

## INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

**BECA DE ESTUDIO**

**PERIODO 04/2015 - 03/2016**

**1. APELLIDO: RAMOS**

**NOMBRES:** ORNELLA YOLANDA

*Dirección Particular: Calle:* Constitución N°: 1747dpt5

*Localidad:* Tandil *CP:* 7000 *Tel:* 0249 15 4572456

*Dirección electrónica (donde desea recibir información):* ornellaramos.y@gmail.com

**2. TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Efecto de la miel sobre el desarrollo de cepas probióticas en alimentos simbióticos

**3. OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

**BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO:** *Fecha de iniciación:* Abril 2015

**2º AÑO:** *Fecha de iniciación:*

**BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO:** *Fecha de iniciación:*

**2º AÑO:** *Fecha de iniciación:*

**4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

*Universidad y/o Centro:* Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires

*Facultad:* de Ciencias Veterinarias

*Departamento:* Producción Animal

*Cátedra:* Área de apicultura

*Otros:*

*Dirección: Calle:* Paraje Arroyo seco N°: s/n

*Localidad:* Tandil *CP:* 7000 *Tel:* 249 4385850 214

**5. DIRECTOR DE BECA**

*Apellido y Nombres:* Basualdo Marina

*Dirección Particular: Calle:* N°:

*Localidad:* Tandil *CP:* 7000 *Tel:*

*Dirección electrónica:* mbasu@vet.unicen.edu.ar

**6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.** (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Con el fin de desarrollar un alimento simbiótico en el cuál la miel actúe como adyuvante o potenciador al efecto de una cepa probiótica en el tratamiento de enfermedades causadas por enteropatógenos, se evaluó el efecto de la miel sobre *Lactobacillus casei* CRL 431 (cepa con propiedades probióticas comprobadas) y sobre *Salmonella* entérica serovar. *Thyphimurium* (cepa enteropatógena). Ambas cepas, fueron obtenidas de la colección de cultivos del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) y estudiadas previamente.

Se estudiaron 7 muestras de miel de diferentes regiones del país. Previamente, estas muestras fueron caracterizadas en cuanto a sus parámetros físico-químicos (color, humedad, contenido de azúcares) y se evaluó su contenido de fenoles, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias patógenas (*S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. y *E. coli*). Durante el período de la beca, se continuó trabajando con las mismas muestras de miel sobre los objetivos específicos que se habían propuesto. Se evaluó el pH y la acidez de las mieles ya que son características que pueden influir sobre el crecimiento de algunas bacterias y, por lo tanto, son importantes a tener en cuenta. El pH fue medido con tiras indicadoras (DF) y la acidez por titulación ácido-base.

Se realizó una revisión bibliográfica referida a las características de la miel y a los alimentos funcionales, probióticos y prebióticos específicamente. Las actividades desarrolladas y los resultados se detallan a continuación:

#### Metodología

##### 1.- Efecto de la miel sobre el crecimiento de *L. casei*

El efecto de las 7 muestras de miel sobre el crecimiento del *L. casei* fue evaluado en caldo MRS (Shin y Ustunol, 2005). Se probaron varias concentraciones de miel (3, 5 y 10 %) sobre el *L. casei* y a diferentes tiempos de incubación (24 y 48hs). Se preparó un inóculo bacteriano con una concentración de  $10E+08$  UFC/ml y se adicionó a cada tubo con caldo MRS y miel; como control se utilizó caldo sin miel. La densidad óptica fue medida por duplicado para cada miel a cada concentración, mediante espectrofotómetro a 600 nm. Se realizaron mediciones a las 24 y 48hs de incubación y se utilizó como blanco un tubo con el caldo MRS y la miel a cada una de las concentraciones empleadas. Con el fin de relacionar las medidas de densidad óptica (DO) con la concentración bacteriana se realizaron recuentos en placa de las UFC/ml en agar MRS a partir de diluciones seriadas. Debido a que a las 24hs de incubación el crecimiento del *L. casei* en MRS con miel fue escaso, se seleccionaron los datos obtenidos a las 48hs de incubación para realizar los análisis estadísticos.

Se realizó un ANOVA a fin de evaluar si existían diferencias significativas en el desarrollo de la cepa a las diferentes concentraciones probadas. Previamente al análisis de regresión lineal, los datos fueron transformados en log. A partir de la ecuación de regresión se estimaron las UFC/ml para cada valor de DO. Los supuestos de normalidad fueron previamente comprobados para tanto en el ANOVA como en el análisis de regresión lineal.

##### 2.-Evaluación de la viabilidad de *L. casei* en leche con agregado de miel.

La viabilidad del *L. casei* fue evaluada en leche con miel durante su almacenamiento refrigerado siguiendo la metodología descrita por Macedo et al., 2008. Para este ensayo se utilizó una de las mieles que anteriormente había permitido un buen crecimiento de la cepa en caldo MRS y se adicionó al 3% a la leche; previamente la miel fue tratada térmicamente a 60°C por 30 minutos. Se eligió esta concentración miel por ser a la cual se obtuvo un crecimiento del *L. casei* en el caldo MRS, significativamente mayor que al utilizar las otras concentraciones. La leche fue

preparada con leche en polvo al 10% y esterilizada en autoclave a 0,5 atm. durante 10 minutos. Una vez comprobada su esterilidad mediante una siembra en agar MRS, fue inoculada con el *L. casei* (previamente cultivado en tubos con leche) e incubada durante 20hs a 37°C en anaerobiosis. La adición de miel se realizó en el momento en que se agregó el inóculo a la leche y luego de la fermentación para comparar procedimientos; como control se utilizó leche sin miel. Luego de la incubación, la viabilidad bacteriana fue evaluada por recuento en placa de las UFC/ml en agar MRS a partir de diluciones de la leche fermentada en solución fisiológica. Los resultados fueron expresados como log<sub>10</sub> UFC/ml. Además, se controló el pH con tiras indicadoras y la acidez por titulación ácido-base con hidróxido de sodio 0,1N. Los mililitros gastados de hidróxido de sodio en la titulación fueron multiplicados x10 para expresar la acidez en °Dornic. Las leches fermentadas fueron almacenadas a temperatura de refrigeración durante 46 días, se realizaron mediciones de pH, acidez y de las células viables a los 0, 7, 14, 21, 28 y 46 días de almacenamiento.

Para comparar la viabilidad bacteriana entre el control y la leche con el agregado de miel antes y después de su fermentación se realizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Para evaluar diferencias en la viabilidad bacteriana entre las leches fermentadas con miel agregada antes y después de la fermentación y el control a los diferentes tiempos de almacenamiento se realizó un ANOVA.

### 3.-Evaluación de la actividad inhibitoria de la miel frente a Salmonella entérica

La actividad inhibitoria de las 7 muestras de miel sobre el crecimiento de Salmonella entérica serovar Thyphimurium fue evaluada por el método de difusión en placas por pocillos en agar Mueller-Hinton de Kirby-Bauer (Koneman et al., 1985). El inóculo se preparó de acuerdo al Tubo N° 1 de la escala de McFarland, se colocó en placas de Petri y se homogeneizó con el agar Muller-Hinton. Luego se realizaron pocillos en el agar donde se colocó una solución de miel previamente preparada con 1g de miel en 1ml de agua destilada estéril. Se utilizó como control un pocillo con agua destilada estéril. Se incubaron las placas por 24hs a 37°C y se midieron los halos de inhibición bacteriana en mm por medio de una escala tipo Vernier. Se distinguió entre la actividad inhibitoria debida al peróxido de hidrógeno y a la otorgada por otros componentes o factores antimicrobianos, utilizando catalasa para inhibir el peróxido presente en la miel. Se empleó el método descrito anteriormente para evaluar la actividad inhibitoria de la miel tratada con catalasa. Se realizaron mediciones por triplicado para cada muestra de miel.

## Resultados

### 1.- Efecto de la miel sobre el crecimiento de *L. casei*

Se estableció la relación entre DO y UFC/ml mediante la ecuación de regresión  $Y=2,45+5,26x$ ,  $R^2=0,82$  (Fig. N°1). El grado de predicción es bueno debido al valor de  $R^2$ . Se utilizó esta regresión para estimar las UFC/ml a partir de mediciones de DO para la evaluación del crecimiento de *L. casei* en caldo con miel agregada.

Los resultados indicaron que la miel no inhibe al *L. casei*, aunque se observó que a medida que aumenta la concentración de miel en el caldo MRS menor es el crecimiento de la cepa. Se registró un valor promedio de  $8,12E+12$  UFC/ml al utilizar 3% de miel, un valor de  $3,16E+12 \pm$ UFC/ml al emplear un 5% de miel y de  $3,01E+11$  UFC/ml al 10% de miel. Se detectaron diferencias significativas ( $F=118$ ,  $gl=3$ ,  $p<0,0001$ ) en el crecimiento de *L. casei* entre las distintas concentraciones de miel empleadas. El control tuvo un crecimiento promedio de  $4E+14$  UFC/ml.

Los valores promedio de las UFC/ml luego de 48hs de incubación, al utilizar cada una de las muestras a cada concentración de miel se pueden ver en la tabla N°1.

### 2.-Evaluación de la viabilidad de *L. casei* en leche con agregado de miel.

El *L. casei* se mantuvo viable en las leches con miel y en el control durante los 46 días de almacenamiento refrigerado, aunque en todos los casos la viabilidad bacteriana

disminuyó con el tiempo (Fig. N° 2). Al analizar las variables sin tener en cuenta el tiempo de incubación no se detectaron diferencias significativas ( $H=2,58$ ,  $gl=2$ ,  $p>0,05$ ) entre las leches fermentadas. Sin embargo, el recuento promedio de colonias fue numéricamente mayor en la leche con miel agregada antes de su fermentación que en el control. En la leche con miel agregada después de la fermentación se registró el menor recuento promedio. Al analizar la viabilidad del *L. casei* a los distintos tiempos de almacenamiento, únicamente a los 46 días se detectaron diferencias significativas ( $DMS=0,51940$ ,  $gl=5$ ,  $p<0,05$ ) entre la leche con miel agregada antes de la fermentación y la leche con miel agregada después. Se registró un valor promedio de  $1,1E+08$  UFC/ml en la leche con miel agregada antes de la fermentación y de  $3,1E+07$  UFC/ml en leche con miel agregada después de la fermentación. El valor del control fue de  $8,2E+07$  UFC/ml.

La acidez de las leches con miel fue mayor que en control y, en todos los casos, se observó un aumento de la acidez a lo largo del almacenamiento (Fig. N° 3). La acidez de las leches antes de su refrigeración (tiempo 0) fue de  $60^{\circ}D$  para la leche fermentada con miel agregada antes de la fermentación y de  $53^{\circ}D$  para la leche con miel agregada luego de su fermentación; el control tuvo una acidez de  $52^{\circ}D$ . A los 46 días de almacenamiento, la acidez aumentó a  $119^{\circ}D$  y  $122^{\circ}D$  en las leches con miel agregada antes y después de la fermentación respectivamente, para el control la acidez fue  $110^{\circ}D$ . El pH fue igual para las leches con miel y para el control. Previamente a almacenar la leche a temperatura de refrigeración el pH fue de 5, luego de 7 días de almacenamiento refrigerado descendió a 4 y a los 46 días disminuyó a 3.

### 3.-Evaluación de la actividad inhibitoria de la miel frente a *Salmonella* entérica

Las mieles estudiadas tuvieron actividad inhibitoria frente a *S. thypimurium*, exceptuando 2 muestras (Fig. N°4). Se observaron halos de inhibición que oscilaron entre 8,03 y 10,6 mm. Una de las muestras produjo un doble halo: uno bien definido, sin crecimiento bacteriano y con un diámetro promedio de 9,4 mm. Y el otro, en el que si bien había crecimiento, éste era escaso y de menor densidad en comparación con el pocillo control o el resto de la placa. Este segundo halo presentó un diámetro promedio de 28,64mm. La actividad antimicrobiana de las mieles, en general, parecería estar dada por el peróxido de hidrógeno, ya que luego de ser tratadas con catalasa perdieron su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. En cuanto a la muestra que antes del tratamiento con catalasa había presentado un halo de inhibición doble, si bien en este caso no presentó el halo bien definido, sí demostró continuar reduciendo el crecimiento bacteriano con un halo promedio de 28,5 mm. Esto podría deberse a algún otro factor antimicrobiano, diferente al peróxido de hidrógeno en esta miel.

### Conclusiones

- El mayor desarrollo de la cepa probiótica se obtuvo utilizando concentraciones de 3 % de miel.
- La viabilidad bacteriana disminuyó y la acidez aumentó durante el almacenamiento refrigerado de la leche. Observando menor crecimiento del *L. casei* a medida que aumentaba la acidez.
- El mayor recuento de *L. casei* a los 46 días de almacenamiento se obtuvo en la leche con la adición de miel antes de la fermentación.
- La acidez de la leche con miel fue mayor que en el control, el rango de acidez  $110-119^{\circ}D$  permite un buen desarrollo de *L. casei*.
- Las mieles utilizadas tuvieron actividad inhibitoria frente a *S. Thyphimurium*.

Por lo tanto, la elaboración de un alimento probiótico con leche fermentada con *L. casei* y la adición de miel es factible. La miel posee capacidad antimicrobiana frente *Salmonella* razón por la cual una leche fermentada con probióticos y miel podría ser un alimento funcional, alternativo con efectos potencialmente positivos en el tratamiento de infecciones gastrointestinales inducidas por *Salmonella*. Sin embargo, serán necesarios

más estudios que confirmen la actividad inhibitoria frente *S. Typhimurium* de un rango más amplio de mieles y se hace imprescindible la evaluación del alimento funcional en un modelo de infección inducido por *S. Typhimurium* en ratones.

#### Dificultades encontradas

Si bien se había propuesto evaluar la actividad metabólica de la cepa probiótica en caldo MRS con miel mediante la detección de ácidos orgánicos con HPLC, esto no se pudo llevar a cabo por problemas técnicos del equipo. Sin embargo, se procedió a evaluar el metabolismo bacteriano midiendo la acidez de la leche fermentada por titulación durante su almacenamiento (Macedo et al., 2008)

Por cuestiones de tiempo, no se pudo determinar el efecto de la administración oral de la leche fermentada con miel a ratones BALB/c infectados con *S. Typhimurium*. Se continuará trabajando en el tema, específicamente sobre este objetivo en el marco de una beca doctoral de CONICET.

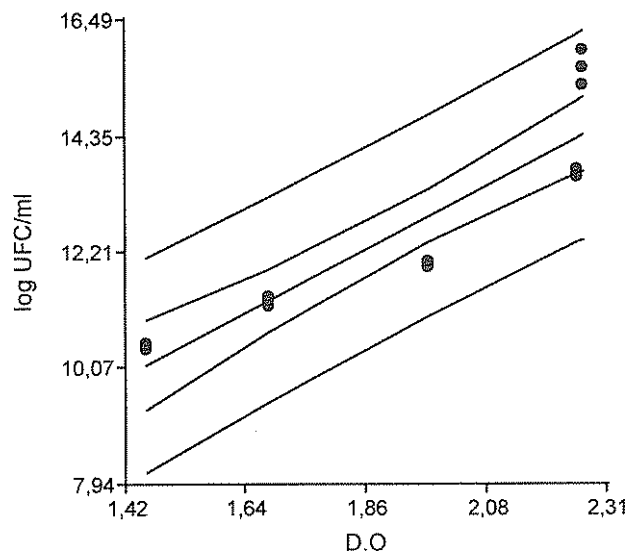
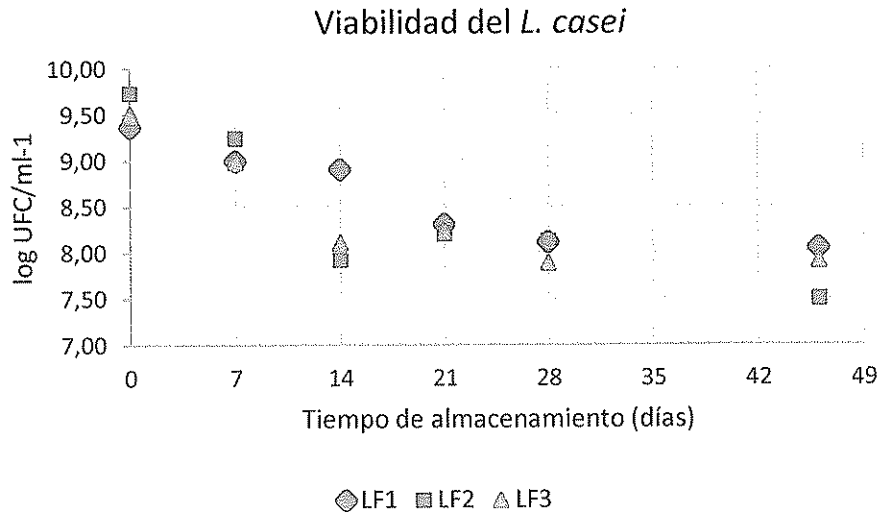


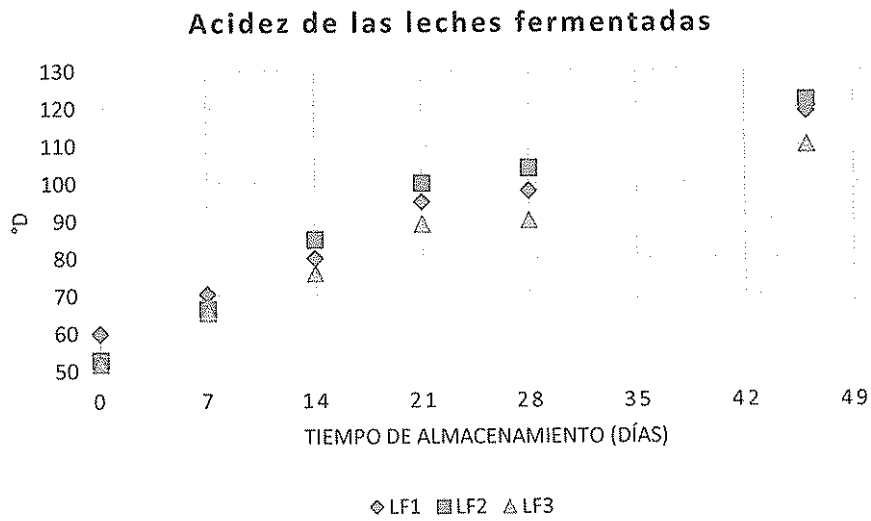
Fig. N° 1: Regresión lineal con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla N° 1: Valores medios de UFC/ml  $\pm$  e.e. del *L. casei* en presencia de las diferentes muestras de miel a las distintas concentraciones.

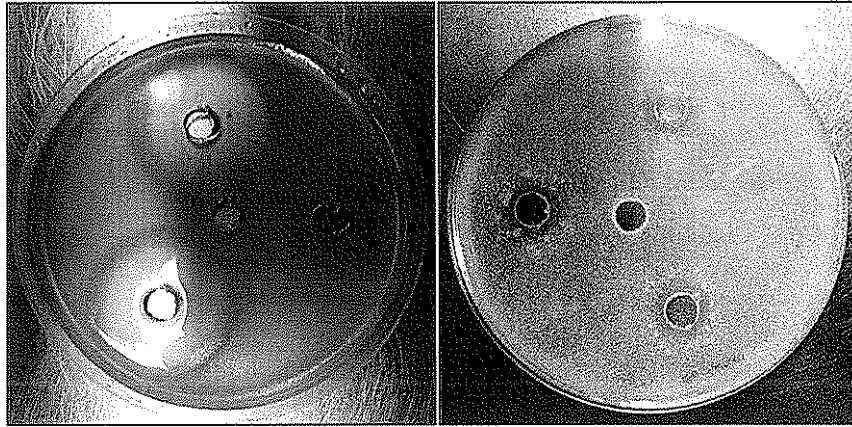
N° Muestra	Concentración de miel (%)		
	3	5	10
1	7,85E+12 $\pm$ 6,17E+11	3,08E+12 $\pm$ 1,59E+12	1,37E+11 $\pm$ 2,62E+10
2	5,72E+12 $\pm$ 9,27E+11	4,52E+12 $\pm$ 1,96E+12	3,92E+11 $\pm$ 7,05E+10
3	6,90E+12 $\pm$ 3,34E+11	4,11E+12 $\pm$ 3,03E+12	8,93E+10 $\pm$ 5,37E+10
4	5,80E+12 $\pm$ 1,00E+12	2,72E+12 $\pm$ 9,48E+11	1,12E+11 $\pm$ 4,72E+10
5	9,79E+12 $\pm$ 4,63E+12	1,47E+12 $\pm$ 5,58E+11	8,55E+11 $\pm$ 5,04E+11
6	3,71E+13 $\pm$ 2,25E+12	1,21E+13 $\pm$ 4,78E+12	1,55E+12 $\pm$ 6,77E+11
7	4,33E+12 $\pm$ 1,34E+12	2,98E+12 $\pm$ 1,52E+13	9,40E+11 $\pm$ 7,30E+11



**Fig. N°2:** Viabilidad del *L. casei* expresada como log UFC/ml en las leches fermentadas durante 46 días de almacenamiento refrigerado. Dónde: LF1= Leche fermentada con miel agregada antes de la fermentación, LF2= Leche fermentada con miel adicionada luego de su fermentación, LF3= Leche fermentada control (sin miel agregada).



**Fig. N°3:** Valores de acidez en °Dornic de las leches fermentadas durante su almacenamiento refrigerado por 46 días. Dónde: LF1= Leche fermentada con miel agregada ante de la fermentación, LF2= Leche fermentada con miel adicionada luego de su fermentación, LF3= Leche fermentada control.



**Fig. N°4:** Halos de inhibición bacteriana de distintos diámetros formados por diferentes mieles.



## **7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.**

**7.1. PUBLICACIONES.** Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

**7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA.** (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

**7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

**7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

**7.5. COMUNICACIONES.** (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

Ramos, O.; Basualdo, M.; Maldonado Galdeano, C. Desarrollo de alimentos simbióticos con la adición de miel. I Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Organizado por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Ministerio de la Producción, Ciencia y Tecnología de la provincia de Buenos Aires. La Plata, Bs. As. 1° de Octubre de 2015.

Ramos, O.; Libonatti, C.; Basualdo, M. Caracterización de mieles con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos aislados de alimentos. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XV CYTAL). Buenos Aires, Argentina. 3 al 5 de Noviembre de 2015.

**7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN.** (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

Se está trabajando en una publicación referida a la actividad antimicrobiana de mieles de diferente origen botánico, con el fin de establecer posibles relaciones entre la capacidad antimicrobiana de la miel y su composición, características fisico-químicas y su origen botánico. Hasta el momento, se realizaron los análisis estadísticos y se está trabajando en la preparación del manuscrito.

**8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS.** (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

**8.1. DOCENCIA**

**8.2. DIVULGACIÓN**

**8.3. OTROS**

**9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS.** (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

II Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Organizado por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Ministerio de la Producción, Ciencia y Tecnología de la provincia de Buenos Aires. La Plata, Bs. As. 1° de Octubre de 2015.

**10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Taller "Redacción de resúmenes o abstracts". Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Humanas. Tandil, Buenos Aires. Mayo-Julio 2015. Calificación: 9 (nueve). Modalidad presencial – virtual. Carga horaria: 24hs.

Curso "Herramientas Estadísticas para Investigación". Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 31 de Agosto y 1° de Septiembre, 2015. Modalidad presencial. Carga horaria: 12hs.

Curso "Modelos Lineales-Análisis de Regresión". Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 7 y 8 de Septiembre 2015. Modalidad presencial. Carga horaria: 12hs.

Asistente en el Seminario de capacitación: "Buenas prácticas de producción de cera de abejas" llevado a cabo por INTI-UE, en el marco del proyecto Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local. 1 de Diciembre de 2015. 4 horas de duración

Capacitación y entrenamiento en el uso del software estadístico InfoStat, a cargo de MSc. Med. Vet Edgardo M. Rodriguez. Área de Bioestadística, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 24-28 de Agosto, 2015. Carga horaria: 30hs.

## **11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO**

## **12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO**

Colaboración en el Curso de Producción del Area de Producción Apícola.

**13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES** (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

## **14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA** (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Se continuará con las tareas de investigación en el marco de una beca doctoral de CONICET, trabajando sobre el tema "Evaluación de las propiedades antimicrobianas de la miel incluida en un producto fermentado probiótico". Se elaborará un producto lácteo fermentado con miel y probióticos y se evaluará la actividad antimicrobiana del producto final; con el fin de sugerir su consumo como alternativo en el tratamiento de infecciones causadas como enteropatógenos.

---

### Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

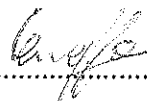
---

**Nota:** El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.



.....  
Firma del Director

**MARINA BASUALDO**



.....  
Firma del Becario