



Formulación de un prototipo TLR6 de biofertilizante a escala laboratorio a partir de una matriz polimérica biodegradable (Alginato de Calcio) con aplicación en restauración ecológica en Bogotá

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, septiembre 2021**



***Formulación de un prototipo TLR6 de biofertilizante a escala laboratorio
a partir de una matriz polimérica biodegradable (Alginato de Calcio) con
aplicación en restauración ecológica en Bogotá***

**Paola Andrea González Moreno
Laura Daniela Valderrama Torres**

Asesor interno:

**Judith Elena Camacho Kurmen
Q.F. Esp. MSc. Dr. en Biociencias**

Asesora externa:

**Carolina Jaime
Rodríguez Microbióloga,
MSc.**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, septiembre 2021**



***Formulación de un prototipo TLR6 de biofertilizante a escala laboratorio
a partir de una matriz polimérica biodegradable (Alginato de Calcio) con
aplicación en restauración ecológica en Bogotá***

APROBADA _____

JURADO _____

ASESORES _____

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, septiembre 2021**

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	9
2.1 Objetivo general	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. Antecedentes	13
4. Marco teórico	17
4.1 Restauración ecológica	17
4.2 Microorganismos utilizados, familias, características	17
4.2.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
4.2.2 <i>Azotobacter spp</i>	19
4.2.3 <i>Lactobacillus casei</i>	21
4.3 Encapsulación celular	22
4.3.1 Métodos que se usan para realizar la encapsulación	23
4.3.1.1 Procesos físicos:	23
4.3.1.2 Procesos químicos:	23
4.3.1.3 Procesos físico - químicos:	23
4.4 Alginato de sodio, goma xantana, carboximetilcelulosa, glicerol, leche descremada	24
4.4.1 Alginato de sodio	24
4.4.2 Goma xantana	25
4.4.3 Carboximetilcelulosa	26
4.4.4 Glicerol	26
4.4.5 Leche descremada	27
4.5 Criterios de selección para encapsulación	27
4.6 Normatividad en Colombia	28
5. Diseño metodológico	29
5.1 Tipo de investigación	29
5.2 Universo, población y muestra	29
5.2.1 Universo.	29
5.2.2 Población.	29
5.2.3 Muestra.	29
5.3 Hipótesis	30
5.4 Variables e Indicadores	30
5.5 Técnicas y procedimientos	30

5.5.1 Activación de cepas bacterianas	30
5.5.2 Preparación del inóculo	31
5.5.4 Selección de los excipientes y formulaciones	32
5.5.5 Formulación excipientes con alginato:	33
5.7 Embalaje, almacenamiento y evaluación de la vida útil	33
6. Resultados	34
6.1. Activación de cepas bacterianas y preparación del inóculo	34
6. 2 Preparación de formulación y encapsulación	35
6.3 Determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos	38
6. 4 Embalaje y almacenamiento de las cápsulas	40
7. Discusión	40
8. Conclusiones	45
9. Recomendaciones	46
Bibliografía	47

Índice de figuras

Figura 1. Morfología <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
Figura 2. Morfología <i>Azotobacter</i> spp	19
Figura 3. Ciclo del Nitrógeno por <i>Azotobacter</i> spp	20
Figura 4. Morfología <i>Lactobacillus casei</i>	21
Figura 5. Mecanismo de gelificación iónica	24
Figura 6. Modelo caja de huevos	25
Figura 7. Estructura de la goma xantana	25
Figura 8. Estructura de la carboximetilcelulosa	26
Figura 9. Estructura del glicerol	27
Figura 10. Escalado de rizobacterias en caldos específicos	31
Figura 11. <i>Luffa cylindrica</i> en cajas en incubadora para eliminar la humedad	36
Figura 12. Formulación líquida de un volumen 200 mL	36
Figura 13. Proporciones distintas de alginato de sodio y goma xantana.	37
Figura 14. Rizobacterias encapsuladas	38
Figura 15. pH de formulaciones	39
Figura 16. Densidad de caldos y formulaciones	39
Figura 17. Recuento bacteriano en caldos y en formulaciones	40

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Azotobacter</i> spp	19
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Lactobacillus</i> spp.	21
Tabla 4. Normas sobre Producción Biofertilizantes y Medio Ambiente en Colombia	
28	
Tabla 5. Variables e indicadores del estudio	30
Tabla 6. Crioprotectantes y excipientes utilizados en las formulaciones	33
Tabla 7. Porcentaje de mezclas en cada formulación	33
Tabla 8. Descripción morfológica macroscópica y microscópica, y pruebas bioquímicas de las rizobacterias.	
34	
Tabla 9. Parámetros evaluados a caldos de las rizobacterias y formulaciones	38

Lista de anexos

Anexo 1. Ficha técnica de la carboximetilcelulosa	53
Anexo 2. Ficha técnica de la goma xantana	55
Anexo 3. Ficha técnica del glicerol	57
Anexo 4. Ficha técnica de la leche descremada	62
Anexo 5. Certificado Transitorio Participación REDCOLSI	65

Resumen

Para la formulación del prototipo TRL6 de biofertilizante que contiene un consorcio de rizobacterias encapsuladas en una matriz polimérica biodegradable como el alginato de sodio; se tomaron 3 cepas de rizobacterias previamente aisladas de la fase 1 y 2 del proyecto y se determinó la pureza de cada cepa, posteriormente se inocularon en tubos con 10 ml de caldo específico para cada microorganismo, luego fueron transferidos a un volumen de 100 ml de caldo para producción de biomasa y finalmente se hizo un pase a 500 ml de volumen final en donde se determinó viabilidad y pureza. Estos fueron utilizados como inóculos para realizar las formulaciones.

Para la encapsulación con alginato se tomaron volúmenes iguales de cada caldo de *Pseudomonas spp*, *Lactobacillus spp*. y *Azotobacter spp*. se transfirieron a un matraz que contenía el alginato de sodio al 2% y el excipiente seleccionado para cada formulación, se tomó la solución con una jeringa y en agitación magnética constante se dejó caer gota a gota a una solución fría de CaCl_2 1M para formar las cápsulas. Por otro lado, se realizaron formulaciones líquidas con el fin de observar características físicas y microbiológicas que permitieran mejorar la estabilidad del biofertilizante a temperatura ambiente.

Como ingrediente activo de la formulación se utilizaron rizobacterias, y aditivos con los cuales se realizó la encapsulación, logrando determinar la matriz polimérica que mejor se adaptó y permitió obtener cápsulas más estables y resistentes, siendo esta el alginato de sodio, finalmente el mejor excipiente para la formación de cápsulas fue la goma xantana debido a que les proporciona dureza.

Palabras claves: Rizobacterias, encapsulación, alginato de sodio, prototipo, restauración ecológica.

1. Introducción

Este trabajo de investigación buscó alternativas que aportarán al conocimiento de la restauración ecológica de ecosistemas terrestres del bosque alto andino formulando un biofertilizante a escala de laboratorio que cumpliera con las características de la normatividad en Colombia. En una fase posterior a este estudio, la formulación adecuada se utilizará inoculando plantas nativas del bosque alto andino a escala de vivero con el fin de evaluar la promoción de crecimiento. Para esto, partimos de la selección de unas cepas previamente identificadas y evaluadas en campo, para diseñar formulaciones o prototipo de un biofertilizante utilizando rizobacterias que han demostrado ser eficientes en promover el crecimiento de plantas, este prototipo se espera que pueda ser evaluado in vivo a escala de vivero. El prototipo corresponde a un nivel TRL6 (Nivel de madurez de tecnología) según Minciencias.

Se ha encontrado que las plantas nativas de alta montaña tropical se caracterizan por su lento crecimiento y más aún cuando los hábitats han sido alterados por actividades humanas tales como la eliminación de la vegetación, la agricultura y ganadería. Además, se siguen utilizando fertilizantes de tipo químico en restauración ecológica para promover el crecimiento de plántulas. El uso de éstos tiene impactos negativos en los ecosistemas, lo que causa que al utilizar las plantas niñeras para la formación de núcleos de restauración en campo, presente una tasa de mortalidad significativa en la etapa de vivero, lo que genera mayores costos en la propagación de semillas y cultivo de plantas nativas.

Razón por la cual se buscaron alternativas que permitieran el restablecimiento del ecosistema, para poder mejorar el crecimiento de las plantas y árboles nativos del bosque Alto Andino. Para ello se implementó una estrategia la cual consistió en el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, que brindan ventajas como fijación de nitrógeno, síntesis de auxinas, citoquinas, vitaminas y hormonas importantes en el crecimiento de plantas.

Sin embargo, no es suficiente la implementación de esta estrategia por sí sola, esta debe ir acompañada de otras como la encapsulación, ya que se ha

observado que la viabilidad y efectividad de las rizobacterias va disminuyendo significativamente con el tiempo. Es por esto que se elaboró la formulación de un prototipo de biofertilizante a partir de la encapsulación de un consorcio bacteriano (*Lactobacillus casei*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter spp*) utilizando una matriz polimérica biodegradable debido a que la encapsulación proporciona protección contra el estrés abiótico y biótico, y permite que las células encapsuladas puedan ser liberadas de forma lenta durante un largo tiempo, además de brindar protección a la planta y a los microorganismos.

Para llevar a cabo la encapsulación de microorganismos se utilizó principalmente el alginato de sodio que es un polisacárido usado como gelificante, como excipientes se utilizó la goma xantana que presenta una viscosidad alta, esta propiedad la convierte en un espesante y estabilizante muy efectivo, y compatible con el alginato para llevar a cabo encapsulación de microorganismos y la carboximetilcelulosa utilizada como emulsificante, agente suspensor, dispersante lo que ayuda a dar mejor consistencia al alginato y como criopreservantes el glicerol y la leche descremada en polvo que permiten preservar los microorganismos utilizados como principio activo en las formulaciones. A raíz de eso surge la pregunta; ¿Cuál es el efecto de las formulaciones de alginato de sodio, goma xantana y carboximetilcelulosa sobre el crecimiento a la hora cero del consorcio de rizobacterias utilizadas como ingrediente activo en la producción a escala de laboratorio de un prototipo de biofertilizante con aplicación en restauración ecológica de bosques altos andinos colombianos?

Por último cabe resaltar que con este proyecto se brindó un mayor conocimiento a los académicos investigadores haciendo un reconocimiento al trabajo realizado desde el Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, a la Facultad de Ciencias de la Salud grupo de Bioprocesos y control y en general a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; así mismo se logró la viabilidad del mismo gracias al apoyo de la Red de Tecnoparque SENA nodo Bogotá y la Universidad Antonio Nariño con el grupo de investigación de Biología celular y funcional e ingeniería de Biomoléculas, aprender sobre la dinámica de interacción con varios grupos de trabajo y conocer los procesos de un laboratorio de investigación.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Formular un prototipo TRL6 de biofertilizante a escala de laboratorio a partir de una matriz polimérica biodegradable (Alginato de Calcio) para su aplicación en restauración ecológica.

2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar las Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PRPG) identificadas previamente, para obtener un escalado del proceso a 500ml en agitador orbital
- Determinar la matriz polimérica biodegradable más eficiente en el proceso de encapsulación del consorcio bacteriano
- Identificar los excipientes compatibles con el consorcio de cepas utilizados para la formulación del prototipo.

3. Antecedentes

Dada la importancia de este trabajo de investigación, se hará una construcción a través de los años, acerca de los principales estudios realizados por expertos académicos y científicos, de las principales normativas vigentes que permiten el desarrollo del tema.

En primer lugar, en 1904 Hitlner observó que las raíces vivas estimulaban ciertos microorganismos del suelo, pero se sabía poco sobre los efectos que estos organismos tienen en las plantas. Este primer descubrimiento se consigna en el artículo de Brown¹ titulado *Sustancias de crecimiento vegetal producidas por microorganismos del suelo y rizosfera*: “Muchas bacterias, especialmente las que se encuentran en la rizosfera y el rizoplano, producen reguladores del crecimiento de las plantas del tipo giberelina o auxina cuando se cultivan en cultivo líquido. Cuando se hizo el test sólo produjo sustancias que favorecen el crecimiento de las plantas. Claramente, la actividad de los reguladores del crecimiento de las plantas es producida por las bacterias del suelo”

Acerca de micorrizas, se encuentra el siguiente artículo *“Interacciones de un hongo micorrízico arbuscular con células co-encapsuladas de Rhizobium trifoli y Yarowia lipolytica inoculadas en un sistema suelo-planta”* de Vassilev et al². Los microorganismos de la rizosfera se caracterizan por algunas actividades como “la mejora del establecimiento de la planta, mayor disponibilidad de nutrientes vegetales, mejora de la absorción de nutrientes y de la estructura del suelo, etc”

A continuación se hace consulta de un artículo titulado *“Evaluation the efficiency of produced Biofertilizer from local Rhizobacteria paddy conditions”* por Alizadeh et al³ En el cual hace énfasis en que algunos investigadores han tenido en cuenta una serie de problemas biológicos, saludables y económicos relacionados con el consumo de fertilizantes químicos que han ocasionado el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno (BNF). “Estas pueden obtener nitrógeno para la planta y además, tienen la capacidad de producir algunos tipos de hormonas de crecimiento, vitaminas, antibióticos y aminoácidos. Por eso se

llaman Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas o PGPR”

Acerca del conocimiento de los integrantes de una comunidad bacteriana que propician un efecto agrobiológico positivo se hizo énfasis en el siguiente artículo llamado “*Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum, Mill)*” por Alfonso et al⁴, su objetivo “era evaluar la efectividad agro biológica de *Azospirillum spp*, en el crecimiento, desarrollo y rendimiento en el cultivo de tomate”. Los resultados demostraron que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* hacen parte de la comunidad microbiana de la rizosfera del tomate y que *Azospirillum* es el género dominante.

También se encontró otro artículo denominado “*Effect of free and encapsulated Pseudomonas putida CC-FR2-4 and Bacillus subtilis CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions*” por Rekha et al⁵, el estudio fue diseñado para desarrollar un protocolo rentable para la entrega de plantas promotoras de crecimiento en plantas(PGPB) e “implicó la detección de dos cepas de PGPB, su rasgos bioquímicos asociados con el crecimiento y regulación de plantas”

En cuanto al diseño metodológico para este proyecto se encontró un artículo con el título “Efficacy of Rhizobacteria strains encapsulated in nontoxic biodegradable gel matrices to promote growth and yield of wheat plants” por Minaxi⁶. En el procedimiento se utilizan dos cepas las cuales son *Pseudomonas fluorescens BAM-4* y *Burkholderia cepacia BAM-12*, éstas se inmovilizaron utilizando alginato de sodio y alginato más leche descremada como vehículo para comprobar la solubilización de fosfato in vitro y se concluyó que tenían una actividad significativamente mayor que el control.

Por otra parte se encontró el artículo llamado “Enhancement of Groundnut Productivity by Inoculation with *Bradyrhizobium* and Rizobacteria under different levels of compost in Sandy Soils” por Rizk⁷, donde se afirma: “La mejora de la modulación y fijación biológica de nitrógeno de las leguminosas por la co-inoculación con microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGP) se convierte en una forma práctica de mejorar la disponibilidad de nitrógeno en forma sostenible en el sistema de producción agrícola”

Según Lupo B, et al⁸, en su artículo “Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones” el alginato de calcio “ha sido uno de los polímeros más empleados para la microencapsulación, este forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para la protección de componentes activos, células o microorganismos sensibles al calor, pH, oxígeno y luz, entre otros factores, a los que son expuestos los alimentos durante el procesamiento y almacenaje”.

En cuanto a la productividad del agua, se encuentra un artículo de Hasanein et al⁹ titulado *The effect of bio-fertilizers and amino acids on tomato production and water productivity under net-house conditions*, donde se describe como es el comportamiento de un cultivo de tomate bajo el tratamiento de biofertilizantes y aminoácidos. “Se utilizaron dos tratamientos con biofertilizantes, a una velocidad de 2 y 4 litros por alimentación y uno de aminoácidos (Delfan) a una velocidad de 200 ppm. El uso de rizobacterias a una velocidad de 4 litros más Delfan (aminoácidos) a una velocidad de 200 ppm aumentó el crecimiento y los caracteres químicos de la fruta, la precocidad y el rendimiento total”

También en Chile se encuentra el artículo *Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de Eucalyptus nitens* por Angulo et al¹⁰ cuyo objetivo “fue caracterizar bacterias rizosféricas y endófitas promotoras del crecimiento de *E. nitens* y determinar los potenciales mecanismos de acción asociados, como la producción de AIA, la solubilización de fosfato y la expresión de la actividad 1-aminociclopropano-1- carboxilato (ACC) desaminasa in vitro”

En relación con la encapsulación con alginato, se encontró el siguiente artículo por He et al¹¹ titulado *Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate*. El cual decía que “los microorganismos encapsulados son biofertilizantes de liberación lenta que se preparan recubriendo bacterias promotoras de crecimiento en plantas con alginato para asegurar una liberación lenta de nutrientes al suelo por difusión o erosión asistida por poros y degradación de cápsulas. Además, las bacterias encapsuladas poseen una vida útil prolongada e incluso pueden

almacenarse a temperatura ambiente durante períodos relativamente largos”

Por otro lado, tenemos el artículo titulado *Natural carriers in bioremediation: A review* de Dzionek et al¹², este artículo resume informes científicos recientes sobre el uso de portadores naturales en la biorremediación, incluida la eficiencia, el impacto del portador en los microorganismos y la contaminación, y la naturaleza de la investigación realizada. La biorremediación de aguas subterráneas o suelos contaminados es actualmente el método más barato y menos dañino para eliminar los xenobióticos del medio ambiente.

Después, se hace la revisión del artículo *Uso de bacterias (Azospirillum spp.) como biofertilizante para el pasto estrella africano (Cynodon nlemfuensis)* por Wingching-Jones et al¹³. El pasto estrella africana es importante en algunas regiones tropicales y puede ser beneficioso el uso de *Azospirillum* como biofertilizante. Se probaron tres cepas de *Azospirillum* en Turrialba, Costa Rica, entre el 2011 y 2013. Dos de las cepas y tres de las mezclas produjeron biomasa forrajera similar como fertilizante químico.

También, se encuentra el artículo titulado *Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (Oryza sativa L.) del Norte de Santander (Colombia)* por Florez et al¹⁴ el cual su objetivo era aislar bacterias asociadas a plantas de arroz cultivadas en suelos del distrito de riego del Río Zulia (Norte de Santander), y determinar su potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal y seleccionar las más promisorias para el desarrollo de biofertilizantes que incrementen el rendimiento de los cultivos regionales.

Por consiguiente, acerca de biofertilizantes bacterianos se encuentra el siguiente artículo *Azotobacter chroococcum como biofertilizante bacteriano potencialmente útil para el algodón (Gossypium hirsutum L.): efecto en la reducción de la fertilización nitrogenada* de Romero et al¹⁵, su objetivo fue evaluar si la aplicación de dos rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal podría reducir la dosis de fertilizante nitrogenado en el cultivo de algodón. Para cumplir con ese objetivo, usaron las cepas *Azotobacter chroococcum* AC1 y AC10 por su habilidad para promover la germinación de semillas y el

crecimiento del algodónero.

4. Marco teórico

4.1 Restauración ecológica

La restauración ecológica es uno de los puntos más importantes ambientalmente hoy en día, ya que en Colombia debido a la destrucción y degradación de ecosistemas se han ido empeorando los problemas ambientales rápidamente a causa de las prácticas agrícolas, ganaderas, industriales y de explotación ¹⁶ que se realizan a diario en el país generando que los cambios en los ecosistemas que pueden llegar a ser irreparables a futuro si no se realiza intervención.

Es por ello por lo que la conservación y restauración de ecosistemas cada día toma más fuerza, aunque esto debe ir de la mano con el aprender a restaurar paisajes, ecosistemas, comunidades y poblaciones de plantas y animales para garantizar sistemas naturales que sean sustentables ¹⁷ ya que no es suficiente con conservar y proteger un ecosistema o parte de él ya que estas acciones por sí solas no tienen mayor impacto sino se llevan a cabo las acciones mencionadas anteriormente.

Por otro lado “la Sociedad para la Restauración Ecológica (SER) define la restauración ecológica como el proceso de ayudar a la recuperación de un ecosistema que se ha degradado, dañado o destruido” Murcia et al¹⁸.

4.2 Microorganismos utilizados, familias, características

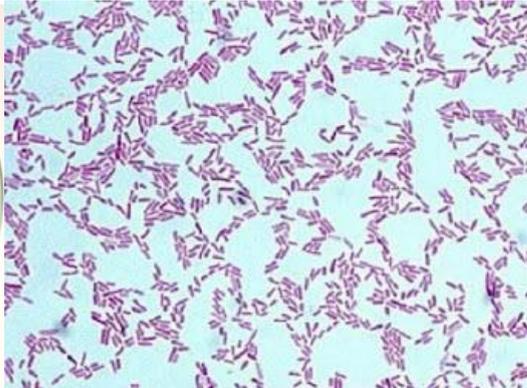
Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas PGPR son benéficas para el suelo ya que estas bacterias tienen la capacidad de colonizar las raíces y promover el crecimiento de la planta a través de acción directa o mediante el control biológico de enfermedades de las plantas¹⁹. Los PGPR también poseen muchas propiedades ventajosas, incluida la fijación de nitrógeno, la disolución de minerales y la síntesis de auxina, etileno, citoquinina, vitaminas y otras hormonas vegetales importantes necesarias para el rápido crecimiento de los cultivos²⁰. Gracias a los beneficios que proporcionan las rizobacterias se ha estado proponiendo trabajar con consorcios de éstas para aumentar dichos beneficios, con la mezcla de estas

bacterias se busca que haya fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y potasio¹⁹.

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó un consorcio microbiano compuesto por tres microorganismos que se ha demostrado que ayudan al crecimiento de plantas y que pueden ser utilizados como biofertilizante, estos son: *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter spp* y *Lactobacillus spp*

4.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Figura 1. Morfología *Pseudomonas fluorescens*



Nutritivo
microscópica.

ente curvados y
su reproducción

... aunque puede crecer en un pH neutro y no crece en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$). Sus flagelos polares hacen posible su movimiento activo en líquido²². Posee un pigmento fluorescente conocido como fluoresceína, esta reacciona frente a la luz ultravioleta. Se puede encontrar en ambientes acuáticos o en el suelo; son conocidas por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas. Su clasificación taxonómica se encuentra en la siguiente tabla

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Pseudomonas fluorescens*

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>

Clase	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Orden	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>

Género	<i>Pseudomonas</i>
--------	--------------------

Tomada de: Perez²³, 2015

Entre las PGPR se encuentran varias especies de bacterias del género *Pseudomonas*. Se ha informado que aumentan el rendimiento y actúan como control biológico de plagas y patógenos debido a su capacidad para producir auxinas, solubilización de fosfatos y producción de sideróforos.

4.2.2 *Azotobacter spp*

Figura 2. Morfología *Azotobacter spp*



Morfología microscópica.

La pared celular compleja y la estructura de peptidoglicano con flagelos peritricos, es característica de este género. Es fijadora de nitrógeno, catalasa positiva. Crece a un rango de pH es 4.8-8.5 el pH óptimo para crecer cuando fija nitrógeno es 7.0-7.5, temperatura de crecimiento a 30°C de 24-48 h. Se encuentra principalmente en suelos²⁵. Su clasificación taxonómica se encuentra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Azotobacter spp*

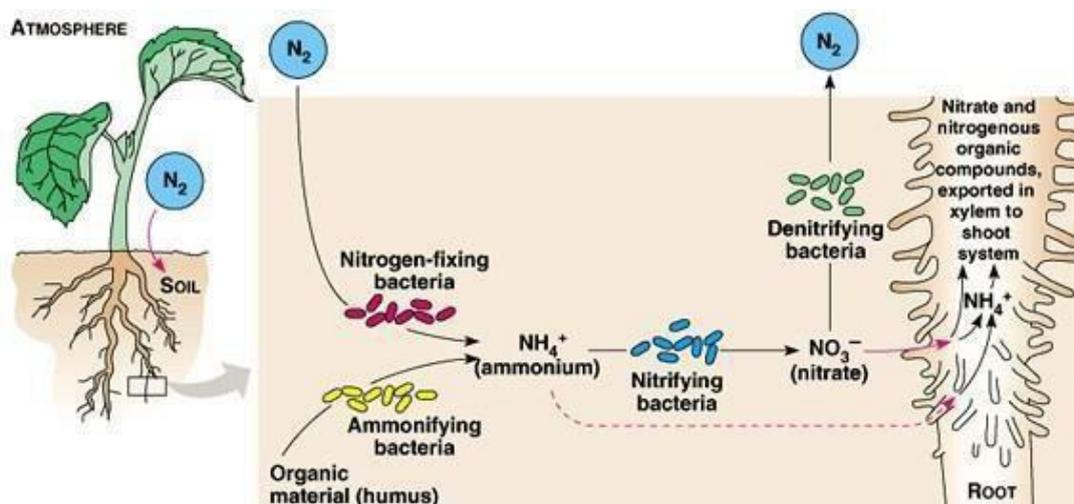
Clasificación taxonómica

Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Orden	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Azotobacter</i>

Tomada de: Contreras²⁶; 2014

Se sabe que *Azotobacter spp* explota el nitrógeno atmosférico para su síntesis de proteínas celulares, que se mineraliza en el suelo, lo que proporciona a las plantas de cultivo una parte considerable del nitrógeno disponible de la fuente del suelo, es sensible al pH ácido, la alta concentración de sal y la temperatura²⁵. La investigación sobre *Azotobacter chroococcum* en la producción de cultivos ha demostrado su importancia para mejorar la nutrición de las plantas y la mejora de la fertilidad del suelo. En otro estudio realizado por Mahato²⁷ menciona que *Azotobacter* es importante en el ciclo del nitrógeno ya que en la naturaleza este se une al nitrógeno atmosférico inaccesible para las plantas y lo libera en forma de iones de amonio dejándolo disponible para las plantas en el suelo; también puede fijar al menos 10 µg de nitrógeno por gramo de glucosa consumida.

Figura 3. Ciclo del Nitrógeno por *Azotobacter spp*



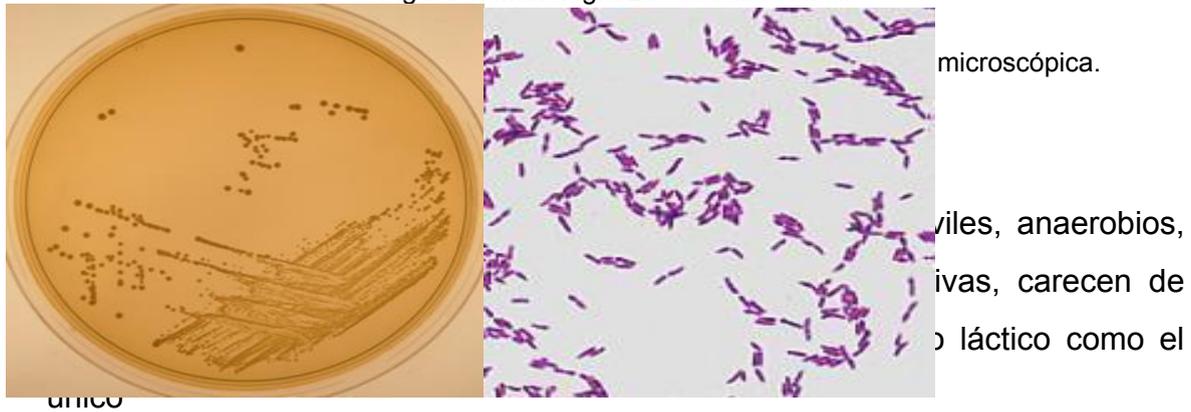
Azotobacter es una bacteria fijadora de nitrógeno que fija el nitrógeno molecular presente en la atmósfera; consta de una serie de enzimas necesarias para la fijación de nitrógeno; esta bacteria toma el nitrógeno atmosférico N_2 y lo transforma en amonio NH_4 gracias al complejo

enzimático

nitrogenasa, la enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas que actúan como donadores de electrones y reductores naturales, la proteína I es llamada también dinitrogenasa o "Fierro-molibdeno-proteína" y la proteína II, es igualmente nombrada dinitrogenasa reductasa o "Fierro-proteína". Fuente: Tierra Overseas²⁸; Auñón²⁹.

4.2.3 *Lactobacillus casei*

Figura 4. Morfología *Lactobacillus casei*



o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Son ácido tolerante pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2 siendo pH óptimo entre 4-4.5; su temperatura de crecimiento es entre 35-42°C, siendo 37°C la temperatura óptima³¹. Su clasificación taxonómica se encuentra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Lactobacillus* spp.

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilo</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Lactobacillus</i>

Lactobacillus además de ser utilizados como probióticos para humanos ya se han aplicado con éxito en el control de enfermedades de las plantas y en la estimulación del crecimiento de las plantas. La aplicación de lactobacilos en combinación con otros microorganismos útiles resultó en la aceleración de la descomposición de materiales orgánicos en el suelo, lo que, a su vez, condujo a una liberación más rápida y mejor de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas³¹.

4.3 Encapsulación celular

Según Lupo⁸ et al en su artículo *Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones* la encapsulación se ha estado fundamentando en la incorporación de una matriz polimérica, que proporciona un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior y protege a los microorganismos, enzimas o sustancias que hayan sido encapsuladas. La técnica de microencapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo (matriz polimérica) formando las cápsulas que tienen variadas aplicaciones o funciones.

“La encapsulación es un proceso aplicado para proteger, mediante un material de recubrimiento o material pared, la estabilidad, biodisponibilidad y conservación de los componentes bioactivos y así mismo la viabilidad en microorganismos. Para la selección de un adecuado material pared se deberán considerar aspectos como costos y propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, peso molecular, transición vítrea/ fusión, cristalinidad, difusividad, formación de películas y propiedades emulsionantes biodegradabilidad y capacidad para formar una barrera entre el interior de la cápsula y sus alrededores³²”

4.3.1 Métodos que se usan para realizar la encapsulación

“Hay varias técnicas como la atomización, liofilización, emulsificación, liposomas y gelificación iónica, que son empleadas para la encapsulación de microorganismos probióticos. La atomización o secado por aspersión es una de las técnicas más usadas para esto, es flexible, segura y económica; partículas de tamaño entre 2 y 3 mm. Los microencapsulados son habitualmente distribuidos en polvo o incorporados en matrices alimenticias, en plaguicidas, en fármacos, entre otros; en sus diferentes aplicaciones”³³.

4.3.1.1 Procesos físicos:

- **Secado por pulverización:** Se fundamenta en la solidificación de un fluido por medio de su atomización (en gotas minúsculas) en un medio de secado, principalmente en caliente³⁴.

4.3.1.2 Procesos químicos:

- **Polimerización interfacial:** Se fundamenta en la polimerización de un monómero en la interfase de 2 sustancias inmiscibles, conformando una membrana que dará sitio a el muro de las microcápsulas³⁴.
- **Incompatibilidad polimérica:** En este procedimiento se usa el fenómeno de división de bases, en una mezcla de polímeros químicamente diferentes e insolubles en un mismo solvente³⁴

4.3.1.3 Procesos físico - químicos:

- **Coacervación:** Procedimiento fisicoquímico que se fundamenta en la formación de un sistema de 3 etapas químicamente inmiscibles: etapa líquida o continua, material a recubrir y materialde cubierta

³⁴.

- **Liposomas:** Hablamos de micropartículas compuestas fundamentalmente por lípidos y agua³⁴
- **Gelificación iónica:** La formación de las cubiertas de las microcápsulas tiene sitio por actitud entre un polisacárido y un ión de carga opuesto³⁴:

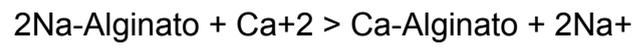
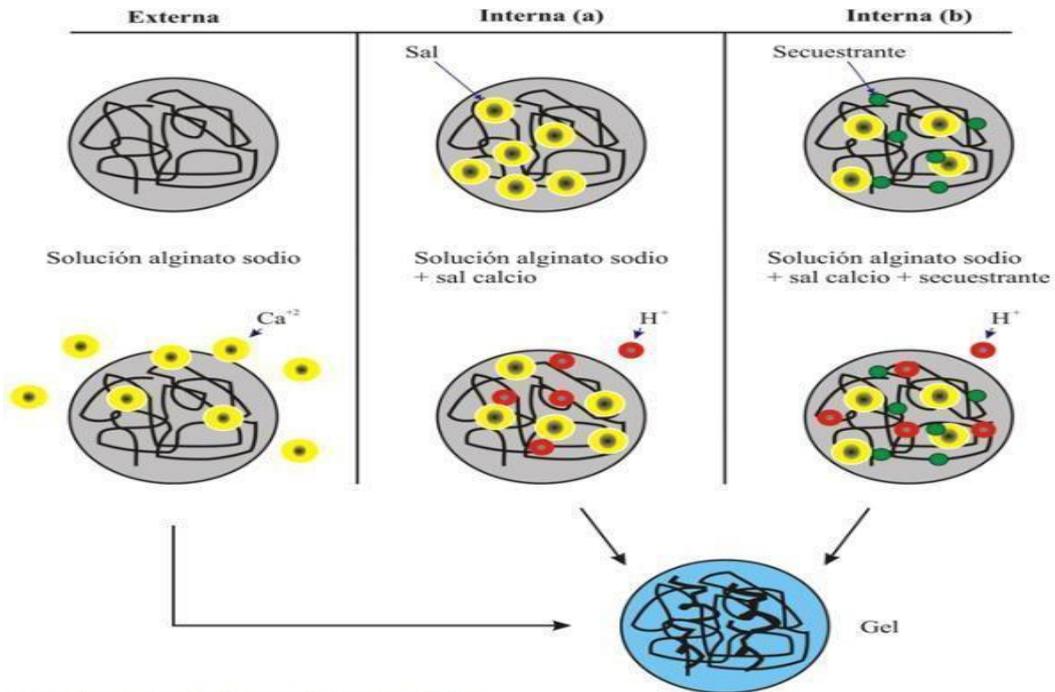


Figura 5. Mecanismo de gelificación iónica



(a) Sal insoluble. (b) Sal parcialmente soluble.

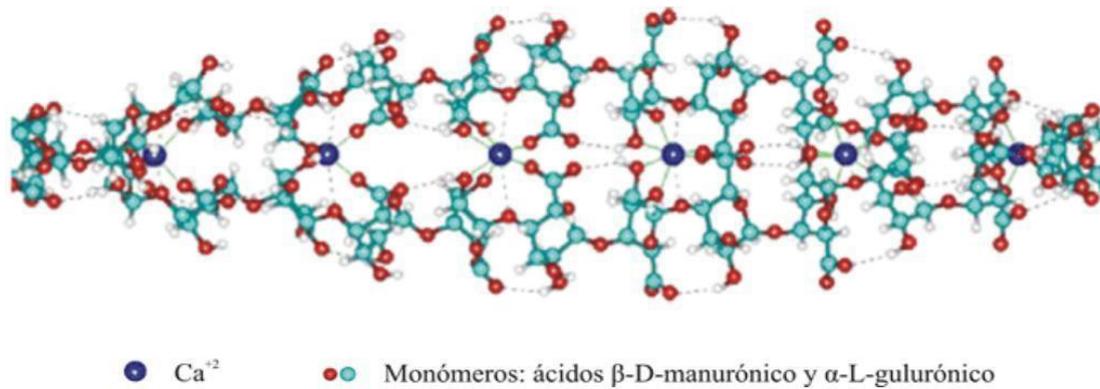
Fuente: Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2012

4.4 Alginato de sodio, goma xantana, carboximetilcelulosa, glicerol, leche descremada

4.4.1 Alginato de sodio

El alginato es un polisacárido procedente de algas marrones, usado como gelificante y para hacer esferificaciones³⁵. La encapsulación con alginato de sodio se conoce como gelificación iónica, donde el alginato se usa como un material encapsulante que, al contacto con una solución de catión divalente o polivalente, forma un hidrogel al instante. Esta facilidad de producción permite tener una técnica de encapsulado con buenas perspectivas de aplicación industrial, no solo por el bajo costo de los materiales formadores de hidrogel, sino, además, por las mínimas pérdidas durante la gelificación iónica una vez establecidas las mejores condiciones de proceso³⁶.

Figura 6. Modelo caja de huevos

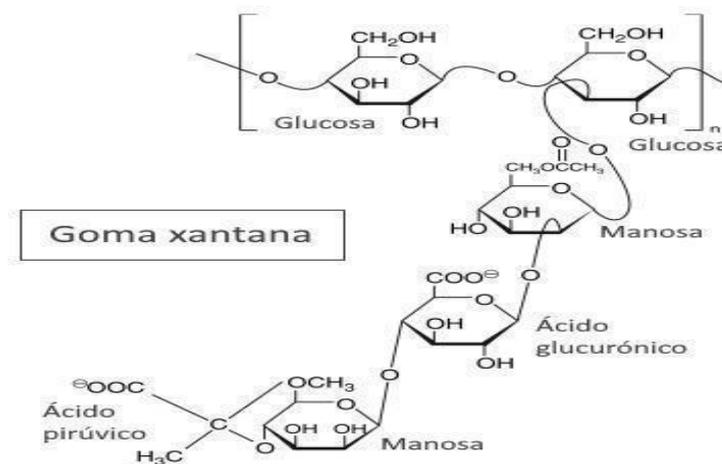


Fuente: Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2012

4.4.2 Goma xantana

La goma xantana es un heteropolisacárido extracelular que se produce por fermentación a partir de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Desde el punto de vista químico constituye una celulosa modificada, compuesta por unidades pentasacáridas repetitivas, donde residuos alternos de glucosa, de un esqueleto poli β-(1 4)-DGlup son α- (1 3), Aguilar et al³⁷

Figura 7. Estructura de la goma xantana



Fuente: Anónimo³⁸

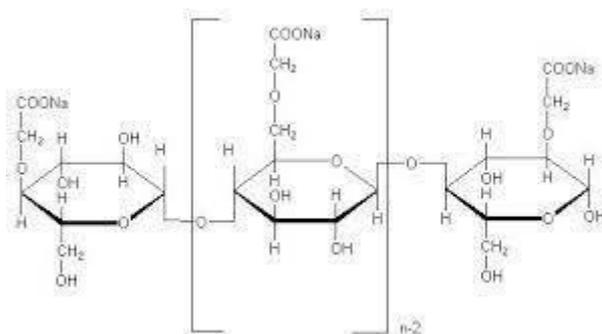
“Aún a bajas concentraciones, las soluciones de goma xantana muestran una viscosidad alta en comparación con otras soluciones de polisacáridos. Esta propiedad la convierte en un espesante y estabilizante muy efectivo. Las soluciones de goma xantana son muy resistentes a las variaciones de pH. Entre

un pH de 1 a 13, la viscosidad de la solución de xantana es prácticamente constante". La goma xantana es compatible con varios materiales como con la mayoría de los espesantes comerciales como el alginato de sodio, la carboximetilcelulosa y el almidón; Sharman et al³⁹

4.4.3 Carboximetilcelulosa

Es un coloide hidrófilo de acción y usos similares a la metilcelulosa. Da geles de buena consistencia pero sin una gran transparencia y de color pardo acaramelado. Tienen una gran adhesividad, lo que les hace muy útiles como excipientes semisólidos. Los geles que se forman con el agua son de carácter aniónico y estables a pH = 4 – 10. Sin embargo, los aumentos de temperatura provocan una pérdida de viscosidad. Admiten la incorporación de hasta un 15 – 20 % de alcohol. Conviene humectarla con glicerina previamente a su gelificación, a fin de evitar la desecación del gel. Es ampliamente utilizada también como emulsificante en emulsiones, como agente suspensor, dispersante , así como disgregante en comprimidos, por tal razón puede ser utilizada con el alginato de sodio con el fin de darle mejor consistencia al gel que puede tener distintas funciones, Acofarma ⁴⁰.

Figura 8. Estructura de la carboximetilcelulosa



Fuente: Peñailillo⁴¹, 2013

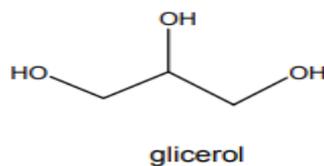
4.4.4 Glicerol

"El glicerol (C₃H₈O₃), denominado también, 1,2,3-trihidroxipropano o 1,2,3-propanotriol, es un polialcohol, un alcohol que posee tres grupos hidroxilos (-OH) y que es conocido comercialmente como glicerina. Se trata de un compuesto líquido a temperatura ambiente, viscoso, incoloro, inodoro y ligeramente dulce.

La presencia de los tres grupos hidroxilo le hace ser higroscópico, fácilmente soluble en agua y alcoholes” Lafuente⁴².

Para Betancourt⁴³ la adición al suelo de glicerina puede estimular la sobrevivencia y el número de bacterias; en su artículo también menciona que algunos investigadores también han encontrado que la glicerina constituye una fuente adecuada de carbono para los microorganismos y puede incrementar la actividad microbiana en el suelo, sin dejar de lado que es un excelente crioprotector.

Figura 9. Estructura del glicerol



Fuente: Lafuente⁵⁷, 2017

4.4.5 Leche descremada

La leche descremada o desnatada es la leche a la que se le ha eliminado la grasa mediante centrifugado⁴⁴.

En varios artículos, se menciona que “la leche descremada es capaz de prevenir el daño celular estabilizando la membrana celular, creando una estructura fácil de rehidratar después del secado y protegiendo las células ya que contiene proteínas que brindan una capa protectora a las células ⁴⁵”

4.5 Criterios de selección para encapsulación

Independientemente del procedimiento de microencapsulación, es fundamental elegir una matriz de encapsulación correcta. El material de cubierta ideal debería consumir ciertas propiedades, como son: no ser reactivo con el material a encapsular, ser capaz de sellar y conservar al otro material en su interior, asegurar la máxima custodia al material encapsulado ante condiciones adversas y permitir su liberación por los mecanismos adecuados, sin olvidar, desde luego, ser económicamente posible⁴⁵.

4.6 Normatividad en Colombia

Tabla 4. Normas sobre Producción Biofertilizantes y Medio Ambiente en Colombia

Norma	Entidad	Año	Definición
Decreto 1840 ⁴⁶	Ministerio de Agricultura e Instituto Colombiano Agropecuario	1994	El ámbito de aplicación del presente Decreto cubre todas las especies animales y vegetales y sus productos ⁴⁶
Decisión Andina 484 ⁴⁷	La Comisión de la Comunidad Andina	2000	Permite la protección de la propiedad industrial al brindar trato igualitario al que den sus propios nacionales por parte de los miembros de la comunidad Comunidad Andina, de la Organización Mundial del Comercio y del Convenio de París ⁴⁷
Resolución 00150 ⁴⁸	El Gerente General Del I.C.A, Ministerio de Agricultura y la Superintendencia de Industria y Comercio	2003	Por la cual se adopta el Reglamento Técnico de Fertilizantes y Acondicionadores de Suelos para Colombia ⁴⁸
Resolución 0187 ⁴⁹	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural	2006	Por la cual se adopta el Reglamento para la producción primaria, procesamiento, empaquetado, etiquetado, almacenamiento, certificación, importación, comercialización, y se establece el Sistema de Control de Productos Agropecuarios Ecológicos ⁴⁹
Resolución 698 ⁵⁰	El Instituto Colombiano Agropecuario- ICA	2011	Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones ⁵⁰
Resolución 1348 ⁵¹	Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible	2014	Por la cual se establecen las actividades que configuran acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados para la aplicación de la Decisión Andina 391 de 1996 en Colombia y se toman otras determinaciones ⁵¹
Decreto 1076 ⁵²	Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible	2015	El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible formulará, junto con el Presidente de la República, la política nacional ambiental y de recursos naturales renovables, de manera que se garantice el derecho de todas las personas a gozar de un medio ambiente sano y se proteja el patrimonio natural y la soberanía de

			la
--	--	--	----

			Nación ⁵²
Productos bioinsumos registrados - Marzo 2021 ⁵³	Instituto Colombiano Agropecuario	2021	Documento que conlleva bioinsumos registrados a la fecha en Colombia.

Fuente: Basados en la normatividad. Construcción propia. González PA, Valderrama LD.

2020

5. Diseño metodológico

5.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación que se maneja en este trabajo es la de tipo mixto, esta se caracteriza por incluir algunos elementos de la investigación cualitativa y algunos de la investigación cuantitativa, al tomar como base fuentes bibliográficas para hacer uso de fundamentos teóricos y bases metodológicas que permiten realizar el planteamiento del modelo metodológico y posteriormente la experimentación requerida para lograr determinar la viabilidad, durabilidad y estabilidad del producto a partir del control de las variables presentes durante la inmovilización de las cepas.

5.2 Universo, población y muestra

5.2.1 Universo.

Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR)

5.2.2 Población.

La población de estudio son las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (*Azotobacter sp*, *Lactobacillus casei* y *Pseudomonas fluorescens*), a las cuales se les va a evaluar su crecimiento y viabilidad.

5.2.3 Muestra.

Formulaciones líquidas y sólidas (cápsulas) con alginato de sodio como matriz inmovilizadora, y con las 3 cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento

en plantas (*Azotobacter spp*, *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas fluorescens*)

5.3 Hipótesis

La goma xantana y la carboximetilcelulosa utilizados como excipientes junto a la matriz que es el alginato de sodio, no inhiben el crecimiento de las rizobacterias utilizadas para las formulaciones

5.4 Variables e Indicadores

Tabla 5. Variables e indicadores del estudio. Fuente: Autoras

Variable	Definición	Indicadores
Independiente	Excipientes: Goma Xhantana y Carboximetilcelulosa	Color Textura
	Crioprotectores: Leche descremada en polvo y Glicerol	Color Textura
Dependiente	Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas	- Recuento UFC - pH - Características microscópicas - Características macroscópicas. Clasificación: - Gram negativas - Gram positivas
	Formulaciones con alginato de sodio y excipientes	- pH - Recuento UFC - Densidad

Fuente: Autoras

5.5 Técnicas y procedimientos

5.5.1 Activación de cepas bacterianas

Para hacer la conservación de las cepas se seleccionaron los microorganismos a conservar, se observaron las colonias en los medios selectivos para cada una de las cepas a utilizar, se realizó coloración de Gram y pruebas de catalasa. En cabina de bioseguridad y en estrictas condiciones de esterilidad, se tomaron de 2 a 4 colonias (las cepas a usar) y se transfirieron a 1 ml de agua peptonada, se adicionaron 1500 uL de glicerol al 50% en un tubo eppendorf y se suspendieron 500uL de la colonia a conservar. Se guardó cada tubo eppendorf en ultracongelador a -70°C para criopreservar cada cepa⁵⁴

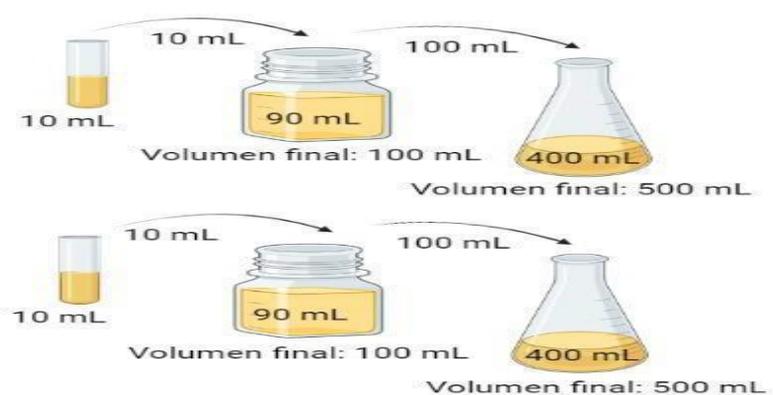
En cuanto a la viabilidad y pureza de las cepas se preparan 200 mL de agar selectivo para cada cepa, se sembró una asada de las cepas de la Universidad Antonio Nariño, se incubaron a 30° C *Pseudomonas spp* y *Azotobacter spp* durante 24 y 48 horas, respectivamente y a 35° C *Lactobacillus spp.* durante 24 horas. Se observó la presencia de UFC en los medios de cultivo y se evaluó la pureza de cada cepa con crecimiento evidenciable mediante tinción de Gram.

5.5.2 Preparación del inóculo

Se seleccionaron de cuatro a cinco colonias bien aisladas y puras, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa purificado, y se transfirió a un tubo de ensayo de 10 mL con caldos específicos para cada cepa (caldo Ashby, caldo MRS, Caldo King B) por duplicado; es importante tener en cuenta que los caldos no deben tener indicador de pH. Se Incubaron los caldos según el tiempo y temperatura requerida para cada Rizobacteria (Caldo Ashby : 48 a 72 h por 30±2° C, Caldo King B : 24 h por 30±2° C, Caldo MRS : 72 h por 35±2° C)⁵⁵

Posteriormente se tomó un erlenmeyer con 90 mL de los caldos estériles descritos para cada rizobacteria y se completó a 100 mL de volumen final (por duplicado) al adicionar los 10 ml preparados anteriormente, se incubó según las temperaturas y tiempos indicados para cada rizobacteria, en agitación a 125 rpm. Luego de obtener los 100 ml de biomasa, estos se agregaron a 400 mL de caldo específico para cada rizobacteria como se observa en la Imagen 2, se colocaron en agitador orbital shaker, en condiciones de crecimiento ya definidas.

Figura 10. Escalado de rizobacterias en caldos específicos



Se realizó la medición de biomasa por densidad óptica en espectrofotómetro midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a los frascos de 500 ml de volumen final. Se usa un patrón de turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mcfarland. Se realizó un recuento en placa en superficie al finalizar la fermentación y se observaron las características morfológicas macro y microscópicas para evaluar la viabilidad y pureza de los inóculos. Para el recuento en placa se usa la técnica de diluciones seriadas así: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ; se siembran en superficie las tres últimas diluciones por duplicada para cada rizobacteria.

5.5.3 Preparación de formulación y encapsulación

Se prepararon 200 mL de una solución de alginato de sodio al 2% (p/v) y 600 mL de una de cloruro de calcio (CaCl_2) 1 M; 100mL de goma Xantana al 1% y 50 mL de leche descremada en polvo al 1%, se esterilizaron por separado en autoclave. Se tomaron 33.3 mL de la suspensión de 500 mL de cada cepa, se centrifugaron a 2500 rpm, se resuspendieron con 1 mL de caldo, se mezclaron asépticamente con 70 mL de la solución de alginato de sodio al 2%, 20 mL de goma xantana al 1% y 10 mL de leche descremada al 1%; procedimiento modificado Rekha et al⁵, se agitó suavemente durante 10 minutos hasta lograr la homogeneización completa de la mezcla. Con una jeringa estéril de 10 ml se adiciona suavemente la mezcla mencionada con anterioridad a la solución de CaCl_2 1M la cual estaba a 4°C , se esperaron 10 minutos a que se diera la reacción entre el alginato de sodio y el cloruro de calcio, se filtraron las cápsulas en gasa estéril y se llevaron a secar en horno a una temperatura de 25°C durante 24 horas.

5.5.4 Selección de los excipientes y formulaciones

Para la selección de la carboximetilcelulosa y de la goma xantana como excipientes se tomó como referencia dos de las formulaciones dadas por Swaminathan et al⁵⁶ teniendo en cuenta algunas modificaciones, por otro lado se consideró la leche descremada en polvo como criopreservante ya que ha se ha encontrado que tiene efecto protector en varios tipos de células, hasta en esperma mamífero⁵⁷ y también se difunde a través de la membrana protegiendo a la célula, tanto interna como externamente⁵⁸.

5.5.5 Formulación excipientes con alginato:

Tabla 6. Crioprotectantes y excipientes utilizados en las formulaciones

Formulación	Alginato 2%	Glicerol 0.8%	Carboximetilcelulos a 0.5%	Leche descremada 1%	Goma Xantana 1%
1	X	X			
2	X	X	X		
3	X			X	
4	X			X	X

Fuente:

Autoras Tabla 7. Porcentaje de mezclas en cada formulación

Frasco	Formulación
1	50% Rizobacterias + 35% Alginato al 2% y 15% Glicerol al 0.8%
2	50% Rizobacterias + 35% Alginato 2%, 10 % CMC 0.5% y 5% Glicerol 0.8%
3	50% Rizobacterias + 35%Alginato 2% y 15% Leche descremada 1%
4	50% Rizobacterias + 35% Alginato 2%, 10% CMC 0.5% y 5% Leche descremada 1%

Fuente: Autoras

5.6 Determinación de parámetros físicos y microbiológicos

Posteriormente a mezclar en partes iguales los tres caldos utilizados para cada microorganismo, el alginato de sodio, el excipiente y el crioprotector a esta mezcla se midieron parámetros físicos como el pH y la densidad; en cuanto a los parámetros microbiológicos se hizo pureza a través de Gram y recuento en placa para cada una de las formulaciones para verificar que se mantenga la concentración del inóculo.

5.7 Embalaje, almacenamiento y evaluación de la vida útil

Una vez obtenidas las cápsulas como se describió anteriormente, se secaron a 25°C en incubadora en una placa de petri por 24 horas, se filtraron con papel filtro wattman N° 1 retirando la humedad restante, y se conservaron en un frasco ámbar a la oscuridad en temperatura ambiente⁵⁹.

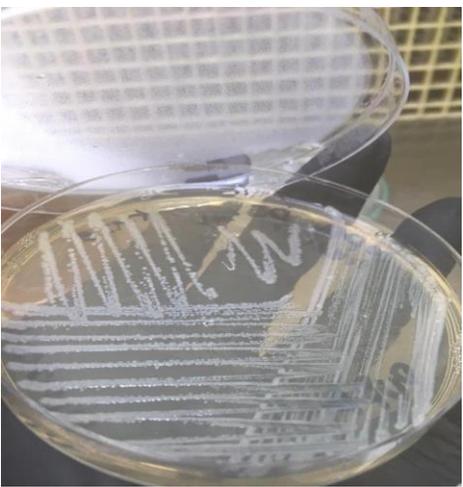
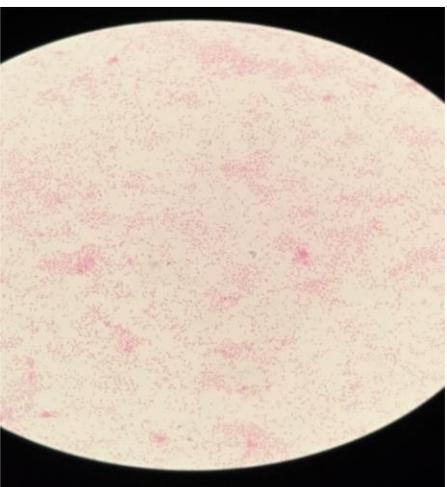
6. Resultados

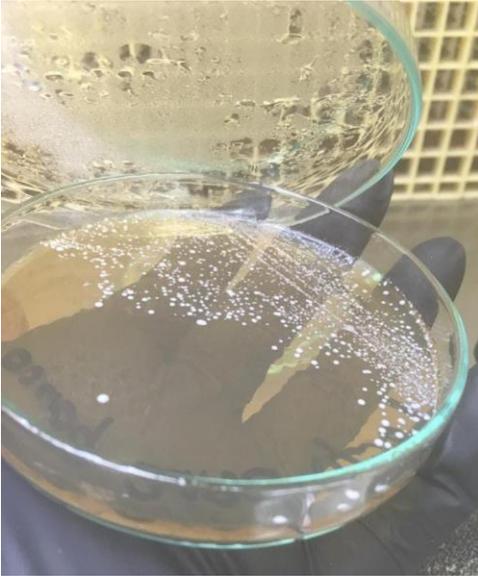
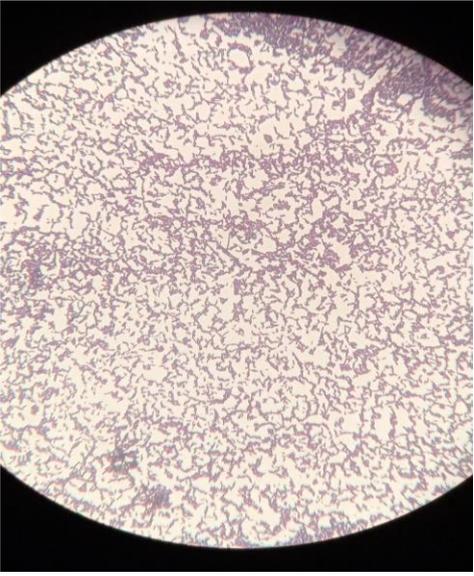
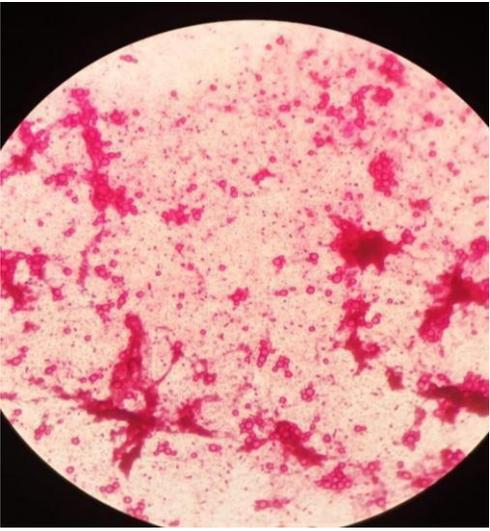
6.1. Activación de cepas bacterianas y preparación del inóculo

A partir de las cepas de Rizobacterias con las que se trabajó previamente en las primeras fases, se inició esta fase del proyecto la cual consistió en realizar la formulación del prototipo biofertilizante en donde el principio activo fueron cepas de *Lactobacillus spp*, *Pseudomonas spp* y *Azotobacter spp*. proporcionadas por la Universidad Antonio Nariño de Bogotá.

Se observaron sus características morfológicas macroscópicas como microscópicas, y además se hizo pruebas bioquímicas, adjuntadas en la siguiente tabla:

Tabla 8. Descripción morfológica macroscópica y microscópica, y pruebas bioquímicas de las rizobacterias. Fuente: Autoras

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	
Colonias pequeñas blancas un poco translúcidas, de bordes regulares y lisas.	Bacilos Gram Negativos pequeños. 100x
Catalasa positiva	Oxidasa positiva
<i>Lactobacillus casei</i>	

	
Colonias blancas cremosas, pequeñas con bordes regulares lisas y con elevación (concavas)	Bacilos largos Gram Positivos. 100 x.
Catalasa negativa	Oxidasa negativa
<i>Azotobacter spp</i>	
	
Colonias transparentes simulando como gotas de agua, de bordes irregulares y son usualmente elevadas.	Cocobacilos Gram Negativos con algunos quistes. 100 x.
Catalasa positiva	Oxidasa positiva

6. 2 Preparación de formulación y encapsulación

6.2.1 Ensayos preliminares con *Luffa cylindrica*

Inicialmente, se planeó utilizar un material biodegradable. Para los ensayos con la *Luffa cylindrica* se trató de trabajar en polvo, para ello se compró el

estropajo, se cortó en trozos pequeños y se dejó en horno de

secado para eliminar humedad y conseguir que este quedara crujiente y así poder macerarlo para obtener el polvo, pero no fue posible lograrlo; por otro lado, a pesar de haberlo esterilizado se presentó contaminación que fue evidente al realizar el recuento de las formulaciones que se habían hecho utilizando esta matriz.

Figura 11. *Luffa cylindrica* en cajas en incubadora para eliminar la humedad



Los excipientes que se utilizaron fueron la Pvp 40K, el Manitol, la CMC y la Goma Xantana, al realizarse la formulación y posterior esterilización en los primeros ensayos se determinó que la Pvp 40k y el Manitol no eran adecuados para posteriores ensayos ya que no demostraron buena solubilidad al igual que el alginato, por lo cual fue necesario cambiarlo y continuar con la CMC y la Goma Xantana como excipientes para darle mejor estabilidad al alginato.

6.2.2 Formulaciones del prototipo TRL6

Luego de esto, se decidió trabajar con formulaciones diferentes. Se llevaron a cabo cuatro formulaciones dos líquidas con alginato de sodio y como excipiente la carboximetilcelulosa, y dos encapsuladas utilizando el alginato de sodio y la goma xantana como excipiente para la encapsulación. Todas las formulaciones aparecen descritas en las tablas 4 y 5.

Figura 12. Formulación líquida de un volumen 200 mL



Fuente: Autoras

Para las formulaciones 3 y 4 se hizo un ensayo preliminar con dos proporciones de matriz y excipiente diferentes, para determinar cuál proporcionaba un mejor estructura, consistencia y forma; una de ellas fue 50% de alginato de sodio y 50% de goma xantana, la segunda 75% alginato y 25 de goma xantana.

Figura 13. Proporciones distintas de alginato de sodio y goma xantana.



Fuente: Autoras

Luego de llevar a cabo el procedimiento para la formación de las cápsulas se obtuvieron cápsulas ovaladas, con bordes irregulares, con una protuberancia pequeña en un extremo, con un diámetro aproximado de 7 mm, se les hizo presión con los dedos para determinar consistencia; la proporción 75% alginato/25% goma xantana presentó un mejor consistencia y resistió idealmente a la presión ejercida con los dedos, cabe resaltar que este ensayo se realizó solo con los excipientes, no se tuvieron en cuenta lo criopreservantes ni la rizobacterias. Estas cápsulas se conservaron en un frasco ámbar a temperatura ambiente, no se observaron cambios significativos en cuanto al tamaño y consistencia, tampoco se evidenciaron deformaciones evidentes durante el tiempo que se conservan.

Luego de determinar que la mejor proporción fue la de 75/25, se procedió a establecer las formulaciones teniendo en cuenta que se debía tratar de mantener esta (ver tabla 4 y 5); se tomaron los volúmenes correspondientes de cada caldo y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, esta decisión se tomó ya que al hacer ensayos previos con los caldos se evidencio que la formulación quedaba muy líquida y al tratar de formar las cápsulas la gota que caía en el cloruro se

abría y no se formaba la cápsula. Luego de centrifugar se realizó la mezcla y se encapsuló como se menciona en técnicas y procedimientos.

Figura 14. Rizobacterias encapsuladas



Fuente: Autoras

6.3 Determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos

Tabla 9. Parámetros evaluados a caldos de las rizobacterias y formulaciones Fuente: Autoras

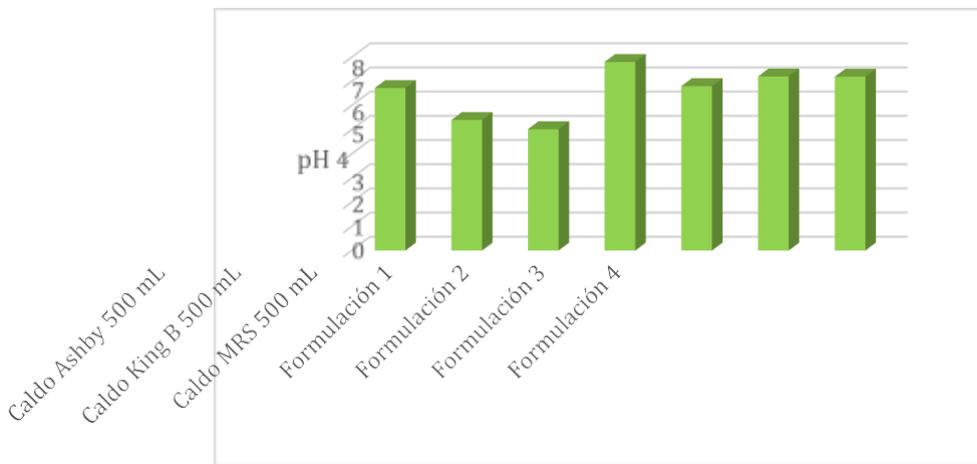
Parámetros	Tiempo (horas)	Caldo MRS 500 mL	Caldo Ashby 500 mL	Caldo King B 500 mL	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
pH	0	5.02	6.72	5.4	7.8	6.8	7.2	7.19
Densidad	0	1,002 g/mL	1,001 g/mL	1,002 g/mL	1,002 g/mL	1,003 g/mL	1,003 g/mL	1,003 g/mL
Recuento <i>Azotobacter</i>	0	—	2.9x10 ⁶ UFC/mL	—	4.0x10 ⁶ UFC/mL	3.9x10 ⁶ UFC/mL	3.3x10 ⁶ UFC/mL	4.5x10 ⁶ UFC/mL
Recuento <i>Pseudomonas</i>	0	—	—	2.5x10 ⁶ UFC/mL	2.6x10 ⁶ UFC/ mL	3.0x10 ⁶ UFC/ mL	4.0x10 ⁶ UFC/ mL	4.2x10 ⁶ UFC/ mL

Recuento <i>Lactobacillus</i>	0	2.2x10 ⁶	_____	_____	3.8x10 ⁶	3.5x10 ⁶	3.5x10 ⁶	3.6x10 ⁶
		UFC/mL			UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL

**Nota: El pH de las formulaciones se ajustó con Na(OH), ya que el pH estaba entre 4 y 5, por lo cual no favorecía la supervivencia de *Azotobacter* spp.

En la figura 15 se puede observar los diferentes valores de pH que se obtuvieron en los caldos y posteriormente en las formulaciones, cabe resaltar que el pH de las formulaciones fue ajustado con NaOH al 0,1 M con el fin de proporcionar un medio óptimo para las rizobacterias.

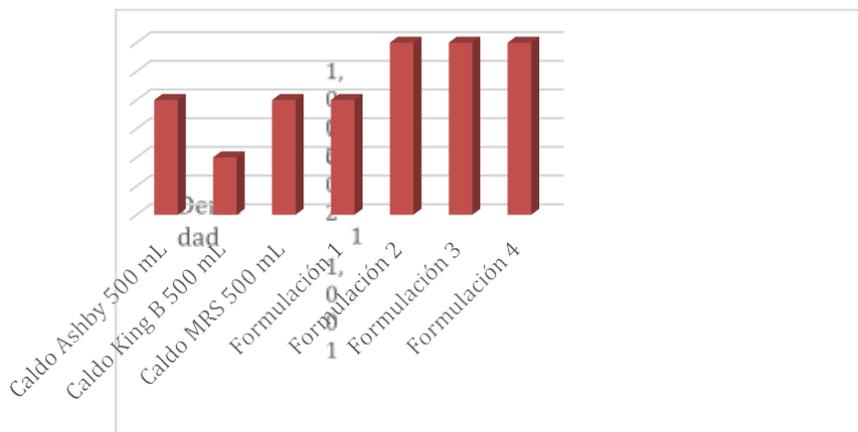
Figura 15. pH de formulaciones



Fuente: Autoras

En la figura 16 se observan las densidades de los caldos y de las formulaciones en ella se puede determinar que al adicionar los excipientes a pesar de ser viscosos no modifica en gran medida las densidades en las formulaciones.

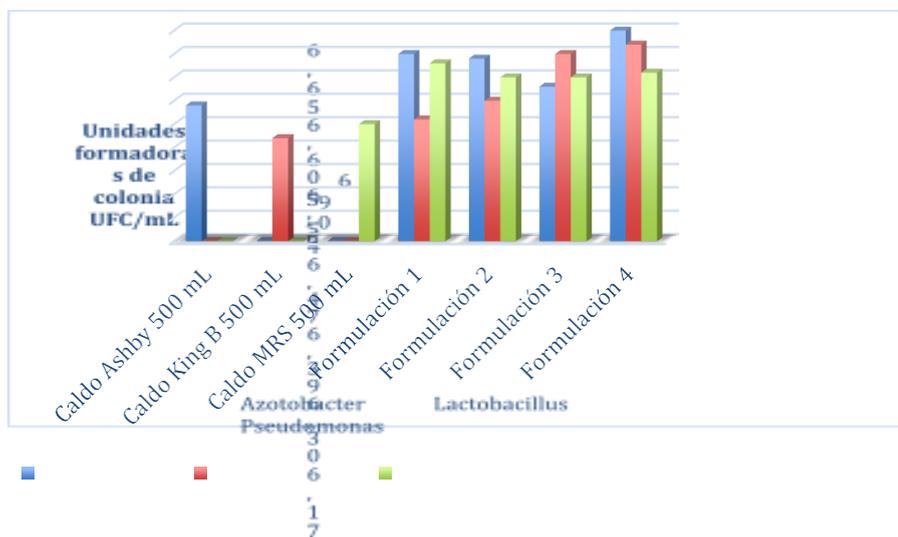
Figura 16. Densidad de caldos y formulaciones



Fuente: Autoras

En la figura 17 se puede observar el recuento bacteriano de los caldos de 500 mL y respecto a las formulaciones que los excipientes no inhibieron el crecimiento de las rizobacterias en estos.

Figura 17. Recuento bacteriano en caldos y en formulaciones



Fuente: Autoras

6. 4 Embalaje y almacenamiento de las cápsulas

Condiciones: Se dejaron a temperatura ambiente en frascos de vidrio estériles, las cápsulas se cubrieron con papel aluminio para conservarlas asemejando el color ámbar.

7. Discusión

A las cepas que se utilizaron se les determinó pureza y se observó cada colonia su morfología macroscópica característica, en el caso de *Lactobacillus* se observaron colonias pequeñas, de bordes regulares, cremosas, convexas y blancas tal como describe Cortez⁶⁰ en su artículo "colonias pequeñas entre 2-5 mm de diámetro, forma circular, convexa, blancas y brillantes" además de describir su Gram como bacilos gram positivos alargados como se observa en la tabla 5, por otro lado las colonia de *Pseudomonas* se vieron colonias pequeñas, de borde regulares, blancas, mucosas, similares a la descripción que hace Condarco⁶¹ "Forman colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y a veces ondulado con un centro opaco; el pigmento se difunde en el medio dándole una tonalidad verdosa" y también concuerda con el Gram observado: bacilos gram

negativos pequeños curvos, las cepas que se observaron de *Azotobacter* eran colonias con bordes regulares, traslúcidas, se veían como gotas de agua, Espín⁶² describe “colonias pequeñas transparentes, convexas y de borde circular”, de acuerdo a lo mencionado anteriormente las colonias corresponden a las características morfológicas macroscópicas descritas, así como el gram observado que describe: “bacilos gram negativos, pleomórficos, variando su morfología desde bacilo hasta célula en forma de coco”

Cuando se hizo el respectivo escalado de los caldos de 10mL a 500 mL antes de encapsular, se midieron algunos parámetros como la densidad y pH, este último se midió debido a que las bacterias requieren condiciones específicas de temperatura, nutrientes y pH, en este caso, tanto temperatura y nutrientes se cumplió para su crecimiento, sin embargo para saber qué tan viables y cómo iban a sobrevivir; se midió su pH, ya que *Lactobacillus spp* por ejemplo como menciona Jurado⁶³ “Los principales mecanismos antagónicos de las bacterias ácido-lácticas son su capacidad de reducir el pH del medio, la producción de biocinas y la producción de ácidos orgánicos, haciendo que los microorganismos patógenos que necesiten pH neutros no sobrevivan y ellas sí pueden sobrevivir, debido a su naturaleza ácida”. Así mismo, *Azotobacter spp* para cumplir una de sus funciones biológicas más importantes como lo es la fijación del nitrógeno y que tenga un óptimo crecimiento debe de ser de 7.0 a 7.5 como cita Mayea⁶⁴ en su artículo en el año 1998. *Pseudomonas spp* así como *Azotobacter spp* son bacterias débiles a pH ácidos, Álvarez nombra que “requiere un pH neutro y no crece en condiciones ácidas (pH< 4,5)”. Considerando los autores y artículos anteriormente mencionados, se determina que los pH obtenidos de los caldos de 500 mL están bien y dentro del rango que dicta la literatura.

Con respecto a la determinación de la mejor matriz polimérica biodegradable en un comienzo se trataron de utilizar dos matrices poliméricas, la *Luffa Cylindrica* (estropajo) como matriz inmovilizante y el alginato de sodio⁶⁵, como matriz encapsulante para desarrollar las distintas formulaciones. Pereira et al⁶⁶ al en su artículo “Empleo del estropajo común (*Luffa cylindrica*) en la remoción de contaminantes” menciona que debido a la “estructura fibrosa y porosa de las

fibras, las esponjas son propensas a adquirir fácilmente impurezas del ambiente,

también se le atribuyen propiedades adsorbentes que facilitan su uso en pruebas de remoción y de inmovilización microbiana". Sin embargo, fue difícil su manipulación, ya que es un trabajo complicado volverla en polvo y además de presentarse contaminación la cual fue evidente cuando se hizo el recuento; por estas razones, se descartó este material como matriz.

Por otro lado, la razón por la que se escogió el alginato de sodio fue debido a los excelentes resultados que ha presentado en diferentes estudios que se han realizado con ella^{67,68,69}, ya que cuenta con distintas propiedades que permite "la liberación lenta de nutrientes al suelo por difusión o erosión asistida por poros y degradación de cápsulas. Además, las bacterias encapsuladas poseen una vida útil prolongada e incluso pueden almacenarse a temperatura ambiente durante períodos relativamente largos. He et al¹¹ Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se utilizó esta matriz con la cual se han hecho varios ensayos, aunque en un principio se presentaron inconvenientes porque el alginato no solubiliza y formaba grumos por lo que en ese momento no fue posible hacer los ensayos de encapsulación con esa matriz.

Acerca de las formulaciones, a éstas también se les midió pH, densidad y se les hizo recuento para determinar qué concentración de bacterias se encuentra en cada una. Según los resultados alcanzados, la formulación 4 permitió una mejor supervivencia de los microorganismos, se deduce que gracias a la matriz de alginato y la goma xantana^{70,71} se inmovilizó de forma segura estas bacterias y además la leche descremada protegió las células de factores externos como dice Silva et al⁴⁵. Sin embargo, a pesar de que *Azotobacter spp* y *Lactobacillus spp* tuvieron un recuento satisfactorio en esta formulación, *Pseudomonas spp* desafortunadamente no, y en todas las formulaciones tuvo un crecimiento similar. La formulación 2 si bien, tuvo un pH bajo en comparación a los demás, las 3 cepas presentaron un crecimiento similar y satisfactorio, no obstante, no tiene un crecimiento más alto de *Lactobacillus spp*, que se supone que debería ser más alto debido a sus condiciones de crecimiento un poco más ácidas que neutras. La formulación 1 en comparación a las demás, tiene un bajo recuento de microorganismos, que puede ser por la falta del excipiente

carboximetilcelulosa ya que es un emulsificante excelente⁷² si es utilizado con sustancias como el alginato de sodio, o por un pH excesivamente alto, ya que a diferencia de las demás, la formulación 1 cuenta con un pH de 7.8; lo que puede dificultar la supervivencia de las bacterias. En cuanto, a la diferencia de crecimiento observada en los recuentos entre los caldos y formulaciones, se sugiere que los caldos al estar suspendidos los microorganismos, no se obtiene un recuento como el de las formulaciones, ya que los inóculos para hacer las formulaciones fueron centrifugados y se utilizó sólo el pellet. Y se deduce que al usar sólo el pellet se utilizó una pequeña biomasa de microorganismos más concentrada que en caldo, por lo cual alteró la concentración inicial de microorganismos antes de hacer la mezcla.

En la normativa 5842 del ICONTEC⁷⁵ denominada “Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos”, refieren que el mínimo de recuento celular que debe tener un bioinsumo agrícola a partir de bacterias promotoras de crecimiento es de 10^4 por lo que se asume, que las formulaciones como los inóculos utilizados en este proyecto cumplen con el requisito que pide esta normativa, y podría utilizarse este prototipo como biofertilizante en futuras fases del proyecto.

Referente a las formulaciones líquidas, en la figura 18 se observa que el crecimiento se ve reducido en la F1 y F2, como describe Schoebitz⁷³ “las tasas de supervivencia bacteriana en formulaciones líquidas disminuyen porque esta técnica no proporciona un entorno protector para los microorganismos y el número de bacterias distribuidas en cada semilla es bastante heterogéneo”, por lo cual se infiere que al estar líquida, las bacterias no quedan encapsuladas y por ende al hacer un recuento no se obtendrá mucho crecimiento bacteriano.

En cuanto, a la encapsulación, hay resultados esperanzadores debido a que se logran unas cápsulas resistentes, no tan grandes ni pequeñas, se observa que la goma xantana y la leche descremada si alteran el crecimiento bacteriano, aumento el recuento de UFC como se observa en la figura 18, lo que justifica a Schoebitz⁷³ al expresar “Se encuentran numerosas ventajas relacionadas con la bioencapsulación de rizobacterias, por ejemplo, liberación controlada de

bacterias al suelo, protección de microorganismos en el suelo contra estreses bióticos y abióticos y reducción de la contaminación durante el almacenamiento y transporte”. Lo cual hace deducir que es mejor la formulación encapsulada que la líquida, debido a la supervivencia de microorganismos en diferentes condiciones, sin embargo, debido a la falta de monitoreo a diferentes tiempos de los recuentos, no podemos confirmar si realmente, la mezcla de formulación 3 y 4 si es propicia para PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas) y si verdaderamente sirve para una mejor fertilización suelo-planta.

Finalmente, posterior a estos estudios se puede experimentar con otro tipo de excipientes, como el almidón, supuesto que mejoran la supervivencia de microorganismos hasta un año; como se especifica en otro artículo de Schoebitz⁷⁴, donde se hace un estudio con rizobacterias encapsuladas en perlas de alginato secas rellenas de almidón, las cuales son evaluadas cuando están en gel, en medio de crecimiento y en perlas secas. El autor aclara que el uso de azúcares como protectores durante el crecimiento de los microorganismos o proceso de secado mejora la supervivencia de las células vivas, ya que muchos de estos azúcares pueden otorgar la estabilización de la membrana celular al momento del secado de las cápsulas.

8. Conclusiones

Se logró obtener las tres cepas puras de rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas y producir un inóculo de los microorganismos a un volumen de 500 mL para luego hacer un recuento de unidades formadoras de colonias antes y después de preparar las formulaciones.

Por otro lado, se determinó que la matriz polimérica más eficiente en el proceso de encapsulación es el alginato de sodio, ya que permitió la formación de cápsulas que se ha reportado que mantienen la viabilidad de los microorganismos y su liberación al medio lentamente, también tiene un costo asequible y accesible y es de fácil manejo y manipulación.

Además, se identificaron los excipientes que mejor se acoplaron a los ensayos y que mostraron mejores resultados en cuanto a manipulación, solubilidad en medio acuoso, homogeneidad y viscosidad, lo que permitió llevar a cabo los dos tipos de formulaciones desarrolladas, la líquida y la formación de la capsulas; estos fueron la carboximetilcelulosa y goma xantana.

9. Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se proponen las siguientes recomendaciones

- Es importante criopreservar y mantener un banco de cepas en ultracongelación a -70°C para tener disponibilidad de estas y evitar tener que recuperarlas cada vez que se contaminen los agares y/o caldos
- Se recomienda realizar más de una medición de los parámetros físico-químicos, con el fin de garantizar que las rizobacterias mantengan una viabilidad y crecimiento durante el tiempo.
- Otra recomendación es tomar la formulación líquida y la formulación sólida, ponerlas en contacto con una planta para evaluar el crecimiento de planta in vivo a escala menor, con el fin de garantizar la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos.
- En caso de que la identificación bacteriana sea determinante para los resultados de un estudio similar al realizado, se debe realizar identificación molecular.

Bibliografía

1. Brown ME. Plant Growth Substances Produced by Microorganisms of Soil and Rhizosphere. *J Appl Bacteriol* 1972;35(3):443-451.. Available in:
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03721.x>
2. Vassilev N, Vassileva M, Azcon R, Medina A. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into a soil-plant system. 23rd ed. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers; 2001.
3. Alizadeh, Siamak Baqche Saraey, Bitá. Evaluation of the efficiency of the biofertilizer produced from the local conditions of Rhizobacteria rice. Investigation Institute of Agricultural Biotechnology, 2003, 31p; Available in:
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2006000117>
4. Alfonso, Elein Terry. Leyva, Ángel. Hernández, Annia. Beneficial microorganisms as efficient biofertilizers for tomato crops (*Lycopersicon esculentum*, Mill) *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2005 Vol 7;2. 47-54. Available in:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/13140/1/498-3292-1-PB.htm>
5. Rekha PD, Lai WA, Arun AB, Young CC. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC- FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. 2007; 98(2):447-451. Available in: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0960852406000356>
6. Minaxi, Saxena J. Efficacy of rhizobacterial strains encapsulated in nontoxic biodegradable gel matrices to promote growth and yield of wheat plants. 2011; 48 (3): 301-308. Available in:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0929139311000801>
7. Rizk, TY. Soliman, EM. El-Araby, FE. El-Sayed, Hala. Enhancement of groundnut productivity by inoculation with *Bradyrhizobium* and *Rhizobacteria* under different levels of Compost in Sandy Soils. *Egypt Journal of Agronomy*, 2012. Vol 34. 267-281. Available in:
https://scholar.google.es/scholar?start=40&q=rizobacterias++biofertilizers&hl=es&as_sdt=0,5#d=gs_qabs&u=%23p%3DCJhBxXVnb-4J
8. Lupo B, González C , Maestro A. Microencapsulación con alginato en alimentos. *Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2012; 3 (1): 130-151. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/26794719.pdf>
9. Hasanein NM, Abdrabbo MA, EL-Khulaifi YK. The Effect of Bio-Fertilizers and Amino Acids on Tomato Production and water productivity under Net-House Conditions. 2014. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/288630215_The_Effect_of_Bio-Fertilizers_and_Amino_Acids_on_Tomato_Production_and_water_productivity_under_Net-House_Conditions
10. Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. 2014; 46 (4): 338-347. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700938>
11. He y, Wu Z, Tu L,,Han Y, Zhang G, Li C. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. 2015; 109–110:68-75. Available in:

<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0169131715000514>

12. Dzionek A, Wojcieszńska D, Guzik U. Natural carriers in bioremediation: A review. 2016; 23: 20-36. Available in:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0717345816300732>
13. WingChing R, Uribe L, Castro L. Uso de Azospirillum spp. Como biofertilizante en la producción de estrella africana (Cynodon nlemfuensis) 2016; 8(2). Disponible en:
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S165942662016000200259&script=sci_arttext&tlng=en
14. Florez JD, Leal GI, Ardila LD, Cárdenas DM. Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (Oryza sativa L.) del Norte de Santander (Colombia). 2017; 51 (4). Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000400373
15. Romero F, Abril J, Camelo M, Moreno A, Pastrana I, Rojas D, Et al. Azotobacter chroococcum as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (Gossypium hirsutum): Effect in reducing N fertilization. 2017; 49(4):377-383. Available in:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117300809>
16. Murcia, C. and Guariguata, M., 2014. La restauración ecológica en Colombia: Tendencias, necesidades y oportunidades. Bogotá. Available at: https://www.cifor.org/publications/pdf_files/occpapers/OP-107.pdf
17. Vargas Ríos, O., Díaz, J., Reyes Bejarano, S. and Gómez Ruíz, P., 2021. GUÍAS TÉCNICAS PARA LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DE LOS ECOSISTEMAS DE COLOMBIA. [ebook] Bogotá: GREUNAL. Available at:
https://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/plan_nacional_restauracion/Anexo_8_Guias_Tecnicas_Restauracion_Ecologica_2.pdf
18. Vargas Ríos, O., 2011. RESTAURACIÓN ECOLÓGICA: BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN. 16th ed. [ebook] Bogotá: Acta Biológica Colombiana. Available at: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028008017.pdf>
19. Jebara SH, Abdelkrim S, Saadani O, Fatnassi IC, Mannai K, Abid G, et al. Chapter 18 - Potential use of efficient resistant plant growth promoting rhizobacteria in biofertilization and phytoremediation of heavy metal contaminated soil. In: Hasanuzzaman M, Prasad MNV, editors. Handbook of Bioremediation: Academic Press; 2021. p. 285-293.
20. Gamez R, Cardinale M, Montes M, Ramirez S, Schnell S, Rodriguez F. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (Pseudomonas fluorescens Ps006 and Bacillus amyloliquefaciens Bs006) on banana cv. Williams (Musa acuminata Colla). Microbiol Res 2019;220:12-20.
21. Meyer J. The Fluorescent Pigment of Pseudomonas fluorescens : Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. Great Britain: Journal of General Microbiology; 1978. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/107/2/mic-107-2-319.pdf?expires=1630469735&id=id&accname=guest&checksum=E879FBB185825CB9D514903AA6A61A61>

22. Pérez S, Coto O, Echemendía M, Ávila G. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?: Scielo; 2015. p. 225-234. Available in: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n3/rpv08315.pdf>
23. Gil M. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*; Morfología, medios de cultivo, enfermedades. Available at: <http://microbitosblog.com/2015/04/28/pseudomonas-aeruginosa-p-putida-p-fluorescens-morfologia-medios-de-cultivo-enfermedades-y-mas/>
24. Naranjole raj college. *Azospirillum* and *Azotobacter*. Available at: https://www.narajolerajcollege.ac.in/document/sub_page/20201019_083448.pdf
25. Biocultivos S.A. FICHA TÉCNICA Ceba *Azotobacter chroococcum*. Available in: <http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf>
26. Casadesús J, Maldonado R, Contreras A, Garzón A. Organización del genomio de *Azotobacter vinelandii*. Available at: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/14891/1/20101020110434827.pdf>
27. Mahato S, Kafle A. Comparative study of *Azotobacter* with or without other fertilizers on growth and yield of wheat in Western hills of Nepal. *Annals of Agrarian Science* 2018;16(3):250-256. Available in: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1512188717301665>
28. Tierra overseas. *Azotobacter* Biofertilizer. Available at: <https://www.exportersindia.com/tierra-overseas/azotobacter-biofertilizer-4468506.htm>
29. Auñón RC. FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN LA VIDA LIBRE. Available at: <https://www.ugr.es/~cjl/FIJACION%20DE%20NITROGENO.pdf>
30. Neogen. MRS Agar (ISO). Available at: <http://www.labm.com/product.asp?id=2066>
31. Vasseur-Coronado M, du Boulois HD, Pertot I, Puopolo G. Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. *Microbiol Res* 2021;245:126672.
32. Champagne, C. P.; Fustier, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion Biotechnol* 18(2): pp. 184-190, 2007.
33. Silvina Michiutti, G., López Novello, L., Córscico, F. and Larrosa, V., 2019. Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano. *Paraná: Ciencia, tecnología e innovación*. Available at: <https://www.redalyc.org/journal/145/14561215012/html/>
34. Técnicas de microencapsulación. Valencia: Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial; 2016. Disponible en: <https://www.inescop.es/images/Proyectos/Regionales/2016/MICROCAPS/E1-TECNICAS%20DE%20MICROENCAPSULACION.pdf>
35. Bashan, Y., Hernández, J., Puente, M., de Bashan, L. and Leyva, L., 2021. Inoculantes microbianos sintéticos: son el futuro para la agricultura?. *La Paz*. Available at: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/syntheticsaltillo.pdf>
36. Sandoval-Peraza, V.M., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G., & Acereto Escoffí, P.O.M. (2016). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience.181-218. Disponible en: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/98/421/857-1?inline=1>
37. Aguilar L, Gastón C, Llopiz J, Jerez A. Estudio de termoestabilidad de goma xantano por análisis térmico y viscosimetría. Ciudad de la Habana: ICIDCA; 2005. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120688009.pdf>
38. Goma Xantana. Insolit Beauty. Disponible en: <https://www.insolitbeauty.com/glosario-ingredientes/goma-xantana/>

39. Sharma B, Narres L, Dhuldoya N. La goma xantana en la industria alimentaria. Rajasthan: Mundo Alimentario; 2011: Disponible en https://www.academia.edu/18085810/La_goma_xantana_en_la_industria_alimentaria_2

40. Carboximetilcelulosa sódica. ACOFARMA. Disponible en: <https://cofgranada.com/formacion/documentos/modulos/CARBOXIMETILCELULOSA.pdf>
41. Peñailillo Retamal P. EVALUACIÓN DE LA CARBOXIMETILCELULOSA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE UN VINO TINTO CULTIVAR CARMÉNÈRE. Santiago: Universidad de Chile; 2013. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/151168/Evaluacion-de-la-carboximetilcelulosa-sobre-las-caracteristicas-fi%CC%81sicas-y-quimicas-de-un-vino-tinto-cultivar-carmenere.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
42. Lafuente Aranda G. Glicerol: Síntesis y aplicaciones. UNED; 2017. Disponible en: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf
43. Betancourt Aguilar C, Prado R, Castellano Gonzáles L, Silva Campos C. CARACTERÍSTICAS DE LA GLICERINA GENERADA EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL, APLICACIONES GENERALES Y SU USO EN EL SUELO. Ciudad de la Habana: INCA; 2016. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v37n3/ctr01316.pdf>
44. Alimentando a la vaca para obtención de lácteos con alto impacto potencial sobre la salud humana. WayBack Machine. 2013. Disponible en: <https://web.archive.org/web/20110903071605/http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/leche/grasabutirosa.htm>
45. SILVA J, FREIXO R, GIBBS P, TEIXEIRA P. Spray-drying for the production of dried cultures. International Journal of Dairy Technology 2011;64(3):321-335. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-0307.2011.00677.x>
46. Derecho del Bienestar Familiar [DECRETO_1840_1994].. Disponible en: https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/decreto_1840_1994.htm
47. Decisión 486. Disponible en: <http://acpi.org.co/wp-content/uploads/2016/11/DECISI%C3%93N-486.pdf>
48. Instituto Colombiano Agropecuario. Resolución 00150 de 2003 Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/1fb4d420-5e11-4ae6-959d-5bada49d683c/2003R0150-1.aspx>
49. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Resolución 187 de 2006. Disponible en: https://www.redjurista.com/Documents/resolucion_187_de_2006_ministerio_de_agricultura_y_desarrollo_rural.aspx#
50. Instituto Colombiano agropecuario. Resolución 698 de 2011. Disponible en: https://www.redjurista.com/Documents/resolucion_698_de_2011_ica_-_instituto_colombiano_agropecuario.aspx#/
51. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Resolución 1348 de 2014. 2014. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Recu>

[rso s_Gen%C3%A9ticos_/Resolucion_1352_de_2017_modifica_la_1348_de_2014.pdf](#)

52. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Decreto 1076 de 2015. 2015.

Disponible en: <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=78153>

53. Instituto Colombiano Agropecuario. PRODUCTOS BIOINSUMOS REGISTRADOS - 16 DE SEPTIEMBRE 2020. Bogotá: ICA; 2020 p.1-18. Available from: <https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/fertilizantes-y-bio-insumos-agricolas/listado-de-bioinsumos/2009/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>
54. Sánchez Ligia, Corrales Lucía. EVALUACIÓN DE LA CONGELACIÓN PARA CONSERVACIÓN DE ESPECIES AUTÓCTONAS BACTERIANAS. Año 2005. VOL.3 No. 4. NOVA. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_4.pdf
55. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S Weissfeld. 1998. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc. St. Louis.
56. Swaminathan J, van Koten C, Henderson HV, Jackson TA, Wilson MJ. Formulations for delivering Trichoderma atroviridae spores as seed coatings, effects of temperature and relative humidity on storage stability. J Appl Microbiol 2016;120(2):425-431. Available at: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13006>
57. Terreros C M, Huanca L W, Arriaga C I, Ampuero B A. Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. Revista de investigaciones veterinarias del Perú 2015 Dec 31,;26(3):420-426. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n3/a08v26n3.pdf>
58. Adriana Belmonte, Mónica G. Noguerras, María Belén Contigiani, Virginia Gandini, Emma G. Sutich. Estudio de métodos de congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de Gardnerella vaginalis. REVISTA BIOQUIMICA Y PATOLOGIA CLÍNICA 2008;72(2):15-28. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/651/65112134003.pdf>
59. Rodríguez-Leyes EA, González-Canavaciolo VL, Sierra-Pérez R de la C, Vicente-Murillo R, Morales-Rico CL, Marrero-Delange D. Estabilidad preliminar de las cápsulas blandas de gelatina con D-004 ingrediente activo. Rev. CENIC Cienc. Quim. 22 de mayo de 2018 ;460:132-4. Disponible en: <https://revista.cnrc.cu/index.php/RevQuim/article/view/152>
60. Cortes.RJ, González. M, Perazzo.J, Lopez - Ortega. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del género Lactobacillus spp a partir de heces de perros (Canis lupus familiaris) mestizos lactantes. Gaceta de Ciencias Veterinarias. 2014;19(1):5- 10.
61. Condarco: Condarco A. Tema 13. Género Pseudomonas. 2013.
62. Espín G. Biología de Azotobacter vinelandii [Internet]. Biblioteca Web UNAM. [cited 3 July 2021]. Available from: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
63. Jurado-Gámez H, Jarrín-Jarrín V. Cinética de crecimiento de Lactobacillus lactis y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. Revista Biosalud 2015; 14(2): 49-62. DOI: 10.17151/biosa.2015.14.2.5
64. Mayea, S. Carone, M. Novo, R. Boado, I. Silveira, E. Soria, M. Moralez, Y. Valiño, A. 1998. "Aplicaciones de la Microbiología Agropecuaria. Biofertilizantes". Tomo II. Ed. Félix Varela. Cuba.
65. Fu, S., Thacker, A., Sperger, D. M., Boni, R. L., Buckner, I. S., Velankar, S., Munson, E. J., & Block, L. H. (2011). Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. AAPS PharmSciTech, 12(2), 453–460. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134659/>
66. Pereira RI, Muñoz JF, Peluffo DH. Empleo del estropajo común (Luffa cylindrica) en la remoción de contaminantes [internet]. 2014 [citado 17 de junio de 2020]. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1850/2069>
67. Dhamecha, D., Movsas, R., Sano, U., & Menon, J. U. (2019). Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. International journal of pharmaceutics, 569, 118627. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7073469/>
68. Castro, R. I., Morales-Quintana, L., Alvarado, N., Guzmán, L., Forero-Doria, O., Valenzuela-Riffo, F., & Laurie, V. F. (2021). Design and Optimization of a Self-Assembling Complex Based on Microencapsulated Calcium Alginate

and Glutathione (CAG) Using Response Surface Methodology. *Polymers*, 13(13), 2080. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8271790/>

69. Richardson, T., Kumta, P. N., & Banerjee, I. (2014). Alginate encapsulation of human embryonic stem cells to enhance directed differentiation to pancreatic islet-like cells. *Tissue engineering. Part A*, 20(23-24), 3198-3211.

Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259202/>

70. Vergara L, Alves C, Chim J, Borges C, Herter F. ENCAPSULAÇÃO DO SUCO DE AMORA-PRETA UTILIZANDO CARRAGENA, TRAGACANTO E XANTANA, ASSOCIADAS COM PROTEÍNA DE ERVILHA, POR COACERVAÇÃO

COMPLEXA [Internet]. Pelotas; 2020 [cited 7 July 2021]. Disponível em: http://schenautomacao.com.br/ssa7/envio/files/trabalho3_171.pdf

71. Schuch, R. A., Oliveira, T. L., Collares, T. F., Monte, L. G., Inda, G. R., Dellagostin, O. A., Vendruscolo, C. T., Moreira, A., & Hartwig, D. D. (2017). The Use of Xanthan Gum as Vaccine Adjuvant: An Evaluation of Immunostimulatory Potential in BALB/c Mice and Cytotoxicity In Vitro. *BioMed research international*, 2017, 3925024. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5438839/>

72. Bogantes D, Flores L, Castellán E, Uribe L. Encapsulamiento de nematodos entomopatógenos en materiales basados en biopolímeros y su efecto sobre *Galleria mellonella*. *Agronomía Costarricense*. 2018;42(2):9-27.

Disponível em: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242018000200009&script=sci_arttext&lng=en

73. Schoebitz, M., López, MD & Roldán, A. Bioencapsulación de inoculantes microbianos para una mejor fertilización suelo-planta. Una revisión. *Agron. Sosten. Dev.* 33, 751–765 (2013). Disponível em: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2162/10.1007/s13593-013-0142-0>

74. Mauricio Schoebitz, Hélène Simonin y Denis Poncelet (2012) Almidón de relleno y osmoprotectores mejorar la supervivencia de rizobacterias en perlas de alginato secos, *Journal of Microencapsulation*, 29: 6, 532-538, DOI: [10.3109 / 02652048.2012.665090](https://doi.org/10.3109/02652048.2012.665090)

75. ICONTEC. NTC 5842. 2018. Disponível em:

<https://tienda.icontec.org/gp-bioinsumos-para-uso-agricola-inoculantes-biologicos-requisitos-ntc5842-2018.html>

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

CARBOXIMETILCELULOSA SODICA

Sinónimos:	Carmelosa sódica. Carboximetil éter de celulosa sal sódica. Glicolato de celulosa sódica. NaCMC. CMCS. E466.
INCI:	Cellulose gum.
Descripción:	Sal sódica de un éter policarboximetílico de la celulosa.
Datos Físico-Químicos:	Polvo granuloso, blanco o casi blanco, higroscópico tras su desecación. Prácticamente insoluble en acetona, en etanol al 96%, y en tolueno. Se dispersa fácilmente en agua dando disoluciones coloidales. Oscurece a aprox. 227°C, y quema a aprox. 252 °C.
Propiedades y usos:	<p>Se puede preparar mediante adición de cloroacetato sódico a la celulosa en medio alcalino.</p> <p>Es un coloide hidrófilo de acción y usos similares a la metilcelulosa. Da geles de buena consistencia pero sin una gran transparencia y de color pardo acaramelado. Tienen una gran adhesividad, lo que les hace muy útiles como excipientes semisólidos bucales.</p> <p>Los geles que forma con el agua son de carácter aniónico y estables a pH = 4 – 10. Sin embargo los aumentos de temperatura provocan una pérdida de viscosidad. Admiten la incorporación de hasta un 15 – 20 % de alcohol. Soportan bastante bien los electrolitos, aunque los cationes trivalentes provocan un precipitado. Conviene humectarla con glicerina previamente a su gelificación, a fin de evitar la desecación del gel.</p> <p>Es ampliamente utilizada también como emulsificante en emulsiones O/W (aunque es menos efectiva que la metilcelulosa), como agente suspensor (de pólvoras insolubles en agua), dispersante (cuando aparecen precipitados), así como disgregante en comprimidos.</p> <p>Se emplea también en la protección mecánica de lesiones orales y periorales formando parte de excipientes como el orabase, y como sustituto de la saliva fisiológica en la xerostomía (sequedad de boca). Contribuye a la formación de un bolo fecal blando, siendo útil en el tratamiento de la constipación habitual. Al tomarse con agua, retiene a ésta por imbibición en el tracto intestinal, formando una masa gelatinosa hinchada que no se absorbe y que aumenta el volumen de las heces, estimulando el colon y la evacuación.</p> <p>Es también un ingrediente de preparaciones protectoras para casos de colostomía e ileostomía.</p> <p>Puede esterilizarse a 160 °C durante 1 h, aunque puede perder características de viscosidad.</p>
Dosificación:	<ul style="list-style-type: none">-Gelificante: 3 – 6 %. Se puede aumentar más aún la consistencia de los geles elevando la concentración hasta el 8 – 10 %.-Emulgente en emulsiones O/W: 0,25 – 1 %.-En comprimidos: 1 – 6 %.-En soluciones orales: 0,1 – 1,0 %.

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

-Como laxante: 1,5 - 10 g/día en varias tomas, con abundante ingestión de agua.

Efectos secundarios: Dosificaciones elevadas de CMCS u otros laxantes de tipomecánico, pueden incrementar temporalmente la flatulencia y distensión, pudiendo llegar a la obstrucción intestinal:
Se han observado casos de obstrucción del esófago tras la ingestión en seco de este tipo de sustancias.

Contraindicaciones: No administrar vía oral a pacientes con obstrucción intestinal o condiciones que provoquen una obstrucción intestinal.

Precauciones: Administrar con precaución si se padece hipertensión, diabetes, o síntomas de apendicitis.

Interacciones: Antibióticos vía oral, anticoagulantes, digitálicos, etc...

Incompatibilidades: Ácidos fuertes, sales de metales (en particular hierro, aluminio, mercurio, cinc, y plata), goma xantán, gelatina, pectina, y colágeno.

Observaciones: Apto uso cosmético. Uso tópico.

Conservación: En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ Y DE LA HUMEDAD.

Ejemplos de formulación:

Gel de carboximetilcelulosa sódica (FN)

Carboximetilcelulosa sódica	2 %
Glicerina	10 %
Agua destilada c.s.p	100 g

Modus operandi:

Humectar en un mortero la carboximetilcelulosa sódica con la glicerina hasta formar una pasta homogénea. Calentar el agua con los conservantes a 60 °C. Añadir la pasta anterior y agitar rápidamente hasta enfriamiento.

Gel celulósico hidroalcohólico

Carboximetilcelulosa sódica	5 %
Etanol 96°	.. 15 - 20 %
Agua purificada c.s.p	100 g

Modus operandi:

Humectar la carboximetilcelulosa sódica con un poco de glicerina. Añadir el agua a 60°C y dejar en agitación lenta hasta que gelifique. Finalmente añadir el alcohol.

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

Saliva artificial

Carboximetilcelulosa sódica	10 g
Sorbitol polvo	30 g
Potasio cloruro	1,2 g
Potasio fosfato monobásico	0,342 g
Sodio cloruro	0,084 g
Calcio cloruro anhidro	0,146 g
Magnesio cloruro	0,052 g
Agua purificada c.s.p	1000 ml

Modus operandi:

Mezclar las sales y el sorbitol y disolverlos en el agua. Añadir la CMCS y agitar sin incorporar aire hasta formar el gel.

Bibliografía:

- Martindale, *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*, 1ª ed. (2003).
- *The Merck Index*, 13ª ed. (2001).
- *Monografías Farmacéuticas*, C.O.F. de Alicante (1998).
- *La Formulación Magistral en la Oficina de Farmacia*, M.ª José Llopis Clavijo y Vicent Baixauli Comes (2007).
- *Formulario Magistral del C.O.F. de Murcia* (1997).
- *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., 2009.

	FICHA TÉCNICA	Código: GT-F-40
	Versión: 03	Fecha: 06/08/2018
		Página: 1 de 2

Número de revisión:	Declaración de fecha de revisión:
Título: GOMA XANTANA GRADO ALIMENTICIO.	

Nombre químico: Goma Xantana Grado Alimenticio.

Calidad: Alimenticia.

Descripción: La Goma Xantana es un polisacárido de alto peso molecular producido por la fermentación de un carbohidrato con la bacteria Xanthomonas Campestris bajo condiciones especiales de suministro de nutrientes, pH, y suministro de oxígeno y temperatura; luego es purificado, secado y molido hasta obtener un polvo de color blanco o amarillo claro y fluido.

Fecha de vencimiento: 24 meses a partir de su fecha de elaboración.

1. MANEJO Y APLICACION

La Goma Xantana puede ser usada como espesante dentro de un amplio rango de medios ácidos/básicos, con una alta eficiencia como agente de suspensión y emulsificante, proporciona alta viscosidad en diversos tipo de alimentos y bebidas. No solo mejora la retención de humedad y consistencia, sino que también ayuda en los procesos de congelación/descongelacion de los productos y mejora la sensación organoléptica al momento de consumirlos. Adicionalmente, contribuye a extender la vida útil de los productos.

2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS.

CARACTERÍSTICAS	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Polvo fluido
Sabor y olor	Insaboro e inodoro
Color	De blanco a amarillo claro

PARAMETROS FISICO-QUIMICOS

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	UNIDADES
Viscosidad sin sln KCL al 1%	1,200 – 1,600	cps
PH (Solución al 1%)	6,0 – 8,0	
Humedad	13 máximo	%
Cenizas	13 máximo	%
Tamaño de partícula	100 a través de malla	%
Solubilidad	Completamente soluble en agua fría	-
Nitrógeno Total	<1,5	%
Ácido pirúvico	1,5 mínimo	%

Dirección: Cra. 52 No 6 Sur | Medellín – Colombia PBX: (+57) (4) 444-8787
E-mail: servicioalcliente@protokimica.com Web:

www.protokimica.com

	FICHA TÉCNICA	Código: GT-F-40
	Versión: 03	Fecha: 06/08/2018
		Página: 2 de 2

Número de revisión:	Declaración de fecha de revisión:
Título: GOMA XANTANA GRADO ALIMENTICIO.	

Metales pesados	20 máximo	ppm
Arsénico	3 máximo	ppm
Plomo	5 máximo	ppm

PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	UNIDADES
Mesófilos Totales	2,000 máximo	ufc/gr
Hongos y Levaduras	100 máximo	ufc/gr
E. Coli (/25 gr)	Ausente	-
Salmonella (/25 gr)	Ausente	-

3. RECOMENDACIONES BÁSICAS

Debido a que la Goma Xantana es altamente higroscópica, es aconsejable agregarla al agua de manera lenta y asegurándose que se disuelve por completo; y mezclarla con los otros ingredientes en proporción 1:10.

4. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Almacene en el empaque original. Ubique en un lugar limpio, fresco, seco y protegido de la luz del sol, a temperatura ambiente (15 °C a 45 °C). Se recomienda su uso en un tiempo máximo de 2 semanas después de abierto el empaque.

Nota: El uso final del producto es responsabilidad directa del cliente, la información consignada en este documento es sólo de carácter ilustrativo y fue tomada de distintas fuentes bibliográficas por nuestro departamento técnico. Estos datos no representan responsabilidad legal alguna y no eximen al comprador de hacer sus propios análisis e investigaciones.

Limpieza

Dirección: Cra. 52 No 6 Sur | Medellín – Colombia PBX: (+57) (4) 444-8787
E-mail: servicioalcliente@protokimica.com Web:

www.protokimica.com

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

GLICERINA

Sinónimos: Glicerol. Alcohol glicérico. Propano-1,2,3-triol. E-422.

INCI: Glycerin.

Formula Molecular: C₃H₈O₃

Peso Molecular: 92,09

Descripción: La glicerina se obtiene principalmente de aceites y grasas como producto intermedio en la fabricación de jabones y ácidos grasos. Puede ser obtenida de fuentes naturales por fermentación, o por ejemplo melaza de remolacha azucarera en la presencia de grandes cantidades de sulfito de sodio. Sintéticamente, la glicerina se puede preparar mediante la cloración y saponificación de propileno.

La glicerina Acofarma es de origen vegetal.

Datos Físico-Químicos: Líquido siruposo, untuoso al tacto, incoloro o casi incoloro, límpido muy higroscópico. Miscible con agua y etanol al 96%, poco soluble en acetona, prácticamente insoluble en aceites grasos y en aceites esenciales. Densidad: 1,256 - 1,264 g/ml. Índice de refracción: 1,4700 - 1,4750.

Propiedades y usos: La glicerina es un agente deshidratante osmótico con propiedades higroscópicas y lubricantes. Tiene también acción antiflogística local y tópica. Es emoliente, protegiendo y abalanzando la piel. Por vía oral es demulcente y laxante débil, también edulcorante. Es un buen disolvente de sustancias orgánicas y minerales.

En concreto se utiliza:

-En todo tipo de formas tópicas para casos de piel seca, asperezas cutáneas, ictiosis, eczemas no rezumantes, etc...

-Para el tratamiento del estreñimiento y de la dependencia a laxantes. En supositorios para promover la evacuación fecal, actúa en unos 15- 30 min.

-Para reducir la presión intraocular y el volumen vítreo antes de la cirugía oftálmica y como coadyuvante en el tratamiento del glaucoma agudo. Se aplica tópicamente para reducir el edema corneal, pero dado que el efecto es transitorio solamente para facilitar el examen ocular previa aplicación de otro colirio anestésico. También se usa vía oral o i.v. para reducir la presión intracraneal y/o el volumen de fluido cerebroespinal en casos de infarto cerebral o ictus.

-Se ha usado a partes iguales con alcohol 96% para la prevención de grietas en el pecho de madres lactantes.

-En gotas óticas utilizadas para extraer la cera de los oídos, que a menudo contienen glicerina como agente lubricante y

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

reblandeciente.

-En cosmética se usa ampliamente por sus propiedades emolientes y humectantes.

-Para evitar la evaporación de la fase acuosa en las emulsiones y sistemas gelificados, mejorando además sus propiedades plásticas.

-Como agente humectante en la elaboración de pastas y suspensiones.

-Como disolvente y vehículo de muchos principios activos para su posterior incorporación a las formas farmacéuticas tópicas.

-Como edulcorante, conservador en algunas formulaciones líquidas, y como plastificante en el recubrimiento de comprimidos. Se incluye a menudo en preparaciones tópicas como gotas oculares, cremas y lociones debido a su efecto lubricante.

Dosificación:

-En supositorios laxantes, dosis de 3 g (adultos) o 1 – 1,5 g (niños menores de 6 años).

-Como emoliente y humectante: hasta el 30 %.

-Como conservador: hasta el 20 %.

-Vehículo en geles acuosos: 5-15%.

-Vehículo en geles no acuosos: 50-80%.

-Formulaciones oftálmicas: 0,5-30%.

-Disolvente para formulaciones parenterales: hasta un 50%.

-Edulcorante para elixires alcohólicos: hasta un 20%.

Efectos secundarios:

Sus reacciones adversas se deben principalmente a su acción deshidratante.

Por vía oral puede causar dolor de cabeza, náuseas, vómitos y menos frecuentemente diarrea, sed, mareos y confusión mental. Se ha observado algún caso de arritmias cardíacas.

Por vía intravenosa puede producir hemolisis, hemoglobinuria y insuficiencia renal aguda.

Por vía tópica o rectal puede causar prurito e irritación.

Precauciones:

Por vía tópica debe usarse disuelta en agua porque concentrada es irritante.

Debe usarse con precaución en pacientes con hipervolemia, fallo cardíaco o hepático, y enfermedad renal, así como en individuos deshidratados y diabéticos.

Incompatibilidades:

Agentes oxidantes fuertes tales como el trióxido de cromo, el clorato y el permanganato potásicos, y el ácido nítrico (forma mezclas explosivas).

En presencia de luz y óxido de zinc o subnitrito de bismuto se colorea de negro.

Observaciones:

Es higroscópica.

A bajas temperaturas cristaliza y no funde hasta los 20°C.

Para uso oral debe advertirse que "por vía oral puede ser perjudicial a dosis elevadas y también provocar dolor de cabeza, molestias de estómago, y diarreas".

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

Conservación: En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.

Ejemplos de formulación:

Pasta al agua

Talco	25 g
Cinc óxido	25 g
Glicerina	25 g
Agua purificada	25 g

Modus operandi:

Mezclar pulverizando antes el talco y el óxido de cinc. Luego añadirle la glicerina para humectar formando una pasta, y finalmente el agua poco a poco, trabajándolo con la mano del mortero y con una espátula hasta que quede una pasta muy fina.

Glicerolado de almidón

Almidón de trigo	100 g
Agua purificada	100 g
Glicerina	900 g

Solución hidroalcohólica con ictiol y glicerina

Ictiol	10 g
Glicerina	30 g
Alcohol 96%	50 g
Agua purificada	200 ml

Modus operandi:

Disolver el ictiol en el agua y añadir luego la glicerina y el alcohol.

Crema con glicerina

Glicerina	10 g
Vaselina líquida	10 g
Crema O/W no-iónica c.s.p.	100 g

Modus operandi:

La emulsión se realiza con un 50% de Ungüento emulsificante no-iónico al que pondremos en baño María en un vaso junto con la vaselina líquida y un 0,02% de Nipasol, y en otro vaso la glicerina, el agua purificada, y un 0,05% de Nipagin. Fundida la fase grasa y caliente la acuosa, verter ésta última sobre la anterior agitando con varilla hasta casi total enfriamiento.

Loción de glicerina

Glicerina	2 p
Agua de rosas	1 p

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

Bibliografía:

- Martindale, *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*, 1ª ed. (2003).
- *The Merck Index*, 13ª ed. (2001).
- *Formulación magistral de medicamentos*, COF de Vizkaia, 5ª ed. (2004).
- *Monografías Farmacéuticas*, C.O.F. de Alicante (1998).
- *La Formulación Magistral en la Oficina de Farmacia*, M.ª José Llopis Clavijo y Vicent Baixauli Comes, 1ª, 3ª y 4ª parte.
- *Formulario Magistral del C.O.F. de Murcia* (1997).
- *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., 2009.



1. **DEFINICIÓN.**- La leche descremada UHT "**GLORIA**" es un producto que se elabora a partir exclusivamente de leche fresca de buena calidad que ha sido descremada, con la adición de vitaminas A, C, D y E. A esta leche se le ha aplicado un tratamiento térmico mediante el proceso UHT (Ultra High Temperature) a altas temperaturas por un tiempo muy corto, para luego ser envasada asépticamente en cajas de polietileno multilaminados.
2. **INGREDIENTES:** Leche descremada, estabilizante (SIN 339), vitaminas A, C, D y E.
3. **USO**
Producto para consumo directo. No necesita tratamiento especial para su consumo. Una vez abierto el envase debe conservarse en refrigeración.

4. COMPOSICIÓN CENTESIMAL:

Sólidos grasos (%)	Máx. 0.1
Sólidos totales (%)	Mín. 8.3

5. CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

5.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

REQUISITO	DESCRIPCIÓN
Color	Blanco
Olor	Característico a leche, sin olores extraños
Sabor	Característico a leche, sin sabores extraños
Aspecto	Líquido uniforme

5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

CARACTERÍSTICAS	ESPECIFICACIÓN
Materia grasa (%)	Máx. 0.1
Sólidos Totales (%)	Mín. 8.3
Acidez (expresado en °D)	14.0 – 16.0
pH	Mín. 6.55
Densidad a 20 °C (g/mL)	Mín. 1.032



5.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

REQUISITOS	Plan de muestreo		ESPECIFICACIÓN
	n	c	
Prueba de esterilidad comercial	5	0	Estéril comercialmente

- n : Número de envases muestreados
- c : Número máximo permitido de envases n conformes

Temperatura de incubación : 35 - 37° C

Tiempo de incubación : 7

días

6. INFORMACIÓN NUTRICIONAL.-

Nutrition Facts / Datos de Nutrición		
Serving Size / Tamaño de Porción: 240 mL Servings Per Container / Porciones por envase: 4		
Amount Per Serving / Cantidad por Porción		
Calories / Calorías	78	
Calories from Fat / Calorías de Grasa	0	
% Daily Value % Valor Diario*		
Total Fat / Grasa Total 0g	0 %	
Saturated Fat / Grasa Saturada 0g	0 %	
Cholesterol / Colesterol 0mg	0 %	
Sodium / Sodio 130 mg	0 %	
Total Carbohydrate / Carbohidratos 12 g	4 %	
Dietary Fiber / Fibra Dietaria 0g	0%	
Sugars / Azúcares 12 g		
Protein / Proteína 7.2 g		
Vitamin A / Vitamina A ** 30 %	Vitamin D / Vitamina D ** 30 %	
Vitamin C ** 20 %	Phosphorus / Fósforo ** 30 %	
Calcium / Calcio		
* Percent Daily are based on a 2,000 calorie diet. Your daily values may be higher or lower depending on your calorie needs / Porcentaje diario son basados en una dieta de 2000 calorías. Sus valores diarios pueden ser más altos o más bajos dependiendo de sus necesidades calóricas.		
** Percent Daily Values are based on CODEX / Los Valores Porcentuales están referidos al CODEX		
Calories / Calorías	2000	2500
Total Fat / Grasa Total	Less than / Menos de 65g	80g
Sat Fat / Grasa Saturada	Less than / Menos de 20g	25g
Cholesterol / Colesterol	Less than / Menos de 300mg	300mg
Sodium / Sodio	Less than / Menos de 2400mg	2400mg
Carbohydrates Totales	300g	375g
Dietary Fiber / Fibra Dietaria		25g
Calories per gram / Calorías por gramo:		
Fat / Grasa 9 *	Carbohydrate / Carbohidratos 4 *	Protein / Proteínas 4

7. PRESENTACION

7.1 ENVASE

El producto es envasado en envases tetrabrik que en su estructura posee seis capas de protección (multilaminar), que impiden el paso de la luz; de diseño sanitario especial para alimentos. La presentación es en cajas de 1 L.

GLORIA, la Calidad que Ud. conoce

**LECHE DESCREMADA UHT
"GLORIA"**

El producto lleva impreso el código de producción y la fecha de vencimiento (día, mes y año),

7.2 EMBALAJE

El producto es embalado en cajas de cartón debidamente rotuladas conteniendo 12 unidades por caja.

8. VIDA ÚTIL Y FORMA DE CONSERVACIÓN

El producto no requiere refrigeración. Conservado en un ambiente fresco y seco, el período de vida útil del producto es de siete (07) meses.

Una vez que es abierto el envase, se deberá conservar el producto en refrigeración.

*Superintendencia de Calidad
Octubre 07, 2013*

GLORIA, la Calidad que Ud. conoce



**EL SUSCRITO COORDINADOR DE LA
RED COLOMBIANA DE SEMILLEROS DE
INVESTIGACIÓN NODO BOGOTÁ -
CUNDINAMARCA**

CERTIFICA QUE:

La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, registrada con el Nit:
800144829-

9, participó en el XIX Encuentro Regional de Semilleros de investigación, el cual
se

llevó a cabo los días 10 al 14 de Mayo de 2021 virtualmente, con los estudiantes
y/o docentes relacionados a continuación:

No.	Nombre completo	Documento de identidad
1	TATIANA ANDREA TORRES OSPINA	1234642465
2	LAURA DANIELA VALDERRAMA LOPEZ	1001199058
3	PAULA ANDREA MARTINEZ RODRIGUEZ	1032498435
4	GINNA LORENA BOHORQUEZ CLAVIJO	1070977987
5	VIVIAN DANIELA PINEDA AMAYA	1012434423
6	ANGELA LIZETH ROJAS LEYTON	1022399584
7	LAURA STEPHANIE DIAZ RAMIREZ	1016113273
8	NATALIA MICHELL COLLAZOS QUEVEDO	1031180376
9	LAURA ROCIO MARTINEZ LEON	1122137202
10	EVERTH DAVID MARMOLEJO GONZALEZ	1014299269
11	MAURA GOMEZ TORRES	1014302936
12	LUZ PATRICIA RIAÑO GOMEZ	1006617928
13	SARA TORRES RAMIREZ	1085290073
14	DANIEL FELIPE GALEANOS SANCHEZ	1233691200
15	KAREN LORENA HIDALGO PULIDO	1000833588
16	VALERIA ANDREA VELEZ LOZANO	1007742683
17	KAROLI ASTRID SILVESTRE LAGOS	1013689226
18	YEIMY YISSETH MORENO GUERRERO	1014308203
19	CAMILA ANDREA BELTRAN PEREZ	1030684449

20	VALENTINA MORA PARRA	1032502234
21	MARIA ISABEL LARA DIAZ	1085344734

22	LORENA MAYORGA CARRILLO	1013684283
23	YERALDINEE MARTINEZ DORADO	1018514898
24	DIEGO ALEJANDRO BELTRAN CASTILLO	1024598944
25	BRYAN ALEJANDRO ORTIZ NARANJO	1233500870
26	ANGIE DANIELA RAMIREZ ALVAREZ	1007727194
27	ABELGIE CAMILA SANCHEZ AMEZQUITA	1000685641
28	DIANA LORENA GUIZA VELANDIA	1026292114
29	KAREM JULIETTE GUZMAN TORRES	1018500479
30	DAVID CHAPARRO LOZANO	1030695893
31	LIZETH VALERIA RODRIGUEZ CHARRY	1000031201
32	EDERSON ARMANDO MORENO PIÑEROS	1012442694
33	DANIEL FERNANDO PERDOMO MONTILLA	1000518148
34	ANDREA LORENA RODRIGUEZ VILLANUEVA	1105692608
35	JOHAN SEBASTIAN SANCHEZ FAJARDO	1003838364
36	SARA XIMENA AGUIRRE BORDA	1001295991
37	JOHN JAIRO CACERES ESPITIA	1014294208
38	SERGIO ANDRES CORTES HENAO	1001090228
39	LAURA CATALINA BARBOSA URREA	1192788688
40	ERICA LUCIANA MONROY RINCON	1000005339
41	DANIELA GONZALEZ CHOQUE	1014268852
42	NATHALEE ALZATE BERMUDEZ	1000970849
43	KAREN NATALIA ALBA VACA	1075690532
44	EDGAR ALFREDO GONZALEZ CAICEDO	1030602956
45	FERNANDO ANDRES SANDOVAL QUIMBAYO	16286825
46	JOSE ALFREDO BERMUDEZ ROJAS	1022399584
47	DIANA KATHERYN DE LOS ANGELES GOMEZ	1030567415
48	JORGE ALEJANDRO SUAREZ CAMPOS	1010001697
49	HAMMER ASDRUBAL QUINTERO LOZADA	1000834621
50	ANGELLY DANIELA NEIRA DELGADILLO	1001186815
51	LICETD LORENA AGUILERA ORDOÑEZ	1000020042
52	RAUL ALEJANDRO CABALLERO MONCADA	1019120059
53	LAURA DANIELA MOSQUERA LERMA	1006072430
54	CRISTIAN JAVIER ROMERO CARDENAS	1001219223
55	RUBENS ALONZO TORRES GRANJA	1000018095
56	NICOLAS ESTEBAN JAMAICA OSORIO	1000255726
57	MARTHA LILILANA OJEDA BLANCO	1018430801
58	LUCILA CHAVEZ	63465914
59	JUAN SEBASTIAN HURTADO VASQUEZ	1023958582
60	JAIME HUMBERTO RIVAS REYES	79402008
61	BLANCA ESTELLA RODRIGUEZ TORRES	20550552



63	AVINADAD MONTAÑO MORA	1007885325
64	JUAN CAMILO TORRES BACCA	1031165285
65	DAYANA STEPHANIA CASTRILLON VALENCIA	1007709286
66	JULIO ANDRES URREGO AMAYA	1022355906
67	JUAN CARLOS RAMOS BELTRAN	1016100349
68	YESICA KATERINE NOVOA GARCIA	1019075971
69	NIKOLE FERNANDA TOVAR FLOREZ	1000688485
70	MAYERLI CASTELLANOS ANGARITA	1000461745
71	LUISA ALEJANDRA FRANCO ARRIETA	1000471869
72	LEIDY LORENA ESPITIA RODRIGUEZ	1001202060
73	LAURA VALENTINA CALDERON VANEGAS	1006856964
74	JULY MELISSA GONZALEZ MEDINA	1000734180
75	DANIEL FELIPE MONSALVE BOLIVAR	1013687127
76	CARLOS ANDRES DAVILA ROMO	1000706615
77	DANILO ESTEBAN GUTIERREZ PAVA	1030626478
78	JEIMY ANDREA LOPEZ BURITICA	1023034432
79	VIVIANA ALEXANDRA BECERRA GOMEZ	1013654604
80	PAULA ANDREA MEJIA CONTRERAS	1016085725
81	SEBASTIAN ARIAS HERNANDEZ	1022435190
82	RONALD DEYS BAQUERO GONZALEZ	1033705104
83	ROBERTO ALFONSO VERDUGO RINCON	79890570
84	LAURA YURANI RODRIGUEZ GALINDO	1032496892
85	LAURA STEFANIA MOSQUERA HOYOS	1033791710
86	JORGE ARMANDO MOLANO PLATA	1062808876
87	CAROLINA ORJUELA OSPINA	52813865
88	JENIFFER ALEXANDRA LOPEZ MORA	1015469144
89	CAROL DANIELA RIVERA SALDAÑA	1026293784
90	CARLOS ANDRES JOJOA JOJOA	1010215523
91	ALEXANDRA GALVIS TORRES	1012443705
92	ANGGIE MARLEN VEGA FORERO	1010224401
93	ADRIANA ALEXANDRA TOLOZA PEÑA	52754440
94	JAIRO ELIECER VERGARA RAMIREZ	1024576462
95	JHIRETH NATALIA SAZA CARDENAS	1010246938
96	JESSICA LISETH PARRA BUITRAGO	1000686309
97	FABIANA TOVAR MORENO	1001077346
98	MARIA LISETH GARCIA AVILA	1010012549
99	BRAYAN STEVEN BELLEIZANO VILLAIZAN	1000226645
100	CRISTIAN DAVID BAQUERO GUEVARA	1000257520
101	DAVID FELIPE LOPEZ RIAÑO	1000240101
102	SAMANTHA RAMIREZ RIOS	1007538360
103	ANGIE LORENA HINESTROZA PEREZ	1023027147



104	NATALIA TORRES GARCIA	1014296118
105	HASLEIDY ALEJANDRA RODRIGUEZ PARRA	1023929783
106	KAREN DAJANA TELLO	1000580342
107	JEIMY ALEJANDRA CASTIBLANCO PIÑEROS	1018500151
108	JHON FELIPE RODRIGUEZ CORREA	1010247315
109	SERGIO ESTEBAN MARTINEZ BENITEZ	1019135861
110	LAURA ANGELICA MEDELLIN ROLDAN	1010248688
111	JUANA VALENTINA HERNANDEZ ORTIZ	1010248217
112	MARIA ISABEL HERNANDEZ ROCHA	1010246042
113	ANDRES FELIPE LOPEZ RAMIREZ	1073526514
114	CARLOS EDUARDO CARRILLO RIAÑO	1033796277
115	JEFER ANTONIO CASTRO MARTINEZ	1019111465
116	MIGUEL STEVEN GONZALEZ GOMEZ	1023964993
117	CAROLINA SOTELO BLANCO	1018515204
118	LAURA FERNANDA JIMENEZ RODRIGUEZ	1010012115
119	DUMAR SANTIAGO ORDOÑEZ CASTILLO	1116809517
120	LAURA JIMENA MALAGON SUAREZ	1070307648
121	LADY NATALIA CARDENAS ORTIZ	1010245362
122	LAURA DANIELA GUAYAN DIAZ	1000117553
123	GENESIS ANGELICA ROMO PIÑEROS	1010247426
124	LAURA CAMILA CORZO GONZALEZ	1000586426
125	PAOLA ESTEFANY CABALLERO ALVAREZ	1001327754
126	DIANA MARCELA DIAZ RAMIREZ	1233495048
127	GLORIA CAMILA BORDA LEMUS	1020832706
128	CRISTIAN CAMILO BOJACA HOYOS	1022436035
129	YESICA JASBLEIDY RAMIREZ ESCOBAR	1013678683
130	LINA MARIA ESCOBAR PINEDA	1019151811
131	YISETH ANDREA PARDO PARDO	1013648019
132	LAURA ALEJANDRA AMADOR ORTEGA	1026600162
133	TANIA HIGUERA BENAVIDES	1000615214
134	LILIANA ALEJANDRA MUÑOZ NAJAR	1026593948
135	YEIMY ANDREA DIAZ CARDENAS	1023958434
136	MARIANA JISELL LAGUNA VEGA	1018500771
137	ZEIRYS HERRERA MARTINEZ	1026293478
138	LINA MARCELA FLOREZ VILLALBA	1030677626
139	JAIRO ANTONIO CACERES TARAZONA	1096950177
140	CATHERINE CAMELO ALEJO	1032508283
141	LIZETH DAYANN MARQUEZ DIAZ	1024600890
142	ERIKA NATALIA RODRIGUEZ BAUTISTA	1015451164
143	ANGIE LORENA CORTES PINEDA	1010081394
144	DANIELA ALEJANDRA SANCHEZ ZAMBRANO	1010006799



145	PAULA SOFIA ESCOBAR USAQUEN	1073718100
146	LEONARDO ESTEBAN SANABRIA SALAZAR	1026595220
147	ANDREA VALENTINA MAYORGA LOPEZ	1015475646
148	KATHERINE ANDREA GARZON SEGURA	1030677375
149	VIVIAN SOFIA ROMERO MARTINEZ	1010069263
150	ANGIELUZ ABY TORRES TORRES	1014253234
151	PAULA NATALIA LOPEZ DAZA	1022443861
152	VALENTINA HENAO BUSTOS	1233509484
153	ISMAEL RUIZ OVALLE	1030569638
154	LEIDY GIOVANNA PACHECO RODRIGUEZ	1023956859
155	AURA CRISTINA GOMEZ PERDOMO	1001314981
156	LEYVER ERLEY SANCHEZ NIÑO	1115733189
157	DANIELA ACEVEDO CEPEDA	1072195748
158	LUISA FERNANDA ALFONSO DUCUARA	1193135913
159	BRENDA SANCHEZ GUTIERREZ	1010124708
160	FABIANA ANDREA LOPEZ RODRIGUEZ	1001287776
161	MADELENE DANIELA QUEVEDO GUERRERO	1013687709
162	MARIA FERNANDA BOLIVAR AREVALO	1000348211
163	DAYANA SOLANO SOLANO MENESES	1031183822
164	VALENTINA FARIAS PULIDO	1192742119
165	ESTEFANIA HERRERA CARDOZO	1010007150
166	LUISA MARIA MENDIETA VARGAS	1014296016
167	WENDY DANIELA MEJÍA CONTRERAS	1001064950
168	JULIANA GONZALEZ ALVAREZ	1020747648
169	KIMBERLLY ALEXANDRA MARTINEZ CAICEDO	1016109825
170	ANGIE LIZETH MIRQUE CANCHON	1012424809
171	JORGE ENRIQUE PULIDO LEGUIZAMON	80769516
172	JOHANA CATALINA BAUTISTA SALCEDO	1033750654
173	SANDRID ALEJANDRA CARDENAS SALAZAR	1010100606
174	TANIA ALEJANDRA ESPITIA MEDRANO	1018484169
175	MARIA CAMILA ESQUIVEL MORENO	1192815171
176	JOSE ARLEY GONZALEZ BURGO	1014192499
177	LUIS FELIPE PINILLA HORTA	1026306974
178	LICETH LORENA MONTAÑO REYES	1000686809
179	MAYRA SOFIA CARREÑO GAONA	1010001653
180	LILI CAROLINA RAMIREZ CRUZ	1022425359
181	ANGELICA LORENA MORENO PACHON	1000572641
182	KAROL ESTEFANY RIOS LEON	1000285737
183	LAURA KATHERINE MORENO BELTRAN	1000182168
184	SIMON MARTINEZ BUSTOS	1020835078
185	MARILYN YULIETH RAMIREZ RODRIGUEZ	1010001702



186	YEIMY YULIETH OSPINA PATIÑO	1022402526
187	KAREN YILIHANA MONTAÑO ACOSTA	1052398539
188	MIGUEL FELIPE CIFUENTES BAQUERO	1022443638
189	WILLIAM FERNANDO ROMERO GONZALEZ	1019140693
190	PAULA ANDREA BUSA RIAÑO	1022440342
191	JOHAN STEVENS ROMERO BERMUDEZ	1000456151



[Handwritten signature]