

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA LIPASA EXTRACELULAR DE *Marinobacter* sp. EMPLEANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA

Partial characterization of an extracellular lipase from *Marinobacter* sp through response surface methodology

Yadira Fernández-Jerí, Amparo I. Zavaleta, Luis Alejandro-Paredes, Victor Izaguirre

Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

En la última década, se ha incrementado la demanda de enzimas de origen microbiano para diversos procesos industriales, por ello, el objetivo del estudio fue la caracterización bioquímica parcial de una lipasa extracelular de *Marinobacter* sp. aislado de las Salinas de Pilluana (San Martín), mediante la metodología de superficie respuesta. Se analizó el efecto de los factores: pH (4,0 - 9,0), temperatura (32,5 - 45,0 °C), tiempo (0,0 - 40,0 min) y las concentraciones de NaCl (0,0 - 10,0%) y CaCl₂ (0,0 - 1,0%), sobre la actividad específica de la enzima mediante el diseño estadístico experimental de Box-Behnken en tres niveles. Además, se determinaron las constantes catalíticas (K_m y V_{max}) y la estabilidad térmica de la enzima. Los parámetros óptimos de reacción de la lipasa de *Marinobacter* sp. fueron pH 7,0; 37 °C y 30 min, usando como sustrato p-NPP. La V_{max} y el K_m de la lipasa fueron 3,1900 U/mg y 0,2428 mM, respectivamente. La actividad enzimática de la lipasa fue estable hasta 45 °C durante 10 min.

Palabras clave: *Marinobacter* sp, lipasa, metodología de superficie respuesta, p-nitrofenilpalmitato.

SUMMARY

In the last decade, has increased the demand for enzymes of microbial origin to diverse industrial processes. Therefore, the aim of these research was the partial biochemical characterization of an extracellular lipase of *Marinobacter* sp isolated from the Salinas de Pilluana (San Martin), using the response surface methodology. Were analyzed the effect of factors such as: pH (4,0 - 9,0), temperature (32,5 - 45,0 °C), time (0,0 - 40,0 min) and the concentrations of NaCl (0,0 - 10,0%) and CaCl₂ (0,0 - 1,0%), on the specific activity through the Box-Behnken experimental statistical design employed in three levels. In addition, were determined the catalytic constants (K_m and V_{max}) and the thermal stability of the enzyme. The optimal reaction parameters to lipase from *Marinobacter* sp. were pH 7,0; 37 °C and 30 min, using as substrate p-nitrophenyl palmitate. The V_{max} and K_m of the lipase were 3,1900 U/mg and 0,2428 mM, respectively. The enzyme activity of lipase was stable up to 45 °C for 10 min.

Keywords: *Marinobacter* sp, lipase, response surface methodology, p-nitrofenil palmitate.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas microbianas de interés industrial presentan ventajas de reacción frente a los catalizadores químicos - y usos en diferentes procesos biotecnológicos limpios y sostenibles. Así, el 90% de enzimas industriales son producidas por fermentación microbiana⁽¹⁾.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, desde microorganismos hasta plantas y animales. La actividad más reconocida de las lipasas es la hidrólisis de triacilgliceroles (grasas y aceites) que produce ácidos grasos y glicerol. Además, estas enzimas catalizan reacciones *in vitro*, tales como esterificación,

transesterificación e interesterificación en medios hidrofóbicos; son estables en solventes orgánicos; presentan amplia especificidad por sustrato y elevada regioselectividad o estereoselectividad en la catálisis⁽²⁾.

Las lipasas, por sus diversas propiedades catalíticas, se usan en la elaboración de detergentes, en las industrias, farmacéutica, textil, cosmética, química, papelera, entre otras. En los últimos años, estas enzimas se emplean en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, en la producción de medicamentos enantioselectivos, agroquímicos y aromatizantes^(1, 3). Sin embargo, solo algunas lipasas microbianas son comercialmente explotadas, en consecuencia, se requiere el continuo estudio de lipasas nativas que presenten amplio rango de sustratos, elevada enantioselectividad y estabilidad⁽⁴⁾.

Las bacterias halófilas se caracterizan por su tolerancia a elevadas concentraciones salinas y pH alcalino. Así, del género *Marinobacter*, se ha descrito actividad lipolítica en *M. hypoliticus* y *M. hydrocarbonoclasticus*; pero no se ha reportado la caracterización de la lipasa de *Marinobacter* sp., bacteria halófila moderada, aislada de las salinas de Pilluana, localizada al nororiente del Perú, que ha demostrado actividad lipolítica frente a diferentes triglicéridos ^(5,6).

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar parcialmente los parámetros cinéticos y factores que afectan la actividad de una lipasa extracelular de *Marinobacter* sp. utilizando la metodología de superficie respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del crudo enzimático

Se utilizó *Marinobacter* sp., bacteria halófila moderada Gram negativa aislada de las salinas de Pilluana (San Martín) ⁽⁶⁾, perteneciente al cepario de microorganismos del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La bacteria se cultivó en medio agua de sales (SW) conteniendo cloruro de sodio 5%, suplementado con extracto de levadura 0,5%, así como aceite de oliva 1% y Triton X-100 0,1% como inductor y emulgente, respectivamente. A 100 mL del medio SW se añadieron 5 mL del cultivo bacteriano en frascos Erlenmeyer de 1 L, luego se incubó a 37 °C por 8 horas a 200 rpm. La biomasa bacteriana se separó del sobrenadante por centrifugación a 5000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo, el mismo que fue filtrado en gradiente en membranas de acetato de celulosa de 0,45 y 0,22 mm, se concentró 5 veces (5X) usando un sistema de ultrafiltración tangencial (Millipore, Alemania) con un cassette de corte molecular 10 kDa, el proceso de filtración y concentración se realizó a 4 °C. La muestra concentrada fue dializada en agua destilada durante 8 horas a 10 °C y se guardó a -20 °C.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad hidrolítica de la lipasa fue evaluada empleando como sustrato el p-nitrofenil palmitato (p-NPP) de la casa Sigma, siguiendo la metodología propuesta por Gupta y col. ⁽⁸⁾, con las siguientes modificaciones: a 1,6 mg de p-NPP se añadió 1 mL de isopropanol; 0,1 mL de Triton X-100 y buffer fosfato 25

mM pH 7 hasta completar 10 mL. Para la determinación de la actividad enzimática se emplearon 1,75 mL de la solución antes descrita y 0,25 mL del crudo enzimático conteniendo la lipasa. La mezcla se incubó por 20 min a 37 °C. La hidrólisis del p-NPP por la lipasa fue determinada por incremento del p-nitrofenol a 410 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitrofenol en un min.

Determinación de proteínas

Se utilizó el reactivo de Bradford siguiendo la metodología propuesta por Amresco, empleando como estándar albúmina sérica bovina (BSA), a las concentraciones de 125, 250, 500, 750 y 1000 μg/mL.

Factores que influyen en la actividad de la lipasa

Se ensayaron los efectos de temperatura, pH, tiempo, concentraciones de cloruro de sodio y calcio, sobre la actividad de la lipasa presente en el extracto crudo, empleando la Metodología de Superficie Respuesta (MRS), con el fin de analizar 5 variables a tres niveles para lo cual se empleó el Diseño Estadístico Experimental (DEE) Box-Behnken, usando el programa Minitab 16, con un total de 40 experimentos y 6 réplicas en el punto central.

Determinación de K_m y V_{max}

La actividad de la lipasa en el extracto crudo se determinó a condiciones óptimas de pH 7,0 y temperatura de 37,0 °C, a concentraciones de p-NPP entre 0,0 y 0,6 mM, manteniendo la concentración de enzima constante. La K_m y V_{max} se determinaron a partir de la curva de dobles recíprocas.

Termoestabilidad de la lipasa

Se pre incubaron alícuotas de 0,1 mL de extracto concentrado a 37, 40, 45, 50, 60, 70 y 100 °C durante 10 min. Después, las muestras se enfriaron e inmediatamente se midieron sus actividades, los resultados fueron expresados en actividades residuales determinadas a 37 °C y pH 7,0.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan las actividades enzimáticas y específicas de la lipasa de *Marinobacter* sp. según el diseño experimental de Box-Behnken. Las variables y sus valores seleccionados fueron: pH (4,0; 7,0 y 9,0), temperatura (5,0; 32,5 y 45,0 °C), tiempo (0, 20 y 40 min), concentraciones de NaCl (0,0; 5,0 y 10,0 %) y CaCl₂ (0,0; 0,05 y 0,1%).

Los efectos individuales de los factores analizados frente a sus respectivas respuestas en actividad específica se presentan en la figura 1. Para este análisis se mantuvieron los parámetros medios como óptimos.

En la figura 2, se presentan las gráficas de contorno que permiten visualizar las superficies de respuesta para el diseño experimental planteado, así en cada gráfica se observa la actividad específica frente a dos factores a la vez, manteniendo los demás fijos a valores medios, la zona más oscura indica la máxima respuesta para cada caso.

Según el análisis de varianza, el modelo de regresión es significativo ($p=0,004$), lo que indica que por lo menos uno de los términos en la ecuación tiene impacto sobre la respuesta media de la actividad específica de la lipasa, y se identifica como significativo al término cuadrático ($p=0,031$). El modelo contiene una sola interacción de dos factores para tiempo y NaCl ($p=0,038$).

La K_m y V_{max} fueron determinadas con la gráfica de Lineweaver Burk, siendo 0,2428 mM y 3,19 U/mg, respectivamente, utilizando p-NPP como sustrato.

La determinación de la resistencia a la inactivación térmica de la lipasa de *Marinobacter* sp. se presenta en la figura 3, la estabilidad se mantuvo hasta los 45 °C, disminuyendo por encima de los 50 °C, hasta perder la actividad a 70 °C.

DISCUSIÓN

El extracto crudo conteniendo la lipasa de *Marinobacter* sp. demostró tener actividad hidrolítica sobre el p-NPP en un rango de temperatura entre 10 y 45 °C siendo la óptima de 37°C (Figura 1A). La actividad específica disminuyó por encima de 38 °C de 0,8 a 0,7 U/mg; pero no disminuyó totalmente, por lo que se infiere que el rango de actividad de la enzima aún puede ser mayor a la descrita. Así las lipasas de *Candida rugosa*, presentan actividad lipolítica entre 20 y 65 °C, con rangos óptimos entre

Tabla 1. Factores que influyen en la actividad enzimática y específica de la lipasa extracelular de *Marinobacter* sp., según diseño estadístico experimental Box-Behnken de superficie respuesta.

N° Experimento	Factores					Act. Enzimática (μmol/minx ml)	Act. Específica (U/mg proteína)
	pH	T (°C)	Tiempo (min)	NaCl (%)	CaCl ₂ (%)		
1	9,0	32,5	20	10	0,05	0,0435	0,2072
2	7,0	32,5	20	10	0,00	0,2135	1,0168
3	7,0	32,5	40	0	0,05	0,8378	3,9893
4	7,0	45,0	20	5	0,10	0,0000	0,0000
5	7,0	32,5	20	5	0,05	0,7018	1,8565
6	4,0	32,5	0	5	0,05	0,0000	0,0000
7	9,0	32,5	20	0	0,05	0,3074	0,8131
8	7,0	32,5	20	5	0,05	0,5984	1,5831
9	9,0	32,5	40	5	0,05	0,1863	0,8872
10	7,0	5,00	20	0	0,05	0,0000	0,0000
11	4,0	32,5	40	5	0,05	0,0048	0,0227
12	7,0	45,0	20	10	0,05	0,1768	0,8419
13	7,0	5,00	40	5	0,05	0,0000	0,0000
14	7,0	45,0	20	0	0,05	0,3182	1,5154
15	7,0	5,00	0	5	0,05	0,0000	0,0000
16	7,0	5,00	20	10	0,05	0,0000	0,0000
17	4,0	5,00	20	5	0,05	0,0000	0,0000
18	7,0	32,5	40	5	1,00	0,2604	1,2402
19	9,0	32,5	20	5	0,00	0,1523	0,7253
20	4,0	32,5	20	0	0,05	0,0136	0,0648
21	7,0	32,5	0	0	0,05	0,1224	0,3238
22	7,0	5,00	20	5	0,00	0,0000	0,0000
23	7,0	32,5	0	10	0,05	0,0408	0,1079
24	4,0	45,0	20	5	0,05	0,0000	0,0000
25	7,0	32,5	20	5	0,05	0,3835	1,8263
26	7,0	32,5	20	10	0,10	0,1414	0,6735
27	4,0	32,5	20	5	0,10	0,0163	0,0777
28	7,0	32,5	20	5	0,05	0,3441	1,6385
29	9,0	45,0	20	5	0,05	0,6922	3,2964
30	4,0	32,5	20	5	0,00	0,0503	0,2396
31	7,0	45,0	40	5	0,05	0,1489	0,7091
32	7,0	32,5	20	5	0,05	0,3441	1,6385
33	9,0	32,5	0	5	0,05	0,0000	0,0000
34	4,0	32,5	20	10	0,05	0,0163	0,0777
35	7,0	32,5	20	0	0,10	0,2026	0,9650
36	7,0	45,0	0	5	0,05	0,0000	0,0000
37	7,0	32,5	40	5	0,00	0,2740	1,3050
38	7,0	5,00	20	5	0,10	0,0000	0,0000
39	7,0	45,0	20	5	0,00	0,2530	1,2046
40	7,0	32,5	0	5	0,10	0,0490	0,2331
41	9,0	5,00	20	5	0,05	0,0000	0,0000
42	7,0	32,5	20	0	0,00	0,7793	3,7109
43	7,0	32,5	40	10	0,05	0,1428	0,6800
44	9,0	32,5	20	5	1,00	0,1428	0,6800
45	7,0	32,5	20	5	0,05	0,3876	1,8457
46	7,0	32,5	0	5	0,00	0,0544	0,2590

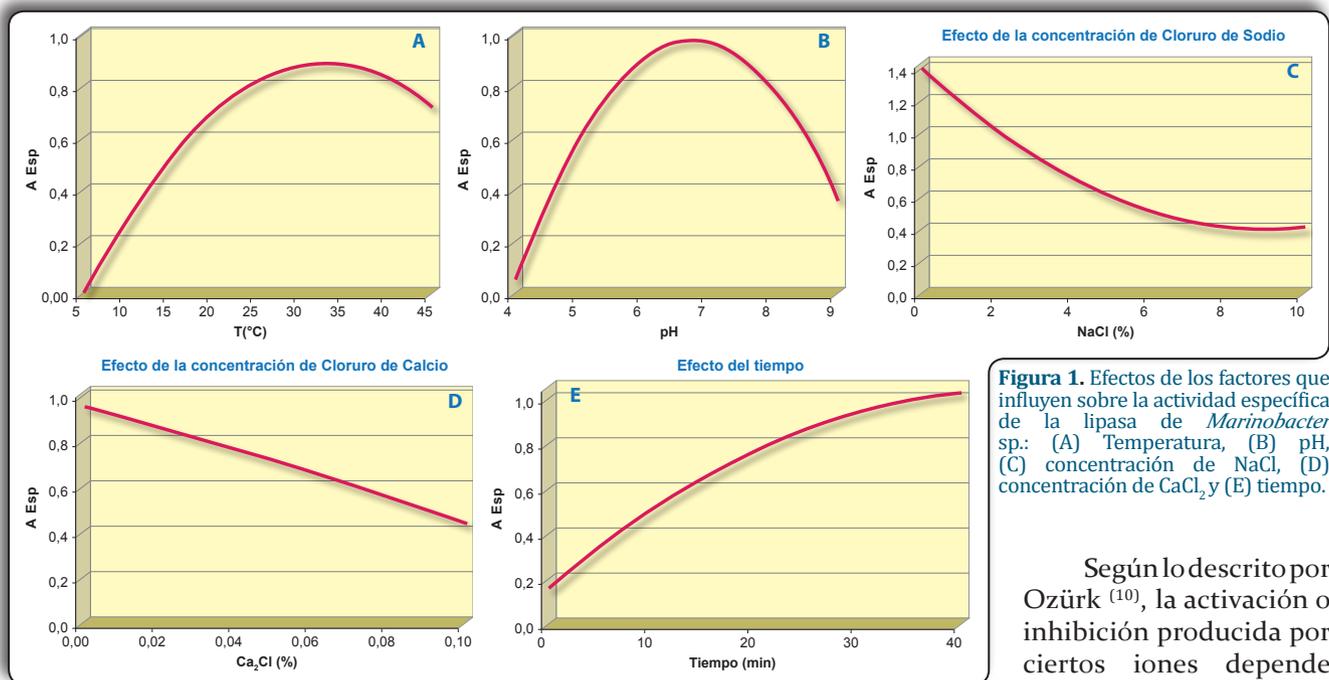


Figura 1. Efectos de los factores que influyen sobre la actividad específica de la lipasa de *Marinobacter* sp.: (A) Temperatura, (B) pH, (C) concentración de NaCl, (D) concentración de CaCl₂ y (E) tiempo.

Según lo descrito por Ozürk⁽¹⁰⁾, la activación o inhibición producida por ciertos iones depende del sustrato empleado, la

30 a 50 °C⁽⁹⁻¹¹⁾. Esta estabilidad térmica de las lipasas se debe al alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, ya que proveen una estructura compacta que evita que la enzima se desnaturalice ante cambios térmicos. Además, González-Bacerio y col.⁽⁹⁾, han reportado que la pureza de la enzima también influye en la temperatura óptima, de modo que las lipasas presentes en preparados crudos, con altas concentraciones de otras proteínas son más estables y exhiben valores mayores al rango óptimo.

La lipasa de *Marinobacter* sp. demostró actividad catalítica a pH de 5,0 y 9,0 con un pH óptimo de 7,0 a 37 °C, el cual está en el rango descrito para lipasas de origen microbiano que presentan mayor actividad entre los pH 7,0 y 8,0. González-Bacerio y col.⁽⁹⁾, describen que las condiciones óptimas de pH dependen del sustrato y tampón empleado, cuando la actividad enzimática se ensaya frente a sustratos específicos como aceite de oliva, tributirina, trioleína y triacilglicéridos.

Al respecto Martín y col.⁽¹²⁾ reportaron el crecimiento óptimo de *Marinobacter lipolyticus* a pH 7,5. En estudios posteriores, Pérez y col.⁽³⁾ aislaron y purificaron la lipasa Lip BL, que presentó actividad hidrolítica a pH entre 6,0 y 10,0 hallándose el óptimo a pH 7,0.

Por otro lado, se investigaron los efectos de los cationes Na⁺ y Ca²⁺ en la actividad de la enzima, ya que han sido descritos como activadores de la actividad de varias lipasas, contrariamente al calcio y sodio que disminuyen la actividad de la lipasa de *Marinobacter* sp. (figuras 1C y 1D).

fuerza de enzima y las condiciones del ensayo. Así el calcio incrementa la actividad de muchas lipasas que emplearon como sustrato el aceite de oliva al producir un cambio conformacional en la enzima, con lo cual se potencia la unión de la lipasa a la interfase agua-aceite.

Por lo descrito previamente, la disminución de la actividad de hidrólisis del p-NPP por la lipasa de *Marinobacter* sp. al incrementar la concentración del Ca²⁺ se puede explicar por el tipo de sustrato empleado.

Las gráficas de contorno (figura 2) permiten observar interacciones entre los factores y la actividad máxima de la lipasa de *Marinobacter* sp. cuando se varían simultáneamente: pH y concentración de CaCl₂ (figura 2A), temperatura y concentración de CaCl₂ (figura 2B), tiempo y concentración de CaCl₂ (figura 2C). La actividad máxima fue mayor a 1,6 U/mg a pH entre 7,0 y 8,0; a 37 °C y 30 min, en los tres casos cuando las concentraciones de cloruro de calcio fueron menores a 0,04%. Además, se observa que a medida que se incrementa el calcio, la actividad específica disminuye. El análisis ANOVA ($p > 0,05$) confirma los resultados, ya que no existen interacciones significativas entre las variaciones de las concentraciones de cloruro de calcio, con el pH, temperatura y tiempo.

A medida que se incrementa el tiempo y la temperatura, la actividad específica aumenta, presentando su valor máximo (mayor a 2 U/mg) por

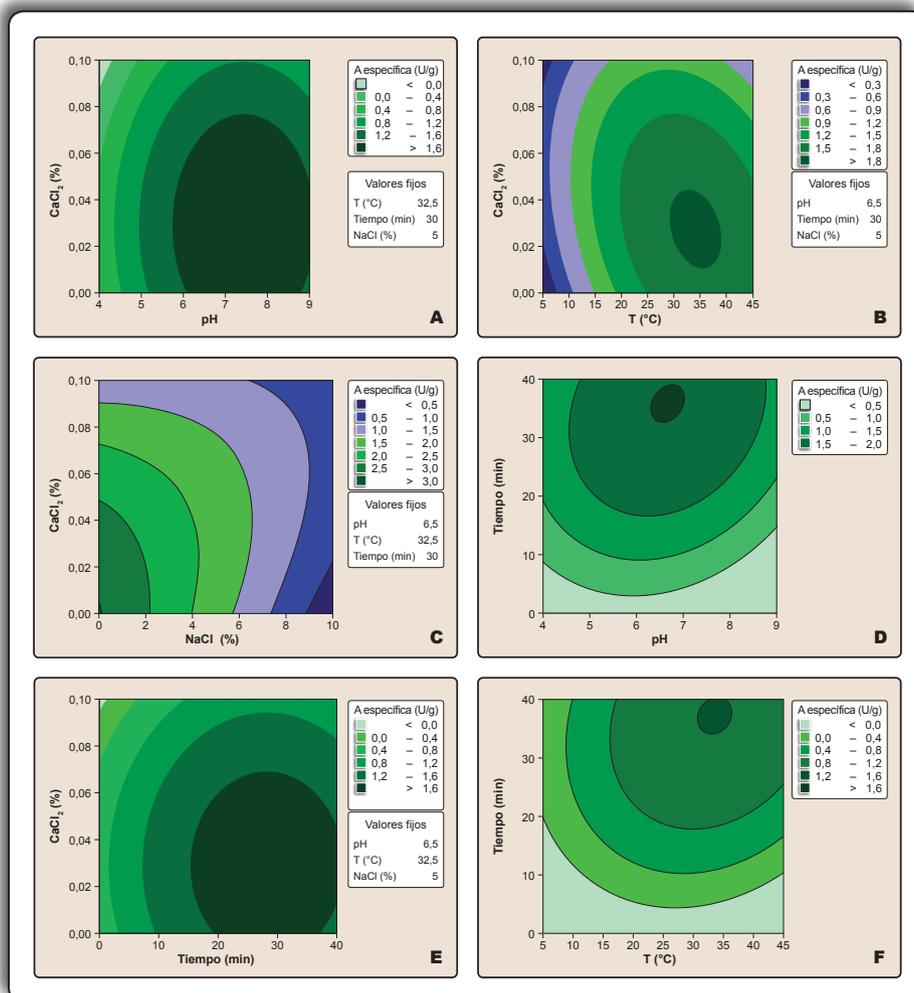


Figura 2. Gráficas de contorno de dos factores y la actividad específica de la lipasa de *Marinobacter* sp. A) CaCl_2 y pH; B) CaCl_2 y temperatura; C) CaCl_2 y NaCl; D) Tiempo y pH; E) Tiempo y CaCl_2 ; F) Temperatura y tiempo.

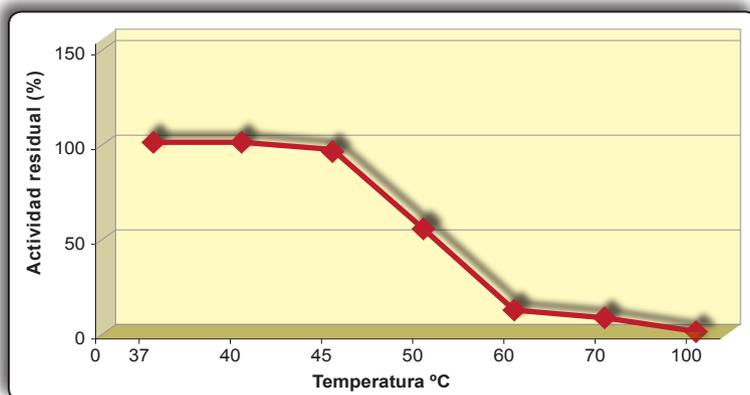


Figura 3. Termoestabilidad de la lipasa extracelular de *Marinobacter* sp.

encima de los 35 °C y 30 min. Comportamiento similar al anterior se observa cuando se varía el tiempo y el pH, con valor máximo a pH 7,0 por encima de 30 min.

De acuerdo al análisis de varianza el pH ($p=0,03$); pH*pH ($p=0,005$), $T(^{\circ}\text{C})*T(^{\circ}\text{C})$ ($p=0,024$), tiempo*tiempo ($p=0,02$), son los factores más significativos sobre la actividad específica del crudo enzimático; además el valor p , para determinar si existe o no interacción entre los diferentes factores no fue significativo ($p=0,262$), con una sola interacción de dos factores para tiempo*NaCl con un valor de $p<0,05$, por lo que el efecto del tiempo en la actividad específica de la enzima varía con la concentración de cloruro de sodio.

La V_{max} y K_m fueron 0,325 U/mg proteína y 2,29 mM, respectivamente. Al respecto se ha descrito que la K_m y V_{max} varían con el tipo de sustrato y con la fuente enzimática. En este sentido, González-Bacerio (9), reportan el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática ensayando en diferentes sustratos y enzimas de diversas fuentes, así la K_m de la lipasa de *Candida rugosa*, utilizando p-nitrofenil butirato y aceite de oliva, fue de 0,0392 mM, respectivamente.

La lipasa de *Marinobacter* sp., contenida en el extracto crudo, se mantuvo estable hasta 45 °C, cuando se empleó el p-NPP como sustrato. A 50 °C la enzima pierde la mitad de su actividad (T_{50}). La estabilidad de esta lipasa fue comparable a la obtenida por Benjamin y Pandey (14), quienes describen la estabilidad entre 35 y 40 °C, de tres lipasas obtenidas de *C. rugosa* DMS 203. Por otro lado, Ruiz y col. (15) ensayaron la estabilidad de la lipasa de *Penicillium candidum* por incubación a diferentes temperaturas durante 10 min, la enzima mantuvo su actividad entre 25 y 35 °C, y la perdió a 75 °C. La estabilidad de la lipasa purificada Lip BL de *Marinobacter lipolyticus* SM19 mostró disminución del 35, 80 y 90% a los 45, 50 y 60 °C, respectivamente, después de una hora de incubación.

CONCLUSIÓN

Se caracterizó parcialmente una lipasa extracelular de *Marinobacter* sp. mediante la metodología de superficie respuesta y se determinó que los factores que influyen en su actividad de hidrólisis del p-NPP fueron pH y tiempo. Los parámetros óptimos fueron pH 7,0; 37 °C y 30 min. La estabilidad de la enzima se mantuvo entre 20 y 45 °C.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado parcialmente por contrato 017/FINCYT/PIBAP/2008 y por el contrato de Subvención N° 031-2011- CONCYTEC – OAJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jaeger K-E, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 315-51.
2. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M van, Missot O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 15(1): 29-63.
3. Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13(4): 390-7.
4. Sharma D, Sharma B, Shukla AK. Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotech* 2011; 10: 23-40.
5. Neelambari V, Vasanthabharathi V, Balasubramanian R, Jayalakshmi S. Lipase from marine *Aeromonas hydrophila*. *Res J Microbiol* 2011; 6 (8): 658-668.
6. Chávez Hidalgo E. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana - San Martín. [Tesis para obtener el grado de Magister]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010.
7. Alejandro Paredes A. Producción en cultivo discontinuo y caracterización parcial de lipasas de *Marinobacter* sp. aislada de las salinas de Pilluana. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico]. Facultad de Farmacia y bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2012.
8. Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem* 2003; 37(Pt 1): 63-71.
9. González-Bacerio J, Rodríguez Hernández J, Del Monte Martínez A. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev Colomb Biotechnol* 2010; 12(1): 124-40.
10. Ozürk B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. [Tesis de maestría]. Departamento de Biotecnología. Universidad de Turquía. 2001.
11. Arroyo M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 1998; 39(2).
12. Martín S, Márquez M, Sánchez-Porro C, Mellado E, Arahál D, Ventosa A. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53: 1383-1390.
13. Pérez D, Martín S, Fernández-Lorente G, Filice M, Guisán JM, *et al.* A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS ONE* 2011; 6(8): e23325.
14. Benjamin S, Pandey A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 1998; 14(12): 1069-87.
15. Ruiz B, Farrés A, Langley E, Masso F, Sánchez F. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. *Lipids* 2001; 36(3): 283-9.

Correspondencia

Nombre: Yadira Fernández Jerí

Dirección: Jr. Puno 1002 - Lima 1 - Perú

E-mail: yfernandezj@unmsm.edu.pe