecen fuertemente con el tiempo, y un según periodo Tr_2 en el cual una cinética de reestructuración es mucho más lenta.

35 A continuación de un largo seguimiento de reestructuración durante 1000 min (más de 16 horas), se aplica de nuevo un procedimiento de desestructuración a cizalladura armónica con amplitud de deformación creciente (etapa 7) (véase la **Figura 4**), seguido de una reposición de la consistencia a pequeña deformación (etapa 8) (véase la **Figura 4**).

En la **Figura 5** se comparan las dos reposiciones de la consistencia, bien sea después de una cizalladura simple de gran deformación (etapa 6), o bien después de una cizalladura armónica con amplitud de deformación creciente

(etapa 8). Los resultados muestran diferentes cinéticas de reestructuración según estos dos modos de desestructuración empleados. La cinética de deformación creciente seguida de una cizalladura simple de gran deformación es mucho más lenta que durante una cizalladura armónica de pequeña deformación con amplitud creciente. En efecto, la cizalladura con gran deformación llega a desestructurar la muestra a un nivel superior que el obtenido durante una cizalladura con pequeña deformación. Este resultado demuestra nuevamente la importancia del tipo de sollicitación y de su intensidad sobre el nivel de desestructuración alcanzado en la muestra durante su cizalladura, lo que es relevante del comportamiento de los sistemas tixotrópicos.

En la **Figura 6** se representa la evolución de los módulos viscoelásticos en función de la deformación, medidos durante un procedimiento de desestructuración (etapa 7) con cizalladura armónica con amplitud creciente de deformación. Se demuestra que la deformación crítica γ_c , más allá de la cual el gel comienza a fluir, identificada por el crecimiento de G' y G'' , es del orden de 0,2.

3.3. Efecto de la fuerza iónica sobre el comportamiento tixotrópico de los geles de α -La

Con el fin de evaluar las diferencias de cinética de reestructuración-desestructuración de los geles de α -La, así como los niveles de consistencia alcanzados en función de la fuerza iónica de NaCl, se realizó un procedimiento idéntico al presentado en la Tabla I en diversas suspensiones de α -La. Los resultados se presentan en las **Figuras 7 a 9**.

En la **Figura 10** se representa la evolución de los módulos viscoelásticos G' y G'' en función de la fuerza iónica de NaCl y de la concentración de α -La. Los niveles fueron comparados con el mismo tiempo de reestructuración de 500 s de la *etapa 3*, que corresponde a la zona de reestructuración con cinética lenta, es decir sobre la "meseta" alcanzada durante la reestructuración. Se puede ver que los niveles de G' y G'' disminuyen cuando la fuerza iónica aumenta, lo que corresponde a una reducción de la consistencia del gel. El aumento de la concentración de α -La provoca un aumento de los módulos viscoelásticos.

En la **Figura 11** se comparan las desestructuraciones aplicadas sobre diversas muestras; estos resultados ponen de manifiesto que la deformación crítica se desplaza hacia niveles más elevados cuando la fuerza iónica aumenta o cuando la concentración de proteína disminuye. Desestructuraciones sucesivas de una misma muestra presentan deformaciones críticas del mismo orden de magnitud (no presentada en la figura) lo que manifiesta la excelente estabilidad del sistema al sufrir sollicitaciones sucesivas de desestructuración-estructuración, así como una estabilidad muy buena en el tiempo por parte de la reproducibilidad de las mediciones de G' y G''

Ejemplo 4 – preparación de un hidrogel de α -lactalbúmina según las condiciones descritas en la tesis de C. Blanchet

El fin de este ensayo es reproducir una suspensión de α -La capaz de obtenerse por el protocolo descrito por C. Blanchet *et al.*, después de caracterizar sus propiedades reológicas.

Las experiencias se llevaron en las condiciones y según el protocolo descrito en la página 203 de la tesis: Las proteínas de α -La (10 mg/ml con NaCl 30 mM) se ponen en suspensión, a continuación el pH de esta suspensión se ajusta a 2, después la suspensión se introduce en un tubo Ependorf; el tubo se agita a 40°C (las condiciones de agitación son las utilizadas para la preparación de los hidrogeles según la invención).

Paralelamente, por el procedimiento según la invención se prepara un hidrogel a 10 mg/mL de α -La con CINA 30 mM.

El cliché de la izquierda de la **Figura 13** ilustra el aspecto de los hidrogeles así obtenidos ((B) según la tesis y (A) según la invención): el hidrogel (B) presenta un aspecto menos homogéneo que el hidrogel (A).

Se observa igualmente que estos dos hidrogeles no tienen el mismo comportamiento cuando se los agita: el cliché de la derecha de la **Figura 13** muestra estos dos hidrogeles después de la agitación. En razón de su comportamiento tixotrópico, la viscosidad del hidrogel (A) según la invención ha disminuido durante la agitación y ha fluido a la parte baja del tubo Ependorf; por el contrario, la agitación no ha provocado fluencia al hidrogel (B) que permanece en la parte superior del tubo Ependorf (extremo cónico).

Ejemplo 5 – preparación de un hidrogel de α -lactalbúmina a pH 7 y 80°C

El fin de este ensayo es reproducir el hidrogel descrito por Kavanagh, G.M., A. H. Clark, *et al.* (2000) "Heat-induced gelation of beta-lactoglobulin/alpha-lactoglobulin blends at pH 3 and pH 7" *Macromolecules* 33(19): 7029-7037, después de caracterizar sus propiedades reológicas.

Condiciones descritas en el artículo:

Concentración de α -La al 15% p/p, es decir 150 mg/mL

T°C = 80°C

Disolvente= agua desionizada

pH = 7,0

Los geles se observan al cabo de 1 a 2h a 80°C.

Condiciones de realización:

Concentración de a-La al 15% p/p, es decir 150 mg/mL

5 T°C = 80°C durante 1h

Disolvente= agua desionizada

pH = 7,2

10 La verificación de la concentración de a-La se realiza midiendo la absorción a 280 nm de la solución con ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (LabTech): las mediciones se realizaron en tres soluciones de proteínas, diluidas cada una a la quinta parte: A1 = 61; A2 = 62; A3 = 61. La concentración de a-La se determina según la ley de Beer-Lambert $A = \epsilon C l$, en donde $\epsilon = 27880 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $l = 1 \text{ cm}$. La concentración molar C de la solución de a-La es por lo tanto 10,9 mM, lo que corresponde a una concentración en masa de 154 mg/mL (la masa molar del a-La es 14150 g mol^{-1}).

15 La solución de a-La, preparada, se separa en dos tupo de 200 μL . Un tubo se coloca a 80°C, 1h sin agitación y el otro tubo se conserva a temperatura ambiente, como testigo.

En menos de una hora se ha formado un gel en el tubo dispuesto a 80°C. El gel obtenido es duro, no se hunde dentro de un cono, pero muestra una cierta elasticidad. Se puede desmoldear igualmente conservando la forma del tubo, lo que no es el caso de los hidrogeles según la invención, que presentan una consistencia más blanda.

20 El hidrogel así obtenido presenta igualmente un aspecto más transparente, mientras que los hidrogeles según la invención son translúcidos (dejan pasar una luz difusa pero no se pueden distinguir objetos a través de estos hidrogeles). Por último, si se sacude fuertemente, no cambia de forma, es irreversible.

Así, el hidrogel aquí producido no presenta ni el aspecto ni las propiedades físicas de los geles tixotrópicos realizados según el procedimiento de la invención.

Bibliografía

- Akkermans, C., P. Venema, et al. (2008). "Peptides are building blocks of heat-induced fibrillar protein aggregates of beta-lactoglobulin formed at pH 2." Biomacromolecules **9**(5): 1474-1479.
- Audic, J. L., B. Chaufer, et al. (2003). "Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review." Lait **83**(6): 417-438.
- Chen, H. (1995). "Functional properties and applications of edible films made of milk proteins." Journal of Dairy Science **78**(11): 2563-2583.
- Gosal, W. S., A. H. Clark, et al. (2004). "Fibrillar beta-lactoglobulin gels: Part 1. Fibril formation and structure." Biomacromolecules **5**(6): 2408-2419.
- Gosal, W. S., A. H. Clark, et al. (2004). "Fibrillar beta-lactoglobulin gels: Part 2. Dynamic mechanical characterization of heat-set systems." Biomacromolecules **5**(6): 2420-2429.
- Gosal, W. S., A. H. Clark, et al. (2004). "Fibrillar beta-lactoglobulin gels: Part 3. Dynamic mechanical of solvent-induced systems." Biomacromolecules **5**(6): 2430-2438.
- Graveland-Bikker, J. F., R. Ipsen, et al. (2004). "Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed alpha-lactalbumin." Langmuir **20**(16): 6841-6846.
- Gunasekaran, S., S. Ko, et al. (2007). "Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications." Journal of Food Engineering **83**(1): 31-40.
- Heidebach, T., P. Forst, et al. (2009). "Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins." FOOD HYDROCOLLOIDS **23**(7): 1670-1677.
- Heidebach, T., P. Forst, et al. (2009). "Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells." INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL **19**(2): 77-84.
- Hines, M. E. and E. A. Foegeding (1993). "INTERACTIONS OF ALPHA-LACTALBUMIN AND BOVINE SERUM-ALBUMIN WITH BETA-LACTOGLOBULIN IN THERMALLY INDUCED GELATION." Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(3): 341-346.
- Holmes, T. C., S. de Lacalle, et al. (2000). "Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6728-6733.
- Ipsen, R. and J. Otte (2007). "Self-assembly of partially hydrolysed alpha-lactalbumin." BIOTECHNOLOGY ADVANCES **25**(6): 602-605.
- Ipsen, R., J. Otte, et al. (2001). "Molecular self-assembly of partially hydrolysed alpha-lactalbumin resulting in strong gels with a novel microstructure." Journal of Dairy Research **68**(2): 277-286.
- Kamau, S. M., S. C. Cheison, et al. (2010). "Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **9**(2): 197-212.
- Kavanagh, G. M., A. H. Clark, et al. (2000). "Heat-induced gelation of beta-lactoglobulin/alpha-lactalbumin blends at pH 3 and pH 7." Macromolecules **33**(19): 7029-7037.
- Kavanagh, G. M., A. H. Clark, et al. (2000). "Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH beta-lactoglobulin gels." International Journal of Biological Macromolecules **28**(1): 41-50.
- Kopecek, J. and J. Yang (2009). "Peptide-directed self-assembly of hydrogels." Acta Biomater **5**(3): 805-816.
- Kyle, S., A. Aggeli, et al. (2009). "Production of self-assembling biomaterials for tissue engineering." Trends in Biotechnology **27**(7): 423-433.
- Le Tien, C., C. Vachon, et al. (2001). "Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes." Journal of Food Science **66**(4): 512-516.
- Livney, Y. D. (2010). "Milk proteins as vehicles for bioactives." Current Opinion in Colloid & Interface Science **15**(1-2): 73-83.

- Loveday, S. M., M. A. Rao, et al. (2009). "Factors Affecting Rheological Characteristics of Fibril Gels: The Case of beta-Lactoglobulin and alpha-Lactalbumin." Journal of Food Science **74**(3): R47-R55.
- Madureira, A. R., C. I. Pereira, et al. (2007). "Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties." Food Research International **40**(10): 1197-1211.
- Mewis, J. (1979). "THIXOTROPY - GENERAL-REVIEW." Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics **6**(1): 1-20.
- Oborocanu, D., L. Wang, et al. (2010). "Characterization of β -Lactoglobulin Fibrillar Assembly Using Atomic Force Microscopy, Polyacrylamide Gel Electrophoresis, and in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy." Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Paulsson, M., P. O. Hegg, et al. (1986). "HEAT-INDUCED GELATION OF INDIVIDUAL WHEY PROTEINS A DYNAMIC RHEOLOGICAL STUDY." Journal of Food Science **51**(1): 87-90.
- Pek, Y. S., A. C. A. Wan, et al. (2008). "A thixotropic nanocomposite gel for three-dimensional cell culture." Nature Nanotechnology **3**(11): 671-675.
- Permyakov, E. A. and L. J. Berliner (2000). "alpha-Lactalbumin: structure and function." Febs Letters **473**(3): 269-274.
- Piau, J. M. (2007). "Carbopol gels: Elastoviscoplastic and slippery glasses made of individual swollen sponges Meso- and macroscopic properties, constitutive equations and scaling laws." Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics **144**(1): 1-29.
- Pignon, F., A. Magnin, et al. (1998). "Thixotropic behavior of clay dispersions: Combinations of scattering and rheometric techniques." Journal of Rheology **42**(6): 1349-1373.
- Restani, P., C. Ballabio, et al. (2009). "Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY **395**(1): 47-56.
- Rodrigues, M. M. A., A. R. Simioni, et al. (2009). "Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of BSA-based nanospheres containing nanosized magnetic particles and/or photosensitizer." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **321**(10): 1600-1603.
- Semo, E., E. Kesselman, et al. (2007). "Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals." Food Hydrocolloids **21**(5-6): 936-942.
- Song, F., L. Zhang, et al. (2009). "Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery." INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS **373**(1-2): 41-47.
- Tokpavi, D. L., P. Jay, et al. (2009). "Experimental study of the very slow flow of a yield stress fluid around a circular cylinder." Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics **164**(1-3): 35-44.
- van der Linden, E. and P. Venema (2007). "Self-assembly and aggregation of proteins." Current Opinion in Colloid & Interface Science **12**(4-5): 158-165.
- Vintiloiu, A. and J.-C. Leroux (2008). "Organogels and their use in drug delivery -- A review." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE **125**(3): 179-192.
- Yan, H., H. Frielinghaus, et al. (2008). "Thermoreversible lysozyme hydrogels: properties and an insight into the gelation pathway." Soft Matter **4**(6): 1313-1325.
- Yan, H., A. Saiani, et al. (2006). "Thermoreversible Protein Hydrogel as Cell Scaffold." Biomacromolecules **7**(10): 2776-2782.
- Yanlian, Y., K. Ulung, et al. (2009). "Designer self-assembling peptide nanomaterials." Nano Today **4**(2): 193-210.
- Zhang, S. (2008). Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for study of 3-D cell biology and beyond. Advances in Cancer Research, Vol 99. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. **99**: 335-+.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un hidrogel de α -lactalbúmina a partir de una suspensión acuosa de α -lactalbúmina a una concentración $C_{\alpha-La}$ comprendida entre 5 y 60 mg/mL, que comprende las etapas siguientes:
 - 5 a) la puesta en suspensión de α -lactalbúmina en una solución acuosa ácida que tiene una fuerza iónica inferior o igual a 60 mM; consistiendo dicha puesta en solución en:
 - (a1) la preparación de una solución acuosa ácida que tenga una concentración de protones expresada en mM, determinada por la suma: (valor numérico de $C_{\alpha-La}$ expresado en g/L) + 10;
 - (a2) la suspensión de la α -lactalbúmina en dicha solución acuosa ácida; y
 - (a3) si fuera necesario, el ajuste del pH a un valor comprendido entre 1,5 y 2,5;
 - 10 (b) la formación del gel a partir de dicha suspensión de α -lactalbúmina obtenida al final de la etapa a); realizándose dicha formación del gel en las condiciones siguientes:
 - a una temperatura inferior a 60°C;
 - bajo una agitación que tenga una intensidad definida por un número de Reynolds comprendido entre 37 y 1000;
 - 15 - durante 10 horas a 1 semana, y
 - en ausencia de evaporación de agua de dicha suspensión de α -lactalbúmina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el número de Reynolds está comprendido entre 300 y 500.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque la temperatura está comprendida entre 35 y 55°C.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el pH está comprendido entre 1,8 y 2,2.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicha suspensión de α -lactalbúmina obtenida al final de la etapa a) se filtra.
- 25 6. Hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina susceptible de ser obtenida según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, un pH comprendido entre 1,5 y 2,5 y una fuerza iónica inferior o igual a 60 mM.
- 30 8. Utilización de un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, como agente texturante alimentario.
9. Producto alimentario que comprende al menos un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL.
- 35 10. Hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, para una utilización para el tratamiento y/o cicatrización de heridas.
11. Apósito que comprende al menos un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, y, opcionalmente, al menos un compuesto activo tal como un agente cicatrizante o un agente antimicrobiano.
- 40 12. Utilización de un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL para la preparación de una composición cosmética.
13. Composición cosmética que comprende al menos un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL.
14. Utilización de un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL, para la preparación de pinturas.
- 45 15. Pintura que comprende al menos un hidrogel reofluidificante, con umbral y tixotrópico, de α -lactalbúmina que tiene un contenido de α -lactalbúmina comprendido entre 5 y 60 mg/mL.

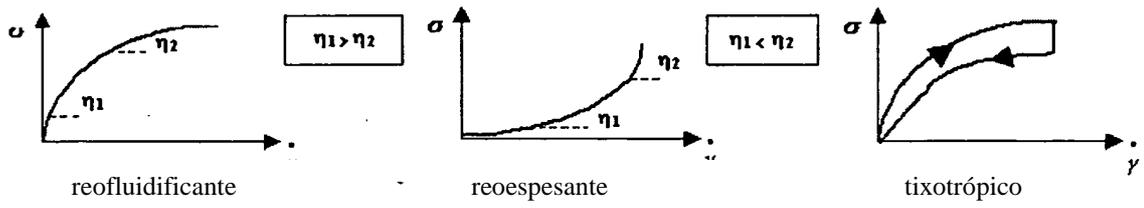


Figura 1

Alfa-lactalbúmina 20 mg/mL – NaCl 30 mM – T = 15°C

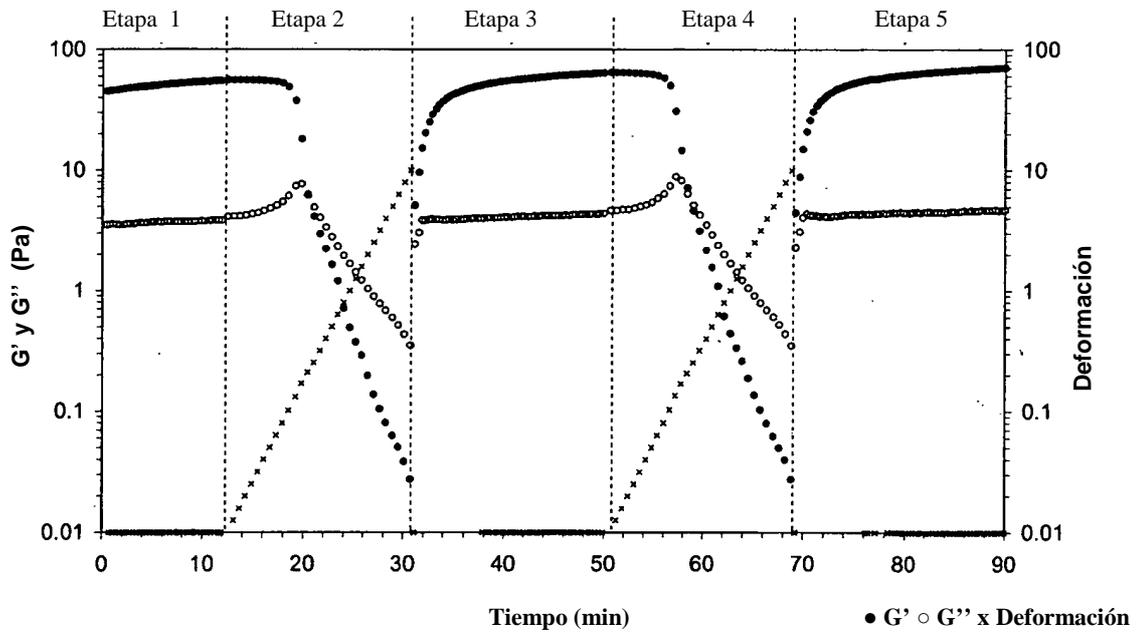


Figura 2

Alfa-lactalbúmina 20 mg/mL – NaCl 30 mM – T = 15°C

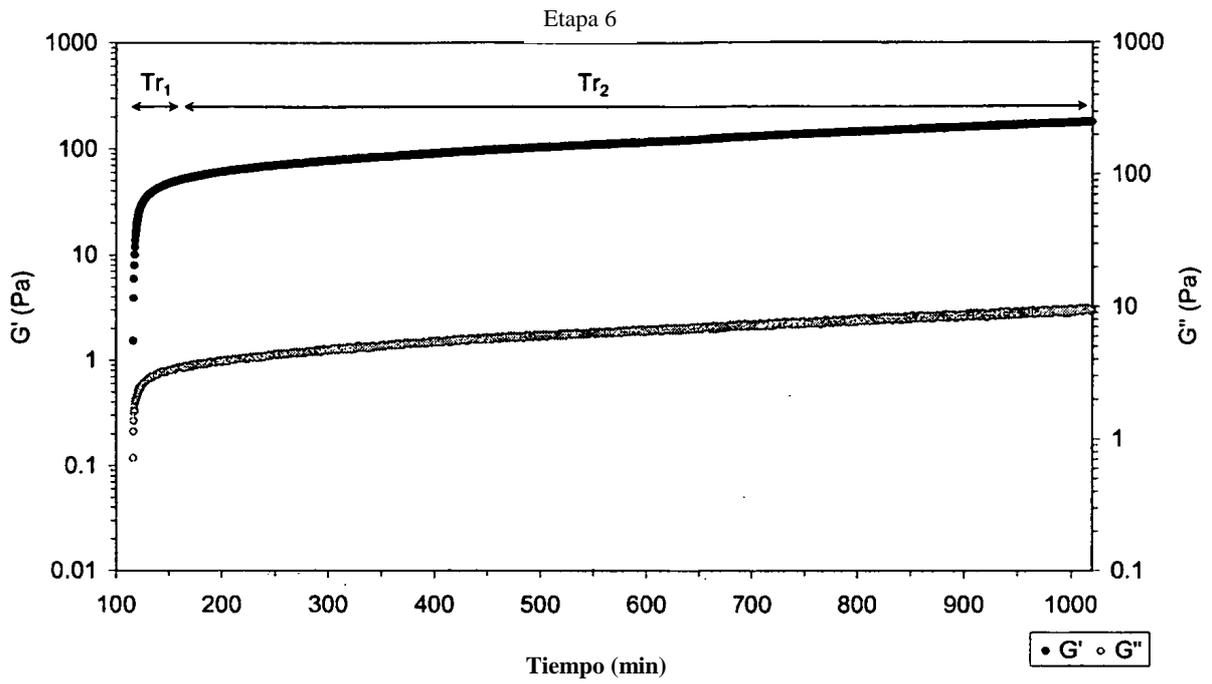


Figura 3

Alfa-lactalbúmina 20 mg/mL – NaCl 30 mM – T = 15°C

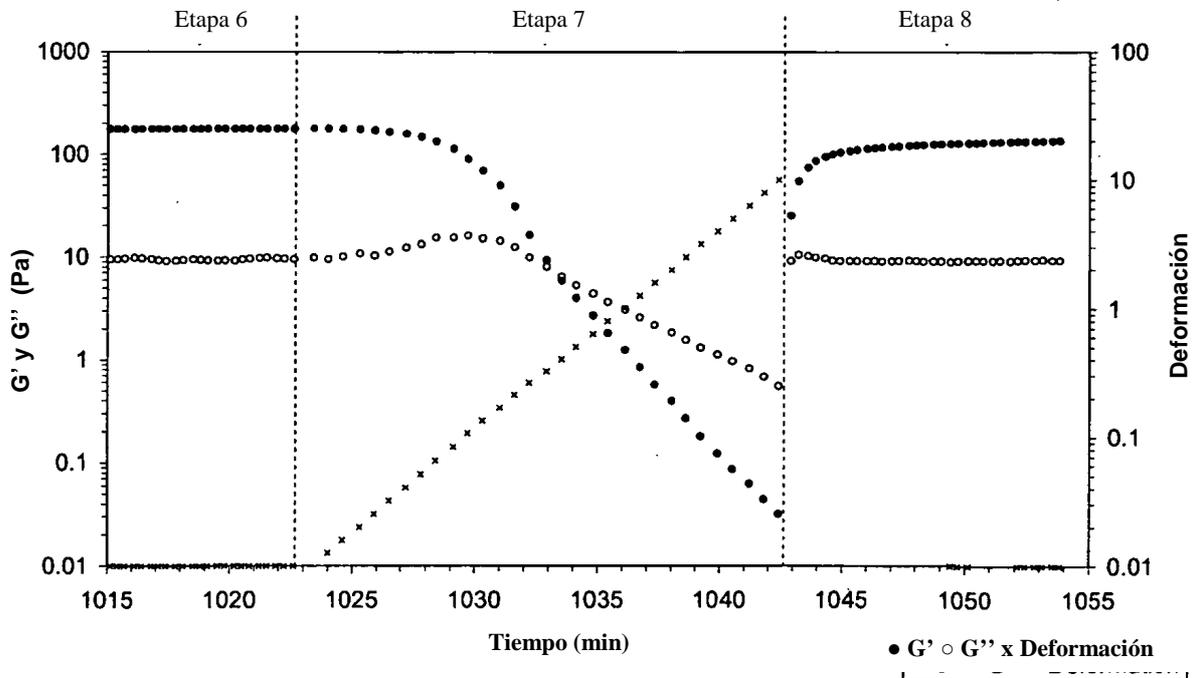


Figura 4

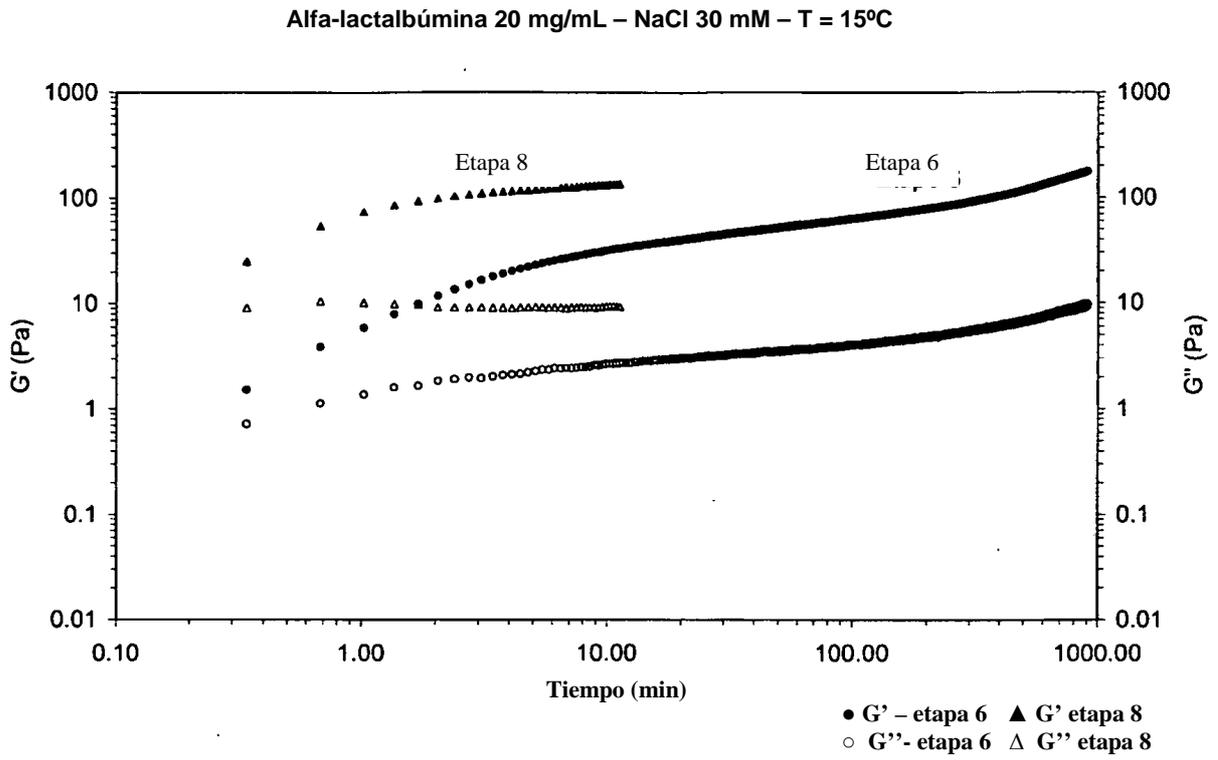


Figura 5

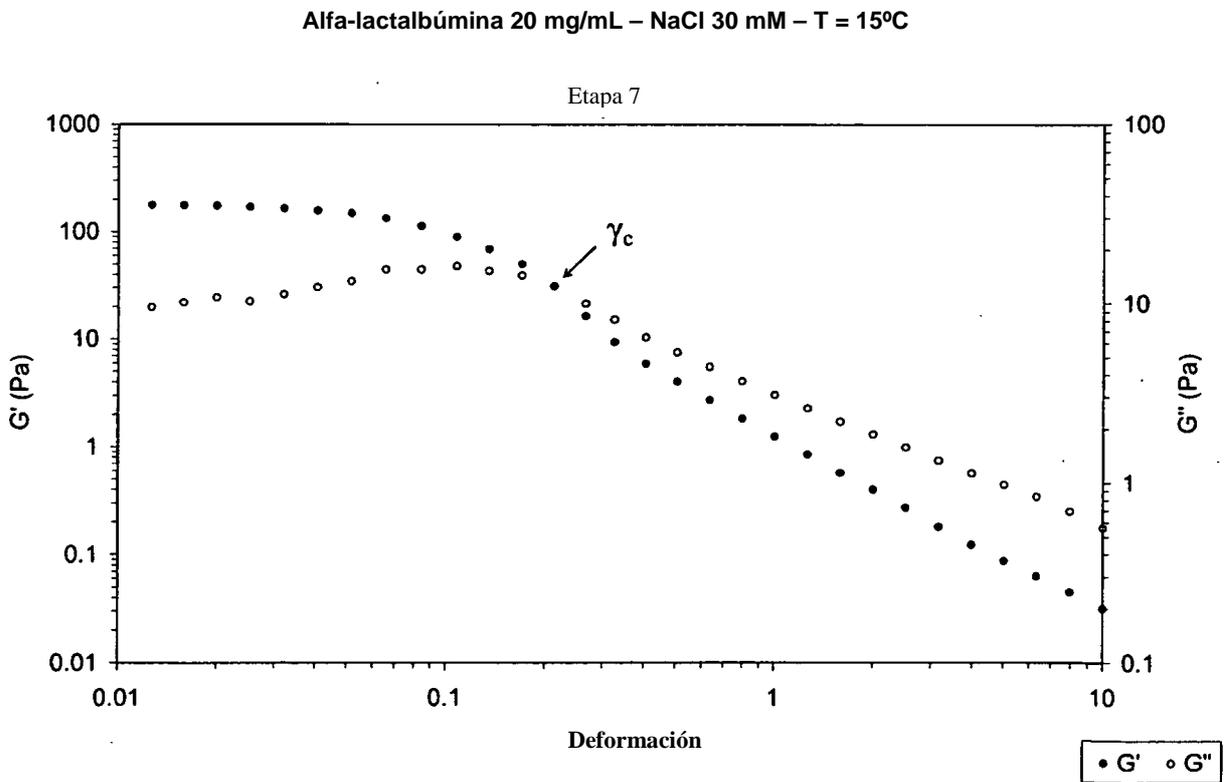


Figura 6

ES 2 556 816 T3
 Alfa-lactalbúmina 20 mg/mL – NaCl 0 mM – T = 15°C

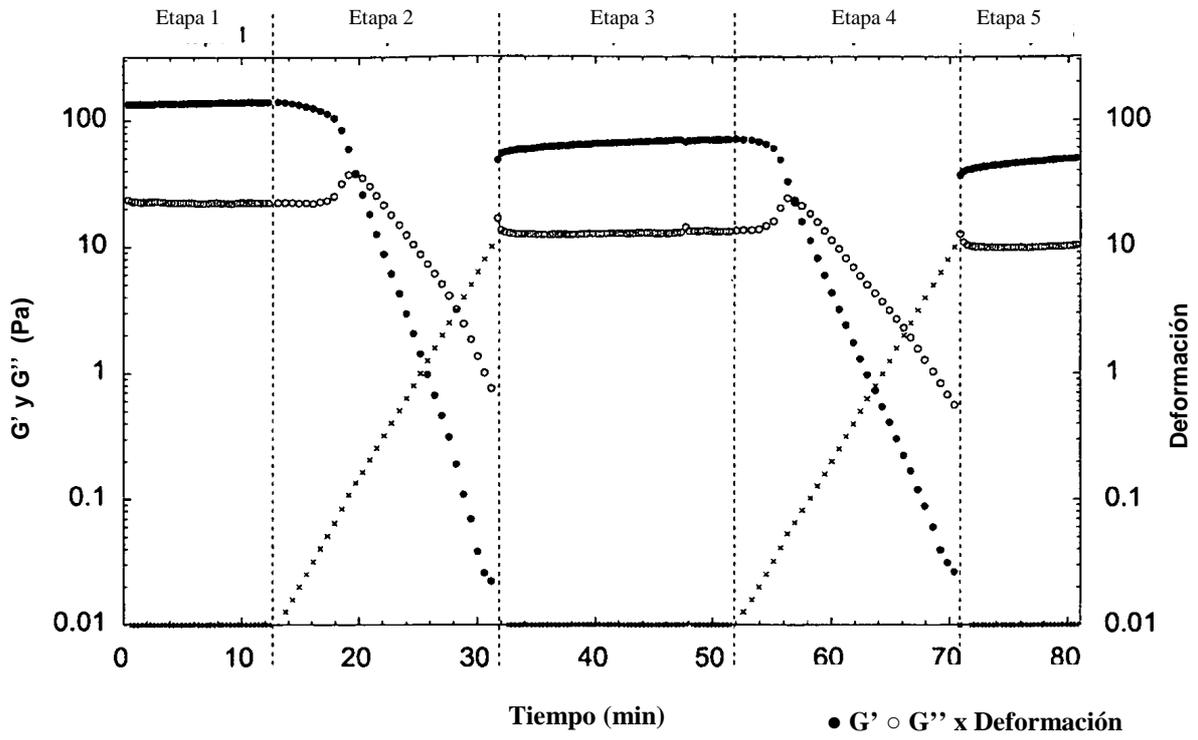


Figura 7

Alfa-lactalbúmina 20 mg/mL – NaCl 0 mM – T = 15°C

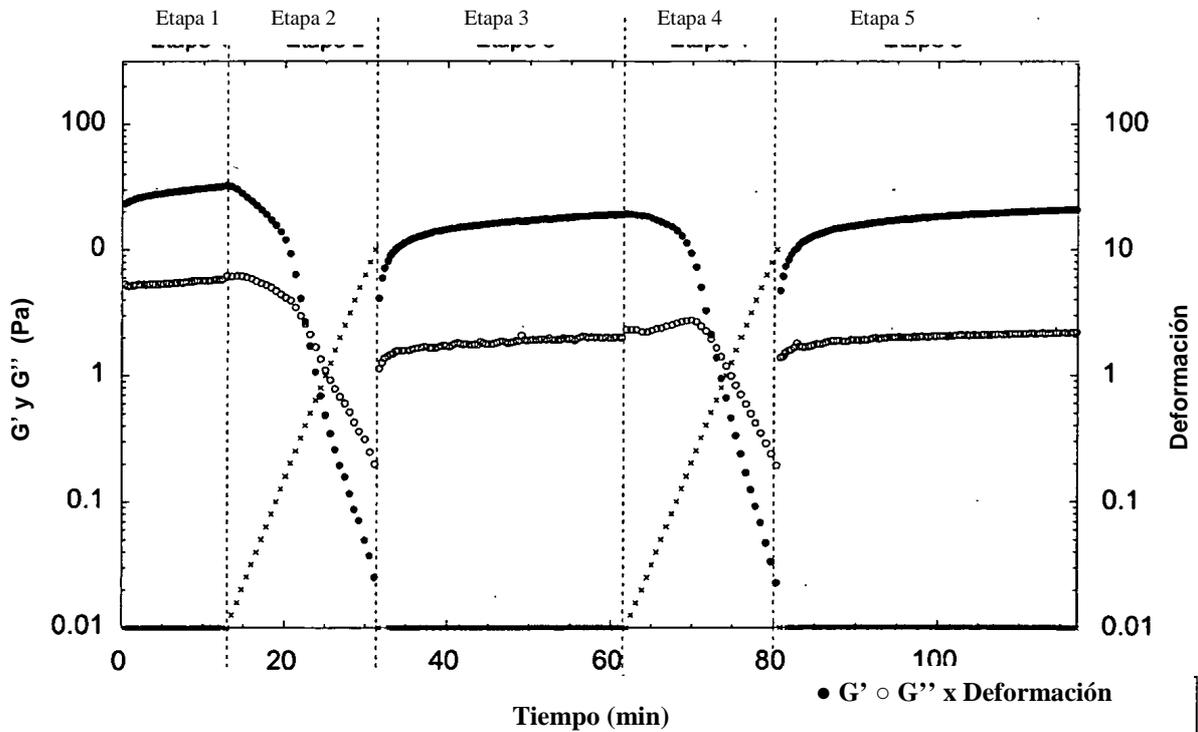


Figura 8

Alfa-lactalbúmina 20 mg/mL – NaCl 0 mM – T = 15°C

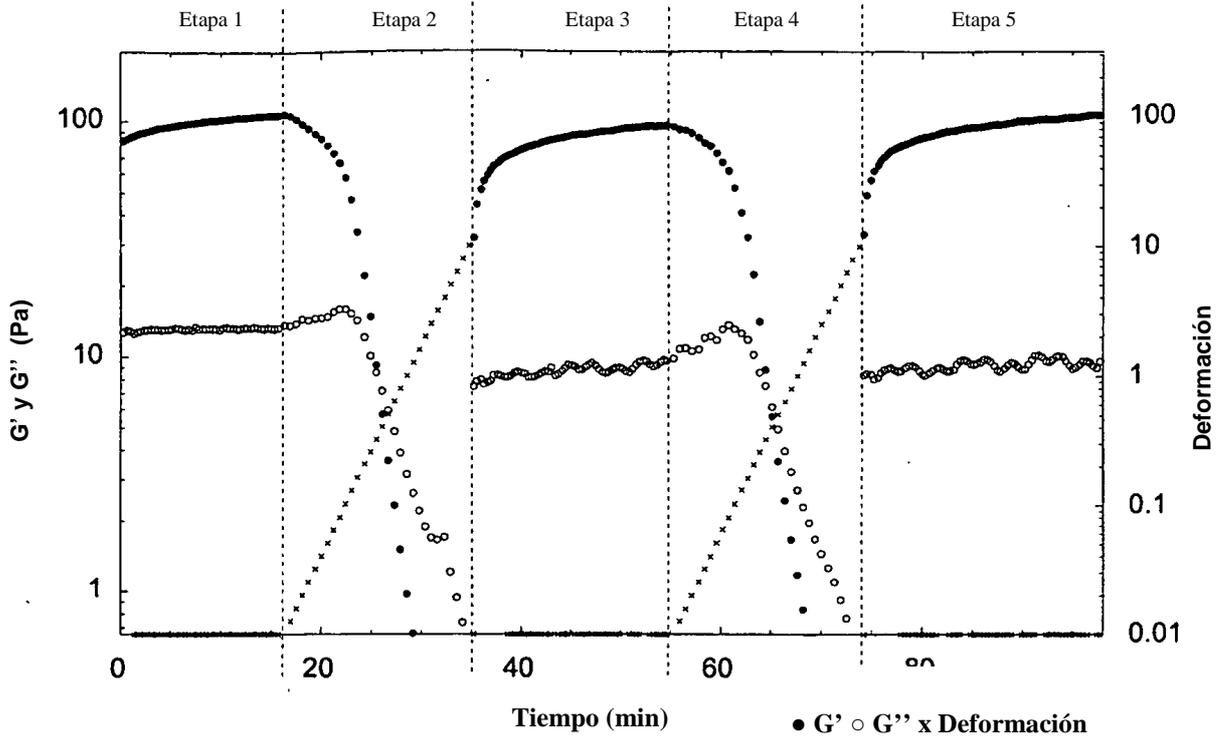


Figura 9

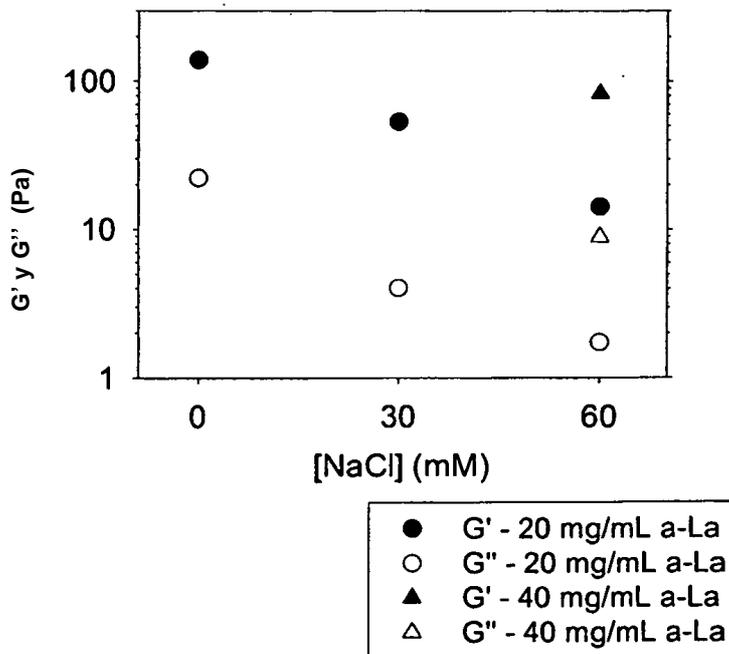


Figura 10

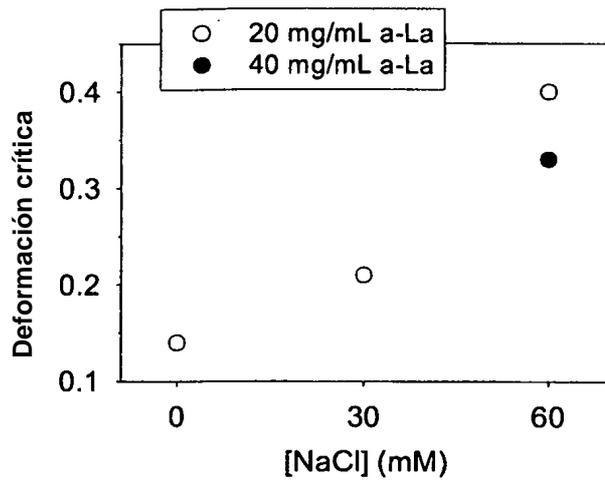


Figura 11

Alphalac 20 mg/mL - 0 mM NaCl - T = 15 °C

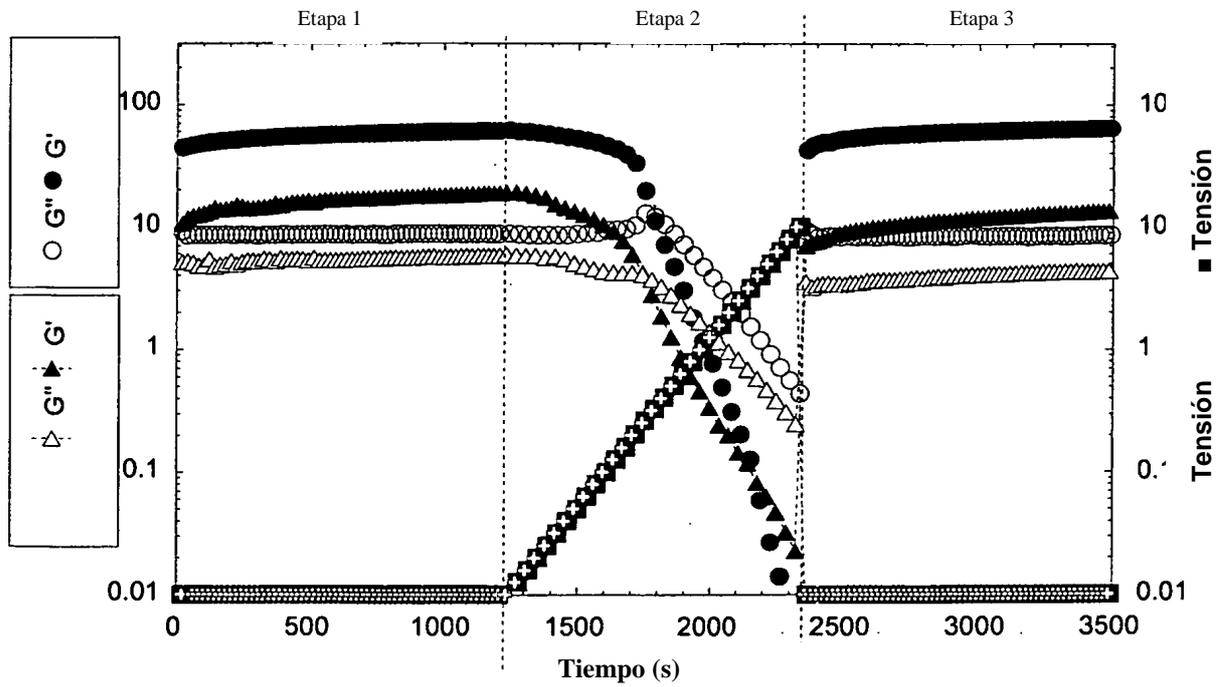
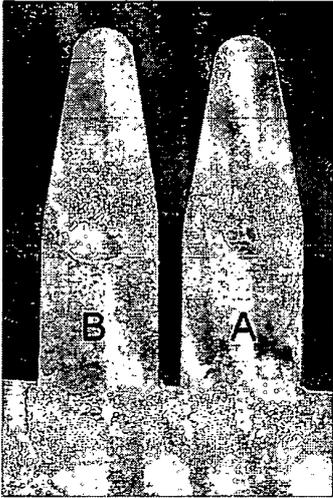


Figura 12

Antes de la agitación



Después de la agitación

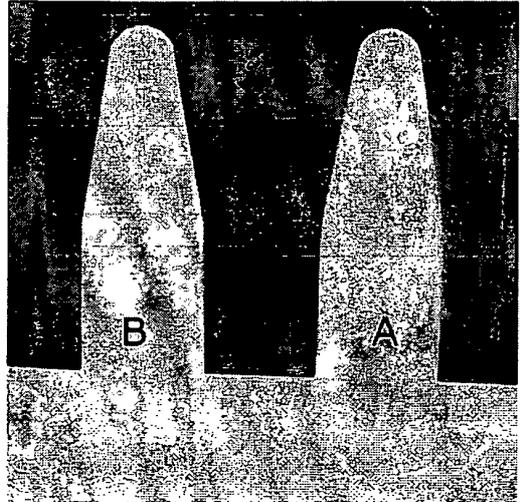


Figura 13