

# CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

## Informe Científico<sup>1</sup>

PERIODO <sup>2</sup>: 1-1-2016/31-12-2017

### 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO: Mendieta*

*NOMBRES: Julieta Renée*

*Dirección Particular: Calle:*

*Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel: Dirección*

*electrónica (donde desea recibir información,*

*que no sea "Hotmail"):*

### 2. TEMA DE INVESTIGACION:

**Compuestos naturales con propiedades antimicrobianas para aplicación en agricultura (IPG y quitosanos)**

**PALABRAS CLAVE (HASTA 3)** Inhibidor de Tripsina                      Quitosanos  
Actividad antimicrobiana

### 3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

*INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 7-10-2010*

*ACTUAL: Categoría: Adjunto desde fecha: 31-5-2015*

### 4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

*Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata*

*Facultad: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

*Departamento: Instituto de Investigaciones Biológicas*

*Cátedra: Fisiología del Estrés en Plantas*

*Otros:*

*Dirección: Calle: Funes Nº: 3250*

*Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel: 0223-4753030*

*Cargo que ocupa: Investigador Adjunto CIC-BA*

### 5. DIRECTOR DE TRABAJOS (En el caso que corresponda)

*Apellido y Nombres:*

*Dirección Particular: Calle:                      Nº:*

*Localidad:                      CP:                      Tel:*

*Dirección electrónica:*

.....  
Firma del Director (si corresponde)

.....  
Firma del Investigador

### 6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

*Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.*

En nuestro laboratorio se purificó un inhibidor de serina proteasas homólogo a una Germin Like-Protein (GLP) a partir del fluido intercelular de hojas de trigo, al que se denominó Inhibidor de Proteasas Tipo Germina (IPG). Además de actividad de inhibidor de proteasas, IPG posee actividades de superóxido dismutasa (SOD) y adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa, lo cual lo convierte en una proteína multifuncional. En este período se ha estudiado el efecto de IPG sobre la formación de biofilms tanto de microorganismos fitopatógenos como benéficos de plantas. Los resultados obtenidos permiten proponer a la proteína IPG como un potencial candidato para la aplicación en agricultura.

Por otra parte se desarrolla un proyecto tendiente a evaluar los efectos de los quitosanos, compuestos obtenidos de los desechos de la industria pesquera de la costa de la Prov. de BA sobre microorganismos patógenos de cultivos de interés

<sup>1</sup> Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

<sup>2</sup> El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1º-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

agronómico. Los resultados obtenidos han dado lugar a publicaciones, presentaciones a congreso y formación de recursos humanos y a un proyecto de beca doctoral, la cual se informará en el próximo período.

## **7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicitar la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

A continuación se expone la labor desarrollada en el período enero 2016-diciembre 2017. Cabe destacar que dicha labor se compone de dos proyectos de investigación: uno correspondiente a un proyecto financiado por la Universidad Nacional de Mar del Plata (EXA 837/17, ver sección...), del cual soy directora y otro financiado por la ANPCyT (PICT start up, dirigido por la Dra. Casalagué, en el cual soy integrante) y por la Universidad Nacional de Mar del Plata (EXA 817/17, del cual soy codirectora). Ambos proyectos tienen en común el estudio de compuestos naturales bioactivos en plantas y microorganismos fitopatógenos con potencial aplicación en el campo de la agricultura.

Proyecto 1: El inhibidor de proteasas tipo germina de trigo (IPG) como biocompuestos con potenciales aplicaciones en el campo de la agricultura

Objetivo General: Estudiar el efecto de IPG sobre la formación de biofilms bacterianos

El Inhibidor de Proteasas tipo Germina (IPG) es un inhibidor de tripsina que se aisló en nuestro laboratorio a partir del fluido extracelular de hojas de trigo y su segmento N-terminal resultó ser homólogo a una *Germin-like Protein* (GLP). Este inhibidor presenta además, otras actividades enzimáticas como superóxido dismutasa (SOD) y actividad de adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa (AGPP), caracterizando a esta proteína como una proteína multifuncional. Estas características multifuncionales, han permitido caracterizar a IPG como una proteína antimicrobiana (objetivo presentado en informes anteriores). Con el propósito de avanzar en el proyecto de investigación se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Analizar el efecto de IPG sobre la formación de biofilms de tres microorganismos: la bacteria patógena de plantas *Pseudomonas syringae*, la bacteria promotora del crecimiento *Sinorhizobium meliloti* y la haloarquea *Halobacterium salinarum*.

OBJETIVO 2: Caracterizar el mecanismo por el cual IPG afecta la formación de biofilms

OBJETIVO 3: Evaluar la formación de biofilms en presencia de IPG en plántulas de tomate.

Objetivo 1 y 2: Teniendo en cuenta las múltiples actividades biológicas asociadas a la proteína IPG, lo cual la convierte en un modelo de proteína multifuncional con alto potencial en biotecnología, se comenzó a explorar el efecto de esta proteína sobre la formación de biofilms bacterianos. Para esto, se probaron tres microorganismos: la bacteria patógena de plantas *Pseudomonas syringae*, la bacteria promotora del crecimiento *Sinorhizobium meliloti* y la haloarquea *Halobacterium salinarum*. Los resultados indican que IPG detiene el desarrollo de *P. syringae* y favorece el crecimiento en biofilms de *S. meliloti* y *H. salinarum*. Por otra parte, se pudo determinar que IPG en una proteína con actividad antimicrobiana frente a la bacteria patógena alterando la permeabilidad de la membrana plasmática, mientras que induce el desarrollo de *S. meliloti* y *H. salinarum*. El mecanismo por el cual IPG ejerce este último efecto es objetivo actual de la Tesis de Grado del Sr. Rodríguez Simón y los resultados serán informados en el próximo período.

Los resultados obtenidos en este punto, dieron lugar a una presentación a congreso (XI Reunión Anual de Biólogos en Red, ver sección 7.5: COMUNICACIONES). Además, se desarrollaron dos pasantías de investigación en este tema realizadas por el estudiante Carlos Rodríguez Simón (ver SECCIÓN 21).

Objetivo 3: A partir de los efectos *in vitro* obtenidos en el objetivo anterior, se procedió a la evaluación del posible efecto causado por IPG sobre el desarrollo de biofilm *in vivo*. Para ello, se trataron plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) crecidas en presencia de *P. syringae* o *S. meliloti* con distintas concentraciones de IPG. Se observó un marcado efecto sobre la capacidad infectiva de *P. syringae*, siendo IPG capaz de restringirla a la etapa epifita y evitar la colonización superficial de la raíz. De manera contraria, se detectó un aumento de biofilm de *S. meliloti*. Estos resultados fueron validados cuantitativamente mediante el conteo de unidades formadoras de colonia a partir de las raíces de las plántulas tratadas.

Los resultados obtenidos en este punto, dieron lugar a una presentación a congreso (XII Congreso Argentino de Microbiología General, ver sección 7.5: COMUNICACIONES). Además, a partir de estos datos se planteó el Plan de Tesis de grado del Sr. Carlos Rodríguez Simón para optar por el título de Licenciado en Ciencias Biológicas, cuya defensa está prevista para junio de 2018 (ver SECCIÓN 13).

## **Proyecto 2: Valoración de quitosanos y derivados provenientes de desechos de la industria pesquera como comúestos antimicrobianos con aplicación en la agricultura**

Quitosanos y derivados: Son compuestos inocuos, biodegradable y con un gran potencial de aplicación en el campo de la agronomía ya sea como compuestos antimicrobiano sobre patógenos de plantas o como inductores de las respuestas de defensa y/o potenciadores del crecimiento en plantas. En esta etapa, se avanzó en el estudio de la actividad antimicrobiana de dos derivados de quitosanos el quitosano N-metilénfosfónico (NMPC) y el oligoquitosano solubles de bajo peso molecular (LMWCh).

Objetivo general: Estudiar la actividad antimicrobiana del LMWCh y del NMPC sobre patógenos de plantas ahondando en su mecanismo de acción.

Objetivo 1: Evaluar el efecto antimicrobiano de LMWCh sobre el hongo *Fusarium solani* y sobre el oomycete *Phytophthora infestans* sólo y en combinación con el fungicida comercial Mancozeb.

Los resultados obtenidos indican que LMWCh es un potente agente antimicrobiano sobre ambos patógenos de plantas. La combinación del quitosano con el fungicida comercial permitió reducir 10 veces la dosis de fungicida y alcanzar el mismo efecto sobre los patógenos. Estos resultados fueron publicados en un capítulo de libro con resultados inéditos (ver SECCIÓN 8, Trabajos Publicados)

Objetivo 2: Estudiar y caracterizar la actividad antimicrobiana del derivado NMPC sobre el hongo *Fusarium solani*.

Los resultados indican que NMPC ejerce una fuerte acción fngicida sobre *F. solani* pero no sobre células de plantas, indicando su acción selectiva, una propiedad muy buscada en los fungicidas actuales. NMPC ejerce permeabilización de la membrana plasmática del hongo, induciendo los niveles de ROS intracelular y conduciendo al hongo a la muerte de las estructuras reproductivas. Estos resultados dieron lugar al desarrollo de la Tesis de Grado realizada por la Srta. Florencia Mesas, la cual fue financiada por una Beca de Estudiante Avanzado de la Universidad Nacional de Mar del Plata y defendida el 27 de diciembre de 2016 (ver sección 12 y 13). Además se terminó de redactar un manuscrito que será enviado para su publicación (ver SECCIÓN 8.4). Además se presentaron dos trabajos en congreso (XIV Congreso Argentino de Microbiología y Reunión Conjunta de Sociedades en Biociencias, ver SECCIÓN 8.5)

## **8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.**

**8.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

1) Vinculación tecnológica. Volumen IV. De la Universidad al Medio Socio Productivo. 2016

### **Valoración biotecnológica de quitina y quitosano para el desarrollo de películas con aplicación en agricultura**

Claudia A. Casalongué, Ana Civatos, Juan Luis Lacomba, Andrea Y. Mansilla, Julieta R Mendieta, Viviana Ramos (Autores por orden alfabético)

La quitina es el polisacárido constitutivo más abundante en los exoesqueletos de insectos y crustáceos. Su derivado más tradicionalmente estudiado es el quitosano. En el presente trabajo se ha propuesto la obtención de quitina y la utilización de quitosano para el desarrollo de películas con potencial uso de aplicación en agricultura. La quitina fue obtenida a partir del desecho de exoesqueletos de langostinos asociados a su comercialización de las industrias pesqueras de la ciudad de Mar del Plata, Argentina. Si bien existen varios métodos de obtención de quitina, en el presente trabajo se utilizó una metodología sencilla en el laboratorio pero de fácil escalonamiento a escala piloto. Esta consistió en un proceso químico de hidrólisis de las proteínas y remoción del material inorgánico utilizando ácidos y álcalis a altas concentraciones pero, a diferencia de la mayoría de los métodos descriptos, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente. Para la obtención de películas o filmes se partió de quitosanos de origen comercial y se utilizó la técnica de evaporación de solvente conocida como *casting*, descripta como altamente práctica y sencilla. Se optimizaron las condiciones para la utilización de dichos filmes en el recubrimiento de semillas de trigo.

Participé en la optimización del protocolo para la obtención de quitina en el laboratorio y en los ensayos de análisis de films de quitosano en semillas de trigo. Además colaboré en la redacción y corrección del artículo.

SE ENCUENTRA EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL CIC-DIGITAL

<http://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/8139>

2) Vinculación tecnológica. Volumen IV. De la Universidad al Medio Socio Productivo

### **Hidrolizados proteicos de pescado a partir de residuos de la industria pesquera con aplicaciones biotecnológicas**

Agueda E. Massa, Emilio A. Manca, Andrea Yamila Mansilla, Julieta R. Mendieta, Claudia A Casalangué

Durante las operaciones pesqueras destinadas al procesamiento de pescados y mariscos para consumo humano, se generan residuos (cabezas, vísceras, piel y espinas) que constituyen más del 40% del peso total de los desembarques pesqueros. Estos subproductos presentan compuestos con importantes propiedades nutricionales, funcionales y bioactivas que pueden ser utilizados en diversos sectores industriales. El objetivo del presente estudio fue elaborar hidrolizados proteicos a partir de residuos pesqueros y evaluar su aplicabilidad en la industria agrícola. La materia prima, que fue obtenida de industrias pesqueras marplatenses, se homogeneizó y se sometió a una hidrólisis enzimática. Finalizado dicho proceso, el hidrolizado proteico fue separado y caracterizado químicamente. La composición química de estos productos incluyó compuestos orgánicos (péptidos aminoácidos libres, ácidos grasos omega-3, vitaminas) y minerales (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y otros oligoelementos) altamente nutritivos para las plantas y microorganismos beneficiosos. En este contexto, el desarrollo de hidrolizados proteicos de pescado puede considerarse como una alternativa económicamente viable y ecológicamente sustentable para su potencial aplicación biotecnológica.

En este artículo colaboré en los ensayos de análisis del efecto de los hidrolizados de pescado sobre el crecimiento de plántulas de tomate y sobre el desarrollo de la levadura *Saccharomyces cereviceae*. Además colaboré activamente en la redacción, elaboración de figuras y corrección del artículo.

SE ENCUENTRA EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL CIC-DIGITAL

3) Chapter from the book Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides

### **Chitosan as Source for Pesticide Formulations.**

Sebastián D. Ippólito\*, Julieta R. Mendieta\*, María C. Terrile\*, Claudia V. Tonón, Andrea Y. Mansilla, Silvana Colman, Liliana Albertengo, María S. Rodríguez and Claudia A. Casalangué. 2017. \*Colaboraron de igual manera

Late blight and wilt caused by the oomycete, *Phytophthora infestans*, and the fungus, *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, respectively, are severe diseases in Solanaceae crops worldwide. Although traditional approaches to control plant diseases have mainly relied on toxic chemical compounds, current studies are focused to identify more sustainable options. Finding alternatives, a low molecular weight chitosan (LMWCh) obtained from biomass of Argentine Sea's crustaceans was assayed. In an attempt to characterize the action of LMWCh alone or in combination with the synthetic fungicide Mancozeb, the antimicrobial properties of LMWCh were assayed. In a side-by-side comparison with the SYTOX Green nucleic acid stain and the nitric oxide-specific probe, diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM DA), yielded a similar tendency, revealing LMWCh-mediated cell death. The efficacy of LMWCh, Mancozeb, and the mixture LMWCh-Mancozeb was in turn tested. A synergistic effect in the reduction of *F. eumartii* spore germination was measured in the presence of subinhibitory dosis of 0.025 mg ml<sup>-1</sup> LMWCh and 0.008 mg ml<sup>-1</sup> Mancozeb. This mixture was efficient to increase the effectiveness of the single treatments in protecting against biotic stress judged by a drastic reduction of lesion area in *P. infestans*-inoculated tissues and activation of the potato defense responses.

En este trabajo realicé los ensayos antimicrobianos sobre *F. solani* y *P. infestans* y colaboré en la redacción y corrección del artículo.

SE ENCUENTRA EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL CIC-DIGITAL

<http://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/8122>

**8.2 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 Investigador 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 figurarán 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 investigador 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.

- Trabajo enviado y aceptado en Ecological Indicators. Ms. Ref. No.: ECOLIND-10066R1

**An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid.**

Iturburu, Fernando G.; Bertrand, Lidwina; Mendieta, Julieta R.; Amé, María V.; Menone, Mirta L.

Stress indices such as the Integrated Biomarkers Response (IBR) index have been developed as a practical and robust tool to assess the susceptibility to pollutants using multiple biomarker responses. Neonicotinoid insecticides are nowadays one of the most sold pesticides worldwide. Nevertheless, imidacloprid (IMI) sublethal effects such as oxidative stress (OS) on fishes are scarcely studied. Hence, the aims of this work were: (1) to evaluate exposure- and effect- biomarkers related to oxidative stress in the freshwater fish *Australoheros facetus* exposed to IMI and (2) to apply the Integrated Biomarker Response index (IBR) to achieve a comprehensive understanding of oxidative stress in the fish. The results of the present work showed that all the biomarkers presented different responses in the three monitored tissues: liver, brain and gills. For example, the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased in liver when fishes were exposed from 1 to 1000 µg L<sup>-1</sup> IMI, while it decreased in brain at the same IMI concentrations and no changes in gills were observed. Results for an initial battery of 19 biomarkers were obtained and for the IBR index only those with significant differences have been considered. The biomarkers that had the most important weight on the IBR index were SOD activity in brain and gills, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in liver, and carbonyl groups concentration in gills in fishes exposed to 100 and 1000 µg L<sup>-1</sup> IMI. This index allowed affirming that a short term exposure to IMI produces oxidative stress in *A. facetus*. However, a more deep understanding of some biomarkers is necessary to improve the index and for finally apply it in field studies.

En este trabajo surge por una colaboración con el grupo de la Dra. Menone, en él cuantifiqué la actividad SOD y los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígado, cerebro y branquias de *A. facetus* tratados con el insecticida imidacloprid

**8.3 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 han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.

- Trabajo enviado para su publicación a Ecotoxicology and Environmental Safety

**Environmental Concentrations of Chlorpyrifos 1 and Oxidative Stress. Responses in Gills and Hepatopancreas of The Freshwater Crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae).**

Negro, C. L., Iturburu F. G., Mendieta, J., Menone, M. L., Collins, P.

Worldwide pesticide application results in the pollution of aquatic environments. The crabs' exposure to organophosphate pesticides as chlorpyrifos may produce an increase in oxygen consumption, which might increase the generation of reactive oxygen species (ROS). For this study, *Zilchiopsis collastinensis* crabs were exposed to environmentally relevant chlorpyrifos concentrations, 0.1 and 25 0.5 µg chlorpyrifos L<sup>-1</sup>; and control conditions. The effects in oxidative stress enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-

transferases (GST), glutathione reductase (GR), and on malondialdehyde (MDA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were evaluated at four different times (12, 24, 48 and 96 hours). In gills the exposure to chlorpyrifos caused a decrease of GST activity after 12 hours at 0.1 µg chlorpyrifos L-1, and the levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased in crabs exposed to both chlorpyrifos concentrations after 96 hours. In hepatopancreas modifications of GST, CAT and SOD activities after 12 hours of exposure, and an increase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in crabs exposed to both concentrations at every time were observed. Although the exposure to these environmentally relevant concentrations was not lethal the increases in hydrogen peroxide levels show the oxidative stress caused by chlorpyrifos, which in turn may produce effects at higher biological organization levels.

En este trabajo cuantifiqué la actividad SOD y los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en branquias y hepatopáncreas del cangrejo *Zilchiopsis collastinensis* tratados con el pesticida chlorpyrifos.

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

##### **N-methyl phosphonic chitosan (NMPC) exerts antifungal activity en phytopathogenic fungi.**

Florencia Mesas, Liliana Albertengo, Adriana Zuñiga, Adriana Debbaut, María Susana Rodriguez, Claudia Casalongué, María Cecilia Terrile, María Ximena Silveyra, Julieta Mendieta

The aqueous solubility of chitosan depends on the degree of protonation of the NH<sub>2</sub> group by acid treatment, which limits its versatility in biological fluids. However, N-methyl phosphonic chitosan (NMPC) is a chitosan derivative which hydrosolubility is improved due to the addition of aminoalkylphosphonic ligands. The aim of this study was to analyze whether NMPC were able to control and/or inhibit the growth of different plant pathogens: the fungi *Fusarium solani* and *Botrytis cinerea* and the oomycete *Phytophthora infestans*. Firstly, we analyzed the effect of NMPC on spores/sporangia germination. *In vitro* quantitative assays showed that NMPC exerted antifungal properties in a dose dependent manner. Values of IC<sub>50</sub> (NMPC concentration needed to inhibit the germination to a 50%) were 2.5 µg/ml, 4 µg/ml and 2 µg/ml for *F. solani*, *B. cinerea* and *P. infestans* respectively. To investigate the mechanism of action of NMPC, different experimental approaches were performed. *F. solani* spores were incubated with of different concentrations of NMPC for 24h. Fungal viability was calculated counting the number of colony forming units (CFU) and Ioduro Propide uptake was evaluated. In addition, the effect of NMPC on cell plasma membrane validated citotoxicity based on the uptake of the fluorogenic dye SYTOX Green. ROS production was *in vivo* measured by DAB staining in fungal spores upon 4 h of incubation with 2.5 µg/ml NMPC. Beside, tomato cell cultures were incubated with 2.5 and 5 µg/ml NMPC, and cell viability was tested. The results showed that at fungicidal doses, NMPC is not toxic to plant cells. Simultaneous analysis of cell viability, cell permeabilization and activation of ROS generation explained integrative citotoxic properties mediated by NMPC on fungal cells.

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

##### **Comunicaciones presentadas a congresos científicos**

Nacionales:

- 1- Mesas F, Albertengo L, Zuñiga A, Debbaut A, Rodriguez MS, Casalongué C, Mansilla AY, Terrile MC, Mendieta JM. N-Methylenphosphonic Chitosan (NMPC) exerts antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*. XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Argentina del 26 al 30 de septiembre de 2016.
- 2- Mendieta JR y Necessian D. Un antioxidante de origen microbiano posee actividad antifúngica sobre *Fusarium solani* y aumenta los mecanismos de defensa en plántulas de tomate. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes, Argentina del 13 al 16 de noviembre de 2016.
- 3- Norberto Rodriguez Simón C, Salvat Correa SM, Necessian D, Mendieta JR. El Inhibidor de Proteasa tipo Germina de trigo (IPG) afecta la formación de biofilms en diferentes microorganismos. XI Reunión Anual de Biólogos en Red, Mar del Plata, Argentina del 14 al 15 de noviembre de 2016.
- 4- Rodríguez Simón C, Salvat Correa S, Necessian D, Mendieta J. (2017). Effects of the germin like protein (GLPI) in the *in vivo* biofilm formation upon *Solanum lycopersicum* roots. XII Congreso Argentino de Microbiología General, agosto 2-4 2017, Tucumán, Argentina.
- 5- Colman S, Díaz G, Mendieta JR, Necessian D, Segarra C, Sollazo M, Sotelo C, Villamonte D (autores en orden alfabético). Aceite de Cannabis: extracción y cuantificación de sus componentes activos. 1° Congreso Argentino de Cannabis y Salud, La Plata, del 21 al 23 de junio de 2017.
- 6- Florencia Mesas, Liliana Albertengo, Adriana Zuñiga, Adriana Debbaut, María Susana Rodriguez, Claudia Casalongué, María Cecilia Terrile, Ximena Silveyra, Julieta Mendieta. N-methylene phosphonic chitosan

(NMPC) exerts cytotoxicity in fungal cells. Reunión Conjunta de Sociedades en Biociencias, Buenos Aires, 13 al 17 de noviembre de 2017.

- 7- Colman S, Díaz G, Mendieta JR, Nercessian D, Villamonte D (autores en orden alfabético). Cannabis-based oil: extraction methods and quantification of active principles. Reunión Conjunta de Sociedades en Biociencias, Buenos Aires, 13 al 17 de noviembre de 2017.

Internacionales

- 1- Iturburu FG, Mendieta JR, Panzeri AM, Götte JY, Menone ML. Time-dependent responses of the freshwater fish *Australoheros facetus* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid. 5th Young Environmental Scientists Meeting, del 28 de febrero al 2 de marzo de 2016, Gainesville, Florida, EE.UU. Organizado por SETAC.
- 2- Iturburu FG, Simoniello MF, Mendieta JR, Panzeri A, Menone M. "DNA damage in the freshwater fish *Australoheros facetus* acutely exposed to imidacloprid: possible explanation through an oxidative mechanism". 12<sup>th</sup> SETAC Latin America Biennial Meeting in Santo, Brazil del 7 al 10 de septiembre de 2017.

**8.6 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.*

**9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**

**9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

**9.2 PATENTES O EQUIVALENTES** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

**9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

Convenio de Confidencialidad y STAN con Empresa COPALIS Francia. Proyecto: Characterize ad evaluate potential technological applications o a fish protein hydrolysate Responsables: Dra Agueda Massa (INIDEP) y Dra Casalengué (IIB UE CONICET UNMDP), Octubre 2016

**9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

**9.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**

**10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

**11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

**11.1 DOCENCIA**

**11.2 DIVULGACIÓN**

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

**12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

- 1- **Codirectora de Beca de Universidad categoría Estudiante Avanzado.** Título: “Valoración de derivados de quitosano obtenidos a partir de los desechos de la industria pesquera como compuestos antimicrobianos y antitumorales”. Abril 2016-marzo 2017.
- 2- **Codirectora de Beca de Universidad categoría Estudiante Avanzado.** Título: “Valoración de derivados de quitosano obtenidos a partir de los desechos de la industria pesquera como compuestos antimicrobianos y antitumorales”. Abril 2017-marzo 2018.

**13. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

- 1- **Directora de Tesis de Grado** para optar por el título de Lic. en Ciencias Biológicas de la estudiante Florencia Anabel Mesas. “**Valoración de derivados de quitosano obtenidos a partir de los desechos de la industria pesquera como compuestos antimicrobianos**”. Defendida el 27/12/2014.
- 2- **Codirectora de Tesis de Grado** para optar por el título de Lic. en Ciencias Biológicas del estudiante Carlos Rodríguez Simón. “Efectos del inhibidor de proteasa tipo germina (IPG) sobre la formación de biofilms de diferentes microorganismos in vitro e in vivo”. Marzo 2017- en curso

**14. 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.*

Asistente en carácter de expositora en la Reunión Conjunta de Sociedades en Biociencias, Buenos Aires, 13 al 17 de noviembre de 2017, de los siguientes trabajos:

- Florencia Mesas, Liliana Albertengo, Adriana Zuñiga, Adriana Debbaut, María Susana Rodríguez, Claudia Casalangué, María Cecilia Terrile, Ximena Silveyra, Julieta Mendieta. N-methylene phosphonic chitosan (NMPC) exerts cytotoxicity in fungal cells. Reunión Conjunta de Sociedades en Biociencias, Buenos Aires, 13 al 17 de noviembre de 2017.
- Colman S, Díaz G, Mendieta JR, Nercessian D, Villamonte D (autores en orden alfabético). Cannabis-based oil: extraction methods and quantification of active principles. Reunión Conjunta de Sociedades en Biociencias, Buenos Aires, 13 al 17 de noviembre de 2017

**15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

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

- Subsidio Institucional para Investigadores de CIC-BA (Resolución N° 48/2016). “Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral”. Monto recibido \$ 11000. **Responsable: Julieta R. Mendieta.** Período: 2016-2017

- CONICET, PIP (Grupo de Investigación). “Integración de la regulación y funciones de componentes del sistema ubiquitina-proteosoma relacionado con el mecanismo de acción de auxinas”. **Integrante del grupo responsable.** Monto recibido \$ 450000. Período 2015-2017.

- “Estudios y desarrollo de formulaciones basadas en recursos naturales para su utilización como agroinsumos.” Dirección: Dra. Claudia Casalangué. Codirección: **Dra. Julieta R. Mendieta.** Período 2015-2016 EXA 726/15.

- El inhibidor de proteasas tipo germina de trigo (IPG) y los extractos de arqueas halófilas como biocompuestos con potenciales aplicaciones en el campo de la agricultura. Director: Dra. Julieta R Mendieta. Codirectora: Dra. Débora Nercessian. Período: 2017-2018. (EXA 837/17).

- "Micro-nanopartículas bioactivas en plantas." Dirección: Dra. Claudia Casalongué. Codirección: **Dra. Julieta R. Mendieta**. Período 2017-2018 EXA 817/17.

**17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

**18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

**19. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

- Evaluador de Proyecto PICT 2016, Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT). Se adjunto mail en la versión impresa de solicitud de evaluación y de recibo del informe correspondiente.

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

Año 2011- actualidad: Jefe de Trabajos Prácticos regular desde 1 de septiembre de 2011 (OCA N° 539/11) Anatomía Humana (2° cuatrimestre) y Fisiología Humana (1° cuatrimestre). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Carga horaria: 10 horas semanales.

**21. 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.*

**1) Actividades y artículos de divulgación:**

- 1- *BER 2016: Por una ciencia hecha entre todos y para todos.* (2016). Diario La Capital, 4 de septiembre de 2016. Mendieta JR, en autoría colectiva con el comité organizador del XI Biólogos en Red.
- 2- Miembro organizador de la Charla divulgación "Visión médica, política y científica del Cannabis medicinal" 16 de agosto Salón ADUM Roca 3865, Mar del Plata.
- 3- Nota del Diario La Capital sobre la Charla-Debate "Visión médica, política y científica del Cannabis Medicinal" Página 10, lunes 21 de Agosto de 2017, Mar del Plata.
- 4- Entrevista Radio Mitre Mar del Plata (FM 103.7) 26 de agosto de 2017 Programa "No es un día Cualquiera". Conducción Gabriela Azcoitia falta pasarlo CVar.
- 5- Nota del Diario Digital <https://www.0223.com.ar/nota/2017-9-24-12-20-0-la-ciencia-extiende-su-mano-investigan-en-mar-del-plata-el-uso-del-cannabis-medicinal>. Realizada al Grupo de Extensión "ConCiencia Cannabis", publicada el 24 de septiembre de 2017.
- 6- Entrevista en Radio Universidad (95.7 FM) . 10 de Octubre de 2017. **Entrevista sobre usos terapéutico del Cannabis.**
- 7- Entrevista en programa de TV "Mardel directo, Canal 8, Mar del Plata. 17 de Octubre de 2017. **Entrevista sobre usos terapéutico del Cannabis.**

**2) Formación de Recursos Humanos:**

- **Tutor de Prácticas de Investigación realizada por el Sr. Carlos Norberto Rodriguez Simón.** Efecto del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG) de trigo en la formación de biofilms bacterianos. Agosto 2016- Diciembre 2016.
- **Tutor de Práctica de Investigación realizada** por la Srta. Melani Shepherd Safar. Título: "Moléculas homólogas y heterólogas podrían revertir el daño causado por la criopreservación en espermatozoides de carnero." Marzo 2016-julio 2016.
- **Tutor de Práctica de Investigación realizada** por la Srta. Estefania Elizabeth Tranier. Título: "Moléculas homólogas y heterólogas podrían revertir el daño causado por la criopreservación en espermatozoides de carnero." Marzo 2016-julio 2016.

**3) Organización de reuniones y congresos**

- Integrante del comité organizador del XI Encuentro Anual de Biólogos en Red. Universidad Nacional de Mar del Plata, 14 y 15 de noviembre de 2016.
- Integrante del comité organizador del XII Encuentro Anual de Biólogos en Red. Universidad Nacional de Mar del Plata, 14 y 15 de noviembre de 2017.

#### 4) Subsidio para la organización de Reuniones Científicas

- **Subsidio para la organización de Reuniones Científicas y Tecnológicas** a realizarse entre julio de 2015 y julio de 2016 **otorgado por la CIC**. Reunión Científica: Biólogos en Red. 15 y 16 de noviembre de 2016. Monto Otorgado: \$ 20000. Acta de Directorio N° 1443/16.
- **Subsidio para la organización de Reuniones Científicas y Tecnológicas** a realizarse entre julio de 2016 y julio de 2017 **otorgado por la CIC**. Reunión Científica: Biólogos en Red. 14 y 15 de noviembre de 2017. Monto Otorgado: \$ 25000. Acta de Directorio N° 1459/17.

#### 5) Subsidios para la asistencia a Congresos y Jornadas Científicas

- **Subsidio para la Asistencia de Reuniones Científicas y Tecnológicas** otorgado por CIC para la Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias (13 al 17 de noviembre de 2017, Buenos Aires). Monto otorgado: \$ 8000.

#### 6) Actividades de Gestión:

- Integrante de la Comisión de Seguridad e Higiene, IIB, UNMdP. Desde marzo 2013.
- Integrante Miembro del Consejo Directivo IIB, a partir del 5/7/2017.

#### 7) Actividades de extensión:

Integrante Grupo de Extensión “ConCiencia Cannabis” OCA N° 1860/17.

## 22. TITULO, PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

### **Partículas de quitosano funcionalizadas con ácido salicílico como sistema de liberación controlada para inducir tolerancia a estrés en plantas de tomate**

El **objetivo general** es diseñar, sintetizar y caracterizar micropartículas de quitosano funcionalizadas con ácido salicílico (MPQ y MPQ-AS) de alta eficiencia de acción (mayor estabilidad y respuesta prolongada en el tiempo) y amigables en términos ambientales capaces de producir protección al estrés bacteriano en plantas de tomate. Los objetivos se asegurarán a través de la colaboración ya establecida entre el grupo de Fisiología del Estrés en Plantas (Dra Casalengué IIB CCT Mar del Plata) y de Materiales Compuestos de Matriz Polimérica (Dra Alvarez, INTEMA CCT Mar del Plata) y con la realización de la Tesis Doctoral de la Lic. Florencia Anabel Mesas, bajo mi dirección y financiada por el CONICET. La Lic. Mesas realizó su Tesis de Grado durante el período informado e iniciará su Tesis Doctoral en abril de 2018, cuyos resultados serán informados en el próximo período.

#### **Los objetivos específicos son:**

- 1) Estudiar la acción y efectividad de las micropartículas de quitosano (MPQ) y micropartículas de quitosano funcionalizadas con ácido salicílico (MPQ-AS) en el crecimiento y respuestas de defensa de las plantas sometidas a estrés (fúngico y bacteriano).
- 2) Estudiar aspectos bioquímicos y genético-moleculares en plantas de tomates sanas y estresadas.
- 3) Analizar las propiedades antimicrobianas de las partículas MPQ y MPQ-AS en hongos y bacterias fitopatógenas.
- 5) Caracterizar las propiedades de biocompatibilidad y citotoxicidad de las micropartículas MPQ y MPQ-AS en diferentes líneas celulares de animales (colaboración con el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, UCM, Madrid, a través del subsidio PICT RAICES “Estudio de las propiedades y mecanismos de acción de micropartículas de quitosano en diferentes sistemas biológicos” dirigido por la Dra. Casalengué).

#### **Antecedentes**

El tomate es una de las hortalizas más cultivada en nuestro país y en nuestra región del sudeste de la Provincia de Buenos Aires. Se puede cultivar durante todo el año, en la medida que sea posible controlar diferentes

situaciones de estrés. En este sentido, el tomate está expuesto a enfermedades causadas por diferentes patógenos que afectan la calidad y el rendimiento de los cultivos. El marchitamiento vascular de tomate es una enfermedad producida por diferentes especies del género *Fusarium* el cual es un hongo necrotrófico abundante en nuestra región. Particularmente, *Fusarium solani* f.sp. *eumartii* (*F. eumartii*) es un patógeno natural de papa y tomate. En plantas de tomate demostramos la acción protectora de oligoquitosano frente a la infección por *F. eumartii* (Mansilla et al., 2015). También Terrile et al. (2015) demostraron la participación del óxido nítrico como parte de la acción fungicida del Q. Por otro lado, las enfermedades de origen bacteriano son particularmente difíciles de controlar debido a sus altas velocidades de multiplicación y, a diferencia de las enfermedades fúngicas, existen muy pocos agroquímicos efectivos contra ellas. Entre los fitosanitarios más utilizados se cita al cobre y algunos antibióticos con el riesgo que esto supone para el desarrollo de cepas resistentes (<http://www.fao.org/3/a-i3359s.pdf>). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*P. syringae*) es una bacteria Gram negativa y el agente causal de la mancha bacteriana en tomate. Su incidencia provoca graves pérdidas de rendimiento y calidad de los frutos. La cepa DC 3000 representa un modelo fitopatológico en tomate y *Arabidopsis*. En nuestro laboratorio, se demostró que la aplicación de quitosano en plantas de tomate reduce los daños de infección bacteriana producidos por *P. syringae* DC 3000 (Mansilla et al., 2013).

### **Valoración del quitosano como recurso natural con alto potencial en agricultura sustentable**

La quitina es un polisacárido insoluble en agua y el componente más abundante en el exoesqueleto de los invertebrados marinos y terrestres, presentándose también en las paredes celulares de algunos hongos (Pillai et al. 2009). Su principal derivado industrial, el quitosano, es un copolímero de N-acetilglucosamina y glucosamina que se ha convertido en una alternativa prometedora para la agricultura del mundo debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad (Lárez-Velásquez 2008). Una de las mayores aplicaciones es su uso como *elicitor* o inductor de la respuesta de defensa frente a estrés biótico (Bautista-Baños et al., 2006; El Hadrami et al., 2010; Ghormade et al., 2011; Deepmala et al., 2014). Además, posee propiedades antimicrobianas contra diversas bacterias y hongos (Kong et al. 2010).

El quitosano ha sido muy valorado como componente de matrices poliméricas para la liberación controlada de principios activos con aplicación farmacológica y biomédica (Ahmed and Aljaeid, 2016). El desarrollo de compuestos micro o nanoencapsulados ha facilitado la estabilización de principios activos y su liberación controlada a bajas dosis de acción y amplia aplicación en agricultura (Ghormade et al., 2011). La liberación predecible y reproducible de un agente activo en un ambiente determinado y durante un periodo de tiempo es, sin dudas, una ventaja biológica y ambiental altamente significativa. La encapsulación de pesticidas y herbicidas ha resultado efectiva para sus respectivas funciones en las plantas (Scrinis and Lyons, 2007). Además, se ha demostrado la acción de nanopartículas de quitosano en la modulación de la respuesta de defensa y los resultados son promisorios para su aplicación en agricultura (Chandra et al., 2015).

### **El ácido salicílico es un inductor de la resistencia natural en las plantas.**

El AS es un compuesto fenólico sintetizado por las plantas, con propiedades hormonales (Raskin et al., 1990). Una vez sintetizado se conjuga produciendo varios compuestos derivados (Vlot et al., 2009). Regula respuestas de desarrollo, incluyendo las respuestas de defensa frente a diversos tipos de estreses bióticos (virus, bacterias y hongos) (Loake y Grant 2007; Vlot et al., 2009) y abióticos: sequía, temperatura, toxicidad por metales pesados y salinidad (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). Las proteínas NPR3 y NPR4 forman parte del complejo E3 ligasa y funcionan como receptores de AS. Ante la presencia de un patógeno, dichas proteínas regulan la degradación de la proteína NPR1 y consecuentemente, se activa la resistencia de las plantas frente a estrés (Fu et al., 2012). La intensidad y regulación temporal de dicha respuesta es crítica e impacta en la capacidad de la planta para defenderse o no ante el estrés. La inmunidad o resistencia natural o innata de las plantas a patógenos se basa en efectos combinados de barreras preformadas y mecanismos inducibles. En muchos casos, los patógenos en su sitio de infección inducen resistencia de defensa localizada denominada respuesta hipersensible (HR) la cual a su vez, desencadena la respuesta sistémica o SAR (por el inglés, *Systemic Acquired Resistance*). La respuesta HR es una respuesta de muerte celular programada que se desarrolla para delimitar el área de infección de un patógeno (Vlot et al., 2008; Mauch-Maní y Métraux, 1998). Los resultados de numerosas investigaciones han demostrado que el AS juega un papel importante en la regulación de la inmunidad innata de las plantas combinando cambios físicos, químicos y moleculares, tales como lignificación o la inducción de varias proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Fu and Dong, 2013).

Existen evidencias recientes sobre el efecto bactericida del AS en *Pseudomonas aeruginosa* (Bandara et al., 2016). El uso externo del AS es preventivo y también se ha demostrado que aumenta la eficiencia que ejercen otros compuestos como, fungicidas, bactericidas, nematocidas o insecticidas permitiendo disminuir sus dosis de aplicación (Singh et al., 2013). El efecto de inductor de resistencia (IR) se prolonga durante 3 a 7 días a partir de su aplicación ([http://www.abenmen.com/a/Acido\\_salicilico\\_aplicacion\\_y\\_concentracion\\_foliar.pdf](http://www.abenmen.com/a/Acido_salicilico_aplicacion_y_concentracion_foliar.pdf)). Dado que la vida media del AS dentro de la planta es muy corta, en el campo, es necesaria la aplicación sostenida durante el ciclo del cultivo lo cual conlleva a mayor operatividad y costos de aplicación. En dicho sentido, los resultados que se esperan del presente proyecto de tesis conducen a alternativas superadoras para la utilización del AS como IR.

## Diseño Experimental

**Materiales químicos.** El quitosano será suministrado por la Empresa Laboratorios Químicos SRL GIHON como parte del trabajo conjunto ANR Proyecto N° 022. También se dispone de quitosano de diferentes pesos moleculares y grado de deacetilación (SIGMA, USA) y ácido salicílico (AS) (W398500-1 Kg-K, SIGMA, USA)

**Materiales biológicos.** Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) var Platense serán obtenidas comercialmente. La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*P. syringae cepa virulenta*) representa un modelo fitopatológico apropiado en tomate. Para las condiciones de cultivo y su mantenimiento se utilizarán los protocolos estandarizados según Mansilla et al (2013).

Las micro-nanopartículas Q y Q-AS se prepararán por gelificación ionotrópica del quitosano con aniones tripolifosfato (TPP) (Calvo et al., 1997). Este método es uno de los más utilizados, debido a su simpleza, condiciones suaves, no tóxico y fácilmente adaptable a un aumento de escala de producción (Dong et al., 2013). El tamaño de las partículas que se obtiene puede ser modificado variando parámetros del proceso, como por ejemplo, la concentración de quitosano, el pH, entre otros. Se estudiará la **morfología** de las micro-nanopartículas obtenidas mediante microscopía de barrido electrónica (SEM, Microscopio JEOL JSM6460LV), disponible en el laboratorio de Microscopía, UNMdP, mientras que las nanopartículas serán observadas en un FESEM Equipo Zeiss ULTRA PLUS INSTRUMENT, disponible en el Laboratorio de Microscopía de la UBA. Se caracterizarán según los siguientes parámetros

**Distribución de tamaño y potencial Z:** Se determinará la distribución de tamaño y carga superficial de las partículas utilizando un equipo de Dispersión dinámica de la Luz (DLS) con capacidad para medir Potencial Z.

**Determinación del ángulo de contacto.** Se calculará para determinar la polaridad de la superficie del material y se realizará según describen Ludueña et al.,(2011).

**Comportamiento térmico:** análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido

**Absorción de humedad:** Las muestras de arcilla original y modificada se secarán bajo vacío y luego se realizará el ensayo en una cuba condicionada a 90% HR.

**Caracterización química:** Se obtendrán espectros FTIR de las micro y nanopartículas

**Eficiencia de encapsulación:** La cuantificación de AS se realizará por espectrofotometría UV a 297 nm y HPLC-UFLC Shimadzu Prominence CBM-20A SPD-M20A.

**Caracterización del anclaje a la arcilla a través de espectroscopia infrarroja (IR):** Se realizarán medidas espectroscópicas en el rango 4000 – 600 cm<sup>-1</sup> a temperatura ambiente

**Cinética de biodegradación del polímero:** Se estudiará la degradación del mismo mediante cambios en la masa y ensayos de UV- Vis y FTIR. En cada uno de los casos al inicio se estudiarán los espectros característicos y los picos del polímero al inicio y en función del tiempo liberación en el medio. **Liberación.** La cantidad de AS intercalado/liberado en las matrices se analizará mediante ensayos de UV- Vis ó HPLC-UFLC Shimadzu Prominence CBM-20A SPD-M20A y FTIR Genesis II. En cada uno de los casos se estudiarán los espectros característicos y los picos de AS al inicio y en función del tiempo de liberación en el medio acuoso y sistemas biológicos correspondiente.

**Bioensayos.** El efecto protector de las diferentes matrices (Q y Q-AS) en plántulas de tomate tratadas e infectadas con suspensiones celulares de *P. syringae*, según las condiciones optimizadas por Mansilla *et al.* (2013). Se optimizarán curvas-dosis respuesta, tiempos y modo de aplicación.

Los síntomas de estrés se cuantificarán como porcentaje de área afectada en función al área total mediante la utilización del programa ImageJ (NIH, Maryland, EEUU).

**Análisis de las propiedades inductoras de la respuesta de defensa:** Para analizar la activación de los mecanismos de defensa se analizarán los niveles de proteínas marcadoras de la respuesta de defensa en las plantas controles y tratadas con las matrices funcionalizadas. El tejido de hoja se tratará con nitrógeno líquido y las proteínas marcadoras se analizarán por PAGE-SDS y *western blots* revelados con anticuerpos disponibles en el laboratorio (anti-quitinasa, anti-glucanasa y anti-ascorbato peroxidasa, Agrisera, Suiza). Por reacciones de PCR en tiempo real (RT-PCR) se analizarán los niveles de transcritos incluyendo, el análisis del gen *PRI* descrito específicamente como marcador de la respuesta a AS y otros genes de respuesta de defensa los cuales son de análisis corriente en nuestro laboratorio (genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis, marcadores de la regulación por jasmónico, auxinas, etileno y ABA (Reymond and Farmer, 1998, D Ippólito et al, 2010 , Iglesias et al 2010, 2014 ).

**Caracterizar las propiedades de biocompatibilidad y citotoxicidad de las micropartículas MPQ y MPQ-AS en diferentes líneas celulares de animales (Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, UCM).**

Como una actividad paralela pero de importancia en la caracterización funcional de nuevos materiales se propone evaluar la biocompatibilidad de los sistemas propuestos (MPQ y MPQ-AS) en cultivos de células animales. Dada las amplias posibilidades de vehiculización de fármacos en micropartículas, se pretende analizar mediante medidas de proliferación, actividad metabólica y muerte celular el efecto de las MPQ en estos sistemas. Para ello, se empleará la experiencia del grupo en estas tareas y se usarán líneas celulares murinas comerciales y autofluorescentes, tanto premitóticas (C2C12-GFP) como endoteliales (C166-GFP) ambos modelos adherentes a sustrato. Se atenderá a la descripción de la proliferación y viabilidad mediante el análisis

del contenido de DNA-Hoechst; calceína y actividad metabólica por Alamar Blue. En paralelo, como modelo microbiológico se examinará crecimiento y muerte de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* en este sistema, empleando la tinción de naranja de acridina para diferenciar entre bacterias vivas y muertas (Redondo et al., 2017) En el caso de las MPQ-AS, la acción conocida del AS en células epiteliales permite comprobar si la liberación de este compuesto es capaz de afectar la regulación de los mecanismos celulares y moleculares internos. Para ello, se emplearán modelos de queratinocitos, fibroblastos y células de melanoma B16, empleando las técnicas anteriormente descritas y, si resulta necesario, el análisis de marcadores moleculares específicos mediante RT-qPCR e inmunocitoquímica (Martínez-Campos, et al, 2017)

**Análisis estadístico.** Cada uno de los experimentos se realizará por lo menos, por triplicado utilizando, por lo menos, 10 plantas para cada uno de los tratamientos. Se utilizará un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico de los resultados se realizará mediante el programa Sigma Stat3.1. Los datos serán sometidos a Análisis de Varianzas (ANOVA) y comparaciones múltiples *post hoc* mediante test de Tukey, según las condiciones y requerimientos de cada ensayo planteado.

## Referencias

- Ahmed TA, Aljaeid BM. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy* 10: 483-507.
- Bandara M, Sankaridurg P, Zhu H, Hume E, Willcox M (2016). Effect of Salicylic Acid on the Membrane Proteome and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 57:1213-20.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E. (2004). Growth inhibition of selected by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 178-186
- Calvo P, Remuñán-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* 63: 125-132.
- Chandra S, Chakraborty N, Dasgupta A, Sarkar J, Panda Koustubh, Acharya K. (2015). *Scientific Reports* 5: 15195.
- D Ippólito S, Martín ML, Salcedo MF, Atencio HM, Casalongué C, Godoy AV, Fiol DF. (2010) Transcriptome profiling of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* -infected potato tubers provides evidence of an inducible defense response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75: 3-12
- Deepmala K, Hemantaranjan A, Bharti S, Nishant Bhanu A. (2014). Future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Advances in Plants and Agriculture Research* 1: 00006. <http://dx.doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>.
- Dong Y, Kiong Ng W, Shen S, Kim S, Tan RBH. (2013). Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate Polymers* 94: 940-945.
- Dong Y, Kiong Ng W, Shen S, Kim S, Tan RBH. (2013). Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate Polymers* 94: 940-945.
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. (2010). Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs* 8: 968-987.
- Fu ZQ, Dong X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839-863.
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486: 228-232.
- Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advance* 29: 792-803.
- Iglesias MJ, Terrile MC, Windels D, Lombardo MC, Bartoli CG, Vazquez F, Estelle M, Casalongué CA. (2014) miR393 regulation of auxin signaling and redox-related components during acclimation to salinity in *Arabidopsis* – Open access Plos One DOI: 10.1371/journal.pone.0107678
- Iglesias MJ, Terrile MC, Bartoli CG, D' Ippolito S, Casalongue CA. (2010). Auxin signaling participates in the adaptive response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 74: 215-222.
- Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144: 51-63.
- Lárez Velásquez C (2008). Some potentialities of chitin and chitosan for uses related to agriculture in Latin America. *Revista UDO Agrícola* 8 (1): 1-22. 2008
- Loake G, Grant M. (2007). Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 466-472.
- Ludueña LN, Kenny JM, Vázquez A, Alvarez VA. (2011). Effect of clay organic modifier on the final performance of PCL/clay nanocomposites. *Materials Science and Engineering: A* 529: 215-223.
- Mansilla AY, Albertengo L, Rodríguez MS, Debbaudt A, Zúñiga A, Casalongué CA. (2013). Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 6957-6966
- Martínez-Campos, E., Civantos, A., Redondo, J.A. et al. *AAPS PharmSciTech* (2017) 18: 974
- Mauch-Mani B, Métraux JP. (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82: 535-540.
- Pillai CKS, Willi P, Sharma CP. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34: 641-678
- Raskin I, Skubatz H, Tang W, Meeuse BJD. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany* 66: 376-373.
- Redondo JA, Martínez-Campos E, Navarro R Pérez-Perrino M, Reinecke H, Gallardo A, Corrales G, Fernández-Mayoralas A, Elvira C, Hydroxyl versus permethylated glycolipolymers as gene carriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 117, 2017, Pages 68-76, ISSN 0939-6411
- Reymond P, Farmer EE. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 404-411
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62: 3321-3338.
- Scrinis G, Lyons K. (2007). The emerging nano-corporate paradigm: Nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems. *International Journal of Sociology of Food and Agriculture* 15: 22-44.
- Singh A, Srivastava AK, Singh AK. (2013). Exogenous application of salicylic acid to alleviate the toxic effects of insecticides in *Vicia faba* L. *Environmental Toxicology* 28: 666-672.
- Terrile MC, Mansilla AY, Albertengo L, Rodríguez MS, Casalongue CA. (2014). Nitric oxide-mediated cell death is triggered by chitosan in *F. eumartii* spores. *Pest Management Science* 71: 668-674.

- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Cameron RK, Park SW, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E, Klessig DF.(2008). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 56: 445-456.

---

### **Condiciones de la 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 Investigador, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período .....".
  - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [infinvest@cic.gba.gob.ar](mailto:infinvest@cic.gba.gob.ar) (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
- C. Sistema SIBIPA:
- a. Se deberá peticionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

---

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