

Hidrógeno

por OSCAR MAURICIO OCHOA ALVAREZ

Fecha de entrega: 08-ago-2019 04:20p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1158687099

Nombre del archivo: 20690_OSCAR_MAURICIO_OCHOA_ALVAREZ_Hidrogeno_150771_1125740951.docx (336.59K)

Total de palabras: 3547

Total de caracteres: 20607

DECIMOQUINTA CONVOCATORIA PARA EL FOMENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y LA INNOVACIÓN 2020

| | |
|--|---|
| Título del proyecto | |
| Evaluación de la producción de hidrógeno y solventes a partir de glicerol empleando una cepa colombiana de <i>Clostridium</i> spp. para ser usada en una biorrefinería. | |
| Campo de acción | Transdisciplinariedad - Aporte al PIM |
| Ambiente | Proyección Social e Investigación pertinentes: El proyecto aborda un problema y busca una solución técnica a un problema ambiental del país. Esto permitirá contribuir al posicionamiento y visibilidad nacional e internacional de la USTA. El proyecto es abordado por un equipo interdisciplinario e interinstitucional. |
| Articulación con funciones sustantivas y el sector social y productivo | |
| Este proyecto busca dar solución a un problema que se presenta en el sector productor de biocombustibles. Mediante el desarrollo de este proyecto se busca incrementar la concentración de solventes e hidrógeno a partir de glicerol. Esto contribuirá en que la investigación pueda aportar a la solución de un problema del país. Adicionalmente, la participación de la Universidad Nacional de Colombia permitirá consolidar el trabajo que desde 2012 se viene desarrollando con ellos en la producción de hidrógeno. Además del aporte en investigación, la información generada se utilizará en el área de termofluidos por constituir energías alternativas contribuyendo a la docencia, y por último la proyección social se verá fortalecida al dar solución a un problema del contexto nacional. | |
| Grupo de investigación | Línea de investigación en la que se inscribe el proyecto |
| GEAMEC – Termofluidos | |

| Nombre del Investigador principal | Enlace CvLAC | Enlace ORCID | Enlace Google Académico |
|-----------------------------------|---|---|---|
| Marco Antonio Velasco Peña | http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001098063 | http://orcid.org/0000-0003-4436-9443 | https://scholar.google.es/citations?user=tqT9rd8AAAAJ&hl=es&oi=ao |
| División | Facultad | Programa | Grupo de investigación |
| Ingeniería | Ingeniería Mecánica | Ingeniería Mecánica | GEAMEC |
| Nombre del Co-investigador | Enlace CvLAC | Enlace ORCID | Enlace Google Académico |
| Oscar Mauricio Ochoa Alvarez | https://scienti.colciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001497866 | | https://scholar.google.es/citations?hl=es&user=Fk5AdqMAAAAJ |

Nit. 860.012.357-6

SEDE PRINCIPAL BOGOTÁ - PBX: (571) 587 87 97. Línea gratuita nacional: 01 8000 111 180
Carrera 9.ª n.º 51-11 / contactenos@usantotomas.edu.co
www.usta.edu.co

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN ABIERTA Y A DISTANCIA
PBX: (571) 595 00 00 ext. 2044 / Carrera 10.ª n.º 72-50 / admisiones@ustadistancia.edu.co
www.ustadistancia.edu.co



| División | Facultad | Programa | Grupo de investigación |
|----------------------------|---|----------------------------|---|
| Ingeniería | Ingeniería Mecánica | Ingeniería Mecánica | GEAMEC |
| Nombre del Co-investigador | Enlace CvLAC | Enlace ORCID | Enlace Google Académico |
| Dolly Montoya Castaño | http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000067474 | | https://scholar.google.es/citations?user=QSFM_QAAAAJ&hl=es&oi=ao |
| División | Facultad | Programa | Grupo de investigación |
| Universidad Nacional | Rectoría-Instituto de Biotecnología | Instituto de Biotecnología | Bioprocesos y Bioprospección |
| Nombre del Co-investigador | Enlace CvLAC | Enlace ORCID | Enlace Google Académico |
| José Mauricio Bernal | http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000281018 | | |
| División | Facultad | Programa | Grupo de investigación |
| Universidad Nacional | Instituto de Biotecnología | Instituto de Biotecnología | Bioprocesos y Bioprospección |

| Resumen de la propuesta | Palabras clave |
|---|--|
| <p>La producción de biodiesel se ha incrementado en el país en los últimos años. En la actualidad se ha llegado a tener 12 plantas productoras en Colombia, con una capacidad de producción cercana a 50 mil toneladas mensuales de biodiesel. Ello ha ocasionado que se incremente la producción de glicerina como un subproducto de dicho proceso, con lo cual los precios internacionales de la misma han caído. Una alternativa para aprovechar este residuo es usarlo como sustrato para la generación productos de alto valor agregado utilizando microorganismos. Mediante la ejecución de este proyecto, se busca realizar la secuenciación de un megaplásmido presente en el genoma de una cepa aislada de suelos colombianos de <i>Clostridium</i> sp, para determinar la organización de los genes involucrados en la producción de solventes e hidrógeno, y así determinar cuál es la mejor estrategia para incrementar la producción de estos metabolitos a escala piloto.</p> | <p>Hidrógeno, <i>Clostridium</i>, solventes, fermentación, ingeniería bioquímica, biorrefinería.</p> |

Problema de investigación

En Colombia la producción de biodiesel ha venido en aumento en los últimos quince años. Las cifras presentadas actualmente por la Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia (Fedebiocombustibles) reporta que en el momento actual hay 12 plantas en funcionamiento a nivel nacional, con una capacidad de producción cercana a 50 mil toneladas mensuales de biodiesel¹, lo cual conlleva a una generación de 5 mil toneladas de glicerol mensuales². Esta



producción tan alta de glicerol ha llevado a que los precios de la glicerina caigan en los mercados globales³. Distintas alternativas para su re-utilización se han venido proponiendo entre ellos la producción de solventes, monómeros e hidrógeno⁴⁻⁶. Bajo el concepto de bio-refinería cada una de las fracciones de materias primas químicas y subproductos obtenidos en el proceso se utilizan para la obtención de un nuevo producto final específico.

En estudios previos el grupo GEAMEC de la Facultad de Ingeniería Mecánica de la Universidad Santo Tomás y el Grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional han trabajado en el aprovechamiento de glicerol para la producción de solventes e hidrógeno⁵⁻⁷. Han logrado productividades del orden de 14.4 mmol/l de hidrógeno a escala laboratorio⁵. Adicionalmente se ha logrado el diseño de un sistema de fermentación a escala 5 litros que consta con un sistema de separación por medio de membranas poliméricas, el cual en el momento actual se encuentra en proceso de patente ante la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (SIC).

A pesar de estos avances, existe limitación por cuanto el metabolismo de los microorganismos no permite que se tenga una mayor producción de hidrógeno y solventes. Mediante la experiencia del grupo del Instituto de Biotecnología en la secuenciación y regulación genética de microorganismos, se ha establecido que es posible modificar la producción por medio de ingeniería bioquímica para el aprovechamiento de los sustratos e incrementar su actividad fermentativa para la transformación del glicerol en hidrógeno y solventes. Es por ello que surge la pregunta: Qué cantidad de solventes e hidrógeno es posible obtener a partir de cepas de *Clostridium* sp. modificacando su regulación genetica usando técnicas de ingeniería bioquímica?

Justificación

La producción de biodiesel ha contribuido con la generación de un número imortante de empleos entre directos e indirectos en Colombia. Sin embargo la producción de glicerol se ha convertido en un problema para las plantas productoras de biodiesel. Es por ello que la transformación de este subproducto en un intermediario en la generación de solventes e hidrógeno termina siendo una oportunidad importante la generación de nuevos procesos. Lograr este aprovechamiento con aislamientos nativos es posible aunque con bajos rendimientos comparados con cepas productoras modificadas genéticamente, por lo cual se requiere la dilucidación de la ruta metabólica empleada, para que mediante ingeniería bioquímica se pueda maximizar la concentración de solventes e hidrógeno. Ello llevará a dar un paso en la estandarización de un bioproceso que aproveche el glicerol residual para la generación de productos de alto valor agregado como son solventes (butanol, acetona y etanol) e hidrógeno así como ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido butírico. De esta manera se lograría dar un mayor aprovechamiento a los sub-productos provenientes de la industria palmicultora en Colombia. Adicionalmente, la posibilidad de generar solventes e hidrógeno, el cual es considerado el combustible del futuro, termina siendo una posibilidad en la cual se aprovecha la biodiversidad y se puedan generar empleos en el mediano plazo.

Objetivo general

Evaluar la producción de hidrógeno y solventes a partir de glicerol empleando cepas silvestres de *Clostridium* sp.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de sustratos, macro y micronutrientes en la producción de metabolitos de alto valor agregado usando cepas de *Clostridium* sp.

Nit. 860.012.357-6

SEDE PRINCIPAL BOGOTÁ - PBX: (571) 587 87 97 Línea gratuita nacional: 01 8000 111 180
Carrera 9.ª n.º 51-11 / contactenos@usantotomas.edu.co
www.usta.edu.co

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN ABIERTA Y A DISTANCIA
PBX: (571) 595 00 00 ext. 2044 / Carrera 10.ª n.º 72-50 / admisiones@ustadistancia.edu.co
www.ustadistancia.edu.co





2. Seleccionar una cepa productora de solventes e hidrógeno.
3. Evaluar el proceso fermentativo a escala laboratorio con una cepa productora de hidrógeno, ácidos y solventes.
4. Escalar el proceso fermentativo hasta una escala de 5 litros.

Estado del arte y marco conceptual

El género *Clostridium* se caracteriza por estar formado por bacterias heterótrofas estrictamente anaerobias, Gram positivas de forma cilíndrica y formadoras de esporas⁸. Muchas de las especies que pertenecen a este género son patógenas, específicamente *C. botulinum* está asociado al botulismo⁹. En general, estos microorganismos tienen capacidad de producción de ácido butírico durante su proceso fermentativo⁵. Además, son una de las especies más estudiadas gracias a su capacidad de producir hidrógeno vía fermentación oscura por medio de dos mecanismos¹⁰:

- Rompimiento de piruvato por medio de la enzima ferredoxina-oxidorreductasa para obtener dióxido de carbono e hidrógeno.
- Gracias a la hidrogenasa el NADH+H a partir de los equivalentes generados en el glucólisis produce hidrógeno, biomasa, acetato, butirato y ATP.

El hidrógeno obtenido por vía biológica es conocido como biohidrógeno. Esta vía de obtención del hidrógeno involucra dos etapas: acidogénesis y solventogénesis en el género *Clostridium*. En la acidogénesis, las moléculas pequeñas como lípidos, aminoácidos y azúcares simples obtenidos en la hidrólisis atraviesan la membrana celular de las bacterias para ser fermentadas anaeróbicamente; los productos de esta etapa son ácidos acético y butírico, hidrógeno y dióxido de carbono y etanol¹¹. En la solventogénesis, se producen solventes tipo butanol, acetona.¹²

Para el cultivo de las cepas de *Clostridium* se requiere del diseño de un medio de cultivo, el cual debe contener la cantidad de nutrientes requeridos por las bacterias para su crecimiento. Para el adecuado crecimiento y reproducción de los microorganismos es necesaria la presencia de compuestos que cubran sus necesidades metabólicas. Es indispensable que en el medio de cultivo se encuentre agua, carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas. El glicerol debido a su estructura química aporta el carbono necesario al medio de cultivo¹³. Además de estos compuestos se requieren otro tipo de elementos como los fosfatos y metales como el hierro, sodio y zinc; siendo más importante el hierro para la enzima hidrogenasa¹³. Los nutrientes comúnmente adicionados a los medios de cultivo para *Clostridium* son: extracto de levadura, K₂HPO₄, KHPO₄, FeSO₄.7H₂O, cisteína, y en algunos casos suplementos de glucosa, como fuente de carbono y energía⁵. La cisteína se adiciona como agente reductor a los medios de cultivo¹⁰. Los medios de cultivo complejos son aquellos que se realizan con ingredientes de origen natural, que no cuentan con una composición conocida. Este tipo de medios necesita suplementos de acuerdo a las necesidades del microorganismo¹³.

El Grupo de investigación de Bioprocesos y Bioprospección fue creado con la finalidad de generar productos y servicios biotecnológicos que contribuyan con el bienestar social y crecimiento económico del país. En la línea de investigación de microorganismos solventogénicos del Grupo de Bioprocesos se aislaron 155 muestras de suelos colombianos de las cuales se obtuvieron 178 aislamientos del género *Clostridium*, y de este total 13 aislamientos produjeron solventes de interés comercial^{4,5}. A partir de ese momento, el Grupo de investigación ha realizado diversos ensayos bioquímicos y moleculares a estas trece cepas promisorias¹⁴ que incluyen la detección y extracción de ADN plasmídico para la determinación de genes de interés implicados en la producción de solventes.



Las técnicas convencionales de extracción de ADN plasmídico implican el principio de lisis alcalina descrito por Birnboim & Doly¹⁵ que se basa en la “desnaturalización alcalina selectiva de ADN cromosómico de alto peso molecular mientras que el ADN circular cerrado covalentemente permanece bicatenario”.

Este método de extracción es efectivo para plásmidos pequeños, pero se vuelve tedioso y consume mucho tiempo cuando se trata de megaplásmidos¹⁶, obteniéndose bajos rendimientos de ADN, siendo la actividad de las nucleasas el principal obstáculo para el aislamiento¹⁷.

Estudios realizados por el Insituto de Biotecnología (tesis en proceso) describen que el protocolo de extracción de plásmidos por lisis alcalina enriquecida presentó muy bajos rendimientos en la extracción de ADNs plasmídicos de las trece cepas nativas de Clostridium demostrando que se comportan de manera diferente a la cepa patrón *C. acetobutylicum* ATCC 824. En este estudio sólo fue posible optimizar una técnica de extracción de megaplásmidos para la cepa patrón y la cepa nativa IBUN 18A.

La producción de estos solventes ha sido asociada con cuatro genes : *ctfA* y *ctfB* que codifican la coenzima A (CoA) transferasa, *adc* que codifica la enzima acetoacetato descarboxilasa y *adhE* que codifica la enzima la aldehído/alcohol deshidrogenasa; estos genes están contenidos en el megaplásmido pSOL1 de 192 kb detectado en la cepa Clostridium acetobutylicum ATCC 824 la cual ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista fisiológico para estudios de biología molecular e ingeniería metabólica¹⁸.

En estudios desarrollados por el Grupo de Investigación de Bioprocesos y Bioprospección, por medio de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se ha estimado el tamaño del genoma y se ha evaluado la presencia de megaplásmidos en las 13 cepas de Clostridium solventogénicos; sin embargo, aún se desconocen los genes implicados en la producción de solventes contenidos en estos megaplásmidos debido principalmente a las dificultades de extracción por los métodos convencionales¹⁹. Es por esto, que lograr estandarizar una técnica para aislar el megaplásmido de una cepa silvestre de Clostridium adquiere relevancia ya que al conocer todo su genoma, se sabrá con exactitud los genes de interés en el proceso fermentativo y de esta manera por técnicas de ingeniería será posible modificar genéticamente una de las cepas silvestres con el fin de mejorar este proceso e incrementar la producción de solventes; por otra parte, muchos de estos grandes plásmidos se han estudiado y en ellos se han encontrado genes que se consideran esenciales para la viabilidad celular como en el caso de *Rhodobacter spheroides*, estos hallazgos han ampliado la posibilidad de que algunos de estos originalmente clasificados como megaplásmidos puedan ser cromosomas²⁰, sugiriendo que el estudio de la secuencia de estos megaplásmidos conducirá a una comprensión más profunda de los mecanismos de la evolución del genoma en procariontes.

Metodología

1. Secuenciación del megaplásmido.

- Se evaluarán dos diferentes metodologías para el aislamiento de ADN plasmídico y una vez se encuentre un ADN de buena calidad y que cumpla con las especificaciones se enviará a secuenciar por medio de la tecnología de nueva generación ILLUMINA® la cual provee secuencias de alta fidelidad y que pueden ser analizadas usando paquetes informáticos de código abierto y así ensamblar las secuencias generadas, se realizarán estudios de genómica estructural y genómica comparativa para determinar la organización de los genes involucrados en la

Referencias bibliográficas

1. Fedebiocombustibles. Distribution of mixture biodiesel and diesel in Colombia. *Statistics of production of biofuels in Colombia* 1 (2019). at <<http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-produccion-titulo-Biodiesel.htm>>
2. Beatriz, A., Araújo, Y. & de Lima, D. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Quim. Nova* **34**, 1–15 (2011).
3. Casallas, I. D. *et al.* Pre-Treatment of Waste Frying Oils for Biodiesel Production. *Chem. Eng. Tra* **65**, 1–6 (2018).
4. Montoya, D. Bioprocesos aplicados a la valorización del glicerol residual en la producción de biodiésel Bioprocesses for adding value to residual glycerol in the production of biodiesel Introducción. **31**, 126–135 (2010).
5. Bernal, M., Tinoco, L. K., Torres, L., Malagón-Romero, D. & Montoya, D. Evaluating Colombian *Clostridium* spp. strains' hydrogen production using glycerol as substrate. *Electron. J. Biotechnol.* **16**, 6 (2013).
6. Jáuregui, M. A., Ladino, A. & Malagón-Romero, D. The effect of the initial concentration of glycerol on the hydrogen produced by strains of the genus *Clostridium* spp. *Int. J. Sustain. Eng.* (2017). doi:10.1080/19397038.2017.1387826
7. Malagón-romero, D. H., Ladino, A., Ortiz, N. & Green, L. P. The Open Fuels & Energy Science Characterization of a Polymeric Membrane for the Separation of Hydrogen in a Mixture with CO₂. 126–136 (2016). doi:0.2174/1876973X01609010126
8. Cárdenas, D. P., Pulido, C., Aragón, Ó. L. & Aristizá-, F. A. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm* **35**, 120–137 (2006).
9. Cassir, N., Benamar, S. & La Scola, B. *Clostridium butyricum*: From beneficial to a new emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 37–45 (2016).
10. Alfonso, F., Páez, A., Zambrano, W. & Torres, D. Evaluación de la producción de hidrógeno usando la bacteria *Clostridium butyricum* en un reactor tipo cstr a escala laboratorio. *Rev. Investig.* **6**, 19–37 (2013).
11. Blanco Londoño, S. A. & Rodríguez Chaparro, T. Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Rev. Chil. Ing.* **20**, 398–411 (2012).
12. Luo, H. *et al.* Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. *Bioresour. Technol.* **253**, 343–354 (2018).
13. Hernández, A. *Microbiología Industrial*. (Editorial Universidad Estatal a Distancia, 2003).
14. Montoya Castaño, D. Producción de solventes de alto valor agregado por cepas nativas de *Clostridium* spp. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **10**, 139–142 (2008).
15. Bimboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1524 (1979).
16. Buchrieser, C., Weagant, S. D. & Kaspar, C. W. Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DNA fragments to ail and pYV probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4371–4379 (1994).
17. Mahony, D. E. *et al.* Rapid extraction of plasmids from *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 521–523 (1986).
18. Cornillot, E., Nair, R., Papoutsakis, E. & Soucaille, P. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *J. Bacteriol.* **179**, 5442–5447 (1997).

19. Quilaguy Ayure, D. M., Suárez Moreno, Z. R., Aristizábal Gutierrez, F. A., Beranl Morales, J. M. & Montoya Castaño, D. Genome analysis of thirteen Colombian clostridial strains by pulsed field gel electrophoresis. *Electron. J. Biotechnol.* **9**, 541–550 (2006).
20. Ng, W. V. *et al.* Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: Megaplasmid or minichromosome? *Genome Res.* **8**, 1131–1141 (1998).

| Presupuesto | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|---|-----------|----------------------------|---------------|
| Horas nómina | | | | | |
| Concepto | Nombre | Escalafón | Horas mes | Sede / Seccional o Externo | Total (\$) |
| Horas Nomina (Investigador Principal) | Marco Antonio Velasco | 5 | 40 | Principal | 17.052.500 |
| | Oscar Mauricio Ochoa | 2 | 30 | Principal | 5.363.750 |
| Horas Nomina (Co-Investigadores) | Dolly Montoya Castaño | Profesora Titular-Universidad Nacional | 5 | Sede Bogotá | \$ 10.000.000 |
| | José Mauricio Bernal | Investigador-Instituto de Biotecnología | 20 | Sede Bogotá | \$ 10.000.000 |

| FINANCIACIÓN | RECURSO | DESCRIPCIÓN | Valor partida | Valor contrapartida (Externa) | Total (\$) |
|---------------|---------------------------------------|--|---------------|-------------------------------|---------------|
| RUBROS | Servicios Técnicos | Se requiere la contratación de servicios de secuenciación de genes aislados y amplificados. La Universidad Nacional colocará como contrapartida los servicios de cromatografía | 8.000.000 | 10.000.000 | \$ 18.000.000 |
| | Salidas de campo | | | | \$ 0 |
| | Equipos | Se requiere la compra de un electrodo de pH para el reactor de la USTA, así como un par de bombas peristálticas y un controlador de pH | 12.000.000 | 0 | \$ 12.000.000 |
| | Materiales, insumos y software | Se requiere la compra de reactivos para el desarrollo del proyecto, así como material de vidrio y laboratorio. La Universidad Nacional aportará reactivos que ellos tienen en stock. | 15.000.000 | 5.000.000 | \$ 20.000.000 |



| FINANCIACIÓN | RECURSO | DESCRIPCIÓN | Valor partida | Valor contrapartida (Externa) | Total (\$) |
|----------------------------|--|---|---------------|-------------------------------|-------------------|
| BOLSAS | Papelería | | | | \$ 0 |
| | Fotocopias | | | | \$ 0 |
| | Material bibliográfico | | | | |
| | Auxilio de transporte | | | | \$ 0 |
| | Movilidad | Se requiere realizar movilidad por parte de docentes de la USTA a presentar los resultados en congresos internacionales | 12.000.000 | 0 | \$ 12.000.000 |
| | Publicaciones (Artículos, proceso editorial y traducción) | Se requiere pagar por la publicación de artículos derivados del proyecto | 4.000.000 | 4.000.000 | \$ 8.000.000 |
| TOTAL DEL PROYECTO: | | | | | 70.000.000 |



Hidrógeno

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

6%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

2%

★ bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 10 words

Excluir bibliografía

Activo