

BIOSELLANTES DE PEZONES

I. CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuentra relacionada con productos para la prevención de la mastitis bovina, así como métodos de selección de formulaciones utilizadas mediante el método de barrera de inmersión con probióticos como agentes que promueven la salud de la glándula mamaria. El campo de la invención incluye formulaciones para la prevención de infecciones causadas por microorganismos patógenos que se propagan por
10 medio del conducto de los pezones. También se incluyen formulaciones caracterizadas por contener bacterias ácido lácticas como agentes activos para la prevención de la mastitis bovina.

II. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La mastitis es definida como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria cuyo origen puede ser infeccioso, traumático o tóxico [1]. También puede ser definida como una inflamación de la glándula mamaria, comúnmente asociada con una infección bacteriana intramamaria [2].

20 La infección intramamaria es definida como una invasión y multiplicación de los microorganismos patógenos en la glándula mamaria. La infección intramamaria resulta una vez el microorganismo atraviesa el conducto del pezón, se multiplica en el pezón y continúa propagándose hacia la cisterna de la glándula, progresando dorsalmente a los tejidos productores de leche. La infección intramamaria puede resultar en daño celular
25 local conduciendo a una respuesta inflamatoria si el microorganismo involucrado es patógeno [3],[4]. La mayoría de las mastitis son infecciones causadas por agentes bacterianos, entre los que se encuentran la *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* [5].

La producción láctea es afectada por la mastitis bovina, la cual es una de las enfermedades
30 que afecta la ganadería a nivel mundial, disminuyendo significativamente la productividad de las zonas afectadas [6].

Las pérdidas asociadas a la mastitis se causan por el descarte de leche anormal proveniente de animales clínicamente afectados. Además, como resultado de la terapia

antibiótica se asocian costos de remplazo de las vacas descartadas, antibióticos, labores extra de manejo de las vacas infectadas y otros costos de tratamiento y servicios veterinarios. Adicionalmente, las vacas con mastitis subclínica reducen su producción de leche. De hecho, un solo cuarto infectado a lo largo de la lactancia puede reducir la producción láctea en un 10 a 12% [3].

La mayoría de las vacas con mastitis clínica son tratadas con antimicrobianos [7]. No obstante, la leche proveniente de bovinos tratados con mastitis bovina provoca la presencia de antibióticos en la leche. Adicionalmente, la resistencia adquirida de las bacterias a los antimicrobianos amenaza la salud humana y veterinaria [8]. Entre los métodos conocidos de protección de pezones bovinos ante la mastitis bovina se encuentran los sellantes de origen químico, cuyos compuestos de naturaleza yodada también llegan fácilmente a la cadena alimenticia a través de la leche.

La integridad e higiene de las estructuras anatómicas de la glándula mamaria, como lo son el esfínter y canal del pezón, son las primeras medidas de protección contra los patógenos causales de infección intramamaria [9]. El canal del pezón es un importante mecanismo de defensa de la glándula mamaria [10], por lo cual los métodos que protegen la punta del pezón pueden reducir la susceptibilidad de la glándula mamaria a infecciones. Una alternativa para proteger la punta del pezón contra microorganismos causantes de mastitis bovina es el uso de sellantes externos de pezones, también llamados productos de barrera de inmersión [10].

Los productos de barrera fueron desarrollados para mejorar la efectividad de la desinfección post ordeño, estableciendo una película que ayuda a proteger los pezones durante el ordeño y en el periodo entre ordeños. Los productos de barrera son diseñados

[7] C. Pinzón-Sánchez, V. E. Cabrera, and P. L. Ruegg, "Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation.," *J. Dairy Sci.*, vol. 94, no. 4, pp. 1873–92, Apr. 2011.

[9] M. de Pinho Manzi, D. B. Nóbrega, P. Y. Faccioli, M. Z. Troncarelli, B. D. Menozzi, and H. Langoni, "Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis.," *Res. Vet. Sci.*, vol. 93, no. 1, pp. 430–4, Aug. 2012.

[10] G. H. Lim, K. E. Leslie, D. F. Kelton, T. F. Duffield, L. L. Timms, and R. T. Dingwell, "Adherence and efficacy of an external teat sealant to prevent new intramammary infections in the dry period.," *J. Dairy Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 1289–300, Mar. 2007.

para reducir efectivamente la infección causada por bacterias ambientales, así como para reducir la diseminación de infecciones causadas por bacterias contagiosas [11].

En el estado de la técnica se han divulgado preparaciones terapéuticas para el tratamiento de bóvidos, más específicamente, para el tratamiento de la sintomatología de la glándula mamaria causada por mastitis. Por ejemplo, la patente US2015/071893(A1) se refiere a una preparación terapéutica que comprende ozono y una sustancia proteica para el tratamiento de los bóvidos, tal como un bovino (*Bos taurus*) o una oveja (*Ovis aries*), más específicamente, para el tratamiento de dolencias de la glándula mamaria causadas por mastitis bovina. También se proporcionan métodos de tratamiento de un trastorno en un bóvido, incluyendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación terapéutica.

Las patentes WO2010/062194(A1) y WO2010044679 también se refieren a los sistemas y métodos conocidos en el estado de la técnica para el tratamiento de la mastitis bovina, entre los que se encuentra una formulación anti-infecciosa para prevenir o mejorar infecciones de las glándulas mamarias, en donde dicha formulación incluye un compuesto antiséptico, un medicamento para prevenir la mastitis bovina y una barrera física basada en aceite con masa cohesiva en el canal del pezón o en la porción baja de la cisterna del pezón, la cual está configurada para desintegrarse después de un periodo determinado.

Del mismo modo, la patente AU2004220714 se refiere a una formulación mejorada de un germicida, solución estable, soluble en agua formador de película por inmersión del pezón, que puede funcionar tanto como un agente anti-microbiano eficaz y como una barrera efectiva en la desembocadura del canal de la leche para prevenir o reducir la incidencia de la mastitis en animales agrícolas. Las composiciones de la invención incluyen un agente formador de película seleccionado del grupo que consta de hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa de metilo, y etilhidroxietilcelulosa, un agente germicida, preferiblemente yodo completado, para proporcionar una solución que tiene una viscosidad de aproximadamente 50 a 1000 cp. También se proporcionan métodos de protección de los pezones de los animales de agricultura de infecciones tales como mastitis, utilizando dicha composición germicida.

[11] C. Foret, H. Agu, and P. Janowicz, "Efficacy of Two Barrier Iodine Teat Dips under Natural Exposure Conditions," *J. Dairy Sci.*, vol. 89, no. 6, pp. 2279–2285, 2006.

La generación de formulaciones no antibióticas basadas en bacterias ácido lácticas para la prevención y tratamiento de la mastitis bovina representa un recurso valioso para reducir la dependencia del uso de antibióticos en el control de mastitis bovina, además de ser una alternativa al uso de sellantes de origen químico [12]. Las bacterias ácido lácticas y sus metabolitos son una alternativa prometedora para la elaboración de sellantes de pezones utilizados en el control de la mastitis bovina. Lo anterior se debe a que algunas bacterias ácido lácticas presentan actividad antimicrobiana contra los principales microorganismos causantes de la enfermedad [13],[14].

Para el uso de las bacterias ácido lácticas en bioproductos se debe garantizar que las bacterias permanezcan vivas en una cantidad apropiada (alrededor de 10^6 UFC/g o por ml) para que puedan ejercer su efecto en el momento de uso, sobreviviendo a los diferentes procesos de manufactura de productos [15], [16]. Por ejemplo, la patente NZ581576 (A) describe un proceso para la selección de bacterias probióticas para prevenir o tratar la mastitis tanto en seres humanos y animales mamíferos mediante el uso de microorganismos derivados de la leche obtenidos a partir de huéspedes sanos de las especies homólogas.

Debido a la emergencia del fenómeno de resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales es importante la búsqueda de alternativas para el manejo de las enfermedades causadas por estos patógenos, entre estas se ha propuesto el uso de anticuerpos, probióticos, lisinas, uso de bacteriófagos, estimulación del sistema inmune, vacunas y péptidos antimicrobianos [17].

Es importante resaltar que el uso de agentes biológicos, como las bacterias ácido lácticas y sus metabolitos aplicados a sellantes de pezones, son opciones efectivas en la prevención de la mastitis bovina, ofreciendo una alternativa al uso de productos comerciales basados en compuestos químicos como el yodo [18]. La anterior afirmación se basa en los sellantes de pezones comerciales que son de origen químico y yodados en su mayoría y

[17] L. Czaplewski, R. Bax, M. Clokie, M. Dawson, H. Fairhead, V. a Fischetti, S. Foster, B. F. Gilmore, R. E. W. Hancock, D. Harper, I. R. Henderson, K. Hilpert, B. V Jones, A. Kadioglu, D. Knowles, S. Ólafsdóttir, D. Payne, S. Projan, S. Shaunak, J. Silverman, C. M. Thomas, T. J. Trust, P. Warn, and J. H. Rex, "Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review.," *Lancet. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 2, pp. 239–51, Feb. 2016.

[18] L. Serna-Cock and O. V. Pabón-Rodríguez, "Development of a Teat Bio-sealant and Evaluation of its Technological and Functional Properties.," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 8, no. 2, pp. 111–9, Jun. 2016.

compuestos químicos como el yodo que representan un peligro en caso de ingresar a la cadena alimenticia. Por el contrario, las bacterias ácido lácticas son consideradas inocuas, de ahí su calificativo de bacterias seguras, y han sido ampliamente utilizadas como microorganismos probióticos seguros. Además, diferentes cepas del genero *Weissella* ha sido identificadas con potencial probiótico [19].

De igual forma, se registran investigaciones en las cuales se propone el uso de bacterias del ácido láctico y/o sus productos metabólicos como una forma para la prevención de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, los sistemas y métodos para el tratamiento de la mastitis divulgados en el arte previo, no han desarrollado un producto que contenga probióticos como agentes activos para la prevención de la mastitis.

Por lo anterior, la presente invención presenta formulaciones alternativas para la prevención de la mastitis bovina utilizando un probiótico como ingrediente activo. Más específicamente, la presente invención comprende la bacteria ácido láctica (*Weissella cibaria*) incluida en una formulación que permite proteger a las vacas de los microorganismos que producen mastitis bovina mediante el método de barrera de inmersión. Esta invención se tituló biosellante de pezones.

III. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

Para desarrollar un biosellante de pezones de la presente invención, se debe garantizar la supervivencia del probiótico. La presente invención utiliza geles de polisacáridos, cuya función principal es proveer un espacio físico para conservar vivo el probiótico, así como ser una fuente de carbono para el probiótico y protegerlo de los cambios de temperatura, lo que contribuye a aumentar la resiliencia del probiótico en la formulación. El gel de polisacáridos debe estar debidamente pasteurizado para evitar la presencia de otros microorganismos que puedan resultar perjudiciales para el animal sobre el que se aplica el biosellante, o perjudicial para la leche o los productos lácteos.

La mayor estabilidad y conservación de los microorganismos durante su almacenamiento se obtiene a menores temperaturas [20]. Cada género y especie bacteriana interactúan de forma específica entre los diferentes criopreservantes y temperaturas de almacenamiento utilizadas [21]. Consecuentemente, la resiliencia del probiótico relacionado con la temperatura de almacenamiento y la adición de criopreservantes debe

[19] K. W. Lee, J. Y. Park, H. R. Jeong, H. J. Heo, N. S. Han, and J. H. Kim, "Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces," *Anaerobe*, vol. 18, no. 1, pp. 96–102, Feb. 2012.

ser evaluada. El mecanismo de acción de los crioconservantes con respecto a la conservación del probiótico se encuentra relacionado a su capacidad de conservar la integridad de la membrana celular de las bacterias [22]. No obstante, para cada microorganismo se debe determinar cuál es la combinación más efectiva para su conservación [23].

La adición de plastificantes permite que la formulación forme una capa no quebradiza en una superficie, lo que permite la formación de una biopelícula concisa sobre la piel de los pezones. Los espesantes se agregan a la formulación para que actúen como compuestos espesantes, aportando la viscosidad necesaria para que el compuesto quede adherido a la piel de los pezones y pueda formar efectivamente la biopelícula.

Para evaluar la viabilidad del biosellante desarrollado, se debe determinar la resiliencia del probiótico en relación al tiempo de almacenamiento y su actividad antimicrobiana contra el patógeno de interés. Una forma de medir la resiliencia del probiótico en relación al tiempo de almacenamiento en una formulación es realizar varias mediciones de la concentración de unidades formadoras de colonia (UFC) utilizando unas condiciones de almacenamiento particulares durante un periodo de tiempo, lo que proporciona suficiente información acerca de la capacidad de supervivencia que tiene el probiótico.

Una vez evaluada la viabilidad del biosellante de pezones, se debe evaluar su capacidad de adherencia del probiótico a los pezones y la adherencia del probiótico a las células epiteliales de la glándula mamaria bovina. En la presente invención, a estas dos últimas mediciones se les llama capacidad de adherencia.

La evaluación de la respuesta fisiológica de vacas ante la aplicación del biosellante de pezones es también, una importante etapa complementaria en el desarrollo de sellantes de pezones, ya que se debe garantizar que la aplicación del biosellante no produzca en la piel del animal, reacciones alérgicas o colaterales. Por lo tanto, además de la realización de las pruebas *in vitro*, es preferible realizar ensayos *in vivo* con el fin de evaluar los efectos de la cepas probióticas sobre la salud del huésped [24].

Sorprendentemente se ha evidenciado que la combinación de un probiótico en un gel de polisacáridos junto con crioconservantes, plastificantes y espesantes, da lugar a varios efectos sinérgicos en relación con la capacidad de supervivencia del probiótico a

condiciones convenientes de almacenamiento, manteniendo o mejorando el efecto antimicrobiano contra los patógenos de interés.

Así, la presente invención da a conocer un método de selección de biosellantes funcionales, el cual comprende las etapas de:

- 5 a) Mezclar un gel de polisacáridos esterilizado y la biomasa de un microorganismo probiótico de modo que se obtienen concentraciones mínimas de microorganismos de 10^6 y concentraciones máximas de 10^{12} UFC/mL en el momento de aplicación de la formulación. Esto debido a que la biomasa de *Weissella cibaria* en forma pura alcanza concentraciones máximas del orden de
10 10^{12} UFC/mL y esta debe ser adicionada a los otros componentes de la formulación.
- b) Agregar un crioprotector de modo que preferiblemente esté presente en la formulación en una concentración de 1% a 10% v/v; la presente invención no está limitada a crioprotectores específicos y en principio es posible utilizar otras
15 concentraciones de crioprotector que posibiliten la protección del componente activo. Las modalidades preferenciales de la invención utilizan los valores máximos y mínimos reportados en la literatura, los cuales indican concentraciones que varían desde el 1 al 10 % para la crioprotección de los microorganismos [23].
- c) Agregar un plastificante de modo que preferiblemente esté presente en la
20 formulación en una concentración de 2% a 55% v/v; la presente invención no está limitada a plastificantes específicos y en principio es posible utilizar otras concentraciones de plastificante que suavicen la formulación y/o conserven el componente activo. Los valores máximos y mínimos obedecen a que en la literatura científica se reporta el uso de agentes crioprotectores y plastificantes
25 como el glicerol, en concentraciones del 2 al 55 % para la crioprotección de los microorganismos [23].
- d) Agregar un espesante de modo que aumente la viscosidad de la formulación, en valores superiores a 1, hasta 5000 centipoise (o mPa·s). Los valores mínimos obedecen a que cada polímero tiene diferente capacidad espesante. Típicamente,
30 estas viscosidades se logran con un espesante en un rango de 0.1% a 10% p/v al gel inoculado
- e) Mezclar los componentes hasta obtener una mezcla homogénea;

- f) Evaluar las capacidades tecnológicas y funcionales del probiótico que interactúan con los componentes en la mezcla, en donde se mide su resiliencia en relación al tiempo de almacenamiento y su actividad antimicrobiana contra los patógenos de interés. Esta etapa es necesaria ya que aunque la capacidad tecnológica y funcional de la cepa ha sido probada contra los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* [14], esta actividad puede perderse al interactuar con otros componentes de la mezcla.
- g) Evaluar la capacidad de adherencia del probiótico, en donde se evalúa la adherencia del probiótico a los pezones, y la adherencia del probiótico a las células epiteliales de la glándula mamaria bovina. Es necesario evaluar la capacidad de adherencia debido a que uno de los mecanismos mediante los cuales las bacterias ácido lácticas ejercen efecto probiótico, es a través de la adhesión a células epiteliales. La capacidad de adhesión es una característica muy importante para la selección de cepas probióticas [25], ya que no todas las bacterias ácido lácticas tienen capacidad de adherencia.
- h) Seleccionar las formulaciones que cumplen los estándares de capacidad probiótica y adherencia del probiótico, en donde preferiblemente se seleccionan las formulaciones con viscosidades de 50 a 1000 cp, la adherencia a los tejidos del pezón supera el 70%, el valor de UFC por mL no decrece más de 3 unidades exponenciales tras 30 días de almacenamiento y la formulación presenta actividad antimicrobiana hasta después de los 30 días contra el patógeno de interés.

Los anteriores estándares se basan en varias investigaciones realizadas con el objetivo de mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos, ya que se ha identificado que durante su procesamiento, producción y almacenamiento se afecta negativamente la viabilidad de los probióticos [16]. Las cepas de bacterias ácido lácticas se deben evaluar varias características para establecer su potencial probiótico, entre ellas determinar la

[16] M. K. Tripathi and S. K. Giri, "Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage," *J. Funct. Foods*, vol. 9, pp. 225–241, Jul. 2014.

[25] D. Ren, C. Li, Y. Qin, R. Yin, X. Li, M. Tian, S. Du, H. Guo, C. Liu, N. Zhu, D. Sun, Y. Li, and N. Jin, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment.," *Anaerobe*, vol. 18, no. 5, pp. 508–15, Oct. 2012.

[26] O. Pringsulaka, K. Rueangyotchanthana, N. Suwannasai, R. Watanapokasin, P. Amnueysit, S. Sunthornthummas, S. Sukkhum, S. Sarawaneeyaruk, and a. Rangsiruji, "In vitro screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics," *Livest. Sci.*, vol. 174, pp. 66–73, Apr. 2015.

capacidad de adherencia [26], y que la administración, o el uso de las bacterias ácido lácticas, no produzca efectos negativos sobre la salud del huésped.

La formulación se puede complementar con la adición de otros compuestos que promuevan la salud de la piel y no afecten la capacidad probiótica de la cepa utilizada
5 como hidratantes, emolientes y vitaminas, todos ellos en concentraciones que no afecten el componente activo, lo cual es fácilmente determinable para una persona versada en la materia.

El biosellante de pezones puede ser utilizado para la aplicación tópica en la piel de pezones de vacas. La aplicación se hará por inmersión de cada uno de los pezones en
10 soluciones acuosas del producto. Preferiblemente, la aplicación se hace como parte final de la rutina de ordeño, para la prevención de la mastitis bovina.

El producto también se puede utilizar en aplicación tópica a animales domésticos que sean susceptibles a adquirir infecciones por *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus agalactiae*, y/o *E. coli*, y/o *Klebsiella neumonic*. En estudios previos se ha demostrado que
15 *W. cibaria* (antes clasificada bioquímicamente, y publicada como *W. confusa*) tiene actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* y Gram negativas (*E. coli* y *Klebsiella neumonic*).

Similarmente, la presente invención puede ser incorporada en la alimentación de cerdos, aves y otros animales domésticos, para la prevención de enfermedades, ya que los
20 ingredientes son comestibles y no causan daño.

IV. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los microorganismos probióticos que utiliza la realización preferencial de la presente invención pertenecen a las bacterias del ácido láctico, particularmente la especie *Weissella cibaria*, la cual ha demostrado tener aplicación probiótica y biotecnológica [27],
25 [28]. Algunas de las especies del género que pueden utilizar como probióticos en la presente invención comprenden *W. confusa*, *W. minor*, *W. Kandleri*, *W. halotolerans*, *W. viridescens*, *W. paramesenteroides*, *W. hellenica*, *W. thailandensis*, *W. cibaria*, *W. kimchii*, *W. soil* y *W. koreensis*. También se pueden utilizar otras bacterias ácido lácticas correspondientes a diferentes géneros que cumplan con los estándares de capacidad
30 probiótica y adherencia del probiótico. No obstante, en principio cualquier microorganismo que sea considerado inocuo, y que demuestre actividad antimicrobiana

contra los principales microorganismos productores de mastitis bovina, y cumpla con los estándares de capacidad probiótica y adherencia del probiótico, pueden ser utilizados en la presente invención como ingrediente activo. Los ejemplos de la presente invención utilizan la cepa de *Weissella cibaria*, seleccionada por su capacidad de inhibición del crecimiento de los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella* *pneumonic* y *E. coli* [29],[30] . También es posible utilizar los microorganismos probióticos solos o en combinación.

El gel polisacárido que utiliza la realización preferencial de la presente invención es preparado a partir de cristales de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), miembro de la familia de las *Liliaceae*. De las 300 especies de Aloe, el Aloe vera L. es el más usado y ampliamente aceptado para propósitos médicos, cosméticos y nutracéuticos [31]. No obstante, en principio cualquier polisacárido, lípido o proteína, que cumpla la función de proveer un espacio físico para conservar vivo el probiótico, así como ser una fuente de carbono para el probiótico y protegerlo de los cambios de temperatura puede ser utilizado para desarrollar la presente invención [32]. Algunos ejemplos de polímeros son alginato, quitosano [33], almidón [34], celulosa [35]. La naturaleza de los polímeros con los cuales se realizan bio-películas, es un factor determinante para la viabilidad de los microorganismos y la producción de sus metabolitos [36]. De la misma forma, estos deben poseer adecuadas propiedades plastificantes para evitar su fragilidad [15]. Los polímeros pueden provenir de productos comerciales o de una extracción directa de una fuente natural. También es posible utilizar geles de polisacáridos solos o en combinación.

La realización preferencial de la presente invención utiliza leche en polvo descremada como crioconservante. La leche en polvo descremada es uno de los compuestos que ha sido más ampliamente utilizado como agente crioprotector para la conservación de diferentes microorganismos [37], [38]. Además, la leche en polvo descremada en solución es una fuente de diversas proteínas, lactosa y minerales, estos componentes pueden ejercer diferentes funciones en los mecanismos de acción de crioconservación de las bacterias [37]. El efecto crioconservante de la leche en polvo se encuentra relacionado a la

[29] R. Serna-cock, Liliana; Valencia, Leidy Johana; Campos-Gaona, "Bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana contra patógenos causantes de mastitis bovina," *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial*, vol. 9, no. 1, pp. 97–104, 2011.

[30] L. S. Cock, C. Elena, and E. Valencia, "Actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* y sus metabolitos frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* Antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*," *Rev. Colomb. Biotechnol.*, vol. XV, no. 2, pp. 63–69, 2013.

lactosa y proteínas presentes en la leche [39]. En principio cualquier crioconservante que contribuya positivamente a la integridad de la membrana celular de las bacterias y a la resiliencia del probiótico ante los choques térmicos puede ser usado en la presente invención. Algunos de los posibles crioconservantes de microorganismos son sulfoxidos, alcoholes, dioles, trioles, polialcoholes, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, amidas, componentes heterocíclicos, aminoácidos, ácidos carbónicos, proteínas, péptidos, polipéptidos, glicoproteínas, surfactantes no iónicos y sustancias complejas [23]. También es posible utilizar crioconsecvantes solos o en combinación.

La realización preferencial de la presente invención utiliza glicerol como plastificante. Se aclara que, aunque el glicerol es uno de estos compuestos que ha sido más ampliamente utilizado en microbiología para crioconservación [23], en esta invención se utiliza como plastificante. No obstante, en principio cualquier plastificante que contribuya positivamente a la formación de una biopelícula en la piel de los pezones y evite las quebraduras de dicha película, puede ser usado en la presente invención. Algunos de los posibles plastificantes a utilizar serían polioles, ácidos grasos saturados e insaturados y líquidos iónicos [40]. También es posible utilizar plastificantes solos o en combinación.

La realización preferencial de la presente invención utiliza el pululano como espesante. Los espesantes son polímeros que proporcionan la viscosidad necesaria a la formulación realizada. Cada polímero interactúa de diversas formas con cada cepa microbiana utilizada [43]. El pululano es un biopolímero soluble en agua que consiste en un polisacárido lineal neutro que contiene varios residuos de maltotriosa unidos por enlaces α 1 – 6. Es un exopolisacárido producido a partir del almidón por el hongo *Aurebasidium pullulans* [41]. Este biopolímero comestible tiene múltiples aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica debido a sus propiedades [42]. Por otra parte, los hidrocoloides poliméricos son ideales para utilizarse como espesantes en el biosellante porque también contribuyen a la resiliencia del probiótico. En principio, cualquier espesante que contribuya positivamente en las propiedades reológicas del biosellante puede ser usado en la presente invención. También es posible utilizar espesantes solos o en combinación.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos pretenden demostrar la realización preferencial de cada una de las etapas del método de la presente invención, así como los resultados experimentales que dan soporte técnico a las composiciones planteadas en el presente documento. Los

expertos en la técnica deberán, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aun así obtener un resultado igual o similar que se encuentra dentro del alcance de la invención, por lo tanto, toda la materia expuesta o mostrada en los dibujos adjuntos no deben interpretarse en un sentido limitativo.

Ejemplo 1

La bacteria *Weissella cibaria* se utiliza como ingrediente activo y probiótico del biosellante. Esta bacteria es aislada y concentrada mediante fermentación siguiendo el protocolo descrito por [44]. La bacteria es inoculada en caldo (MRS) y 4 % de glucosa en agua destilada. Las fermentaciones se realizan en erlenmeyer de 1000 ml, con volumen de trabajo de 600 ml, los cuales son agitados elipsoidalmente sin inyección de aire a 100 rpm y 37 °C, utilizando el equipo (Incubating Orbital Shaker VWR model 5000I, USA). El proceso de incubación y agitación se suspende transcurridas 4 horas de fermentación. En las fermentaciones se utiliza 10 % de inóculo con respecto al volumen del sustrato. La fermentación se ajusta a pH 6,0 utilizando NaOH 1M.

Después de 4 horas de fermentación, el volumen fermentado se distribuye en tubos falcón de 50 ml, los cuales se llevan a centrifugación utilizando una centrífuga (Eppendorf Centrifuge-5804R, Alemania), bajo condiciones de 4000 g durante 10 min a 4 °C. Las bacterias probióticas son separadas del sobrenadante y son lavadas. A cada tubo falcón se le adiciona de a 5 ml de NaCl al 0,9%, se agita suavemente, se centrifuga por 10 min a 4000 g, y se descarta el sobrenadante. Este proceso se realiza por duplicado. Finalmente, se realiza un nuevo lavado con la adición de 5 ml agua destilada, los tubos se agitan suavemente y se centrifugan por 10 min a 4000 g y posteriormente se descarta el sobrenadante y se obtiene la biomasa de *W. cibaria*.

Los geles polisacáridos son obtenidos del interior de hojas de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) previa desinfección y de forma aséptica se retiran las espinas y la epidermis en una cabina de flujo laminar (Streamline, USA), obteniendo los cristales de la planta.

Los cristales son procesados en un extractor de jugos para separar el material sólido del líquido, obteniendo como resultado el gel de *Aloe vera*. El gel de *Aloe vera* es sometido a dos tipos de tratamientos térmicos, esterilización y pasteurización.

Sobre 3 volúmenes de 50 ml del gel polisacárido pasteurizado se adiciona el probiótico. Realizando este procedimiento las bacterias probióticas son pesados de forma estéril en balanza analítica (Mettler Toledo AL 204, Suiza), utilizando tubos falcons. Con base a los pesos del probiótico en cantidad suficiente para alcanzar concentración de 10^9 UFC/ml. El tratamiento se agita generando el tratamiento de gel polisacárido pasteurizado inoculado con *W. cibaria*, la sigla a utilizar para este tratamiento es (GAVP+INOCULO).

Como se muestra en la figura 1, el tratamiento pasteurizado (GAVP+INOCULO) se selecciona como el más adecuado debido a que en el día 7 no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, y pasteurizar es más económico que esterilizar, por lo cual se toma ese criterio de economía en la selección.

Ejemplo 2

La resiliencia de *Weissella cibaria* en relación a la temperatura de almacenamiento y la adición de crio conservantes es medida utilizando el tratamiento pasteurizado del Ejemplo 1 (GAVP+INOCULADO). La resiliencia se evalúa en un periodo de tiempo de 29 días utilizando dos temperaturas de almacenamiento (4 °C y 25 °C). El efecto de la adición de crioconservantes y plastificantes (glicerol, leche en polvo descremada, sacarosa) sobre la viabilidad del microorganismo probiótico (*W. cibaria*).

Sobre el tratamiento (GAVP+INOCULO) se desarrolla la segunda fase experimental. A seis volúmenes iguales de geles polisacáridos se les adicionan bacterias probióticas hasta obtener concentración inicial de 10^9 , a continuación, se adicionan por separado los compuestos, plastificante y crioconservantes así: glicerol al 10% (volumen/volumen), leche en polvo descremada al 10% (peso/volumen). Cada uno de los tratamientos es homogenizado, obteniendo la combinación (GAVP+INOCULO+GLI+LEC).

A seis volúmenes iguales de geles polisacáridos (de *Aloe vera*) se les adicionan bacterias probióticas (*W. cibaria*) hasta obtener concentración inicial de 10^9 UGC por ml. A continuación, se adicionan, por separado y por triplicado, plastificante (glicerol al 10% (volumen/volumen) y crioconservantes (leche en polvo descremada al 10% (peso/volumen) y sacarosa al 5% (peso/volumen). Cada uno de los tratamientos es homogenizado con agitador magnético. Los tratamientos se almacenan a dos temperaturas de (4°C y -25 °C). A los 0, 8, 15, 22 y 29 días de almacenamiento se evalúa la viabilidad de la cepa probiótica (*W. cibaria*) en cada uno de los tres compuestos (el tiempo 0 corresponde a las condiciones iniciales).

Se encuentra que la adición de leche en polvo descremada a geles de *Aloe vera* pasteurizados conserva la viabilidad del probiótico hasta por 29 días en las dos temperaturas de almacenamiento utilizadas. En la Figura 2 se resumen los resultados experimentales de esta realización, donde se puede observar que a -25°C , los

5 tratamientos no muestran pérdidas significativas en las unidades logarítmicas que hacen referencia a las unidades formadoras de colonias (UFC). Sorprendentemente se evidencia que a 4°C el tratamiento con leche en polvo descremada conserva significativamente la capacidad que tiene la bacteria de permanecer viva. Este efecto sinérgico es claramente ilustrado en la Figura 2.

- 10 Por lo tanto, en esta etapa experimental se escoge el tratamiento a 4°C , debido a que para un uso práctico del biosellante es conveniente que las temperaturas de almacenamiento sean cercanas a las condiciones ambientales normales, además de ser más económico energéticamente un almacenamiento a 4°C que a -25°C . Particularmente, resulta conveniente que la temperatura de almacenamiento del biosellante no tenga la necesidad
- 15 de un protocolo de descongelación para su uso, como sí sucedería a -25°C .

Ejemplo 3

- Tres volúmenes del gel de *Aloe vera* pasteurizada inoculada con probiótico a concentración de 10^9 UFC por mL, se une con una mezcla de leche en polvo descremada y glicerol, los cuales son los componentes que muestran mayor rendimiento según el
- 20 ejemplo 2. Se utilizan las mismas concentraciones descritas en la fase dos (glicerol al 10% (volumen/volumen, + leche en polvo descremada al 10% peso/volumen). Los tubos se agitan y se almacenan a 4°C . Se evalúa la viabilidad de la cepa probiótica (*W. cibaria*) en los mismos tiempos descritos en la fase dos (0, 8, 15, 22 y 29 días). Además, se mide la actividad antimicrobiana en el día 29. Esta fase experimental se realiza con el fin de
- 25 determinar si al mezclar dos compuestos se potencializaba la actividad probiótica de los mismos.

- La combinación de leche-glicerol no tiene efecto sinérgico sobre la viabilidad del probiótico en 29 días de almacenamiento (Figura 3). Sin embargo, la combinación de leche-glicerol si tiene efecto sinérgico sobre la capacidad antimicrobiana. Los
- 30 microorganismos utilizados para medir la actividad antimicrobiana son las cepas comerciales de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923TM) y de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813TM) a concentraciones de 10^7 UFC/ml. Particularmente, se utiliza la prueba

de difusión en agar de acuerdo al protocolo descrito por [14]. La capacidad antimicrobiana se determina midiendo con regla milimétrica, los halos de inhibición del crecimiento de ambos patógenos.

En la evaluación de la capacidad antimicrobiana contra los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC) es el que conserva en mayor cantidad la capacidad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* hasta el día 29 (22.5 mm), evidenciando diferencia significativa con los tratamientos (GAVP+INOCULO+LEC) (20.11 mm) y (GAVP+INOCULO+GLI) (18.6 mm). Por este motivo se elige el tratamiento con mezcla (GAVP+INOCULO+GLI+LEC), para continuar el desarrollo del bio-producto. Con relación a *Streptococcus agalactiae* en el día 29 no se presentan diferencias entre los tratamientos (GAVP+INOCULO+LEC) y (GAVP+INOCULO+GLI+LEC).

Ejemplo 4

Del ejemplo 3 se selecciona el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC). Al tratamiento seleccionado se le midió la viscosidad utilizando un viscosímetro digital (Brockfield LVDV-I+, USA). Es necesario generar una viscosidad que garantice la adherencia de la mezcla a la piel de los pezones, el cual se encuentra entre 50 y 1000 centipoise (ó mPa·s). El valor de referencia evaluado fue de 471.5 centipoise (ó mPa·s) a 60 rpm. La viscosidad obtenida en el ejemplo 3 no permite formar una biopelícula que se adhiriera a la piel de los pezones.

Para aumentar la viscosidad del tratamiento seleccionado (GAVP+INOCULO+GLI+LEC), se utilizan cuatro hidrocoloides espesantes: carboximetilcelulosa, alginato de sodio, goma xanthan, y pululano. Como valor de referencia de viscosidad se toma la viscosidad de un sellante de pezones comercial basado en compuestos químicos sintéticos, el cual a velocidad de 60 revoluciones por minuto (RPM) su viscosidad es de 471.5 centipoise (ó mPa·s).

La viabilidad de la cepa probiótica (*Weissella cibaria*) se evalúa en cada uno de los tratamientos. A los dos tratamientos que conservaron mejor la viabilidad del probiótico, se les mide actividad antimicrobiana. Los tratamientos son evaluados en diferentes tiempos 0, 8, 15, 22 y 29 días (el tiempo 0 corresponde al momento inicial).

Los tratamientos son conservados a temperatura de refrigeración (4°C). A la mezcla de compuestos que conservan la mayor capacidad probiótica (viabilidad y actividad antimicrobiana), se le denomina bio-sellantes de pezones. Se evalúa el efecto de la adición

de hidrocoloides sobre la viabilidad y la capacidad antimicrobiana del probiótico (*Weissella cibaria*).

Mediante una superficie de respuesta se establece que: en el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+CMC), la adición de carboximetilcelulosa al 0.292 % genera viscosidad de 392 centipoise (ó mPa·s). En el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+ALG) la adición de alginato de sodio al 4.993 % genera en la mezcla viscosidad de 384 centipoise (ó mPa·s). En el tratamiento (GAVP + INOCULO + INOCULO + LEC + XAN) la adición de goma xanthan al 0.314 % produce viscosidad de 415 centipoise (ó mPa·s). Finalmente, el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) con la adición de pululano al 7.848 % produce viscosidad de 478 centipoise (ó mPa·s).

En referencia a la viabilidad del probiótico (*W. cibaria*) con el uso de estos compuestos, se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad del probiótico por efecto de los diferentes hidrocoloides y por efecto del tiempo. Como se puede observar en la Figura 4, los polímeros que conservan mejor la viabilidad del probiótico en el tiempo son los tratamientos con pululano (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL), y los tratamientos con goma Xantan (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+XAN). Sin embargo, en cada tiempo de almacenamiento después del momento inicial (día 0) se observan diferencias en la viabilidad del probiótico (*W. cibaria*) entre los tratamientos (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) y (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+XAN) que son significativos. Por lo cual se selecciona el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) para el bio-desarrollo.

En relación al patógeno *Staphylococcus aureus* se observan diferencias significativa entre los tratamientos (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) y (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+XAN) ($p=0.005$), El tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) conserva la mayor actividad antimicrobiana. Se observan diferencias significativas en los dos grupos de tratamiento en los diferentes momentos de evaluación. Como puede observarse en la Tabla 1 con pululano se conserva la actividad antimicrobiana contra este patógeno hasta el día 29 de evaluación en los dos tratamientos.

Tabla 1. Efecto de la adición de los polimeros (goma xanthan y pululano) sobre la actividad antimicrobiana de *Weissella cibaria* contra los patogenos *Staphylococcus aureus* y

Streptococcus agalactiae en el gel de *Aloe vera* pasteurizado combinado con glicerol y leche descremada.

Patógeno	Actividad antimicrobiana (mm) <i>Stahphylococcus aureus</i>				Actividad antimicrobiana (mm) <i>Streptococcus agalactiae</i>			
	Pululano	SD	Xanthan	SD	Pululano	SD	Xanthan	SD
Tiempo (días)								
0	20.56	±0.23	20.80	±0.17	20.33	±0.35	18.33	±0.35
8	23.00	±0.30	19.70	±0.00	21.53	±0.40	21.00	±0.30
15	21.90	±0.34	21.43	±0.23	21.56	±0.23	19.10	±0.17
22	19.90	±0.17	19.90	±0.34	20.10	±0.17	18.23	±0.40
29	22.03	±2.53	16.20	±2.81	20.80	±0.17	17.65	±0.49

5 En la evaluación de la actividad antimicrobiana contra el patógeno *Streptococcus agalactie* se observan diferencias significativa entre tratamientos (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) y (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+XAN) ($p<0.0001$).

El tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) conserva la mayor actividad antimicrobiana. Se observa diferencias significativa entre los diferentes momentos de
10 evaluación. Se conserva la actividad antimicrobiana contra este patogeno hasta el día 29 de evaluación en los dos tratamientos. Por lo anterior se selecciona el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) por conservar mejor la viabilidad del probiótico, y por mantener la capacidad antimicrobiana por 29 días. A la mezcla de estos compuestos geles
15 polisacáridos + glicerol al 10% volumen/volumen + leche en polvo descremada al 10% peso/volumen, con viscosidad de 478 centipoise (ó mPa·s), y adicionado de microorganismos probióticos (*W. cibaria*) en concentración inicial de 10^9 UFC por ml.

Ejemplo 5

La caracterización fisicoquímica del biosellante de pezones formulado mediante el
tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) se ilustran en la Tabla 2 y Tabla 3, en donde
20 se especifican los valores de densidad, pH, actividad de agua, humedad y grosor determinados.

Tabla 1: Propiedades físicas del bio-sellante de pezones. Se muestran además las desviaciones estándar.

Muestra	X Densidad gr / ml	SD Densidad	X Humedad (%)	SD Humedad	X Grosor (mm)	SD Grosor
Replica1	1.079	±0.00058	92.1267	±4.6924	0.237	0.03750
Replica 2	1.088	±0.00188	87.4733	±7.8104	0.350	0.02500
Replica 3	1.085	±0.00606	90.9033	±7.1598	0.221	0.04018

Tabla 2: Propiedades químicas del sellante de pezones elaborado.

Muestra	X pH	SD pH	X A _w	SD A. Agua
Replica 1	5.13	±0.01732	0.8047	±0.00305
Replica 2	4.86	±0.00577	0.7843	±0.00153
Replica 3	4.85	±0.01155	0.9543	±0.00493

En la Tabla 2 se encuentra el promedio de tres replicas los cuales a su vez se le hacen tres
5 repeticiones, de las variables: densidad, humedad, y espesor del sellante de pezones
elaborado con GAVP+B+GLI+LEC+PUL. El espesor de 0.27 mm, indica que su aplicación en
la piel de lo cuartos de las vacas genera una película muy delgada.

En la Tabla 3 se describen dos principales características químicas del sellante de pezones,
se encuentra un valor de pH de 4.95 lo que indica que es un producto con un valor ácido
10 débil, apto para ser aplicado sobre la piel del pezón y ayudar a conservar la salud de la
misma. En la piel humana el pH óptimo para aplicación de productos varía entre 4 a 6,
conservar este valor es importante para mantener la salud de la piel [45], igual
comportamiento se espera en la piel bovina. La actividad de agua se encuentra en un valor
de 0.848, lo que indica que requiere de tratamientos de conservación para mantener su
15 estabilidad microbiológica, y química.

Ejemplo 6

Con el fin de determinar la adherencia de la cepa de *Weissella cibaria* a células epiteliales
de la glándula mamaria bovina, se utilizan cortes de tejido de la punta del pezón, estos
son obtenidos en la planta de sacrificio local donde se obtiene el tejido en la línea de
20 procesamiento inmediatamente después del sacrificio del animal. La capacidad de
adherencia se mide utilizando métodos de recuento microbiano y microscopía electrónica.

En el proceso de evaluación de la capacidad de adherencia de *Weissella cibaria* a células
epiteliales se elaboran tres tratamientos. El primer tratamiento es el bio-sellante de
pezones. El segundo tratamiento consiste en reconstituir la biomasa de *Weissella cibaria*
25 en una solución de buffer fosfato (PBS). El tercer tratamiento es el grupo control se
elabora con el uso de (PBS) estéril sin inóculo (sin *W. cibaria*). Las pruebas se hacen por
triplicado en cajas de petri.

Muestras de tejido de glándula mamaria son depositadas en cada una de las cajas de petri que contienen los diferentes tratamientos descritos. Los tratamientos se incuban durante una hora, después de este periodo a cada muestra del tejido se le realizan cinco lavados seriales por inmersión en cinco cajas de petri que contienen (PBS) estéril.

- 5 Se determinan las concentraciones microbiológicas iniciales (número de *W. cibaria* presente en los tratamientos) en cada uno de los tratamientos, y se miden las concentraciones microbianas finales (número de *W. cibaria* presente en los tratamientos) después de los lavados de los tejidos. Utilizando la ecuación 1 se obtiene el porcentaje de adherencia.

$$10 \quad \% \text{ adherencia} = \frac{\text{Log Concentración bacteriana inicial}}{\text{Log Concentración bacteriana final}} \times (100) \quad (\text{Ecuación 1})$$

El porcentaje de adherencia del tratamiento sellante de pezones elaborado, de acuerdo a la formula se describe un porcentaje de adherencia del 80.40%.

$$15 \quad \text{Porcentaje de Adherencia} = \frac{\text{Log } 22.2 \times 10^{07}}{\text{Log } 24 \times 10^{09}} \times (100)$$

Porcentaje de adherencia del tratamiento de *Weissella cibaria* reconstituida en (PBS), de acuerdo a la fórmula aplicada se describe un porcentaje de adherencia del 74.08%.

$$20 \quad \text{Porcentaje de Adherencia} = \frac{\text{Log } 53.5 \times 10^{06}}{\text{Log } 27 \times 10^{09}} \times (100)$$

- Los valores de porcentaje de adherencia determinados demuestran una alta capacidad de adherencia de *Weissella cibaria* a células epiteliales, en el primer tratamiento del sellante de pezones elaborado se encuentra un mayor valor de adherencia, indicando que uno o
25 varios materiales incluidos en la formulación facilitan la adherencia de la cepa a las células epiteliales del pezón bovino.

Ejemplo 7

- La adherencia también se mide por medio de la técnica de microscopia electrónica de barrido, para ello se utilizan los mismos modelos experimentales descritos en: (evaluación
30 de adherencia de *Weissella cibaria* a células epiteliales de glándula mamaria bovina con el

uso de técnicas microbiológicas). Cada uno de los tejidos provenientes de los diferentes tratamientos, se sumergen en soluciones de glutaraldehído al 2.5%, con el fin de fijar las muestras. Las muestras se preparan para ser observadas en el microscopio de barrido electrónico.

- 5 En la Figura 5. A se observa la superficie del epitelio del pezón bovino del grupo control, en el mismo se observan células de descamación del epitelio, y no se observan bacterias adheridas sobre el tejido. En la Figura 5. B se demuestra la adherencia de *Weissella cibaria* a células epiteliales, después de 5 lavados del tejido con PBS. En la Figura 6 se observa la película formada al aplicar el sellante de pezones sobre tejido de la glándula mamaria
10 bovina.

La evaluación de la adherencia de las cepas es una de las características de evaluación de la capacidad probiótica. En el desarrollo de bioproductos un factor importante a considerar es garantizar que haya adecuada adherencia de las cepas probióticas con sus sitios de acción. Se demostró que la bacteria *Weissella cibaria* tiene capacidad de
15 adhesión a células epiteliales de la glándula mamaria bovina. La capacidad de adherencia y la inhibición de adherencia de patógenos es una característica específica de cada especie y cepa bacteriana.

Ejemplo 8

Para la evaluación de la respuesta fisiológica de vacas, ante la aplicación del biosellante de
20 pezones, se utilizan 6 vacas lecheras.

Para realizar la elección de los animales de experimentación se usan los siguientes criterios: Bovinos que se encuentran en lactancia, con sus cuartos (pezones) funcionales, sin evidencia de mastitis bovina clínica, bovinos que no estén recibiendo tratamiento antibiótico o terapia antiinflamatoria.

- 25 Para determinar el estado de salud de los pezones de los animales, se realiza la prueba de mastitis de california, recuento de células somáticas, y conductividad eléctrica. Además, se evalúan características fisicoquímicas, en leche proveniente de cada uno de los cuartos de los animales seleccionados (pH, acidez, densidad).

En el análisis de prueba de mastitis de California, pH, porcentaje de acidez, densidad,
30 conductividad eléctrica y recuento de células somáticas no se observan diferencias

significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. Por lo tanto, se puede analizar que la aplicación del bio-sellante de pezones aplicado como producto de inmersión pos ordeño, no genera una respuesta inflamatoria, y no genera cambios significativos en la leche que puedan ser detectados por medio de las pruebas realizadas.

- 5 De este modo, a partir de los ejemplos 1 a 8 se soporta el tratamiento (GAVP+INOCULO+GLI+LEC+PUL) como la formulación preferencial del biosellante de pezones acorde a la presente invención. Su correspondiente diagrama de flujo se ilustra en la Figura 7. Consecuentemente, la formulación preferencial del biosellante de pezones comprende:
- 10 a) Geles polisacáridos pasteurizados obtenidos del *Aloe vera*
b) Probiótico *Weissella cibaria* a concentración de 10^9 UFC/ml.
c) Glicerol al 10% v/v
d) Leche en Polvo descremada 10% p/v
e) Pululano 7.848% p/v

15

V. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Ilustra el efecto de aplicación de los procesos de pasteurización y esterilización en el gel de *Aloe vera* sobre la viabilidad de *Weissella cibaria*.

- Figura 2: Ilustra el efecto de dos temperaturas de conservación 4°C y -25°C sobre la
20 viabilidad del probiótico *Weissella cibaria* en un medio de *Aloe vera* pasteurizado, utilizando diferentes crioconservantes (glicerol, leche descremada y sacarosa).

- Figura 3: Ilustra una comparación de las cinéticas de conservación del probiótico (*Weissella cibaria*), en una mezcla de compuestos (leche en polvo+glicerol) adicionados a un medio de *Aloe vera* pasteurizado, utilizando una temperatura de almacenamiento de
25 4°C .

Figura 4: Efecto de la adición de hidrocoloides al gel de *Aloe vera* pasteurizado combinado con glicerol más leche descremada, sobre la viabilidad del probiótico (*Weissella cibaria*).

- Figura 5: A. Tejido de la punta del pezón bovino utilizadas en el grupo control, aumento (600x). B. Adherencia de *Weissella cibaria* a células epiteliales del tejido del pezón bovino
30 (imagen de tejido después de haber sido lavado 5 veces con PBS). Aumento (10000x).

Figura 61: A. Sellante de pezones probiótico, aplicado sobre la superficie de tejido bovino (pezón), aumento (600x). B. Demostración de la adherencia de *Weissella cibaria* a células epiteliales del pezón bovino. Aumento (10000x).

5 Figura 72: Diagrama de elaboración de la realización preferencial del biosellante de pezones de la presente invención.

Figura 83: A. Prueba de evaluación de la viabilidad de *Weissella cibaria*. Colonias de *Weissella cibaria* circulares y teñidas con azul de anilina. B. Pruebas de viabilidad de *Weissella cibaria*, evaluación de las tres últimas diluciones de viabilidad.

10 Figura 94: A. Capacidad antimicrobiana de *Weissella cibaria* contra *Staphylococcus aureus*. B. Capacidad antimicrobiana de *Weissella cibaria* contra *Streptococcus agalactiae*.

15

20

25

30

35

40

45