



INFORME PERIODO 2012-2013

1. APELLIDO: Liggieri

Nombre(s): Constanza Silvina

Título(s): Lic. En Biología (Ecología). Dra. en Ciencias Exactas.

Dirección electrónica: cliggieri@biol.unlp.edu.ar

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría Profesional Asistente Mes: Septiembre Año: 2005

ACTUAL: Categoría: Profesional Adjunto. Sesión Directorio 25/05/10. Acta 1319

Mes: Mayo Año: 2010

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Nombre del Proyecto: "Síntesis de péptidos bioactivos de interés alimenticio y farmacéutico, utilizando fitoproteasas autóctonas.". Código PICT-2012-1129.

Período de Ejecución: 2012-2015

Unidad de Ejecución: Laboratorio de Bromatología.

Institución de la que depende la unidad de ejecución: Instituto de Física Aplicada (INFAP). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)- Universidad Nacional de San Luis (UNSL).

Entidad Financiadora: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, Presidencia de la Nación. Programa FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica). Resolución 141/13.

Financiamiento obtenido: Sí

b) Nombre del proyecto: "Obtención de compuestos bioactivos naturales, sintéticos y recombinantes mediante el uso de hidrolasas de plantas autóctonas. Evaluación de las propiedades biológicas". Código X-576.

Período de ejecución: 2010-2014

Unidad de ejecución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Institución de la que depende la unidad de ejecución: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Entidad financiadora: Universidad Nacional de La Plata.

Financiamiento obtenido: Sí

c) Nombre del Proyecto: "Aplicación de fitoproteasas de la flora autóctona en la producción de compuestos bioactivos". Código 02224

Período de Ejecución: 2009-2012. Prorrogado hasta junio del año 2013.

Unidad de Ejecución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Institución de la que depende la Unidad de Ejecución: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Entidad Financiadora: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, Presidencia de la Nación. Programa FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica). Resolución del directorio ANPCyT N° 320/2009.

d) Nombre del Proyecto: “Aplicación de la flora nativa en la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica”. Código: X-613 (Resolución 617)

Período de Ejecución: 2012-2013

Unidad de Ejecución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Institución de la que depende la Unidad de Ejecución: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Entidad Financiadora: Universidad Nacional de La Plata.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Caffini, Néstor Oscar

Cargo Institución: Ex-Investigador Principal CICPBA. Director del LIPROVE. Profesor Extraordinario Consulto. Fac. de Ciencias Exactas. U.N.L.P.

Dirección Electrónica: caffini@biol.unlp.edu.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIProVe)

Dependencia: Departamento de Ciencias. Biológicas. Fac. de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Dirección: Calles 47 y 115. Ciudad: La Plata. C. P: 1900 Prov: Bs. As.

Tel: (0221) 423 5333/0121 (int. 57).

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: Fac. de Ciencias Exactas. UNLP

Dependencia: Departamento de Ciencias Biológicas.

Dirección: Calles 47 y 115.

Ciudad: La Plata C. P: 1900 Prov: Bs. As Tel: (0221) 423 5333/0121 (int. 34)

Cargo que ocupa: Jefe de Trabajos Prácticos. Dedicación Simple. Area: Biología, Especialidad:
Biología

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

En el período informado se llevaron a cabo las actividades que se detallan a continuación:

7.1. Especie *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad “Malcacha” (nombre vulgar: papa andina)

El objetivo principal de este trabajo fue la obtención de péptidos naturales con potencial actividad inhibitoria de la enzima conversora de angiotensina obtenidos a partir de esta especie.

7.1.1. Materiales y Métodos

7.1.1.1. Obtención de extracto crudo de tubérculos de “malcacha” y determinación del contenido de proteínas

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad *malcacha*, provenientes de la Quebrada de Humahuaca, (Jujuy, Argentina). El nombre vulgar de esta especie es “papa andina”. En estos tubérculos se encuentran almacenados inhibidores de proteasas, además de los nutrientes necesarios para esta planta de característica herbácea.¹

Las papas fueron peladas y lavadas con agua destilada fría. Luego se cortaron y trituraron en 150 ml de agua destilada conteniendo 0,1 mM DTT como agente antioxidante a 4°C, utilizando una licuadora a baja velocidad. A continuación se centrifugó diferencialmente a 8000 g durante 30 minutos a 4°C utilizando una centrífuga Hermle Z323K y luego a 15.000 g durante 60 minutos a la misma temperatura. El sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo (EC), a partir del cual se realizarán las reacciones de identificación y caracterización.

La determinación del contenido de proteínas se realizará por el método de Bradford²

7.1.1.2. Determinación de la presencia de actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A en el EC de “malcacha”

a) *Actividad enzimática de Carboxipeptidasa A (CPA)*

Para el ensayo de medición de actividad carboxipeptidásica se añadieron 15 µl de solución de Carboxipeptidasa A (CPA) de páncreas bovino (Sigma-Aldrich), $7,0 \times 10^{-9}$ M, en una cubeta de 1 cm de paso óptico conteniendo 1,5 ml buffer de reacción (Tris-HCl 20 mM NaCl 0,5 M pH 8,0) y

¹ Milan, Dimitri (1987). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Descripción de plantas cultivadas. ACME S.A.C.I, Buenos Aires.

² Bradford, M.B. (1976). “A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry* 72: 528-530.

15 µl de solución 10 mM de sustrato [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] (AAFP). La reacción se llevó a cabo a 37°C. La actividad fue registrada durante 3 minutos por el descenso de la absorbancia a 350 nm (la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja).

b) Actividad inhibitoria de CPA

Para verificar que el EC de papa posee actividad inhibitoria de CPA se modificó el protocolo anterior de la siguiente manera: se incubó a 37°C, 1,4 ml de buffer de reacción con 100 µl de EC de malcacha durante 3 minutos. Seguidamente se agregaron 15 µl de sustrato AAFP y por último 15 µl de la dilución de CPA.

7.1.1.3. Evaluación dosis-respuesta del EC de “malcacha”

Se evaluaron distintas concentraciones de EC de malcacha frente a CPA para determinar la concentración inhibitoria adecuada a utilizar en posteriores ensayos de caracterización enzimática.

Para ello se incubaron diluciones seriadas del EC con la enzima, durante 5 minutos a 37°C, y se evaluó la actividad inhibitoria como se describió anteriormente.

Los resultados de los estudios de inhibición permiten obtener, además, un parámetro muy utilizado en la industria farmacéutica simbolizado como $i_{0,5}^3$. Dicho parámetro expresa la concentración de inhibidor que produce el 50 % de inhibición bajo condiciones estándar.

7.1.1.4. Perfil electroforético del EC de “malcacha”

Se realizó una electroforesis desnaturalizante discontinua al 20% de poliacrilamida del EC para evaluar el perfil de tamaños moleculares que componen a la muestra.

Las muestras a ser sometidas a SDS-PAGE se colocaron en tubos eppendorf conteniendo buffer de muestra con SDS y sin β-mercaptoetanol. Luego se les adicionó β-mercaptoetanol y se las calentó nuevamente durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 5.000 × g durante 5 minutos a 4 °C en una centrífuga Hermle Z 323 K utilizando un rotor 22087 V01. Cuando las muestras se calientan en exceso de SDS y un reactivo tiólico, como el β-mercaptoetanol, la mayoría de los polipéptidos unen el SDS en una relación constante que depende de la masa, de tal forma que la densidad de carga es idéntica y migran en los geles de acuerdo a su tamaño, lo que permite determinar la masa molecular de los polipéptidos separados.

³ Cortés, A; Cascante, M; Cárdenas, M L; Cornish-Bowden, A. (2001) “Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50%inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data”. *Biochem. J* 357, 263-268.

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto con el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad), en placas de vidrio de 7 cm x 8 cm y separadores de 0,75 mm de espesor. En un primer paso se dejó polimerizar el gel de resolución y luego se hizo lo propio con el gel de "stacking".

Previo a aplicar las muestras, lavaron las calles dos veces con agua destilada antes de la siembra y luego se sembraron las mismas (5 a 10 μ l) con jeringa Hamilton.

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad). Los reservorios anódico y catódico se llenaron con buffer de reservorio de pH 8,3. La corrida se realizó en dos etapas de intensidad de corriente constante; la primera etapa, a 20 mA por placa, finalizó cuando el frente de corrida abandonó el gel de stacking; la segunda etapa se corrió a 30 mA por placa evitando superar los 200 V. La electroforesis concluyó cuando el frente de corrida llegó al borde inferior del gel (aproximadamente 90 minutos).

Una vez completada la corrida, los geles se sumergieron durante 30 minutos en la solución fijadora. Luego fueron sumergidas en solución colorante (Coomasie Blue G-250) durante aproximadamente 1 hora. Finalmente el gel se decoloró en solución decolorante 3 veces durante 15 minutos. Con el fin de estimar las masas moleculares de las diferentes bandas proteicas se sembraron en los geles marcadores de bajo peso molecular (P1: rango de 2,5 kDa a 16,94 kDa) y de alto peso molecular (P2: rango de 14,4 kDa a 94 kDa).

7.1.1.5. Tratamiento térmico del extracto crudo

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas ⁴. Las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 60, 70, 85 y 100 °C durante 60 minutos como un paso preliminar de purificación. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 8000 x g por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue posteriormente centrifugado a 15.000 x g durante una hora para clarificar aún más la solución. Finalmente fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente. Para ello se evaluó nuevamente la actividad inhibitoria de CPA.

⁴ Bartová V., Bárta J. (2008). "Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice." *RES. AGR. ENG.*, 54(4): 170–175.

7.1.1.6. Ensayo de actividad inhibitoria de ECA al extracto crudo y a cada tratamiento térmico

La enzima convertora de angiotensina (ECA) es un tipo de metalocarboxipeptidasa. La actividad inhibitoria de esta enzima in vitro fue medida utilizando el sustrato fluorogénico Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH⁵.

Muestras del EC y de los tratamientos térmicos fueron liofilizadas durante 24 horas en liofilizador, luego se resuspendió el sólido en 100 µl de agua bidestilada, concentrando 10 veces la muestra. La actividad inhibitoria de estas muestras fue determinada incubando 3 µl de ECA con 2 µl de una solución de sustrato en DMSO (0,5mg/ml) en presencia de 25 µl de muestra y llevando a un volumen final de 3 ml en una cubeta de cuarzo con buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, conteniendo NaCl 50 mM y Cl₂Zn 10 µM a 37 °C. La reacción se llevó a cabo utilizando un espectrofluorómetro RF-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) registrando el incremento de la fluorescencia (λ_{ex} = 320 nm, λ_{em} = 420 nm) durante 3 minutos. Como control positivo de inhibición se utilizó un stock de Captopril (1 mM en agua), inhibidor sintético de ECA. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos fueron expresados en porcentajes de inhibición (un resultado de 0% corresponde a la mezcla de reacción sin el inhibidor). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.1.2. Resultados

7.1.2.1. Obtención de extracto crudo de tubérculos de “malcacha”

El proceso de obtención del extracto crudo (EC) descrito en 7.1.1.1. permitió obtener un extractivo clarificado, libre de partículas de gran tamaño, tales como gomas, resinas, polisacáridos, mucílagos, etc. La concentración de proteínas presentes en el EC determinada por el método de Bradford fue de 858 µg/ml.

7.1.2.2. Determinación de la presencia de actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A en el EC de “malcacha”

A fin de buscar una nueva molécula inhibidora de la enzima convertora de angiotensina (ECA), se realizó en primer lugar el ensayo de inhibición de CPA para verificar la presencia de estos inhibidores en la muestra, dado que esta enzima es también una metalocarboxipeptidasa y resulta mucho menos costosa que la ECA.

⁵ Carmona, Schwager, Juliano, Juliano, & Sturrock, 2006. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature protocols*, 1(4), 1971-6. doi:10.1038/nprot.2006.306

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1.

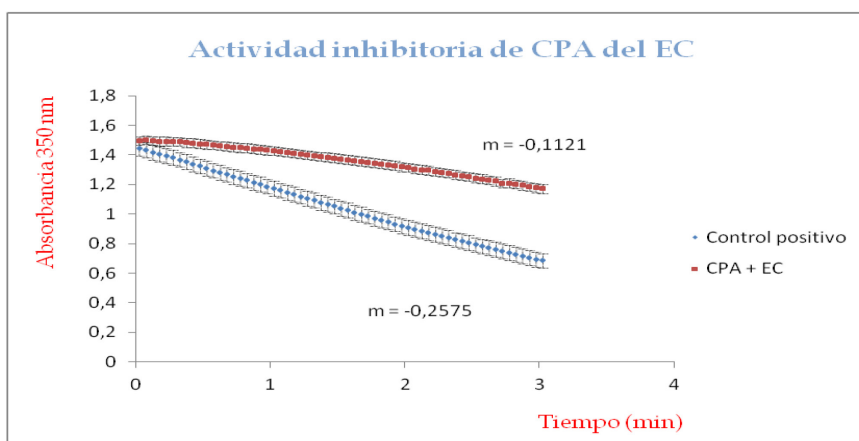


Figura 1: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la CPA con el sustrato sin inhibidor (E.C. malcacha). En rojo se muestra la curva que corresponde a la actividad de la CPA con el sustrato en presencia de EC (inhibidor).

Puede observarse que la curva de incubación del extracto crudo con la CPA presentó una menor pendiente respecto a la curva control de CPA. Es decir, que al incubarse la enzima en presencia del extracto crudo, los componentes del mismo (inhibidores) produjeron una disminución en la actividad de la CPA que justifica la diferencia entre las pendientes. En cambio cuando no hay incubación de la enzima con el EC, ésta hidrolizó el sustrato color naranja.

7.1.2.3. Evaluación dosis-respuesta del EC de “malcacha”

Con el fin de verificar la concentración necesaria de EC para inhibir en un 100% la actividad de CPA se realizaron ensayos cinéticos de actividad inhibitoria en presencia de concentraciones crecientes de EC. En la Fig. 2 se grafica la actividad inhibitoria del EC a diferentes concentraciones utilizadas del mismo.

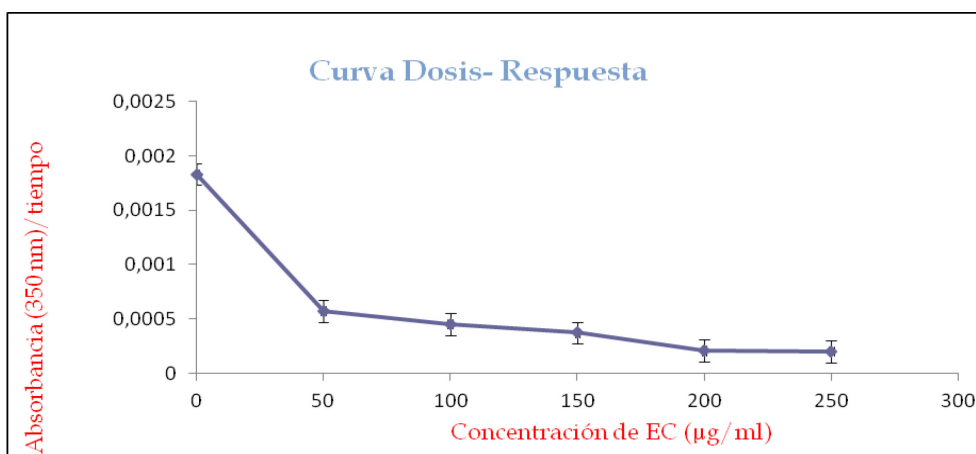


Figura 2: Curva dosis respuesta del Extracto Crudo de “malcacha” frente a Carboxipeptidasa A (CPA).

La curva del gráfico muestra que a medida que crece la concentración de inhibidor (EC), la actividad inhibitoria aumenta hasta alcanzar una concentración de EC de 200 µg/ml, a partir de la cual la actividad de CPA disminuye a un valor mínimo que se mantiene constante con mayores concentraciones de dicho extracto.

La concentración de inhibidor (EC) necesaria para disminuir en un 50 % la velocidad de hidrólisis de la enzima CPA ($I_{0,5}$) fue de aproximadamente 45 µg/ml.

7.1.2.4. Perfil electroforético del EC de “malcacha”

El perfil electroforético del EC mostró una distribución de tamaños moleculares que abarcaron desde los 3000 Da hasta los 100000 Da. (Fig. 3). Entre sus componentes principales podemos destacar: patatinas (esterasas de aprox. 40000 Da), inhibidores de proteasas, entre las que se destacan cisteínicas, serínicas, aspárticas y metalocarboxipeptidasas, con distribución de pesos moleculares variada, abarcando desde los 3000 a 80000 Da ⁶.

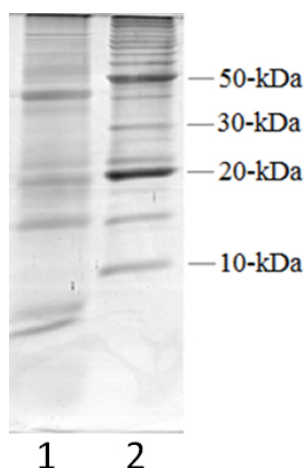


Figura 3: SDS-PAGE del extracto crudo de *Solanum tuberosum* subespecie *andigena* variedad “malcacha”. Calle 1: Extracto crudo. Calle 2: Patrones moleculares (BenchMark™ Protein Ladder)

7.1.2.5. Purificación preliminar de los inhibidores. Tratamiento térmico

Con el fin de separar gran parte de los componentes proteicos y aislar los inhibidores presentes en el EC de malcacha, se procedió a realizar un tratamiento térmico del extracto crudo como etapa preliminar de purificación. Se sabe que los inhibidores de proteasas de tamaño molecular menor a 30 kDa generalmente presentan cierta estabilidad frente a tratamientos térmicos extremos³. Por este motivo se sometió al EC a incubación a distintas temperaturas y se determinó la

⁶ Kim, J. Y., Park, S. C; Hwang, I; Cheong, H; Nah, J. W; Hahm, K. S; Park, Y. (2009). “Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity.” *Int J Mol Sci* 10(6): 2860-72.

concentración de proteína residual luego de cada proceso. Finalmente se evaluó la actividad inhibitoria residual en cada caso.

El EC obtenido se incubó a 60, 70, 85, y 100 °C durante 60 minutos, luego se centrifugó durante 60 minutos a 13958 x g, descartando el pellet y reteniendo el sobrenadante. A cada sobrenadante se lo denominó: TT60, TT70, TT85 y TT100 según el respectivo tratamiento. Se pudo observar que el EC se clarificó notablemente en especial con los tratamientos de 70, 85 y 100°C, donde la concentración final de proteínas determinada por el método de Bradford fue de 156 µg/ml, 91 µg/ml y 63 µg/ml, respectivamente. En cambio el tratamiento a 60°C mantuvo mayor porcentaje de proteínas solubles, obteniendo una concentración final de 316 µg/ml (Tabla 1).

Considerando al EC como un 100% de proteínas en solución, podemos decir que para TT60 mantuvo un 36 % de proteínas en solución; en cambio para TT70, TT85 y TT100 el porcentaje de proteínas solubles fue de 18%, 10% y 7%, respectivamente.

Muestra	Concentración de proteínas
Extracto Crudo	858 µg/ml
Extracto Crudo a 60°C (TT60)	316 µg/ml
Extracto Crudo a 70°C (TT70)	156 µg/ml
Extracto Crudo a 85°C (TT85)	91 µg/ml
Extracto Crudo a 100°C (TT100)	63 µg/ml

Tabla 1. Concentración proteica de cada tratamiento térmico. EC: Extracto Crudo; TT60: Tratamiento Térmico a 60°C; TT70: Tratamiento Térmico a 70°C; TT85: Tratamiento Térmico a 85°C; TT100: Tratamiento Térmico a 100°C.

Los datos de la tabla indican que la concentración de proteínas fue disminuyendo a medida que el extractivo era sometido a mayores temperaturas (desnaturalización térmica). Es de destacar que los tratamientos a 85°C y 100°C prácticamente no difieren en la concentración final de proteínas.

Para verificar si efectivamente las proteínas residuales son inhibidores, se procedió a determinar actividad inhibitoria de CPA a cada extracto tratado, por triplicado.

7.1.2.6. Evaluación de la actividad inhibitoria de CPA frente a cada tratamiento térmico

Tal como se mencionó anteriormente, a cada tratamiento térmico se le determinó actividad inhibitoria de CPA para evaluar el porcentaje de recuperación de estos inhibidores frente a los diferentes ensayos calóricos. Se pudo observar que los tratamientos térmicos no afectaron a la actividad inhibitoria de la CPA; ésta se mantuvo entre un 70 y 90% de la actividad inicial que presentaba el extracto crudo original (Fig. 4). Como se estableció anteriormente, la concentración

de proteínas fue disminuyendo a medida que aumentaba la temperatura de incubación pero la actividad inhibitoria se mantuvo constante, por lo que podemos inferir que en cada tratamiento térmico hay enriquecimiento del inhibidor de CPA y su función biológica no se alteró frente a cada proceso.

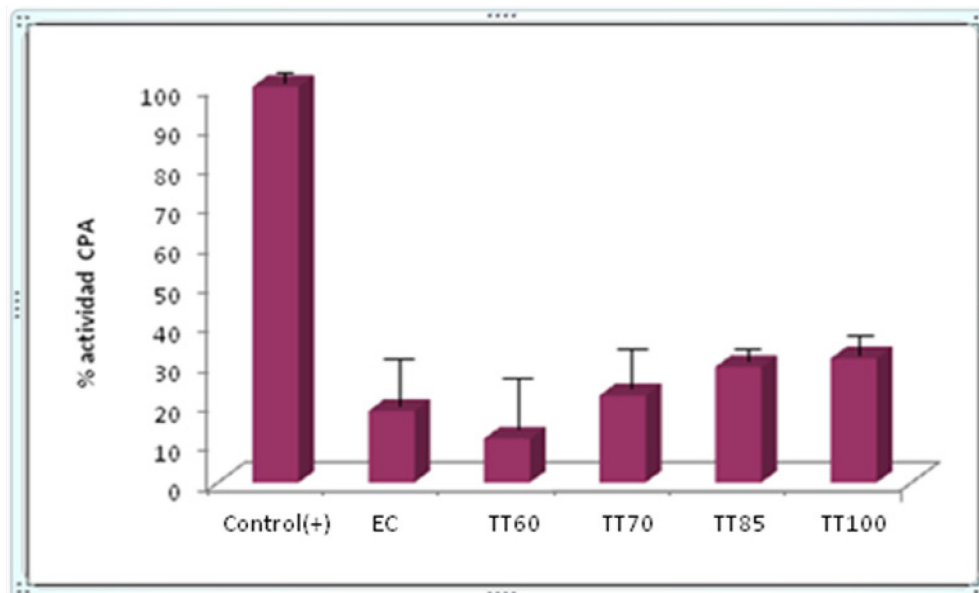


Figura 4. Actividad porcentual de CPA frente los diferentes tratamientos térmicos. Control (+): CPA + Sustrato; EC: CPA + Sustrato + EC; TT60, TT70, TT85 y TT100: CPA + Sustrato + EC tratado a cada temperatura respectivamente.

7.1.2.7. Ensayo de actividad inhibitoria de ECA al extracto crudo y a cada tratamiento térmico

Se procedió a determinar actividad inhibitoria de ECA al extracto crudo de “malcacha” y a los diferentes tratamientos térmicos del mismo.

Si bien confirmamos que el inhibidor de CPA mantuvo su actividad con los diferentes tratamientos térmicos, no pudimos observar inhibición de ECA frente a los mismos. Es por ello, que a priori, se puede concluir que el inhibidor de CPA no inhibe la actividad de ECA.

7.2. Especie *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae)

De esta especie se obtiene un extractivo enzimático en nuestro laboratorio, el cual es enviado periódicamente al Laboratorio de Bromatología perteneciente a la Universidad Nacional de San Luis (UNSL) ubicado en la ciudad de San Luis (Pcia de San Luis, Argentina). Dicho extracto es utilizado por los investigadores del laboratorio para ser probado en distintos tipos de ensayo. Como ejemplo de ellos se puede mencionar la utilización del extractivo como uno de los potenciales componentes de formulaciones de detergentes para lavandería por su contenido de proteasas

alcalinas. En dicho laboratorio se encuentra trabajando la Prof. Dra. Sonia Barberis, quien forma parte del Grupo Responsable del PICT-2007-02224. Este proyecto, el cual tiene como Unidad Ejecutora el Liprove, finalizó en junio de 2013. Es por ello que existe una relación laboral entre el Liprove y el Laboratorio de Bromatología.

Recientemente a la Dra. Barberis le han otorgado un PICT-2012-1129 en el cual ella es la directora del mismo (punto 3.a.), del cual formo parte del grupo colaborador. Es por ello, que el vínculo establecido con el Laboratorio de Bromatología perteneciente al Instituto de Física Aplicada (INFAP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)- Universidad Nacional de San Luis (UNSL), seguirá en vigencia.

Explicaré brevemente lo que está a mi cargo de este proyecto como colaboradora.

Obtención de extractivos crudos, determinación de la actividad proteolítica y cuantificación del contenido de proteínas

Para la **obtención del extractivo** se parte del látex presente en esta especie. Para colectar el mismo, se realizaron incisiones superficiales de los pecíolos de las hojas de *A. curassavica*, lo que produce la exudación de un látex "lechoso" y de características semilíquidas. El mismo fue colectado en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,5 conteniendo 5 mM de EDTA y cisteína. El agregado de EDTA al medio fue necesario a fin de impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo. En el caso de cisteína, la misma se adicionó debido a que permite mantener el medio reductor evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas.

La suspensión obtenida primeramente fue centrifugada a 16,000 x g por espacio de 30 minutos a 4°C con la finalidad de descartar gomas y otros materiales insolubles presentes. Luego, el sobrenadante fue ultracentrifugado a 100.000 g durante 1 h a 4°C. El sobrenadante resultante de la ultracentrifugación, contiendo las proteínas solubles, fue llamado *extracto crudo* (EC). El mismo fue fraccionado y conservado, congelado a -20°C o bien liofilizado, hasta el momento de ser procesado para estudios posteriores.

Con el fin de verificar que el extracto obtenido como se detalló precedentemente, posee actividad enzimática, se realizó el **ensayo de actividad proteolítica** utilizando caseína como sustrato. Dicho ensayo asegura que la muestra presenta actividad enzimática, lo cual otorga al extracto, la capacidad de ser potencialmente viable para ser utilizado en las experiencias que se llevan a cabo en el Laboratorio de Bromatología de la ciudad de San Luis.

La mezcla de reacción contiene 0,1 ml de extracto crudo y 1,1 ml de caseína con cisteína 12 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. La reacción se lleva a cabo en baño termostático a 42°C, y se detiene 20 minutos después por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Cada

tubo de ensayo luego fue centrifugado a 3.000 x g durante 30 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm⁷.

Para expresar la actividad enzimática se definió una unidad arbitraria a la que se llamó *unidad caseinolítica* (Ucas). Dicha unidad expresa la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo⁸.

En cuanto a la **determinación del contenido de proteínas** también se utilizó, al igual que en las otras especies estudiadas, el método de Bradford².

7.3. Colaboración en la realización de distintas técnicas de laboratorio

En este apartado se detallan los distintos ensayos que he realizado como colaboración al estudio de las muestras pertenecientes a las especies *Arctium minus*, *Sylibum marianun* y *Maclura pomifera*. Es por ello que mencionaré brevemente algunas técnicas que ya han sido dadas a conocer en informes anteriores y, otras, que detallaré debido a que en esta ocasión las informo por primera vez. Sin embargo, creo importante señalarlas porque es parte de mi labor desarrollada en el laboratorio a lo largo del presente período. Los resultados de la mayoría de estos experimentos no se muestran debido a que son ensayos de rutina, los cuales tienen como finalidad la obtención de muestras óptimas de las especies estudiadas para utilizarlas en la realización de distintos tipos de experiencias, como por ejemplo la determinación de diferentes actividades antimicrobianas, el empleo como potenciales aditivos en formulaciones de detergentes de lavandería, etc.

7.3.1. Especies *Arctium minus* y *Sylibum marianun* (Fam *Asteraceae*)

Obtención de extractivos crudos, determinación de la actividad coagulante, cromatografía de exclusión molecular e hidrólisis enzimática de lactosuero bovino de los mismos.

Como ambas especies pertenecen a la misma familia, la metodología de preparación de los extractivos crudos, la determinación de la actividad coagulante al igual que la cromatografía de exclusión molecular e hidrólisis enzimática de lactosuero bovino son semejantes, con algunas diferencias que serán remarcadas oportunamente.

Así, para la **obtención de los extractos crudos** se colectaron flores de *A. minus* y *S. marianun*. Dichas flores fueron procesadas de manera independiente, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación: las flores de cada una de las especies fueron trituradas en presencia de N₂ líquido en mortero hasta obtener un polvo fino al cual se le agregó inmediatamente el buffer de

⁷ Arribére, M.C., Cortadi, A.A., Gattuso, M.A., Bettioli, M.P., Priolo, N.S., N.O. Caffini, (1998). "Comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases". *Phytochem. Anal.* **9**: 267-273.

⁸ Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* **19**: 39-49.

extracción (*A. minus*: 0.1 M buffer fosfato, pH 7; 5 mM cisteína; 1.0 mM EDTA. *S. marianum*: 0,1 M buffer cítrico-citrato, pH 3, 5 mM cisteína; 1 mM EDTA) en una relación 1:3. La suspensión obtenida se clarificó por centrifugación; el sobrenadante fue denominado extracto crudo (EC). Este tratamiento se repitió tantas veces como fue necesario al procesar flores frescas colectadas en distintos periodos de tiempo.

Se determinaron las actividades proteolíticas de los ECs midiendo la **actividad coagulante de leche** para cada una de las especies. Para esto se preparó una solución con leche descremada al 10 % (Sam Regim) en solución de CaCl₂ 30 mM ambas conteniendo 0,1% de azida sódica. La mezcla de reacción consistió en 100 µl de muestra por cada ml de leche. Se incubó a 35°C hasta observar la formación de un coágulo macroscópico. Se emplearon extractivos de *Cynara scolymus* (*Asteraceae*)⁹ para realizar los controles positivos de coagulación y buffer de extracción para los controles negativos. La actividad coagulante se expresó en unidades Rennet (UR), la cual expresa la cantidad de enzima que coagula 10 ml de leche a 35°C en 100 segundos, en las condiciones de ensayo.

Con el fin de eliminar pigmentos y otros compuestos de naturaleza fenólica presentes en los extractivos crudos de ambas especies se realizaron **cromatografía de exclusión molecular** en columna PD 10 (Pharmacia) empleando como relleno Sephadex G-25 Fine en el caso de *A. minus* y G-50 Fine para *S. marianum*. La columna correspondiente a *A. minus* se equilibró con buffer ácido cítrico-fosfato de pH 6,2 y se sembraron 1,5 ml de EC. La muestra fue eluida con el mismo buffer con bomba peristáltica. A cada una de las fracciones colectadas se le determinó la absorbancia a 260, 280 y 330 nm y la actividad enzimática residual se determinó midiendo el tiempo de coagulación de leche (leche descremada al 10 % en solución de CaCl₂ 30 mM a 35°C). Las fracciones con actividad coagulante fueron reunidas y constituyeron el extractivo enzimático parcialmente purificado (EE). El contenido de proteínas se midió empleando el método de Bradford², con rango de detección de 10-100 µg de proteína/ml. Se siguió el mismo procedimiento para *S. marianum*, pero en este caso la columna fue equilibrada con buffer fosfato 0,1 M, pH 6, el volumen de siembra de la muestra fue de 3,25 ml y la determinación del contenido proteico también se realizó con el método de Bradford².

Los perfiles de degradación de los hidrolizados del lactosuero bovino se analizaron mediante (SDS-PAGE), de acuerdo a la técnica de Laemmli¹⁰, con algunas modificaciones, en geles de poliacrilamida (resolución: 20%; concentrador: 5%) para el caso de *A. minus*. En cuanto a *S. marianum*, dichos perfiles fueron evaluados por medio de geles de tricina al 16%¹¹.

⁹ Llorente B, Brutti C, Caffini NO, (2004). "Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinases from globe artichoke (*L*)". *J. Agr. Food Chem.* **52**: 8182-8189.

¹⁰ Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

¹¹ Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols.* 1 (1) 16-23.

El sustrato para la hidrólisis enzimática fue una suspensión de lactosuero bovino al 1% (LAC PRODAN 80) en agua destilada. La mezcla de reacción consistió en 4,6 ml de sustrato al que se le adicionó 90 µl del extracto enzimático parcialmente purificado (EE). El ensayo se llevó a cabo a 35 °C. La reacción se detuvo a las 3 y 5 horas llevando los tubos a ebullición (shock térmico) durante 5 minutos. Se emplearon los siguientes controles de la reacción: lactosuero 1% en agua destilada sin la adición de la enzima, con enzima inhibida con pepstatina A (inhibidor específico de proteasas aspárticas) y el último con la enzima inactivada por temperatura previo al inicio del ensayo. Los perfiles de degradación de los hidrolizados del lactosuero bovino se analizaron mediante SDS-PAGE: geles 20% en el caso de *A. minus*⁷ y en geles de tricina para *S. marianun*⁸. Posteriormente los hidrolizados fueron ultrafiltrados en tubos Amicon a 4000 g y las fracciones respectivas de bajo peso molecular (≤ 3000 Da) fueron reservadas para realizar ensayos posteriores.

En el caso de la especie *A. minus* con las fracciones de bajo peso molecular reservadas previamente, se realizaron los análisis de los productos de hidrólisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), tanto para los hidrolizados correspondientes al tiempo 5 horas como al de 3 horas. Para ello se utilizó como equipamiento RP-HPLC (ÄKTA Purifier) utilizando una columna LiChrospher 100 RP-18 (5µm, 250 mm×4mm, Merck). Las condiciones de la cromatografía fueron: solvente A, 0,1% (v/v) TFA en agua; solvente B, 0,1% (v/v) TFA en CH₃CN/ H₂O 50:50. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml/min y la detección se realizó a 215 y 280 nm. Se analizó también por esta técnica el lactosuero empleado como sustrato para la reacción de hidrólisis enzimática. El resultado de este análisis fue utilizado como control del ensayo de hidrólisis.

Los péptidos obtenidos como resultado de esta cromatografía fueron seleccionados y utilizados para ensayar las siguientes actividades biológicas: determinación del poder antioxidante mediante la inhibición de la decoloración del β-caroteno (para ambos tiempos de hidrólisis) y actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (para el tiempo de hidrólisis de 3 horas). Los resultados del poder antioxidante de los péptidos aislados ya fueron informados en el período 2011-2012.

En el presente informe presento los resultados la actividad antihipertensiva de los péptidos aislados por RP-HPLC de los hidrolizados de 3 h de tiempo de hidrólisis. Dicha actividad fue evaluada como la capacidad para inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Es así que se seleccionaron cuatro picos de tiempos de retención de 21,78; 26,5; 27,26 y 34,27 minutos, respectivamente, para realizar el ensayo. La técnica empleada para la realización del ensayo es la que se describe en el ítem 7.1.1.6. para la determinación de actividad antihipertensiva del extracto crudo y de los tratamientos térmicos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad *malcacha*.

Muestra	Porcentaje de inhibición de la ECA
Blanco de enzima	0,0
Blanco 3 h	0,9
Hidrolizado de lactosuero de 3 h	22,0
Pico 21,78 min	1,6
Pico 26,5 min	10,1
Pico 27,26 min	22,4
Pico 34,27 min	4,1
Captopril (dilución 1/40000)	30,0

Tabla 2. Porcentaje de de inhibición de la ECA en muestras de hidrolizados lactosuero (3 h); los picos cromatográficos (RP-HPLC) corresponden a los tiempos de retención; Captopril se utilizó como control positivo.

Como puede apreciarse en la tabla, la fracción de bajo peso molecular (≤ 3000 Da) correspondiente al pico 27,26 min. resultante de la RP-HPLC de hidrolizados parciales (3 horas) de proteínas de lactosuero bovino realizados con los EE presentó actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA).

7.3.2. Especie *Maclura pomifera* (Moraceae)

En referencia a esta muestra colaboré en la búsqueda de actividades biológicas en el lactosuero y en la caseína utilizando los hidrolizados realizados con fitoproteasas pertenecientes a la especie *M. pomifera*. Es así que se investigó si dichos hidrolizados poseen actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la ECA.

7.3.2.1. Determinación de la actividad antioxidante

Para detectar actividad antioxidante en los hidrolizados de esta especie empleando como sustratos proteicos suero y caseína, se utilizaron dos métodos: técnica del DPPH¹² y el método de la inhibición de la decoloración del β -caroteno¹³.

¹² Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H. & Kim, S.K. (2002). "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison", *Plant Science*, 163:1161-1168.

¹³ Tepe, B.; Sokmen, M.; Akpulat, H.A. & Sokmen, A. (2005). "In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey", *Food Chemistry*, 92: 89-92.

A) Hidrolizados de *M. pomifera* utilizando lactosuero como sustrato

En primer lugar, se estudió la actividad antioxidante de los sueros obtenidos de la coagulación de la leche con el EC y con quimosina comercial (tanto aquellos sin filtrar como los filtrados). Las muestras de suero obtenido coagulando con EC, presentaron curvas que indican una mayor inhibición de la decoloración del β -caroteno que las curvas correspondientes a las muestras de suero obtenido con quimosina. Se determinó que las curvas correspondientes al lactosuero se hallan comprendidas entre las de los patrones de ácido ascórbico de 0,01 y 0,1 mg/ml. Por otro lado, siempre se aprecia una mayor inhibición para las muestras sin filtrar que para las filtradas. Esta inhibición podría atribuirse a la presencia de péptidos antioxidantes producto de la hidrólisis producida por el contacto con las proteasas durante la coagulación y resultaría mayor para las muestras sin filtrar porque éstas incluyen todos los péptidos generados. La curva correspondiente al agua destilada se ubica por debajo de todas las demás, funcionando como control negativo.

Se puede concluir que por ambos métodos los sueros obtenidos coagulando la leche con quimosina comercial presentaron menores valores de actividad antioxidante que los sueros de leche coagulada con el EC. Por último, se observa que en comparación con el β -caroteno, el método del DPPH muestra siempre menores porcentajes de actividad antioxidante para una misma muestra. Esto podría deberse a que en la preparación de las mismas se realiza una precipitación con etanol, lo que causaría la pérdida de parte de los péptidos entre los que se incluirían algunos con poder antioxidante.

B) Hidrolizados de *M. pomifera* utilizando caseína como sustrato

No se detectó actividad antioxidante por el método del DPPH en los hidrolizados filtrados, mientras que los valores obtenidos para soluciones de ácido ascórbico de 0,1 y 0,01 mg/ml fueron de $94 \pm 1,1 \%$ y $17 \pm 1,2 \%$, respectivamente.

Aparentemente todos los hidrolizados, excepto el de 10 min, presentan valores similares de actividad antioxidante. A continuación se ensayaron las muestras filtradas por el método de la inhibición de la decoloración del β -caroteno. De manera cualitativa, se observa un comportamiento muy similar para los diferentes hidrolizados inclusive el de 10 min, que había resultado no detectable por el método del DPPH. El control de tiempo 0 min presenta una curva que resultó muy por debajo de todas las demás. Este hecho indicaría que el compuesto responsable de la actividad antioxidante observada en las curvas correspondientes a todos los tiempos de hidrólisis sería un péptido proveniente de la hidrólisis de las caseínas. El control con ácido ascórbico (1 mg/ml) presentó la mayor inhibición de la decoloración.

7.3.2.2. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA

La técnica de esta determinación fue detallada en el punto 7.1.1.6.

A) Hidrolizados de *M. pomifera* utilizando lactosuero como sustrato

De este modo, se evaluó la actividad inhibitoria de la ECA de las distintas muestras de los hidrolizados de lactosuero, utilizado como sustrato, para verificar la presencia de péptidos que inhiban esta enzima. Para el suero obtenido con el EC se obtuvo una inhibición del $21 \pm 1 \%$, mientras que para este mismo filtrado se obtuvo un $11 \pm 2 \%$, lo que indicaría que la filtración disminuye 10% el poder de inhibición de la ECA de la muestra. En comparación, en el suero obtenido coagulando la leche con quimosina (tanto filtrado como sin filtrar) no se detectó actividad inhibitoria. Luego, se procedió a concentrar 5 veces (por liofilización y resuspensión en un volumen menor) las muestras de ambos sueros filtrados y se realizó nuevamente el ensayo. En este caso se obtuvo un $19 \pm 2 \%$ de inhibición para el suero de quimosina y más del doble ($41 \pm 3 \%$) para el obtenido coagulando con el EC.

Finalmente, el valor de IC_{50} hallado para el suero obtenido con EC fue de 16 mg/ml mientras que para el control de captopril resultó de 0,034 μ g/ml. Esto indicaría en principio un bajo poder inhibitorio de la ECA para la muestra de suero, aunque debe tenerse en cuenta que los posibles péptidos responsables de esta actividad se encontrarían en muy baja concentración e inmersos en una muestra compleja, mientras que el captopril es un inhibidor sintético comercial puro.

B) Hidrolizados de *M. pomifera* utilizando caseína como sustrato

También se ensayaron los hidrolizados utilizando caseína como sustrato, con el fin de detectar la presencia de actividad inhibitoria de la ECA y comparar los resultados para los distintos tiempos de hidrólisis. Los máximos valores fueron hallados en los hidrolizados de 180 min ($91,2 \pm 0,3 \%$) y de 60 min ($86,4 \pm 0,2 \%$). Para determinar las IC_{50} se procedió a concentrar ambas muestras por liofilización y resuspensión en diferentes volúmenes de agua bidestilada, obteniéndose 4 concentraciones diferentes respecto de la muestra original. Los valores de IC_{50} resultaron de $2,6 \pm 0,3$ y $4,8 \pm 0,4$ mg/ml, respectivamente.

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1. PUBLICACIONES, CAPITULOS DE LIBROS, COMUNICACIONES, ETC.

8.1.1. PUBLICACIONES DE TRABAJOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Sonia Barberis, Evelina Quiroga, Cristina Barcia and Constanza Liggieri. "Study of alkaline phytoproteases for their application to laundry detergents" *EJB Electronical Journal of Biotechnology*. ISSN 0717-3458. (2013). DOI: 10.225.Vol 16, no 3. <http://dx-doi.org/vol16-issue3-fulltext-1>.

8.1.2. COMUNICACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS

8.1.2.1. Durante, N., Obregón D., Liggieri, C., Bruno, M., Priolo, N. y S. Vairo Cavalli. Liberación de péptidos bioactivos encriptados en proteínas alimentarias utilizando proteasas vegetales. CINTA EXPO 2012. Expo alimentos y bebidas. 3º Congreso Internacional en Nutrición y Tecnología de los alimentos. 9, 10 y 11 de agosto de 2012. Mendoza, Argentina. Libro de resúmenes III CINTA N° 57.

8.1.2.2. Corrons, María Alicia; Bertucci, Juan Ignacio; Liggieri, Constanza Silvina; Cimino, Cecilia Verónica; Bruno, Mariela Anahí. Obtención de hidrolizados de caseínas empleando un extracto de *Maclura pomifera* con posible acción antihipertensiva". CINTA EXPO 2012. Expo alimentos y bebidas. 3º Congreso Internacional en Nutrición y Tecnología de los alimentos. 9, 10 y 11 de agosto de 2012. Mendoza, Argentina. Libro de resúmenes III CINTA N° 61.

8.1.2.3. Liggieri, Constanza S. Muestra de Extensión de compromiso social Universitario, Realizada el día 26 de octubre de 2012. Organizada por la Universidad Nacional de la Plata (UNLP).

8.1.2.4. Martín, MJ; Cisneros JS, Lufrano D, Obregón WD, **Liggieri C.** "Caracterización e identificación de un nuevo inhibidor de proteasas serínicas con potencial aplicación biomédica aislados de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum*". 9 Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (Bio Veg 2013). 7-10 de mayo de 2013. Ciego de Avila. Cuba. Libro de resúmenes BioVeg 2013 pags. 59-60.

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

9.1. CARGO: Jefe de Trabajos Prácticos

Concurso del cargo ejercido: Dedicación simple. Ordinario (N^o 1897). Cargo obtenido por concurso de antecedentes y clase de oposición. Área de Biología Básica (Expte N^o. 700-14517/13-000). Especialidad: Biología General de la Fac. de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Resolución HCA 11-04-13.

9.2. TAREA DOCENTE DE GRADO

Se continuó con la modalidad implementada en el año 2012, tal como fue informado en el periodo anterior. Básicamente se partió de cada unidad temática de conocimientos previos que tenían los alumnos respecto al tema a discutir. Se abordó la clase con una dinámica tipo taller, dando algún texto de trabajo o consigna que dispere una discusión. Se hizo hincapié sobre todo en el sustento experimental de cada teoría o modelo tratado, remarcando sus limitaciones. Los docentes a cargo de la clase desarrollaron alguna cuestión conceptual a lo largo de las horas de discusión. En cuanto a la *Evaluación* se mantuvo un esquema de dos evaluaciones parciales, correspondientes a dos partes de la cursada. El contenido y modalidad de las evaluaciones fueron acordes a la modalidad de ejercitación y discusión de conceptos realizados durante las clases.

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES

10.1. TUTORÍA DE TESINA DE GRADO. FAC. DE CIENCIAS EXACTAS. U.N.L.P.

Tutoría de la alumna Julia Martin para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular que corresponde a la asignatura Laboratorio de Procesos Biotecnológicos (Trabajo Final. Título: “Identificación de inhibidores peptídicos de proteasas con potencial aplicación biomédica obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad “Malcacha”) perteneciente al último año de la carrera. El mismo se realizó en las instalaciones del LIPROVE (Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales) perteneciente al departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

10.2. ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Directora del Proyecto de Extensión: “Un acercamiento al mundo de las proteasas vegetales” (Expte Nro. 700-10670/11-000, resolución N° 0037, 22/02/2012). Este Proyecto se encuentra enmarcado dentro del “Programa de Experiencias Preuniversitarias” de la Facultad de Ciencias Exactas de la U.N.L.P. Se desarrolla con un conjunto de alumnos del 6^{to} Año de la Escuela de Educación Media N° 14 "Carlos Vergara" y del Colegio Lincoln (DIPEGEP N° 4044) ambas ubicadas en la ciudad de La Plata, Pcia de Buenos Aires. Responsable de la organización general, armado y desarrollo del proyecto: elección del temario, preparación y dictado de clases, preparación y puesta a punto de los trabajos prácticos y seminarios. Año 2012.

10.3. REFERATO DE TRABAJOS CIENTIFICOS

10.3.1. Referato del manuscrito AJB-12-2728 (2013). *African Journal of Biotechnology (AJB)* ISSN 1684-5315.

10.3.2. Referato del manuscrito MOLCAB-D-13-00056 (2013). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (MOLCAB)*. ISSN: 1381-1177.

10.3.3. Referato del manuscrito IJBIOMAC-D-13-00262. (2013). *International Journal of Biological Macromolecules (IJBIOMAC)*. ISSN: 0141-8130

10.3.4. Referato del manuscrito MACN acta 421 (2013). *Revista Argentina de Ciencias Naturales del Museo “Bernardino Rivadavia” (MACN)* (CABA, Argentina) ISSN: 0524-949X.

10.4. MIEMBRO EVALUADOR DE PROYECTOS

Evaluación del Proyecto *PICT 2012-0455. FONCYT*. Año 2013.

10.5 MIEMBRO DE JURADO PARA EVALUACIÓN DE TRABAJO FINAL DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS (UNLP)

10.5.1. Integrante del Jurado para evaluar el Trabajo Final de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la alumna María Alicia Corrons realizado bajo la dirección de la Dra. Mariela Bruno. Septiembre de 2012.

Título del Trabajo Final: “*Aplicación de fitoproteasas de *Maclura pomifera* en la liberación de péptidos bioactivos presentes en caseínas bovinas*”.

10.5.2 Integrante del Jurado para evaluar el Trabajo Final de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la alumna María Julia Martín realizado bajo la dirección de la Dr. David Obregón y la Tutoría de Dra. Constanza Liggieri. Febrero de 2013. Título del Trabajo Final: “Identificación de inhibidores peptídicos de proteasas con potencial aplicación biomédica obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Malcacha (papa andina)”.

10.6. REALIZACIÓN DE LA CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN DOCENCIA UNIVERSITARIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Acreditada con Categoría A (Resolución de CONEAU N° 262/13)

Autorizada la inscripción para la realización de la misma por la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Resolución N° 1743. Actualmente en realización.

10.6.1. Detalle de los Cursos y Seminarios cursados y aprobados hasta la fecha

- A) Seminario Intensivo: ***Diseño y Coordinación de los Procesos Formativos***. Docente: Mg. Mónica Ross. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 22/09/2012.
- B) Seminario Intensivo: ***Problemática de la Enseñanza en Campos. Disciplinarios Específicos - Ciencias Naturales***. Docente: Dra. Graciela Merino. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 10 (diez). Fecha: 29/09/2012.
- C) Seminario Intensivo: ***Pedagogía y Universidad***. Docente: Prof. Daniel Suarez. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 28/02/2013.
- D) Seminario intensivo: **Perspectivas sociopolíticas del sistema universitario**. Docentes: R. Marengo y C. Caminos Lagorio. Obligatorio. Primer cuatrimestre, año 2013. Aprobado: 7 (siete). Fecha: 2/08/2013.
- E) Seminario: **Desarrollo e innovación curricular**. Docentes. R. Coscarelli y G. Hernando. Obligatorio. Primer Cuatrimestre, año 2013. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 9/08/2013.

10.6.2. Detalle de los Seminarios cursados y/o en proceso de cursada hasta la fecha

- A) Seminario Intensivo: **Procesos de Evaluación en la Educación Superior**. Docente: Sonia Araujo. Electivo. Primer Cuatrimestre año 2013. Cursado.
- B) Seminario: **Prácticas de Intervención académica**. Docente: Mónica Paso. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre año 2013. En proceso de realización.

C) Seminario: **Taller de Producción del Trabajo Final de la Especialización**. Docentes: Santos y Catino. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre año 2013. En proceso de realización.

10.7. ASISTENCIA A CONFERENCIA

-Participación en calidad de Asistente a la conferencia "*Nuevas subjetividades y transformaciones en los procesos de formación de la Universidad*", a cargo de la Dra. Sandra Carli, en el marco del Ciclo de conferencias: Docencia Universitaria, Problemáticas y Desafíos. Organizada por la Dirección de Capacitación y Docencia de la Secretaría de Asuntos Académicos de la Universidad Nacional de La Plata. Fecha: 18 de junio de 2013.