



Fecha de presentación del Informe: Día  Mes  Año

### Datos generales del Proyecto

Código del proyecto: CI 7927			
Título del proyecto: Biocatalizadores basados en lipasas coimmobilizadas para la síntesis de esteres etílicos de ácidos grasos.			
Facultad o Instituto Académico: Ciencias Naturales y Exactas			
Departamento o Escuela: Química			
Grupo (s) de investigación: GIPAB (escuela de ingeniería de alimentos)			
Investigadores <sup>1</sup>	Nombre	Tiempo asignado	Tiempo dedicado
Investigador Principal	César Alonso Godoy	15h/semana	15h/semana
Coinvestigadores	Aida Rodríguez Stouvenel	5h/semana	5h/semana
Otros participantes	Diego Fernando Rodríguez	20 h/ semana	20 h/ semana
	Jessica Medina	1h/ semana	1h/ semana
	Juan Camilo Sinisterra	20h/semana	20h/semana

### 1. Resumen ejecutivo:

Investigar fuentes de energía y materia primas basadas en recursos renovables constituye el camino para mitigar la dependencia hacia el petróleo y consolidar un modelo de desarrollo sostenible. En Colombia, el biodiesel de palma es el principal biocombustible, sin embargo, debido al uso de catalizadores no renovables, homogéneos y altamente corrosivos su producción industrial es intensiva en energía y agua y requiere materias primas refinadas: esto resulta paradójico para un producto que busca contribuir en la sostenibilidad. Así, la biocatálisis nace como alternativa más verde al actuar en condiciones suaves de reacción y requerir

<sup>1</sup> Todas las personas relacionadas en el informe y que participen en el proyecto deben haber suscrito el acta de propiedad intelectual de acuerdo con los formatos establecidos.



materias primas crudas. Sin embargo, hay retos a superar para extender su uso en la industria (altos precio, baja actividad).

Así, en este proyecto se planteó la inmovilización de lipasas para permitir el reúso de los biocatalizadores obtenidos y que incorporaran lipasas complementarias coinmovilizadas para una mayor actividad frente a biocatalizadores convencionales en la producción de biodiesel de palma (ésteres etílicos de ácidos grasos o FAEEs).

Para obtener biocatalizadores basados en lipasas (BTL2, TLL y CAL B) fue necesario adaptar o desarrollar técnicas de inmovilización en soportes con matrices de agarosa entrecruzada o con polimetilmetacrilato con diferentes grupos funcionales; para BTL2 fue posible modular su inmovilización del grado de aminación y orientación en aldehído-agarosa, obteniéndose biocatalizadores estables y activos en hidrólisis de aceite. *Producto: Artículo A1, revista Process Biochemistry (2014).*

Para determinar la actividad en transesterificación de los biocatalizadores obtenidos, se adaptaron métodos de cuantificación de FAEEs mediante CG-MS y ATR-FTIR, la última, con una inversión de tiempo y recursos hasta un 90% inferior. *Producto: IV Simposio de Química (2014).*

Fue posible determinar que las lipasas mostraban actividades en hidrólisis y transesterificación diferentes según el soporte en que se inmovilizaban. Así, se estableció que TLL y CAL B eran las más activas cuando se inmovilizaban en Lewatit® y en aldehído-agarosa. Según diseño experimental, estas enzimas y el soporte Lewatit® se emplearon para desarrollar metodologías para la co-inmovilización y establecer las condiciones óptimas de reacción. TLL fue inmovilizada en una primera etapa hasta el porcentaje requerido y posteriormente CAL B, tomando como criterio su afinidad por el soporte. Así, se estableció un biocatalizador óptimo con 75% TLL y 25% CAL B en Lewatite® VP OC 1600, al 6% en la mezcla de reacción 3:1 EtOH/Aceite (mol/mol) a 46°C permite obtener porcentajes de conversión por encima de 90% en 48h, siendo 1,2 a 3 veces más activo que los biocatalizadores de referencia y con la capacidad de realizar



15 ciclos de reacción manteniendo un 94% de la actividad inicial. *Producto: IX Simposio de Catálisis Colombiano (2015)*. Las enzimas aminadas y co-inmovilizadas en soporte glioxil-agarosa mostraron conversiones de solo el 30%. *Producto: V Simposio de Química (2015)*.

Concluyendo, demostramos que se producen biocatalizadores estables y más activos en producción de FAEEs cuando CAL B y TLL se encuentran espacialmente cercanas (coinmovilizadas) en las superficies de los soportes y bajo proporciones adecuadas. Así, el conocimiento generado permitirá aplicar la biocatálisis a otras reacciones hidrolíticas donde se requieran enzimas complementarias catalíticamente.

### **Executive summary.**

Finding renewable sources of energy and raw material constitutes the path to mitigate oil dependency and to consolidate a sustainable development model. Palm biodiesel is the main biofuel in Colombia, however, given the current technology based on homogeneous and corrosive catalyst their production is energy and water intensive and requires refined raw material; this is a paradox for a product intended to contribute to energetic sustainability. Therefore, biocatalysis is conceived as a greener alternative since can act under mild reaction conditions with unrefined raw material. However, it is necessary improving biocatalyst costs and activity for their implementation in industry.

Thus, in this work was intended the immobilization of catalytically complementary lipases to facilitate recycling and to increase the activity of the biocatalyst in the production of palm biodiesel (fatty acid ethylic esters or FAEEs) in regard of conventional biocatalysts.

To obtain biocatalysts based on BTL2, TLL and CAL B lipases, it was necessary a previous adaptation and developing of immobilization protocols on macroporous supports based on cross-linked agarose or poly(methyl methacrylate) with different surface groups; modulation of the BTL2 attachment to aldehyde-agarose supports was possible by controlling enzyme amination and orientation, obtaining stable and active biocatalysts in oil hydrolysis.

To quantify biodiesel production activity of the biocatalyst, it was necessary to adapt CGMS and ATR-FTIR techniques, the latter up to 90% more efficient in terms of time and costs.



It was evidenced that hydrolytic and transesterification activities were greatly influenced by the immobilization support. Therefore, it was established that TLL and CAL B were more active in Lewatit<sup>®</sup> and aldehyde agarose when compared with other supports. Following a proper experimental design, these enzymes and the Lewatit<sup>®</sup> support were selected to develop co-immobilization protocols and to establish optimal reaction conditions. Thus, it was found that co-immobilized TLL (75%) and CAL B (25%) on Lewatite<sup>®</sup> at 6% on a reaction mix with 3:1 molar oil- EtOH ratio at 46°C yields up to 90% biodiesel after 48h, being up to 1,5-7,0 times more active than the conventional ones and able to perform fifteen reaction cycles preserving 94% of the initial activity.

In conclusion, we demonstrate that stable and active biocatalysts for the production of biodiesel were obtained when CAL B and TLL are collocated (co-immobilized) in suitable surfaces and proportions. Thus, the contributions of this work will allow applying biocatalysis to other processes when catalytically complementary enzymes are need.



## **SÍNTESIS DEL PROYECTO**

**TEMÁTICA:** Biocatálisis basada en inmovilización de lipasas en soportes macroporosos para la síntesis de ésteres de ácidos grasos (Biodiésel).

### **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar derivados estables y activos basados en dos lipasas coinmovilizadas en soportes macroporosos en condiciones controladas con aplicación en la producción de ésteres de ácidos grasos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- I. Controlar la fracción de cada lipasa (y su cantidad global) en tres soportes macroporosos con superficies hidrofóbicas, iónicas, o que promuevan la interacción de tipo covalente con las enzimas.
- II. Caracterizar los nuevos derivados obtenidos en términos de su actividad hidrolítica, estabilidad térmica y estabilidad frente bioetanol.
- III. Evaluar preliminarmente el rendimiento y la velocidad de producción de FAEEs del derivado más estable en función de su cantidad en la mezcla de reacción; de la relación molar entre aceite de palma: bioetanol y la temperatura.

### **1. METODOLOGÍA**

La estrategia metodológica general se basó en la selección de un/unos soportes macroporosos que al inmovilizarles las lipasas BTL2 (de *Geobacillus thermocatenulatus*), TLL (de *Thermomyces lanuginosus*) y CAL B (de *Candida antarctica*) nativas o modificadas químicamente, permitieran obtener biocatalizadores activos en hidrólisis y síntesis de derivados

de aceites naturales.

Una vez fueran seleccionados los soportes donde cada enzima se mostrara activa, se procedería a co-inmovilizarlas en cada uno de esos soportes y encontrar las mejores condiciones de reacción. Hecho esto, se procedería a establecer la capacidad de re-uso del biocatalizador más activo en síntesis de FAEEs (estabilidad operacional). A continuación se describen los protocolos experimentales generales que permitieron desarrollar los objetivos de investigación:

### **1.1 Métodos asociados al objetivo 1:**

**1.1.1 Protocolo general de inmovilización de lipasas en soportes macroporosos:** las enzimas obtenidas directamente del fabricante se diluyen a una Cf de 10 mg/mL en una *disolución de inmovilización* que podía contener EDTA 5 mM, NaN<sub>3</sub> (0,01 % p/v) y glicerol al 10% al pH adecuado en tampón con fuerza iónica apropiada. El progreso de la inmovilización se sigue mediante medidas a diferentes tiempos de actividad hidrolítica estándar ante butirato de 4-nitrofenilo (*p*-NFB) y cantidad de proteína con ácido bicinconínico (BCA) del *blanco*, del *sobrenadante* y de la *suspensión* de inmovilización [1]. La inmovilización se detiene cuando la relación de actividad frente al blanco se mantiene constante o cuando han transcurrido 48h. El *derivado* obtenido (soporte con enzima inmovilizada) se lava con tampón de inmovilización varias veces y se almacena hasta su posterior uso. Previo a su lavado, para los derivados covalentes (gloxil-agarosa) se añade 1mg de NaBH<sub>4</sub> por mL de suspensión durante media hora.

### **1.1.2 Protocolo general de Co-inmovilización de lipasas en soportes macroporosos:**

Para el soporte que produce derivados activos en hidrólisis y síntesis de biodiésel, la *coinmovilización se realiza en dos pasos*: en el *primer paso*, se inmoviliza a la enzima menos afín por el soporte al *porcentaje de saturación* establecido por el diseño (el 100% se considera a la actividad máxima de enzima que es posible inmovilizar en tal soporte). Después de lavar el derivado obtenido, en un segundo paso, se inmoviliza a la enzima más afín hasta el porcentaje de saturación deseado finalizándose la *coinmovilización*.

### **1.2 Métodos asociados al objetivo 2.**

**1.2.1 Medida de la actividad hidrolítica de los derivados obtenidos:** esta medida se realizó por espectrofotometría UV-VIS en cubeta agitada y termostaticada según protocolo estándar [1]:



*p*-NFB 0,4 mM, en fosfato de sodio 25mM pH 7,0 (en presencia o ausencia de detergentes); en el caso de la actividad de hidrólisis de aceite de pescado para los derivados covalentes de BTL2, esta se realizó en sistema bifásico y mediante HPLC-ELSD [1,2].

**1.2.2 Medida de la actividad de síntesis de FAEEs:** según el diseño experimental, la cantidad deseada de biocatalizador se mezcla con el aceite durante 15 minutos en un agitador termostatzado (Thermomixer C®) a 1700 rpm a la temperatura deseada. Posteriormente se adiciona la cantidad de etanol dando comienzo a la reacción. A diferentes tiempos y una vez decantado el catalizador se toman 60  $\mu$ L de la fase oleosa y se calienta a 46°C por 30 minutos para retirar restos de etanol. Se adiciona 3 mg de sílica seca para retirar restos de glicerol. Cerca de 30uL de sobrenadante se analizan por ATR-FTIR; el porcentaje de conversión se deduce de la respectiva curva de calibración obtenida mediante el valor del área de pico en 1033  $\text{cm}^{-1}$ .

**1.2.3 Estabilidad de los biocatalizadores:** para el biocatalizador más activo y bajo las condiciones de reacción óptimas, se realizan varios ciclos de reacción. Al final de cada ciclo el catalizador se separa por decantación de la mezcla de reacción y se lava 5 veces con 250  $\mu$ L de *tert*-butanol por 10 minutos. Por cada 75mg de catalizador a hidratar se adicionan 50uL de agua y se agita suavemente por 30 minutos a temperatura ambiente quedando listo para ser evaluado en un nuevo ciclo. La estabilidad operacional se deduce del rendimiento en el ciclo N frente al del ciclo inicial.

### **1.3 Métodos asociados al objetivo 3: diseño experimental CCD.**

Para el diseño experimental tipo Diseño Compuesto Central (CCD)[3] se definió como *variable de respuesta* el porcentaje de conversión (FAEEs) y *variables de entrada*, % biocatalizador en la mezcla; Fracción de saturación de cada enzima (TLL y CAL B) en el derivado, relación molar entre aceite de palma y etanol y la temperatura. Mediante el programa Minitab® se diseñan los experimentos, procesan los datos obtenidos y se obtiene el modelo fenomenológico para establecer las condiciones óptimas de reacción.



### RESULTADOS PRINCIPALES

Asociado al objetivo	Descripción
1  <b>Nuevas metodologías: Control de inmovilización</b>	Se controló la intensidad de la unión covalente de la lipasa BTL2 en el soporte Glioxil disulfuro-agarosa mediante aminación de su superficie. En el caso de TLL y CALB fue posible cuantificar y controlar el porcentaje de cada lipasa en los soportes (co-inmovilización) mediante medidas de actividad hidrolítica donde el 100% de cada una lo definió la actividad máxima que podía ser inmovilizada por unidad de masa de soporte: en el soporte covalente Glioxil-agarosa se inmovilizó primero CAL B y después TLL (aminadas) ya que la segunda fue más afín por el soporte ( $t_{1/2}$ de inmovilización: 50' vs. 60' de CAL B); mientras que en el hidrofóbico Lewatit este orden se invirtió ( $t_{1/2-CALB}$ 3h y $t_{1/2-TLL}$ 8h). Así, fue posible generar siete nuevos biocatalizadores basados en lipasas co-inmovilizadas en soportes covalentes e hidrofóbicos.
1-3  <b>Nuevas metodologías: Determinación de Biodiesel étílico (FAEEs) de palma en mezclas con aceite y de reacción.</b>	Con la participación de la estudiante de maestría Jessica Medina (Grupo DARMN), se estableció una metodología de ATR-FTIR hasta 90% más rápida y económica que las cromatográficas para la cuantificación de FAEEs en sus mezclas con aceite de palma y en mezclas de reacción. Las mejores curvas de calibración se construyeron empleando el valor de área de pico en $1033\text{ cm}^{-1}$ ( $R^2=0,997$ ; LD 2,75% w/w; LC 2,87% w/w). La sensibilidad es comparable a la hallada en literatura para FAMEs por FTIR ( $6,6 \times 10^{-3}$ ) [4]. Para la determinación de FAEEs en mezclas de reacción hubo que realizar un pretratamiento para corregir interferencias por el etanol residual y el glicerol obtenido como subproducto.
2  <b>Caracterización en actividad y estabilidad de biocatalizadores</b>	En colaboración con grupos de investigación del ICTAN y el ICP del CSIC (España), encontramos que los biocatalizadores covalentes de BTL2 fueron hasta 2,4 veces más productivos en hidrólisis de <i>p</i> -NFB que los de referencia, con diferentes selectividades en la hidrólisis de aceite (mol EPA/mol DHA de 1 a 2,4) y altamente estables (100% actividad inicial en 20 ciclos de reacción).





<p>2</p> <p><i>(continuación)</i></p> <p><b>Caracterización en actividad y estabilidad de biocatalizadores</b></p>	<p>Los diversos biocatalizadores de CAL B y TLL se mostraron activos en hidrólisis de <i>p</i>-NFB (hasta con 6,51 μmol/min-mg<sub>proteína</sub>-g<sub>soporte</sub>), algunos con alto grado de hiperactivación como TLL en glioxil-agarosa (20 veces con detergente CTAB).</p> <p>Según el diseño experimental y modelo obtenido, el derivado óptimo en síntesis de biodiésel (véase más abajo) conservó el 94% de su actividad en al menos 15 ciclos de reacción, lo que implica que es estable aún en presencia de etanol anhidro o del 96% en condiciones de reacción (46°C). Temperaturas superiores implicaron actividades de solo un 50% de conversión.</p>
<p>3</p> <p><b>Evaluación de la actividad de los biocatalizadores en producción de FAEEs (biodiésel)</b></p>	<p>En síntesis de FAEEs solo fueron activos el derivado iónico TLL-Q-Sepharose®, los derivados de TLL y CAL B en Lewatit® (los más activos) y los Glioxil agarosa de TLL y CAL B aminadas. En general, los derivados de TLL fueron más activos en síntesis de FAEEs que los de CAL B; por ejemplo en 6h TLL-Lewatit® produjo 70% de FAEEs mientras que el de CALB solo un 20%.</p> <p>El biocatalizador óptimo consistió en 75% TLL y 25% de CAL B coinmovilizadas en Lewatit® con 88% de conversión a FAEEs a 6h (46°C, 1700 rpm, al 6% p/p y relación molar 3 EtOH/ 1 aceite); en iguales condiciones los <b>NO</b> co-inmovilizados 100% TLL, 100% CAL B y su mezcla 75%/25% (p/p) produjeron 75%, 30% y 60% de FAEEs, respectivamente. El biocatalizador óptimo conservó el 94 % de su actividad inicial, aún en 15 ciclos de reacción y fue 40% más activo que la referencia (Novozyme 435®) sobre aceite de palma usado o etanol no rectificado.</p>

**CONCLUSIONES – RECOMENDACIONES:**

Demostramos que la inmovilización y coinmovilización óptima de lipasas en transformación de aceites naturales, permite obtener nuevos biocatalizadores muy activos y estables. La co-inmovilización óptima de lipasas complementarias catalíticamente permitió producir un biocatalizador más activo en producción biodiésel que los convencionales (no co-inmovilizados) y bajo condiciones de reacción muy suaves. Esto es acorde con nuestra hipótesis de que los tiempos de difusión de especies químicas co-procesadas por cada lipasa se reducen al estar estas co-localizadas en la misma superficie del soporte.

Se recomienda explorar otros soportes y un mayor número de lipasas para ampliar el espectro de complementariedades catalíticas de modo que los métodos y hallazgos aquí señalados puedan extenderse a obtener catalizadores aún más activos en producción de FAEEs y nuevos biocatalizadores para otro tipo de biotransformaciones.



**2. productos:**

Tabla No. 1. **Cantidad y tipo de productos pactados en el Acta de Trabajo y Compromiso y productos finalmente presentados**

TIPO DE PRODUCTOS	No. de PRODUCTOS PACTADOS		No. de PRODUCTOS PRESENTADOS	
<b>Productos de nuevos conocimientos</b>				
Artículo completo publicado en revistas A1 o A2	0		1	
Artículo completo publicados en revistas B	1		Se publicó Art. A1 (ANEXO 1)	
Artículo completo publicados en revistas C	-		-	
Libros de autor que publiquen resultados de investigación	-		-	
Capítulos en libros que publican resultados de investigación	-		-	
Productos o procesos tecnológicos patentados o registrados	-		-	
• Prototipos y patentes	-		-	
• Software	-		-	
Productos o procesos tecnológicos usualmente no patentables o protegidos por secreto industrial	-		-	
Normas basadas en resultados de investigación	-		-	
<b>Formación de recursos humanos</b>	No. de estudiantes vinculados	No. de tesis	No. De estudiantes Vinculados	No. De tesis
Estudiantes de pregrado				
Semillero de Investigación	2	0	3 (ANEXO 2)	0
Estudiantes de maestría	1	0	1 (ANEXO 3)	0
Estudiantes de doctorado	-	-	-	-
<b>Productos de divulgación</b>				



TIPO DE PRODUCTOS	No. de PRODUCTOS PACTADOS		No. de PRODUCTOS PRESENTADOS	
	No. de ponencias nacionales	No. de ponencias internacionales	No. de ponencias nacionales	No. de ponencias internacionales
Ponencias presentadas en eventos (congresos, seminarios, coloquios, foros)	1	0	1 Nacional (ANEXO 3) y 2 Regionales (ANEXOS 4 y 5).	0
<b>Propuesta de investigación</b>				
Propuestas presentadas en convocatorias externas para búsqueda de financiación.	1		2 (ANEXO 6 y 7).	

**Tabla No. 2. Detalle de productos.**

Para cada uno de los productos obtenidos y relacionados en la tabla anterior, indique la información solicitada para cada uno, anexando copia de las respectivas constancias. Como anexo a esta guía encontrará el instructivo para instructivo para la revisión de informes finales y productos

Tipo de producto:	Artículo Internacional
Nombre General:	Revista: Process Biochemistry Volume 49, Issue 8, August 2014, Pages 1324–1331.
Nombre Particular:	Site-directing an intense multipoint covalent attachment (MCA) of mutants of the <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> lipase 2 (BTL2): Genetic and chemical amination plus immobilization on a tailor-made support.
Ciudad y fechas:	Editorial Elsevier, Agosto de 2014.
Participantes:	César A. Godoy <sup>a,b</sup> ; Blanca de la Rivas <sup>c</sup> ; José M. Guisán <sup>a</sup> .
Sitio de información:	<a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.020">http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.020</a> y ANEXO 1.
Formas organizativas:	a Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain b Grupo de Investigación en Ingeniería de los Procesos Agroalimentarios y Biotecnológicos (GIPAB), Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia c Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN-CSIC, Madrid, Spain



Tipo de producto:	Poster 1 (Regional)
Nombre general:	IV Simposio de Química
Nombre Particular:	Adaptación de la técnica ATR-FTIR para la cuantificación de biodiésel de palma en sus mezclas con aceite de palma y en mezclas de reacción catalizadas por enzimas inmovilizadas.
Ciudad y fechas:	Cali, Octubre 28-31 de 2014.
Participantes:	D.F. Rodríguez, S.L. Aristizábal, J.C. Sinisterra, C.A. Godoy.
Sitio de información:	<a href="http://simposioquimica.univalle.edu.co">http://simposioquimica.univalle.edu.co</a> y ANEXO 4.
Formas organizativas:	Grupo de Investigación en Ingeniería de los Procesos Agroalimentarios y Biotecnológicos (GIPAB), Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia – Laboratorio de Investigaciones en Biocatálisis y Biotransformaciones (LIBB).

Tipo de producto:	Ponencia 1 (Nacional)
Nombre general:	IX Simposio de Catálisis de Colombia
Nombre Particular:	Biocatalizadores basados en lipasas co-inmovilizadas para la producción de esteres etílicos de ácidos grasos (Biodiesel).
Ciudad y fechas:	Cali, Septiembre 7-11 de 2015.
Participantes:	Diego F. Rodríguez Sánchez, César A. Godoy Vargas, Jessica Medina.
Sitio de información:	<a href="http://siccat2015.univalle.edu.co">http://siccat2015.univalle.edu.co</a> y ANEXO 3.
Formas organizativas:	Universidad del Valle.



Tipo de producto:	Poster 2 (Regional).
Nombre general:	V Simposio de Química.
Nombre Particular:	Evaluación y diseño de biocatalizadores basados en lipasas inmovilizadas covalentemente para hidrólisis y transesterificación.
Ciudad y fechas:	Cali, Octubre 14-16 de 2015.
Participantes:	J.C. Sinisterra, C.A. Godoy*.
Sitio de información:	<a href="http://simposioquimica.univalle.edu.co">http://simposioquimica.univalle.edu.co</a> y ANEXO 5.
Formas organizativas:	GIPAB - Laboratorio de Investigación en Biocatálisis y Biotransformaciones (LIBB). Departamento de Química, Universidad del Valle

### 3. Impactos actual o potencial:

Un impacto concreto asociado a esta investigación en lo académico y educativo es que favoreció la creación y financiación de infraestructura del Laboratorio de Investigación en Biocatálisis y Biotransformaciones **LIBB** (Resolución 135 de 2013) dentro del Plan de Condiciones Esenciales de Calidad para Laboratorios de la Universidad del Valle. En este nuevo laboratorio se ejecutó la presente investigación, se está consolidando un espacio para la formación de RRHH (tres estudiantes a graduar entre 2016 y 2017) y la generación de conocimiento en Biocatálisis como un área inédita en el Departamento de Química y para el refuerzo de la respectiva línea del GIPAB.

*La presente versión del informe contiene las observaciones de los evaluadores:*

---

Firma del investigador principal

---

VoBo. Vicedecano de Investigaciones

*Por favor presente su informe impreso y en formato digital en hoja tamaño carta, letra arial 11, con espacios de 1 1/2*