

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°: 7240

TIPO DE BECA DOCTORAL

PERIODO 01/04/2016 - 31/03/2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: ARANSIBIA

NOMBRES: Sofía Patricia

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Luján CP: 6700 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"): saransbia@gmail.com

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

Contaminantes en Alimentos: micotoxinas. Metodologías de extracción con empleo de enzimas y procesos de descontaminación.

PLAN de ACTIVIDADES presentado con la solicitud de beca

Actualización de la bibliografía relacionada con el tema de estudio en forma permanente

En el primer año de beca las actividades a desarrollar serian:

Para la extracción de las FBs atrapadas y/o ligadas se probarán las enzimas que produzcan mayor liberación en maíz entre α -amilasa fungal, α -amilasa maltogénica, celulasa, fosfolipasa, glucosa-oxidasa, lipasa, proteasa bacteriana, proteasa fungal, transglutaminasa, xilanas bacteriana y xilanas fúngica. Para evaluar las condiciones óptimas de actividad de las enzimas (temperatura, pH, concentración) se ajustarán las variables para las fracciones utilizando superficies de respuesta y comprobando los resultados. Los contenidos de FBs totales se compararán con los obtenidos por hidrólisis alcalina.

Puesta a punto y validación de los métodos para cada fracción, luego de definido el protocolo de extracción.

Determinación y cuantificación de FBs totales y libres en las diferentes fracciones de la molienda húmeda. Con estos resultados se evaluarán las fracciones más contaminadas para su detoxificación posterior considerando libres y totales.

En una etapa posterior de la duración de la beca las actividades propuestas son:

Evaluar la exposición de la población a fumonisinas totales

Ensayos preliminares de descontaminación en función de la enzima empleada, a escala laboratorio y banco, en una de las fracciones más contaminadas detectadas el año anterior.

Determinación de la cinética de degradación de las FBs totales y evaluación de los resultados de los ensayos de descontaminación.

Caracterización de los productos obtenidos luego del tratamiento con enzimas para reducir la contaminación con fumonisina, estableciendo sus posibles aplicaciones. adjunta plan de actividades presentado con la solicitud de beca)

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) Fumonisinas atrapadas / enmascaradas Molienda húmeda del maíz Enzimas

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DOCTORAL 1º AÑO (ex ESTUDIO 1º AÑO): *Fecha inicio:* 01/04/2016

BECA DOCTORAL 2º AÑO (ex ESTUDIO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

BECA DOCTORAL 3º AÑO (ex PERFECCIONAMIENTO 1º AÑO): *Fecha inicio:*

BECA DOCTORAL 4º AÑO (ex PERFECCIONAMIENTO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro:

Facultad:

Departamento:

Cátedra:

Otros: Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Bendeicta de la Cruz

Dirección: Calle: Dorronzoro Nº: 141

Localidad: Luján CP: 6700 Tel: 02323-425946

5. CARGO UNIVERSITARIO (si existe, especificar categoría, dedicación, condición de ordinario, regular o interino):

6. CARGOS EN OTRAS INSTITUCIONES:

Instituto Tecnológico Leopoldo Marechal - Docencia con dedicación simple (nivel terciario)

7. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: RESNIK, Silvia Liliana

Dirección Particular: Calle:

Localidad: C.A.B.A. CP: 1417

Dirección electrónica: sresnik2000@yahoo.com.ar

8. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Las fumonisinas (FBs) pertenecen a una familia de micotoxinas producidas principalmente por *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*, dos de los hongos asociados al cultivo de cereales y que resultan ser contaminantes importantes en el maíz que se utiliza para la alimentación de animales y en productos destinados al consumo humano. El objetivo general de la investigación consiste en la extracción de FBs atrapadas / enmascaradas por medio de métodos enzimáticos, la cuantificación del total de FBs incluyendo las atrapadas y/o ligadas en los productos de la molienda húmeda de maíz y el desarrollo de estrategias para reducir la contaminación por aplicación de tratamientos enzimáticos en la fracción de la molienda que presente mayor contaminación, y la evaluación de posibles aplicaciones de esta materia prima decontaminada.

9. EXPOSICION SINTETICA 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. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Durante el período 2016 se realizaron las siguientes actividades:

Se comenzó con una búsqueda bibliográfica amplia de artículos científicos y tesis relacionados con metodologías para la determinación de fumonisinas hidrolizadas, en especial aquellas que usan cromatografía líquida de alta resolución. A su vez se realizó un relevamiento sobre las diferentes formas de clasificación de las fumonisinas de acuerdo a su estado en la matriz.

Concluida esta revisión, se procedió a la puesta a punto y validación de la metodología para la extracción y determinación de fumonisinas libres en maíz, analizando hasta el momento 15 muestras provenientes de la provincia de Buenos Aires y 14 de Entre Ríos, más precisamente de la ciudad de Gualguaychú. Entre los resultados obtenidos se puede mencionar que en el caso de nuestra provincia se obtuvo una media para FB1 de 2801 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, con un valor máximo de 7602 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y un mínimo de 274 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Para FB2 la media fue de 733 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ con un máximo de 1989 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y un valor mínimo de 56 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla 1 se adjunta). En el caso de la provincia de Entre Ríos, los valores obtenidos fueron muy diferentes a los antes mencionados: una media de 283 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y de 54 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para FB1 y FB2 respectivamente. El máximo alcanzado para FB1 fue de 670 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y un mínimo de 110 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; en el caso de FB2 el máximo fue de 81 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y un valor mínimo por debajo del límite de detección (Tabla 2 se adjunta).

La técnica empleada consistió de una etapa de extracción con metanol : agua, seguida de una purificación con cartuchos de intercambio aniónico fuerte (SAX). La cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia (FLD) y derivatización pre-columna con orto-ftaldialdehído (OPA) y 2-mercaptoetanol.

En la puesta a punto de la metodología para la extracción y determinación de fumonisinas hidrolizadas en maíz, se empleó la muestra que mayor contaminación presentó de fumonisinas libres (proveniente de la provincia de Buenos Aires con un valor de 7602 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para FB1 y de 1989 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para FB2). Se evaluaron diferentes variables para optimizar la metodología de extracción, dentro de las cuales se encuentran: proporción matriz / KOH, tiempos de hidrólisis (se ensayó con tres tiempos de hidrólisis diferentes: 50, 100 y 150 minutos, Tabla 3, Figura 1), método de extracción (Ultraturrax, Blender, Reposo, Tabla 3 y Figura 2), extracciones consecutivas con acetonitrilo después del proceso de hidrólisis (la primera extracción con 50 mL, seguida de otra con 40 mL y por último una extracción con 30 mL de acetonitrilo, Figura 3). Evaluadas todas estas variables la metodología escogida corresponde a una hidrólisis con una relación matriz / KOH 1/10 empleando Ultraturrax a 8000 rpm por un tiempo de 10 minutos, posteriormente un tiempo de hidrólisis de 100 minutos y tres extracciones consecutivas con acetonitrilo. Adicionalmente, se planteó una etapa de extracción líquido - líquido con hexano para la eliminación de interferencias del extracto.

Para la extracción de las FBs atrapadas y/o ligadas también se probaron las enzimas α -amilasa fungal, α -amilasa maltogénica, celulasa, fosfolipasa, glucosa-oxidasa, lipasa, proteasa bacteriana, proteasa fungal, transglutaminasa, xilanas bacteriana y xilanas fúngica. El estudio preliminar realizado de acuerdo a las recomendaciones de concentración, temperatura, pH y tiempo de hidrólisis sugeridas por los proveedores de enzimas o de bibliografía cuando no se contaba con dicha información, permitieron establecer las enzimas más promisorias para trabajar posteriormente: fosfolipasa, proteasa fúngica y xilanas bacteriana, ya que dieron las mayores cantidades de fumonisinas totales. A su vez los resultados mostraron que muchos de los tratamientos enzimáticos producen la degradación de las fumonisinas, generando una interesante posibilidad para realizar tratamientos de detoxificación de fumonisinas, teniendo en cuenta que se debe comprobar que los productos de la degradación no sean tóxicos.

10. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

10.1 PUBLICACIONES. Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se haya 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 mención no debe ser adjuntada ya que no será tomada en consideración. A cada trabajo asignarle un número e indicar el nombre de los autores, en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, lugar donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde. En cada trabajo que el becario presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación. Asimismo, en cada caso deberá indicar si el trabajo se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.

10.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que aparecen en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el becario deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

10.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que ha sido enviado. Adjuntar copia de los manuscritos.

10.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

DISTRIBUCIÓN DE AFLATOXINAS EN PRODUCTOS ELABORADOS CON SOJA

Vicente, Sebastián; Aransibia, Sofía; Pok, Sol; García Londoño, Víctor; Pacin, Ana.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios, sintetizados por especies de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, que ocasionan efectos tóxicos ante la ingesta de alimentos contaminados.

El tofu o “queso” de soja se obtiene a partir de semillas de soja y es un producto alimenticio muy difundido en Asia y está aumentando el consumo en Argentina.

Se analizó la presencia de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en fracciones obtenidas en el proceso de elaboración de tofu a partir de porotos de soja.

Se incubaron 250 g de porotos de soja con una cepa productora de *A. parasiticus*, se mezcló la soja contaminada con soja sin contaminar que alcanzó un promedio de 249,6 µg/kg de AFB1, 26,62 AFB2, 953,8 de AFG1, y 129,7 de AFG2. Se elaboraron cuatro tofus de textura firme con esta soja.

El análisis de aflatoxinas se realizó por cromatografía líquida de alta performance y detector de fluorescencia.

La contaminación inicial del poroto utilizado se distribuye hasta 6,2 % de AFB1; 7,5 % de AFB2, 4,7 % de AFG1 y 4,7 % de AFG2 en tofu; en okara (la otra fracción utilizada para elaborar alimentos), la presencia de aflatoxinas fue de 29,5 % de AFB1; 20,3 % AFB2, 24,6 % AFG1 y de 17,8 % de AFG2.

Los resultados muestran que en el tofu y okara persiste la contaminación por aflatoxinas.

10.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

Contaminantes en Alimentos: Fumonisinias. Análisis y decontaminación. Aransibia, Sofía; Resnik, Silvia; García Londoño, Víctor. Presentación: Póster. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología. 1 de Septiembre de 2016. La Plata, Buenos Aires, Argentina (se adjunta poster).

10.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

11.2 DIVULGACIÓN

11.3 OTROS

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología. 1 de Septiembre de 2016. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

13. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc, y si se realizó algún entrenamiento.*

Cromatografía líquida de alta resolución, Departamento de Química Orgánica (FCEN, UBA).

Fundamentos de la Cromatografía de Alta Resolución de Intercambio Aniónico (HPAE-PAD, Sistema Dionex), Departamento de Química Orgánica (FCEN, UBA).

Procesamiento Hidrotérmico de Cereales, Departamento de Industrias (FCEN, UBA).

14. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz 029/15. Evaluación de métodos de extracción enzimática para la determinación de metabolitos tóxicos. Responsables: Víctor Londoño y Sofía Aransibia. Dirección Silvia Resnik. Fecha de otorgamiento: 12 de agosto de 2016. Monto 10.000 pesos por año.

15. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

16. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Se ha dictado "Química tecnológica y de la atmósfera" en el Instituto de educación terciaria Leopoldo Marechal 2,5 horas por semana fuera de horario cubierto por la beca.

17. 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.*

18. DESCRIPCION DEL AVANCE EN LA CARRERA DE DOCTORADO.

Debe indicarse los logros alcanzados en la carrera de Doctorado en relación a los requisitos particulares de la misma (cursos, seminarios, trabajos de campo, etc), así como el porcentaje estimado de avance en la tesis.

El 13 de abril de 2016 se efectuó la inscripción al Doctorado en Química Industrial (UBA), y el 3 de octubre de 2016 se efectivizó con número de resolución CD N° 2420 el ingreso al Doctorado en Química Industrial (se adjunta copia resolución)

Hasta el día de la fecha se realizaron los siguientes cursos:

Cromatografía líquida de alta resolución (DOC8800155), Departamento de Química Orgánica (FCEN, UBA). Nota: 7 (siete).

Fundamentos de la Cromatografía de Alta Resolución de Intercambio Aniónico (HPAE-PAD, Sistema Dionex) (DOC8800156), Departamento de Química Orgánica (FCEN, UBA). Nota 8 (ocho).

Procesamiento Hidrotérmico de Cereales (DOC8800544), Departamento de Industrias (FCEN, UBA). Nota: 9 (nueve).

Los cursos realizados suman un total de 7 puntos de los 20 establecidos en la programa de doctorado de Química Industrial.

Hasta el momento el porcentaje de avance de la tesis es aproximadamente de un 25%.

19. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Deberán indicarse claramente las acciones a desarrollar.*

Se continuará con el plan de beca presentado en un principio cuyo título es:
Contaminantes en Alimentos: micotoxinas. Metodologías de extracción con empleo de enzimas y procesos de descontaminación.

Dentro de las actividades (A) a desarrollar se pueden mencionar las siguientes:

A 1: Puesta a punto y validación de los métodos para cada fracción de la molienda húmeda de maíz para la determinación de FBs libres e hidrolizadas, luego de definido el protocolo de extracción.

A 2: Determinación y cuantificación de FBs totales y libres en las diferentes fracciones de la molienda húmeda. Con estos resultados se evaluarán las fracciones más contaminadas para su detoxificación posterior considerando libres y totales.

A 3: Evaluar la exposición de la población a fumonisinas totales

A 4: Ensayos preliminares de descontaminación en función de la enzima empleada, a escala laboratorio y banco, en una de las fracciones más contaminadas detectadas el año anterior.

A 5: Determinación de la cinética de degradación de las FBs totales y evaluación de los resultados de los ensayos de descontaminación.

A 6: Caracterización de los productos obtenidos luego del tratamiento con enzimas para reducir la contaminación con fumonisina, estableciendo sus posibles aplicaciones
Comparación de hidrólisis alcalina respecto a hidrólisis enzimáticas con las enzimas seleccionadas.

En este segundo año se prevee terminar con las actividades 1 y 2

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario

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.

Provincia	Localidad	Datos de muestra	FB1 (ug/Kg)	FB2 (ug/Kg)
Buenos Aires	Saladillo	Maíz Polvaredas 1	1513	146
			1561	135
	Luján	Maíz Luján Los Gallos	1131	80
			901	56
	Trenque Lauquen	Maíz granel de silo	1268	102
			1435	117
			7602	1523
			4834	1816
			5368	1989
			4563	1656
Lincoln	Maíz granel de silo (inundación)	2682	742	
		2884	843	
			3240	999
			2764	693
			274	102

Tabla 1: concentración de Fumonisinias libres en la provincia de Buenos Aires

Provincia	Localidad	Datos de muestra	FB1 (ug/Kg)	FB2(ug/Kg)
Entre Ríos	Gualedguaychú	Maíz Campo Ezcurra	151	nd
			110	nd
		Maíz Campo Parodi Luis	111	nd
			670	81
		Maíz La Fraternidad II	116	nd
			206	nd
			143	nd
		Maíz Campo Daniel Sanchez	171	nd
			224	nd
			299	nd
		Maíz El Gato Felipe	298	nd
			480	38
465	42			
		515	55	

Tabla 2: concentración de Fumonisinias libres en la provincia de Entre Ríos

Tipo de extracción	Relación	Tiempo de hidrólisis (min)	Área			Tiempo de retención (min)		
			HFB1	HFB2	HFB3	HFB1	HFB3	HFB2
Blender	B 1/10	50	644.85	123.42	31.97	19.30	41.56	44.72
		100	512.41	110.83	27.39	19.38	41.08	44.26
		150	328.23	70.59	18.16	19.40	41.23	44.45
	B 1/15	50	375.76	79.70	23.04	19.41	41.33	44.60
		100	445.86	103.65	25.83	19.44	41.75	45.05
		150	335.54	75.38	15.33	19.50	42.35	45.71
Ultraturrax	U 1/10	50	683.25	173.29	31.46	19.51	42.31	45.73
		100	762.29	155.49	38.69	19.57	42.92	46.32
		150	674.09	155.25	38.25	19.59	42.97	46.34
	U 1/15	50	571.24	132.37	29.00	19.61	42.88	46.26
		100	678.50	164.87	33.88	19.65	42.85	46.25
		150	573.73	133.31	29.70	19.67	42.89	46.31

Tabla 3: concentración de Fumonisin hidrolizadas en diferentes tiempos de hidrólisis para blender y ultraturrax con dos relaciones de KOH.

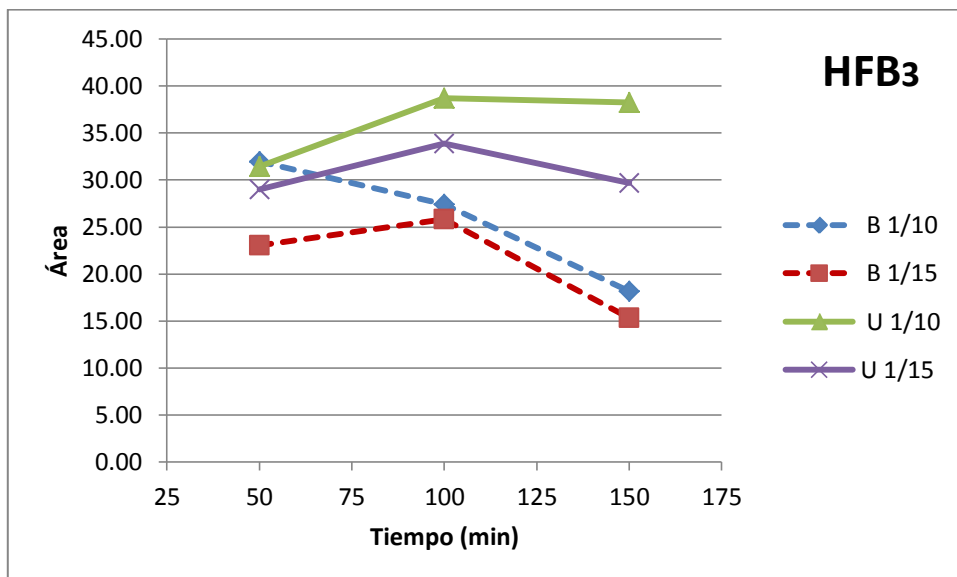
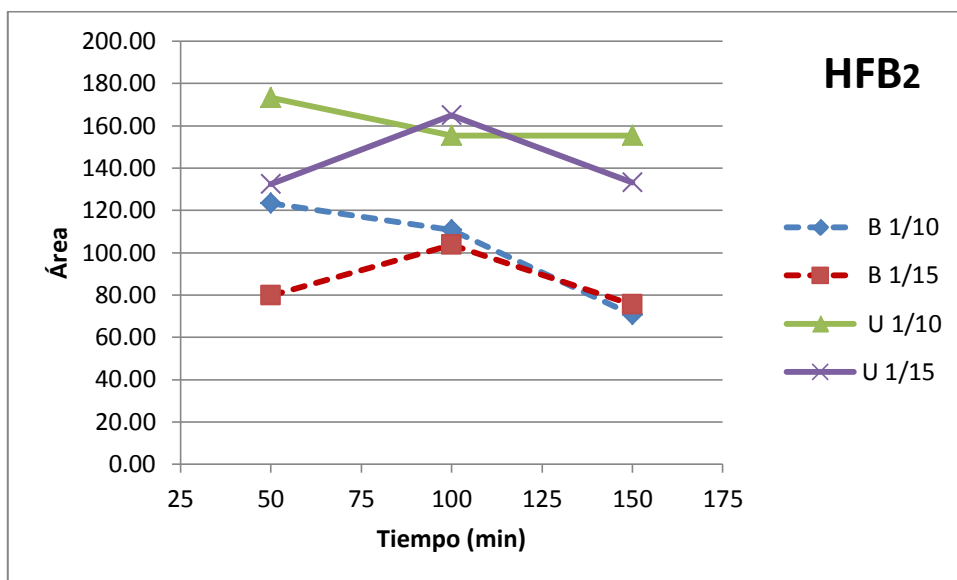
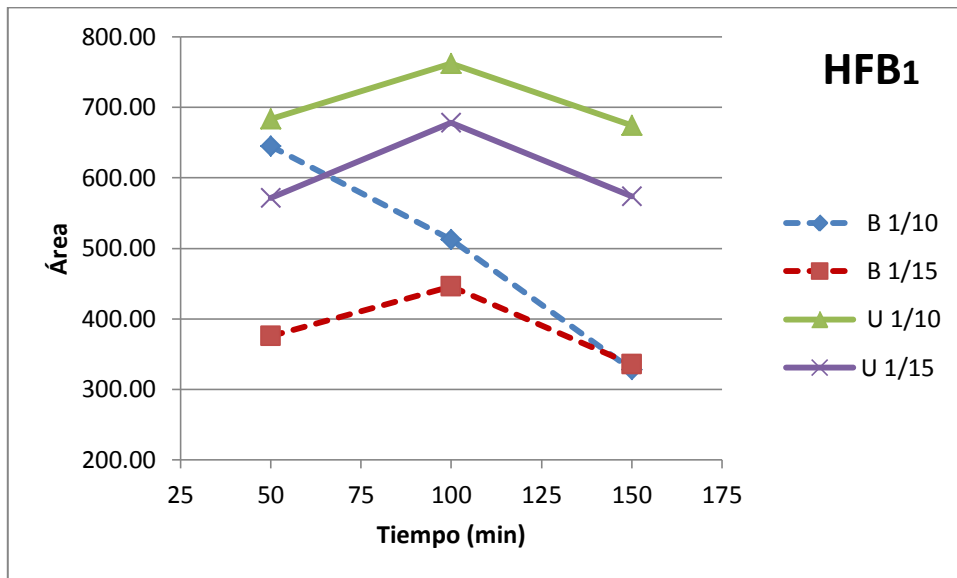


Figura 1: valor de área de HFBs para blender y ultraturrax (1/10 y 1/15) para diferentes tiempos de hidrólisis (50, 100 y 150 min)

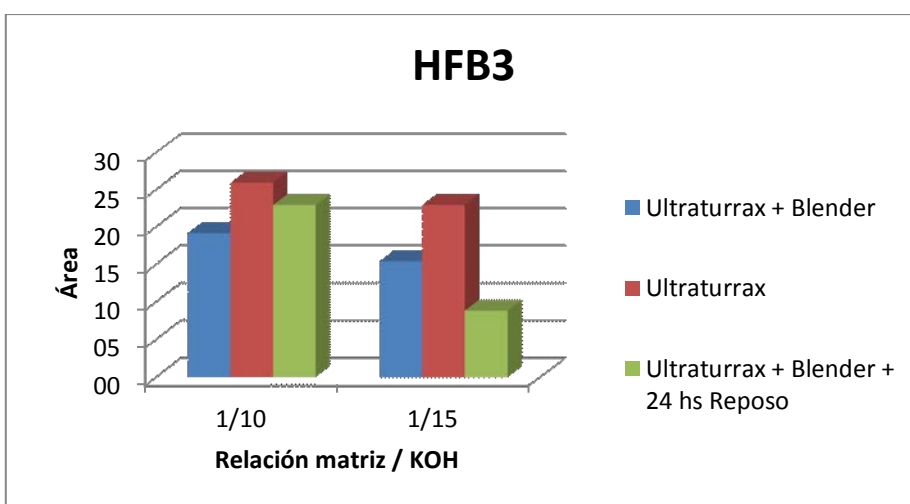
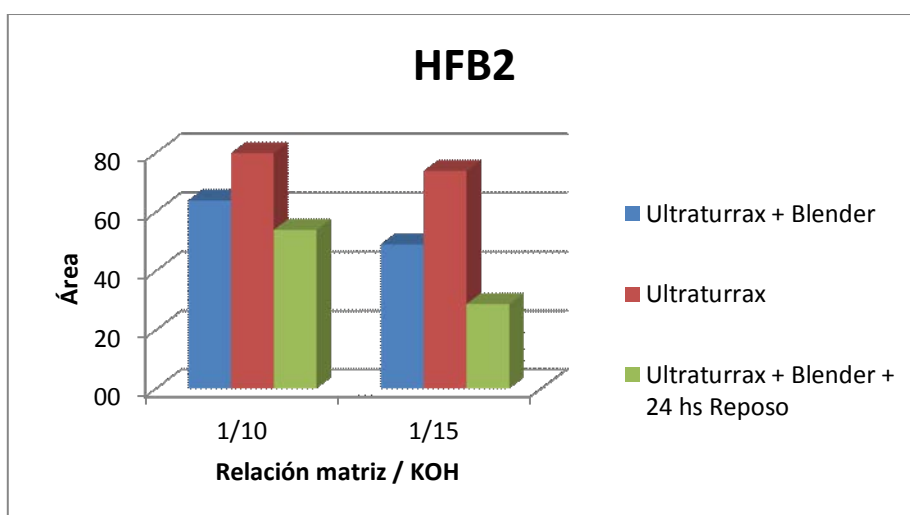
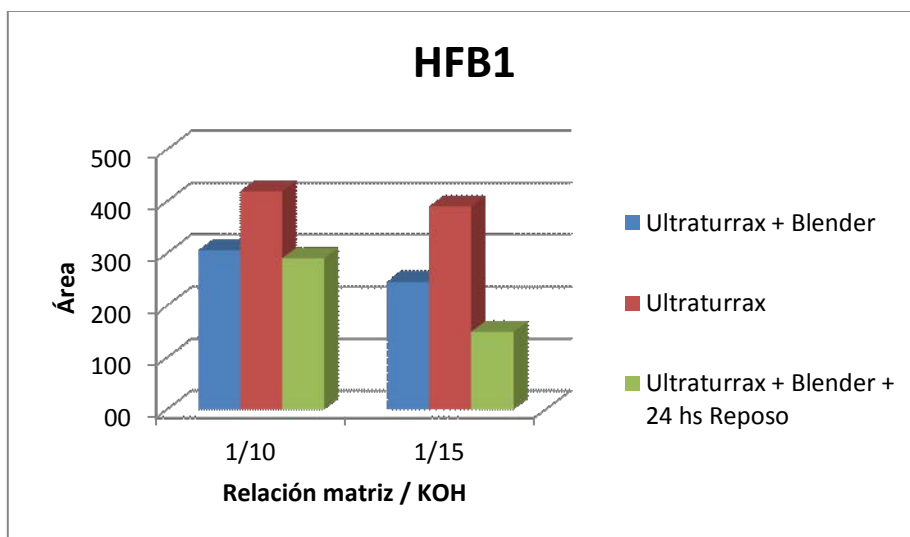


Figura 2: valor de área de HFBs para ultraturrax + blender, ultraturrax y ultraturrax + blender + reposo para relación matriz / KOH 1/10 y 1/15.

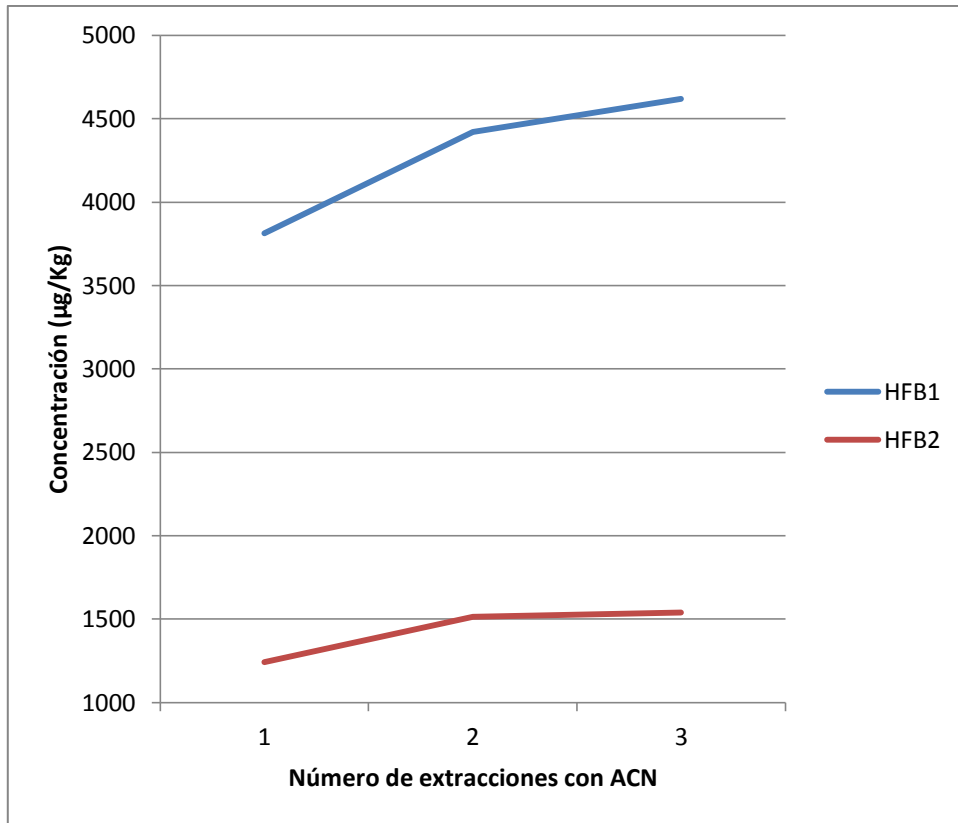


Figura 3: extracciones consecutivas con acetonitrilo. (1) 50 mL, (2) 40mL, (3) 30 mL.