



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILITOL CON ALDOSA REDUCTASA MEDIANTE NANOSOPORTES

**Tesis
presentada por:**

M.C. Tania Méndez Pérez

**a la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ingeniería Química
como requisito parcial para obtener el grado de**

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN
INGENIERÍA QUÍMICA**

**Directora: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga
Co-director: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco**

Morelia, Michoacán de Ocampo, octubre del 2023



Asunto: Impresión de Tesis.

M.P.P. Venecia Azereet Medina Ortiz.
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle, que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILITOL CON ALDOSA REDUCTASA MEDIANTE NANOSOPORTES", después de haber revisado el manuscrito que presentó la alumna **Tania Méndez Pérez**, con matrícula **1505627K**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de su Tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

Directo de Tesis: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002

Codirector: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco 94002061

Vocales:

Dr. Rafael Huirache Acuña 11000201

Dr. Rafael Maya Yescas 04002040

Dr. José Apolinar Cortés 82033374

Atentamente.
Morelia, Michoacán a 05 de septiembre de 2023.

Dr. Jaime Espino Valencia
Coordinador del Doctorado en Ciencias en Ingeniería Química.



JEV/mcpa.



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

Facultad de Ingeniería Química / Universidad San Nicolás de Hidalgo
Francisco J. Mújica S/N / Col. Felicitas del Río / C.P. 58060 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443 327 3584

<http://posgrado.fiq.umich.mx/>

Índice de Contenido

I. RESUMEN	4
ABSTRACT	5
II. LISTA DE FIGURAS	6
III. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 GENERALIDADES	9
1.2 JUSTIFICACIÓN	11
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.4 HIPÓTESIS	12
1.5 OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos particulares	13
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS	14
2.2 INMOVILIZACIÓN COMO ESTRATEGIA DE PROTECCIÓN DE BIOMOLÉCULAS ACTIVAS	16
2.3 ENSAYOS <i>IN SILICO</i> PARA DILUCIDAR LOS MECANISMOS DE REACCIÓN DE ALDOSA REDUCTASA Y SUS SUSTRATOS	17
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	19
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	22
4.1. Diferenciar azúcares de edulcorantes	22
4.2. Inmovilizar a aldosa reductasa en nanopartículas porosas de sílice	23
4.3. Acarrear aceites esenciales en partículas mesoporosas para control de hongos que manchan madera	24
4.4. Demostrar que la oxidación de NADPH+H ⁺ por aldosa reductasa no indica la conversión de xilosa a xilitol	25
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	32
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

I. RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILITOL CON ALDOSA REDUCTASA MEDIANTE NANOSOPORTES

Por

Tania Méndez Pérez

Septiembre del 2023

Dirigida por: D.C. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co-dirigida por: D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

La demanda de xilitol en las industrias alimentaria y farmacéutica incrementa el interés en su producción, tanto en aumentarla como en reducir sus costos. Esto se debe a sus propiedades como edulcorante bajo en calorías y no cariogénico. El propósito es la obtención de un complejo enzimático para la producción de xilitol. Un complejo enzimático que resuelve algunos problemas que se presentan durante la producción enzimática de xilitol se desarrolló. En este trabajo, el complejo enzimático formado por aldosa reductasa (AR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FDH) se protegió en soportes mesoporosos, a fin de conservar la actividad enzimática. Las partículas mesoporosas de sílice (PMS) tipo SBA y MCM-41 se sintetizaron para la inmovilización de enzimas y compuestos de bajo peso molecular (aceites esenciales), respectivamente. Diferentes técnicas (Fisisorción de nitrógeno, potencial zeta, dispersión de luz dinámica, difracción de rayos X, análisis termogravimétrico, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier) se utilizaron para caracterizar tanto las partículas como la presencia de las biomoléculas dentro de las PMS. La conservación de la actividad de las biomoléculas se midió como producción de glicerol para el complejo enzimático y como control de mancha en madera de pino para los aceites esenciales. Un análisis *in silico* dilucidó la ausencia de xilitol en las reacciones que se llevaron a cabo con AR.

Palabras clave: xilitol, aldosa reductasa, partículas mesoporosas, actividad enzimática, *in silico*.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE XYLITOL PRODUCTION WITH ALDOSE REDUCTASE ON NANOSUPPORTS

By

Tania Méndez Pérez

September 2023

Directed by: D.C. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co-directed by: D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Xylitol demand in the food and pharmaceuticals industries increases the interest in its production, in increasing it and in decreasing its cost. This is due to its properties as a low calorie non cariogenic sweetener. The purpose is the obtention of an enzymatic complex for xylitol production. An enzymatic complex that resolved some problems of the enzymatic production of xylitol was developed. In this work, the enzymatic complex comprised of aldose reductase (AR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6FDH) was protected in mesoporous particles, to preserve its enzymatic activity. The silica mesoporous particles (PMS) type SBA and MCM-41 were synthesized for the immobilization of enzymes and low molecular weight compounds (essential oils), respectively. Different techniques (nitrogen physisorption, zeta potential, dynamic light scattering, X ray diffraction, thermogravimetric analysis, Fourier transform infrared spectroscopy) were used to characterize the particles and the presence of biomolecules onto the PMS. Conservation of the activity of the biomolecules was measured as glycerol production for the enzymatic complex and as pinewood stain control for the essential oils. An *in silico* analysis elucidated the absence of xylitol in the reactions performed with AR.

Key words: xylitol, aldose reductase, mesoporous particles, enzymatic activity, *in silico*.

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Consumo de edulcorantes en México (miles de toneladas)	9
Figura 1.2. Producción de xilitol por los métodos químico y biotecnológico.....	10
Figura 2.1. Esquema de la estrategia para producir xilitol con extracto enzimático obtenido de cristalino de conejo	15
Figura 2.2. Estructuras porosas de las partículas mesoporosas MCM-41, SBA-15 y SBA-16.....	16
Figura 3.1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.	19
Figura 4.1. La información científica no es accesible para el público en general, por lo que es necesario transformar esa información y divulgarla.....	23
Figura 4.2. La conservación de actividad del complejo AR+G6FDH al inmovilizarse en partículas mesoporosas de sílice se comprueba con la producción de glicerol.	24
Figura 4.3. El acarreamiento de los aceites esenciales en partículas mesoporosas controlan la mancha en madera de <i>Pinus</i> sp. por los hongos <i>Alternaria</i> sp. y <i>Geosmithia</i> sp.	25
Figura 4.4. El estudio de la interacción de aldosa reductasa con xilosa como sustrato y NADPH+H ⁺ como cofactor de forma <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> para dilucidar los productos de la reacción.	26

III. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

AE: Abreviatura de aceite esencial.

AH: Abreviatura de agentes de hinchamiento

AKR: Sufijo de la superfamilia de enzimas Aldo ceto reductasas, cuya nomenclatura fue introducida y aceptada por el *Hugo Genome Nomenclature Committee* (HGNC) en 1997. Formada por 15 familias (1-15) y 7 subfamilias (A-G). ej. AKR1B1.

ATG: abreviatura de Análisis termogravimétrico.

AutoDock: Software de simulación de anclaje automático, diseñado para predecir la unión de moléculas pequeñas a un receptor cuya estructura en tercera dimensión es conocida.

CO: Abreviatura del aceite esencial de cítricos.

CTAB: Abreviatura del compuesto bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

Desmond®: Software de simulación de dinámicas moleculares para las ciencias biológicas y de los materiales. Desarrollado por la empresa D. E. Shaw Research, forma parte de las herramientas del programa Maestro de Schrödinger.

DLS: Abreviatura de Dispersión de Luz Dinámica.

DRX: Abreviatura de Difracción de rayos X.

FTIR: Abreviatura en inglés de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

G6FDH: Abreviatura de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

HPLC: Abreviatura en inglés de Cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*).

MCM-41: Material mesoporoso (*Mobil Composition of Matter No.41*), formado por óxido de silicio y desarrollado por la empresa *Mobil Oil Corporation*.

MEB: Abreviatura de Microscopía Electrónica de Barrido.

NIST: Abreviatura en inglés del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología del Departamento de Comercio de los EE.UU.

PDB: Acrónimo de Protein Data Bank. Repositorio de acceso libre que contiene estructuras proteicas y de ácidos nucleicos en tercera dimensión, en la que científicos alrededor del mundo aportan información.

PMS: Acrónimo de partículas mesoporosas de sílice.

RMSD: Abreviatura en inglés de Raíz del error cuadrático medio (*Root Mean Square Deviation*).

SBA: Material mesoporoso Santa Barbara Amorphous

SO: Abreviatura del aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*).

TEOS: Abreviatura del compuesto Tetraetil ortosilicato.

TO: Abreviatura del aceite esencial de *Tagetes* sp.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El xilitol es un polialcohol de cinco carbonos derivado de la D-xilosa (figura 1.2), con propiedad edulcorante no calórico y no cariogénico. Además, previene osteoporosis, arritmias cardíacas e infecciones respiratorias. Debido a estas características, este producto en las industrias alimentaria y farmacéutica presenta demanda (Figura 1.1), lo que incrementa el interés en su producción y en reducir los costos corrientes. En México el consumo de edulcorantes aumenta, mientras el consumo de azúcar disminuye. (Programa Nacional de la Agroindustria de la caña de azúcar 2021-2024)

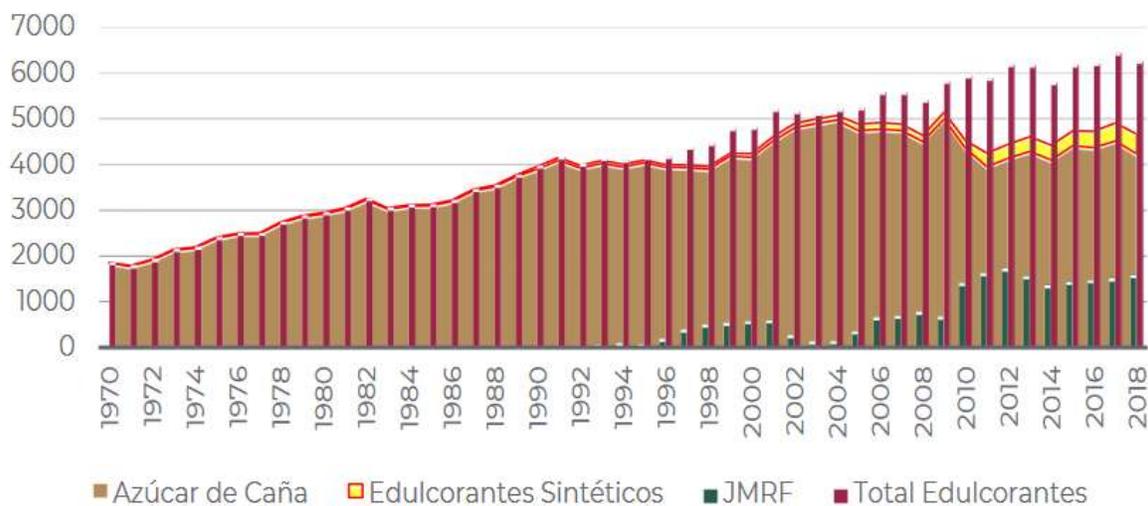


Figura 1.1. Consumo de edulcorantes en México (miles de toneladas) (Programa Nacional de la Agroindustria de la caña de azúcar 2021-2024, DOF 2021).

El xilitol se considera como uno de los 12 bioproductos derivados de recursos renovables más valiosos de acuerdo con el departamento de energía de los Estados Unidos de Norteamérica (USDOE, 2021). Estimaciones predicen que el valor del xilitol en el mercado global alcanzará los mil millones de dólares (USD) para el año 2026 con una tasa de crecimiento compuesto anual de 5.8%.

Actualmente, la producción de xilitol se realiza mediante procesos químicos costosos (Figura 1.2). Donde, la xilosa (azúcar derivado de los residuos

hemicelulósicos) es la fuente de carbono y se transforma en xilitol por medio de hidrogenación catalítica con el uso de equipo costoso que logra presiones y temperaturas altas.

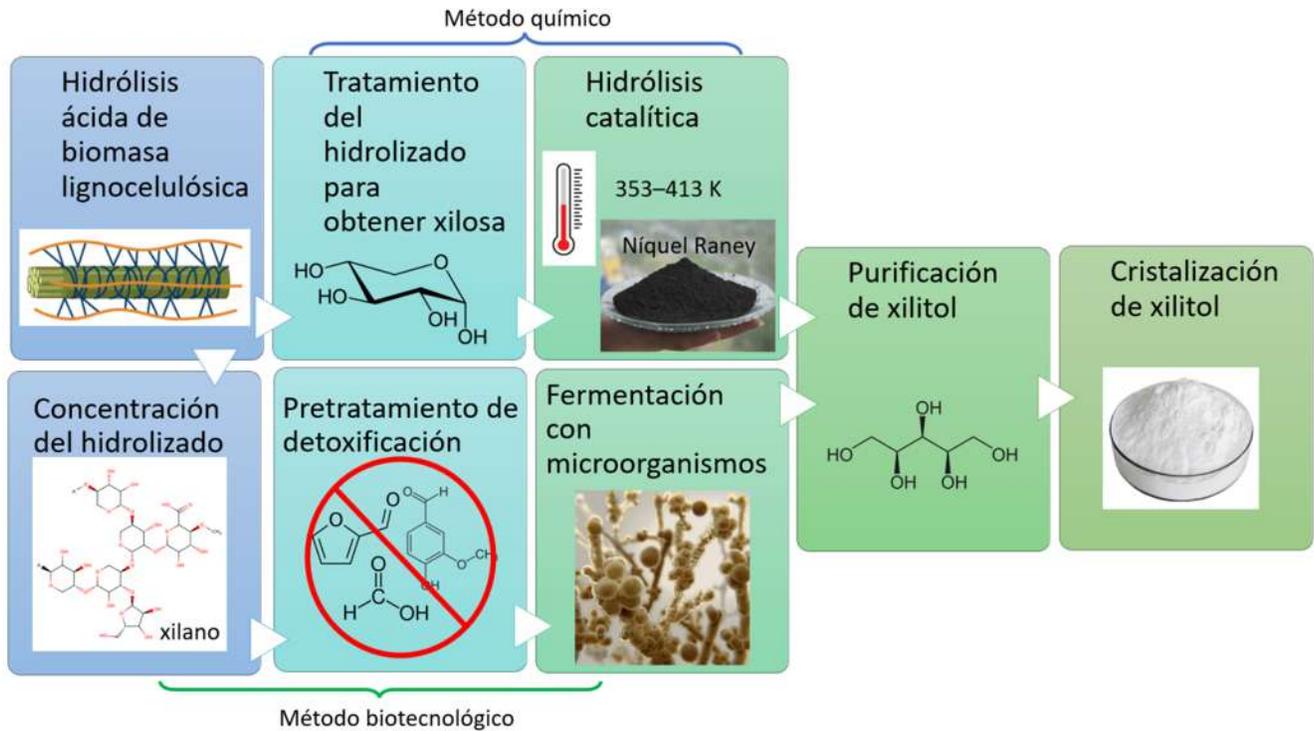


Figura 1.2. Producción de xilitol por los métodos químico y biotecnológico (modificado de Umai *et al.*, 2022).

Los estudios recientes se enfocan en encontrar alternativas económicas para la producción de xilitol, e.g. la fermentación microbiana. El proceso fermentativo destaca por ser económico, pero con algunas desventajas como la generación de subproductos dañinos al crecimiento de los microorganismos, principalmente furfuraldehídos, alcoholes y algunos ácidos débiles, de aquí la importancia de generar nuevas alternativas de producción.

Algunos microorganismos producen xilitol como producto intermedio durante el metabolismo de la xilosa. Por lo tanto, en el metabolismo microbiano existen las enzimas necesarias para transformar la xilosa a xilitol. En este proyecto se utilizará

una enzima con características similares en su conformación peptídica, aunque de origen distinto. La posibilidad de obtener xilitol con estas enzimas se evalúa.

Una de las ventajas potenciales del uso de enzimas es la disminución de pasos de purificación de producto. Los métodos tradicionales de purificación de xilitol incrementan su costo y una pérdida parcial del producto. Aproximadamente, un 40–60% de recuperación de xilitol se obtiene con resinas de intercambio iónico, carbón activado, cromatografía, extracción líquido-líquido y nanofiltración (Queiroz *et al.*, 2022b).

La conservación de la actividad de enzimas es un reto vigente. Diversos tipos de materiales se estudian para mejorar la estabilidad de las enzimas, de los que destacan las partículas mesoporosas de sílice. Estas partículas son de interés en la industria y en el área académica por sus poros ordenados y ajustables con abundantes grupos hidroxilo. Otras ventajas son su proceso de síntesis simple, relación costo-beneficio y durabilidad (Miao *et al.*, 2022).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Debido al interés por el xilitol en las industrias farmacéutica y alimenticia se buscan nuevas alternativas para la producción de este edulcorante. Su producción por medio de enzimas óxido-reductasas se estudia como alternativa.

Previamente, datos alentadores se obtuvieron acerca de la estabilidad de la enzima Aldosa reductasa en la producción de xilitol. Sin embargo, la estrategia de inmovilización que se eligió no fue adecuada y el xilitol no se detectó.

Por lo anterior, esta investigación se continuará, innovando mediante la protección de la enzima utilizando soportes mesoporosos como alternativa. Con ello se espera mantener la actividad enzimática

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción enzimática de xilitol se modifica por diversos factores como son la promiscuidad de AR, la inestabilidad tanto del cofactor $\text{NADPH}+\text{H}^+$, como de las enzimas AR y G6FDH. Cambios controlados en el ambiente de reacción enzimática como el dado al inmovilizar a las macromoléculas, afectará las estabilidades de los componentes de la reacción y por lo tanto la producción de xilitol.

1.4 HIPÓTESIS

Los soportes protegen al complejo enzimático aldosa reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la producción de xilitol se favorece.

1.5 OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un método eficiente de protección del complejo enzimático compuesto por Aldosa reductasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, mediante inmovilización en soportes sólidos de óxido de silicio, para la producción xilitol.

Objetivos particulares

1. Diferenciar azúcares de edulcorantes.
2. Inmovilizar a aldosa reductasa en nanopartículas mesoporosas de sílice.
3. Acarrear aceites esenciales en partículas mesoporosas para control de hongos que manchan madera.
4. Demostrar que la oxidación de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ por aldosa reductasa no indica la conversión de xilosa a xilitol.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS

En un proyecto previo se demostró que, al utilizar una enzima de origen distinto al microbiano, de fácil obtención *in vitro*, como las enzimas óxido reductasas de origen bovino y de rata, la reacción con xilosa como sustrato es posible. Asimismo, se determinaron los factores con mayor influencia sobre la producción de xilitol, siendo estos el pH del medio y su temperatura, ya que la concentración inicial de xilosa no fue estadísticamente significativa (Morales-Cabral, 2016). En base a esos resultados se propuso un método enzimático de producción de xilitol de bajo costo, con tiempos de producción reducidos al establecer las condiciones de la enzima pH y temperatura (Méndez-Pérez, 2018).

Un problema recurrente fue la poca disponibilidad de la fuente enzimática, por lo que se procedió a la búsqueda de alternativas enzimáticas. Las enzimas que se extrajeron de cristalinos de conejo y cerdo funcionaron satisfactoriamente. El rendimiento en el extracto de la enzima de conejo fue más adecuado que el de cerdo. Además, aceptable estabilidad de la actividad se observó con respecto al tiempo de almacenamiento.

En consecuencia, la estrategia para activar a la aldosa reductasa y regenerar el cofactor se estableció. La cual consistió en adicionar la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el sistema reacción-regeneración $\{NADP^+ + H^+\}$; acción que además evita la adición continua de uno de los reactivos más costosos (Figura 2.1).

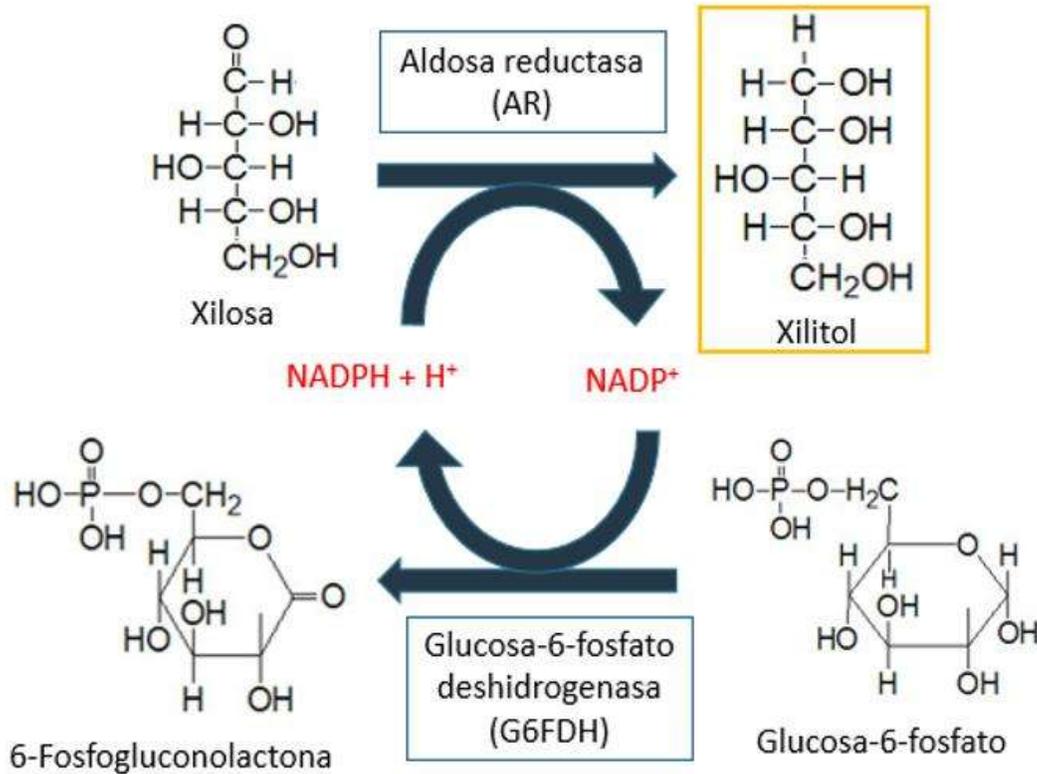


Figura 2.1. Esquema de la estrategia para producir xilitol con extracto enzimático obtenido de cristalino de conejo (Méndez-Pérez, 2018).

La velocidad máxima de la reacción promovida por la Aldosa reductasa aumentó, así que el motor de regeneración propuesto {NADPH + H⁺} funcionó, dispuso a la enzima AKR1B1 de mayor cantidad de coenzima para realizar la catálisis.

Otra de las estrategias que se plantearon para la estabilización del complejo enzimático fue su protección por inmovilización. Esta estrategia combina la actividad elevada y específica de las biomoléculas activas, como enzimas o anticuerpos, con la estabilidad química y mecánica del soporte. El método de inmovilización consiste en mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico, y así conservar su actividad catalítica y permitir el flujo de sustratos y productos (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011).

El complejo enzimático se inmovilizó en soporte de alil dextrano y epiclorhidrina, se realizaron mezclas de reacción con todos los componentes necesarios para la

actividad de ambas enzimas, y por tanto para la producción de xilitol, el cual se cuantificó por dos métodos: HPLC y un método colorimétrico para la cuantificación de polialcoholes por medio de espectrofotometría a 540 nm.

El cromatograma obtenido del análisis por HPLC mostró que, a los 19 minutos, tiempo aproximado de retención del xilitol, no hubo señal, en cambio a los 8 minutos se encontró una señal que indica la presencia de xilosa, por lo que se infiere que, durante el proceso de inmovilización, la enzima AR se inactivó por interacciones no deseadas con el soporte. Este resultado es una aparente desventaja del uso de inmovilización como estrategia de estabilidad, y se plantea como el reto a solucionar.

2.2 INMOVILIZACIÓN COMO ESTRATEGIA DE PROTECCIÓN DE BIOMOLÉCULAS ACTIVAS

Las partículas mesoporosas de sílice se proponen como estrategia para conservar la actividad de biomoléculas de interés. Para este proyecto se propuso un análisis detallado del proceso de inmovilización. Asimismo, materiales de protección de las enzimas fueron variables sujetas a medición. Con la intención de conservar la actividad enzimática y obtener los demás beneficios de la inmovilización como son la estabilidad y reutilización de las enzimas.

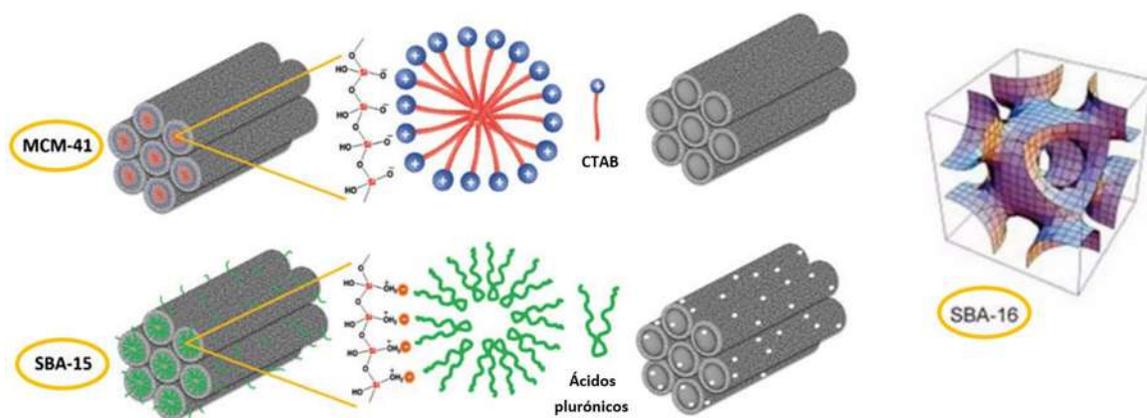


Figura 2.2. Estructuras porosas de las partículas mesoporosas MCM-41, SBA-15 y SBA-16 (modificado de Schwanke *et al.*, 2019)

Las partículas de sílice mesoporosa se sintetizan a partir de precursores de silano con el uso de moldes surfactantes para obtener estructuras porosas con tamaño de poros reducidos. El diámetro de los poros se puede alterar por medio de la selección del surfactante apropiado y de las condiciones experimentales. Este diámetro de poro va de los 2 nm a los 50 nm. La estructura regular mesoporosa ofrece la posibilidad de adsorber o atrapar biomoléculas grandes dentro de los poros. Grupos funcionales adicionales como aminos o carboxilos se pueden introducir en la estructura del soporte al cambiar el precursor de silano; estos grupos pueden facilitar la adsorción de la enzima, mientras se mantiene su actividad. La posibilidad de modificar tanto los grupos funcionales superficiales como el diámetro de los poros de la partícula durante su síntesis, proporciona la posibilidad de “amoldar” la estructura de las partículas para acomodar la forma de la enzima (Nam, Coll, Erthal, Torre, & Id, 2018).

La modificación del diámetro de los poros se lleva a cabo con agentes de hinchamiento (AH). Los AH son moléculas de naturaleza hidrofóbica que se difunden a la región hidrofóbica de las micelas del surfactante. El resultado es el incremento del volumen y del radio de las micelas, por lo tanto se incrementa el diámetro de los poros del material (Saikia *et al.*, 2019).

La adsorción de las biomoléculas usualmente se lleva a cabo después de la síntesis y la estructura mesoporosa provee un microambiente protegido. En el caso de la inmovilización de enzimas, este el cual las reacciones con sustratos elegidos se pueden llevar al cabo, aun si hay algunos problemas de difusión (Hanefeld *et al.*, 2009).

2.3 ENSAYOS *IN SILICO* PARA DILUCIDAR LOS MECANISMOS DE REACCIÓN DE ALDOSA REDUCTASA Y SUS SUSTRATOS

Los métodos *in silico* nos muestran aproximaciones de lo que sucede en una reacción *in vitro*. Las aproximaciones *in silico* nos indican el tipo de interacciones que suceden entre una enzima y sus sustratos, así como la afinidad que existe entre

ellos. La simulación molecular es un término que incluye métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar, imitar y predecir el comportamiento de las moléculas. Los métodos de modelado molecular son usados para investigar estructura, dinámica y termodinámica de sistemas inorgánicos, biológicos y poliméricos. La actividad biológica que se investiga usualmente es función del plegamiento molecular y se manifiesta como catálisis enzimática, estabilidad de proteínas y cambios conformacionales asociados con la función biomolecular.

Las interacciones que se dan entre la xilosa y los residuos del sitio activo de AR se observaron con acoplamientos moleculares (docking molecular) y energías de afinidad.

El docking se refiere al modelado molecular que determina la conformación en que los ligandos (molécula de interés) ocupan al receptor (macromolécula). Teóricamente, la conformación en que un ligando ocupa a su receptor será la de menor energía, ya que las interacciones que suceden en el par receptor-ligando, son suficientes para mantener una conformación que sería inestable si el medio que rodea al ligando fuera otro distinto al receptor (Trott y Olson, 2010)

El cálculo de los valores de delta G (energía libre de Gibbs) de la interacción enzima-sustrato por medio de Mecánica Molecular Generalizada-Born/Área de Superficie (MM-GBSA) provee cálculos de afinidad más cercanos a la realidad que los acoplamientos moleculares (docking) (Mehra *et al.*, 2018). Un análisis *in vitro* combinado con un análisis *in silico* se propuso para dilucidar si la obtención de xilitol es posible con el uso de AR y xilosa.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos se plantearon metodologías *in silico* e *in vitro*. La estrategia experimental que se siguió se muestra en la figura 3.1.

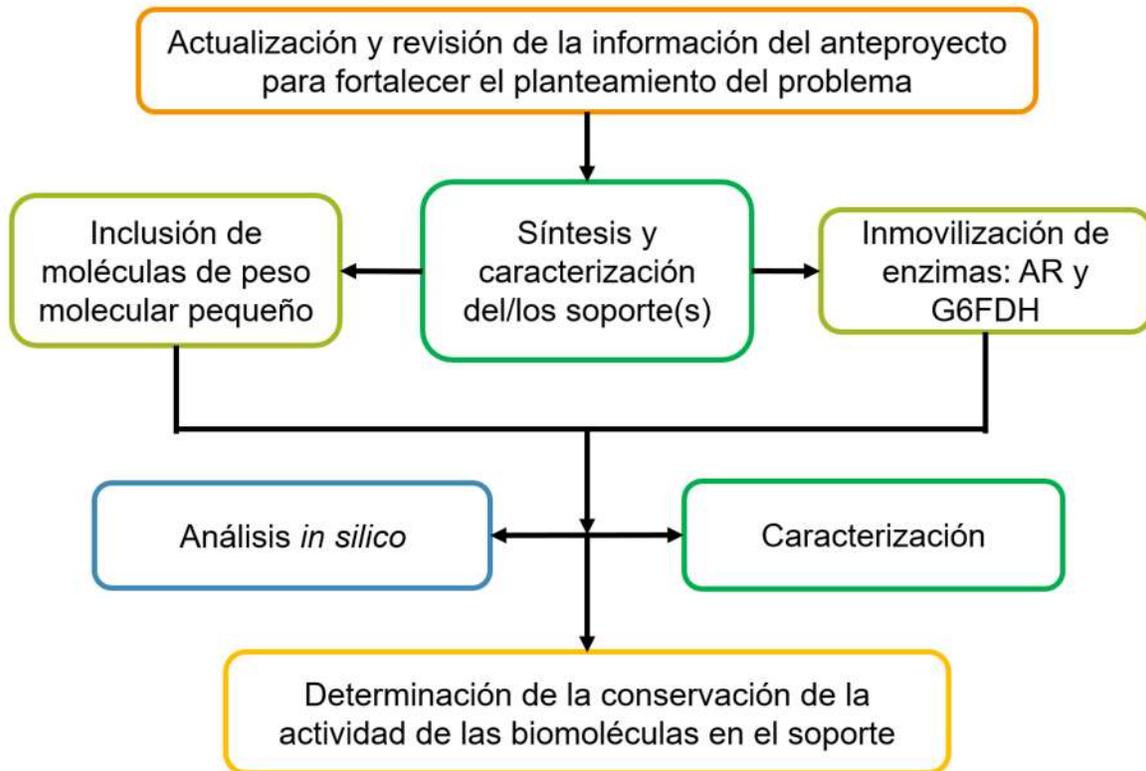


Figura 3.1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

El anteproyecto que se presentó al iniciar el programa del DCIQ se revisó y actualizó. Durante la actualización se localizó el problema de la falta de divulgación de información acerca de edulcorantes bajos en calorías, entre ellos el xilitol.

La inmovilización de biomoléculas en partículas mesoporosas de sílice (PMS) se llevó a cabo. Las PMS tipo MCM-41 y SBA se eligieron y sintetizaron con el uso de agentes de hinchamiento (AH) para obtener poros de diámetros más amplios (Jana *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011).

La caracterización de las PMS incluyó fisisorción de nitrógeno, difracción de rayos X (DRX), potencial zeta, dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica

de barrido (MEB), Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y análisis termogravimétrico (ATG).

La inclusión de las biomoléculas se realizó después de observar las características de las partículas. Las partículas MCM-41 con diámetro de poro pequeño se designaron para el acarreamiento de moléculas de peso molecular bajo (aceites esenciales bioactivos). Las partículas SBA se designaron para la inmovilización del complejo enzimático de aldosa reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La inclusión de las biomoléculas dentro de las PMS se caracterizó por medio de potencial zeta, DLS, DRX, MEB, FTIR y ATG.

Posteriormente, la actividad de las biomoléculas se cuantificó y la conservación de su actividad en las PMS se determinó.

En el caso de la inmovilización del complejo enzimático, la conservación de su actividad se midió por medio de la cuantificación de glicerol. Primero, las condiciones de inmovilización del complejo enzimático se establecieron de acuerdo a los valores de potencial zeta de las enzimas y las partículas SBA. La presencia de las enzimas se comprobó por medio de espectrofotometría y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. El glicerol que se obtuvo con las enzimas libres y las enzimas inmóviles se cuantificó con un kit comercial (Free Glycerol Determination Kit, Sigma-Aldrich®).

En el caso de la inclusión de aceites esenciales, la conservación de su actividad antifúngica se comprobó con el control *in situ* de mancha en madera de *Pinus* sp. Un diseño experimental de superficie de respuesta estableció las condiciones de acarreamiento de los aceites en las PMS. El control de la mancha de los aceites acarreados en madera de pino se midió como cambio de color (ΔE) con la fórmula CIEDE₂₀₀₀. El efecto de los aceites esenciales libres y acarreados en las partículas MCM-41 en la mancha sobre madera de *Pinus* sp. se comparó.

Las herramientas *in silico* se utilizaron para dilucidar si es posible la reacción de la aldosa reductasa con sus sustratos.

El docking molecular se realizó con AutoDock Vina en modo flexible para observar las interacciones y energías de afinidad de diferentes sustratos de aldosa reductasa. Las dinámicas moleculares mostraron la estabilidad de las interacciones de los

diferentes sustratos con la aldosa reductasa en 100 ns. Los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) y los orbitales HOMO y LUMO esclarecieron cómo se lleva a cabo la reacción de los sustratos con aldosa reductasa.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Diferenciar azúcares de edulcorantes

En ocasiones las personas no tienen la información necesaria para saber la diferencia entre un alimento que contiene azúcares y un alimento que contiene edulcorantes. Es conveniente conocer esta diferencia ya que nuestro país tiene prevalencia de personas con diabetes de 22.1% en adultos (Ensanut, 2022). El control en el consumo de alimentos con cantidades elevadas de azúcares es importante para evitar este padecimiento y otras enfermedades metabólicas. Para esto, la divulgación de información acerca de la diferencia de azúcares y edulcorantes no calóricos es necesaria. Una recopilación de información para diferenciar los azúcares de edulcorantes no calóricos se realizó (figura 4.1). La información se redactó con lenguaje sencillo dirigido a un público no especializado. Las características que se tomaron en cuenta para la redacción de este artículo fueron fidelidad al contenido científico, creación de un nuevo mensaje con lenguaje no técnico y brevedad.

El artículo de divulgación se enfocó en la diferencia entre azúcares y polioles, de los cuales destacamos al xilitol. Las características fisicoquímicas del xilitol y sus usos en diferentes industrias se mencionaron. La necesidad de la investigación biotecnológica se demostró con el descubrimiento y usos de estas moléculas edulcorantes. Finalmente, su uso se propuso para sustituir los azúcares en la alimentación de personas con enfermedades metabólicas.

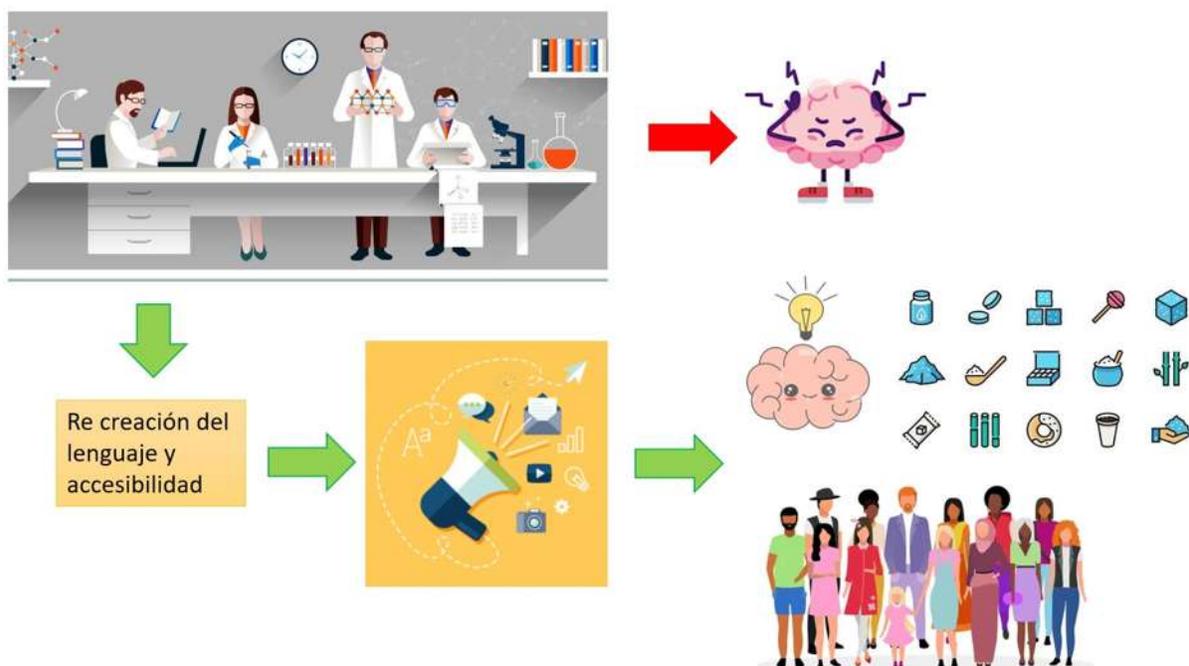


Figura 4.1. La información científica no es accesible para el público en general, por lo que es necesario transformar esa información y divulgarla.

4.2. Inmovilizar a aldosa reductasa en nanopartículas porosas de sílice

La enzima aldosa reductasa (AR) es una oxidoreductasa dependiente de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ que cataliza una amplia variedad de sustratos como azúcares aldehídos, esteroides y prostaglandinas. Esta actividad de AR es interesante para las industrias farmacéutica, alimenticia y en la investigación. La actividad de las enzimas se afecta por diversos factores como falta de cofactores, cambios de pH y temperatura. La inmovilización del complejo enzimático AR y G6FDH (como regeneradora de cofactor) en partículas mesoporosas de sílice se planteó como estrategia para conservar la actividad de AR. Las partículas mesoporosas tipo MCM-41 y SBA se sintetizaron por el método hidrotermal con surfactantes (CTAB, P123, F127 y F108) y tetraetil ortosilicato (TEOS). Ciclohexano (C) y trimetilbenceno (T) se usaron como agentes de hinchamiento para modificar los diámetros de poro de las partículas. Nueve partículas se obtuvieron con tamaños de poro distintos (de 4.2 nm a 12 nm de diámetro). Las diferentes técnicas de caracterización proporcionaron información acerca de las propiedades fisicoquímicas de las partículas. La inmovilización del complejo enzimático en partículas que se sintetizaron con el uso del surfactante plurónico F127 y ciclohexano como agente

de hinchamiento se llevó a cabo a pH de 6 y se comprobó con FTIR. La actividad de AR se verificó con la conversión de gliceraldehído a glicerol (figura 4.2). La enzima inmóvil produjo significativamente más glicerol (0.26 mg/ml) que la enzima libre (0.13 mg/ml) (t-Student $p \geq 0.05$). El complejo enzimático AR+G6FDH se inmovilizó en partículas SBA con poros modificados y su actividad se mantuvo.

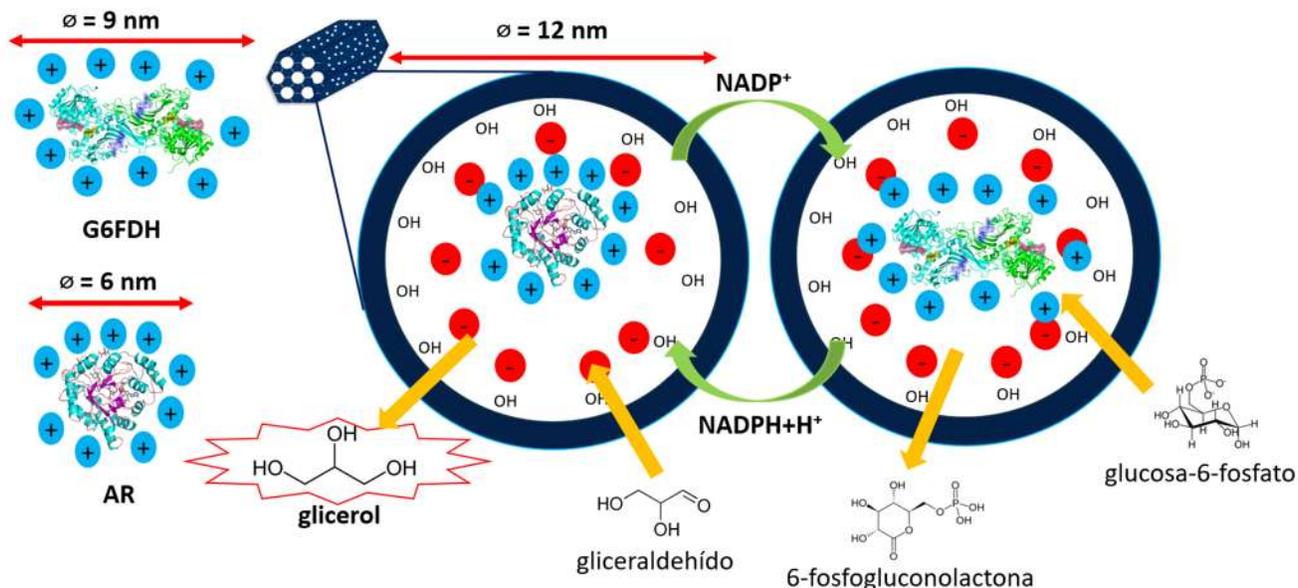


Figura 4.2. La conservación de actividad del complejo AR+G6FDH al inmovilizarse en partículas mesoporosas de sílice se comprueba con la producción de glicerol.

4.3. Acarrear aceites esenciales en partículas mesoporosas para control de hongos que manchan madera

El uso de aceites esenciales (AE) acarreados en partículas mesoporosas de sílice (PMS) se evaluó para controlar mancha en madera. Tres tipos de PMSs se sintetizaron y caracterizaron fisicoquímicamente por fisisorción de nitrógeno (tipo IV), difracción de rayos X [índices de Miller (100), (110), (200)], microscopía electrónica de barrido, potencial zeta (valores negativos), dispersión de luz dinámica ($< 200 \text{ nm}$) y análisis termogravimétrico (pérdida de peso de 5% a 10%). Un diseño de superficie de respuesta se usó para encontrar las condiciones de acarreamiento de AE para controlar la mancha, esta se midió como cambio de color con la fórmula CIEDE₂₀₀₀. El acarreamiento de aceite esencial en partículas MCM-41+C se confirmó fisicoquímicamente por una pérdida de peso de 47% en el análisis termogravimétrico. Los aceites de cítricos, *Syzygium* sp. y *Tagetes* sp. acarreados

en partículas mesoporosas MCM-41+C (30:1 p/p) controló la mancha en madera de pino causado por *Alternaria* sp. y *Geosmithia* sp. (figura 4.3). Esto se demostró por la ausencia de pigmentación y escaso crecimiento fúngico.

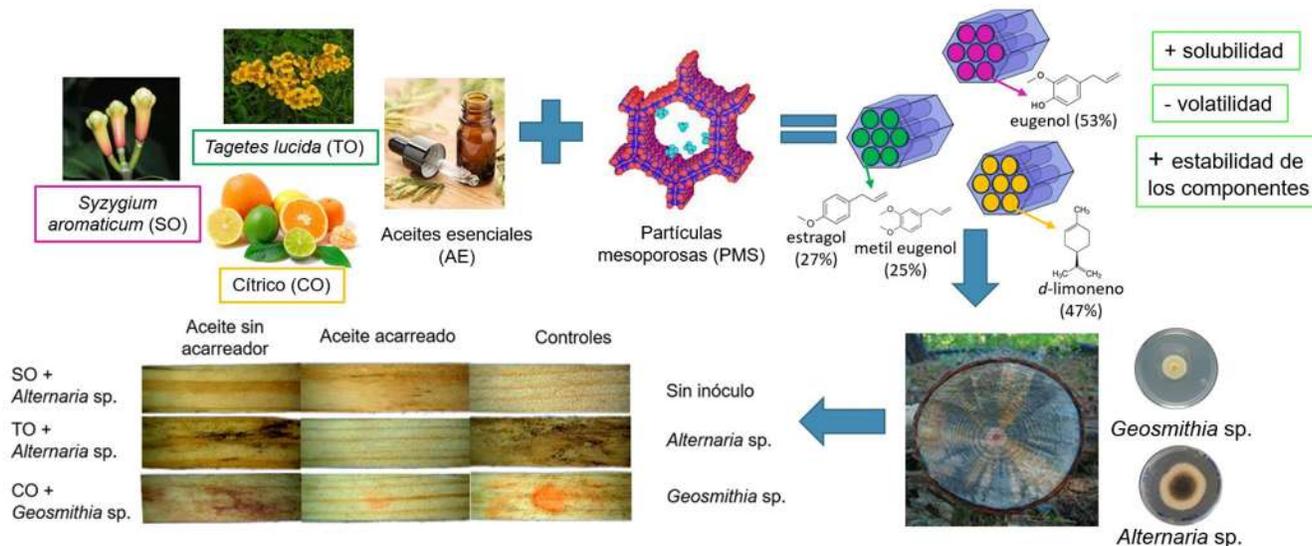


Figura 4.3. El acarreamiento de los aceites esenciales en partículas mesoporosas controlan la mancha en madera de *Pinus* sp. por los hongos *Alternaria* sp. y *Geosmithia* sp.

4.4. Demostrar que la oxidación de NADPH+H⁺ por aldosa reductasa no indica la conversión de xilosa a xilitol

El uso de enzimas para catalizar reacciones en la industria tiene puntos de interés por la especificidad de las reacciones y la poca generación de subproductos. La búsqueda de enzimas en diferentes fuentes para catálisis biotecnológica es necesaria. El xilitol es una de las moléculas cuya producción biotecnológica es de interés. El uso de la oxidorreductasa aldosa reductasa (AR) para catalizar la reacción de xilosa a xilitol se propuso (figura 4.4). Esta es una enzima bisustrato que necesita al cofactor NADPH+H⁺ para llevar a cabo su reacción. La actividad de AR se cuantifica por la medición de la oxidación del cofactor y una conversión equimolar de xilosa se asume. La cuantificación de xilitol se propuso por medio del uso de un kit comercial de cuantificación de sorbitol/xilitol y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo con AR de

cristalino de conejo y AR recombinante de placenta humana. La xilosa se usó como sustrato en diferentes concentraciones molares. Las técnicas de cuantificación que se plantearon no fueron capaces de cuantificar el xilitol en las mezclas de reacción. Un análisis *in silico* se llevó a cabo donde se comprobó que el sitio catalítico de la AR de orígenes distintos se conserva. Los orbitales HOMO y LUMO de la xilosa demostraron que es improbable que la molécula reciba electrones, por lo tanto es poco probable que AR catalice su reacción.

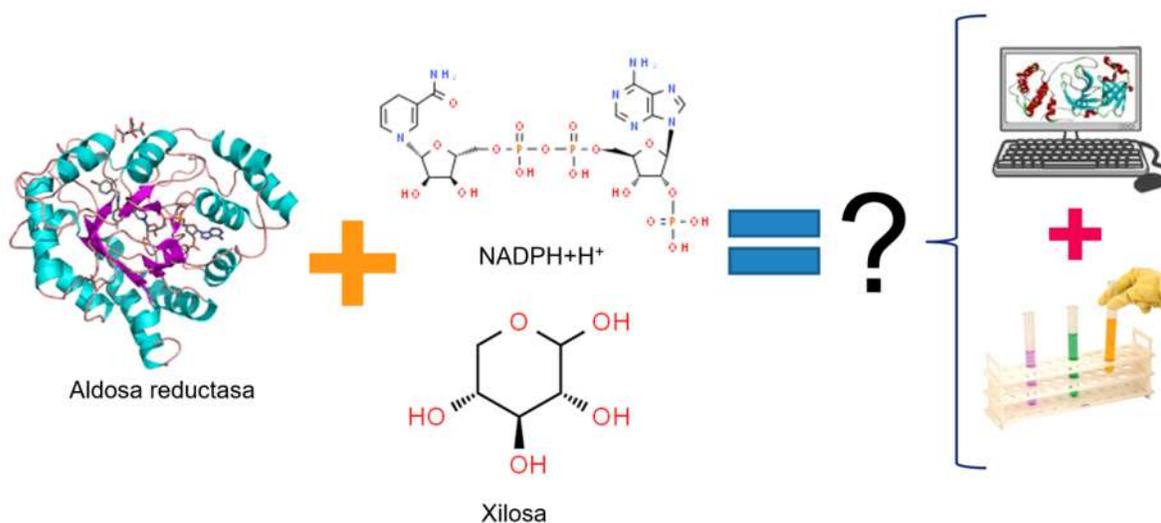


Figura 4.4. El estudio de la interacción de aldosa reductasa con xilosa como sustrato y NADPH+H⁺ como cofactor de forma *in silico* e *in vitro* para dilucidar los productos de la reacción.

.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Los resultados del proyecto de tesis se integraron en cuatro manuscritos que evidencian las habilidades que se adquirieron durante la habilitación en el programa de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Química.

La búsqueda de productos de valor agregado llevó al interés que existe en el estudio de los edulcorantes bajos en calorías. Este interés se debe a que los hábitos alimenticios en la población cambian conforme pasa el tiempo. La necesidad de alimentos más sanos -traducidos en alimentos sin azúcares, sin gluten, con más proteína- responden al aumento de algunas enfermedades que se desarrollan por la inadecuada alimentación. La búsqueda de sustituyentes de azúcares se evidencia en el patrón de consumo de edulcorantes en México donde, la demanda por azúcares disminuye mientras la demanda por edulcorantes no calóricos aumenta. Esto demuestra la necesidad de continuar la investigación de moléculas edulcorantes que sustituyan a los azúcares de los alimentos que se comercializan. La biotecnología es una herramienta útil en el desarrollo tanto de nuevas moléculas edulcorantes como de nuevos procesos de producción de estos. Por esto, esta investigación se enfocó en la producción biotecnológica del xilitol.

La insuficiente divulgación de la información acerca de estas nuevas moléculas edulcorantes de bajo contenido calórico genera dudas en el público general. Las personas que realizan investigaciones tienen la obligación de comunicar el conocimiento y hallazgos científicos a la sociedad. Por esto, la primera habilitación de una servidora en la escritura consistió en la redacción de un artículo de divulgación. Este tipo de escritos van dirigidos a un público general, con lenguaje sencillo y sin dejar de lado la integridad de la información científica. La información que se decidió divulgar fue la diferencia entre azúcares y edulcorantes, con enfoque en el xilitol.

La publicación accesible, sencilla y con alcance en diferentes medios es necesaria para que información verídica y vigente llegue al público en general. De esta forma se rinden cuentas a la sociedad.

La inmovilización de enzimas en partículas mesoporosas resolvió la conservación de la actividad del complejo enzimático. Uno de los atractivos del uso de partículas mesoporosas para la inmovilización de enzimas es la capacidad de reutilización que estas adquieren. La reusabilidad de este sistema de enzimas inmovilizadas es deseable por la reducción de costos que representa. Al tener el complejo inmóvil activo surgió la siguiente pregunta; ¿El sistema propuesto es reutilizable?. Los factores que determinan la reutilizabilidad son la permanencia de la enzima en la partícula y la conservación de su actividad en el tiempo. Para resolver la pregunta surgen dos hipótesis: 1. La funcionalización de la superficie de las partículas mesoporosas de sílice evita que las enzimas se desorban del soporte y 2. La vida media de la enzima aumenta cuando está inmovilizada en partículas mesoporosas de sílice. Para responder la primera hipótesis, al momento de la síntesis se agregan moléculas que añaden grupos funcionales en la superficie de las partículas. Moléculas como ácido poliacrílico (Gao *et al.*, 2020) 3-aminopropiltriétoxilsilano (Ismail *et al.*, 2022) y propildimetoximetilsilano (Khanmohammadi *et al.*, 2020) funcionalizan la superficie de las partículas con grupos amino. En ocasiones, la enzima inmóvil en partículas funcionalizadas se inactiva por impedimentos estéricos (Ismail *et al.*, 2022), por limitaciones en la difusión o cambios conformacionales en la enzima (Esmi *et al.*, 2021). Por esto, la conservación de la actividad de la enzima se determina nuevamente después de la inmovilización. El valor de actividad de la enzima en la partícula sin funcionalización de superficie se toma como control para este ensayo. Para responder a la segunda hipótesis, se compara la actividad de la enzima en el día de la inmovilización con la actividad en días posteriores hasta perder el 50% de la actividad. La estabilidad de la enzima cuando está inmóvil se demuestra como una vida media prolongada. El aumento de la vida media de enzimas inmóviles en partículas mesoporosas de sílice se reporta en lipasa, que incrementó de 25 a 45 d en almacenamiento a 4 °C (Zhang *et al.*, 2021). Estos

parámetros son fundamentales para continuar con el desarrollo de tecnologías de inmovilización de enzimas.

Las partículas mesoporosas de sílice tienen múltiples usos potenciales por su síntesis sencilla y la posibilidad de modificar tanto sus poros como su superficie. En este trabajo presentamos partículas de tamaño de poro de 2 a 12 nm. Las partículas de poro de 2 nm de diámetro las utilizamos para acarrear aceites esenciales bioactivos, mientras que las segundas las utilizamos para el acarreo de enzimas como se describió en el párrafo anterior. Las partículas de 2 nm cargadas con aceites esenciales de cítricos, clavo y *Tagetes* sp. se utilizaron como sistemas de acarreamiento para el control de mancha en madera de pino. La pregunta que surge del desarrollo de este sistema es ¿Las PMS con aceites esenciales controlan la mancha de madera de otras especies maderables?. Con la evidencia planteamos la siguiente hipótesis: Las PMS con aceites esenciales inhiben a otros hongos que causan mancha en madera. Para resolver la hipótesis se propone el escrutinio de diferentes hongos que causan mancha en maderas susceptibles como *Pinus* sp. y *Cupressus* sp.

Por otro lado, la madera tiene propiedades mecánicas que la hacen adecuada para fabricar casas, construcciones, muebles y herramientas (Guzel, 2020). La conservación de estas propiedades es necesaria para determinar si la aplicación de partículas mesoporosas es factible. Las propiedades físicas de la madera incluyen: contenido de humedad en equilibrio, densidad, masa, coeficiente de hinchamiento volumétrico y adsorción de agua (Ali *et al.*, 2021). La pregunta que surgió en este sentido es ¿Existe una afectación en la fibra superficial de la madera con la aplicación de partículas mesoporosas de sílice? La hipótesis que surge es: la aplicación de partículas mesoporosas de sílice con aceites esenciales no afectan las propiedades fisicoquímicas de la madera. Para resolver la hipótesis es necesario analizar las probetas de madera después del tratamiento con las PMS. La evaluación de estas propiedades develará las posibilidades del uso de las PMS en distintos ámbitos. Para analizar estas propiedades con el uso de las normativas

vigentes es necesaria la vinculación con el posgrado de Ingeniería en Tecnología de la Madera.

El uso de aldosa reductasa para la obtención de xilitol a partir de xilosa se refutó. La medición de la actividad de las enzimas de doble sustrato asume la conversión de ambos sustratos a sus respectivos productos. La medición de uno solo de los sustratos es válida y se acepta. Este es un problema al que nos enfrentamos en este proyecto cuando se observó la oxidación de uno de los sustratos (el cofactor) y no así la reducción del otro sustrato (xilosa). La medición tradicional de un solo sustrato nos indica que la enzima está activa, pero no indica la obtención de producto. La perspectiva de uso de enzimas bisustrato en el área industrial atrae la atención y una cantidad mayor de análisis se deben realizar para dilucidar si los sustratos se convierten a los productos deseados. La pregunta que surgió con nuestra evidencia es ¿La medición de cofactor de la aldosa reductasa es adecuada para calcular su actividad?. Para resolver la pregunta surgen dos hipótesis: 1. Ambos productos de una enzima bisustrato se miden para calcular su actividad y 2. La AR recibe el electrón del cofactor $\text{NADPH}+\text{H}^+$ cuando xilosa es el sustrato. En este hallazgo no encontré estudios similares que me orienten en la resolución de este problema. De tal manera que se considera que es un descubrimiento de una enzima que conocemos desde los 60's (Hayman y Kinoshita, 1965).

Particularmente, en nuestros ensayos la oxidación del $\text{NADPH}+\text{H}^+$ se llevó a cabo sin la conversión de xilosa a xilitol. El destino del protón es desconocido. Los análisis de dinámica molecular y el cálculo de los orbitales HOMO y LUMO se utilizaron para entender la poca posibilidad de reacción de la xilosa. Un análisis de teoría funcional de la densidad (DFT) de química cuántica con enfoque en el cofactor y los aminoácidos con los que interacciona se propone para dilucidar lo que sucede con el protón del $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Esto desvelará las energías y dinámicas de la formación y rompimiento de enlaces. Similarmente, el mecanismo de oxidación de agua por el fotosistema II se dilucidó con ensayos con simulaciones de mecánica cuántica (Allgöwer *et al.*, 2022).

Las que presentamos son solo algunas de las preguntas que surgieron en el desarrollo de esta investigación. Estas tendrán respuesta en el futuro cercano.

CONCLUSIONES

Las partículas mesoporosas de sílice de poro de 2 nm a 12 nm son utilizables para acarrear moléculas pequeñas como aceites esenciales y macromoléculas como enzimas. El complejo enzimático de aldosa reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se inmovilizó y su actividad se conservó en partículas mesoporosas de sílice de 12 nm. La ausencia de xilitol se explicó con las diferentes técnicas de cuantificación. La conversión de xilosa a xilitol por medio de la aldosa reductasa es improbable de acuerdo con el análisis *in silico*. La hipótesis que se planteó se respondió parcialmente.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M. R., Abdullah, U. H., Ashaari, Z., Hamid, N. H., y Hua, L. S. (2021). Hydrothermal modification of wood: A review. *Polymers*, 13(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/polym13162612>
- Allgöwer, F., Gamiz-Hernandez, A. P., Rutherford, A. W., y Kaila, V. R. I. (2022). Molecular principles of redox-coupled protonation dynamics in photosystem II. *Journal of the American Chemical Society*, 144, 7171–7180. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c13041>
- CONADESUCA (2021). Programa Nacional de la Agroindustria de la caña de azúcar 2021-2024. Diario Oficial de la Federación. Pp. 18.
- Esmi, F., Nematian, T., Salehi, Z., Ali, A., y Dalai, A. K. (2021). Amine and aldehyde functionalized mesoporous silica on magnetic nanoparticles for enhanced lipase immobilization, biodiesel production, and facile separation. *Fuel*, 291, 120126. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120126>
- Fajardo-Ochoa, R., Escalante-Minakata, y Ibarra-Junquera, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 42–56.
- Gao, F., Zhou, H., Shen, Z., Zhu, G., Hao, L., Chen, H., Xu, H., y Zhou, X. (2020). Long-lasting anti-bacterial activity and bacteriostatic mechanism of tea tree oil adsorbed on the amino-functionalized mesoporous silica-coated by PAA. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110784. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110784>
- Guzel, T. A. (2020). Consumer attitudes toward preference and use of wood, woodenware, and furniture: A sample from Kayseri, Turkey. *BioResources*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.15376/biores.15.1.28-37>
- Hanefeld, U., Gardossi, L., y Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453–468. <https://doi.org/10.1039/b711564b>
- Ismail, A. R., Kashtoh, H., Betiha, M. A., Abu Amr, S. A., Baek, K.-H., y El-Gendy, N. S. (2022). Valorization of waste cooking oil into biodiesel via *Bacillus stratosphericus* lipase amine-functionalized mesoporous SBA-15 nanobiocatalyst. *International Journal of Chemical Engineering*, 2022,

- e7899996. <https://doi.org/10.1155/2022/7899996>
- Jana, S. K., Mochizuki, A., y Namba, S. (2004). Progress in pore-size control of mesoporous MCM-41 molecular sieve using surfactant having different alkyl chain lengths and various organic auxiliary chemicals. *Catalysis Surveys from Asia*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1023/B:CATS.0000015110.85694.d9>
- Khanmohammadi, F., Molina, M. A., Blanco, R. M., Azizi, S. N., Márquez-Álvarez, C., y Díaz, I. (2020). SBA-15 with short channels for laccase immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 309, 110527. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110527>
- Ma, S., Wang, Y., y Zhu, Y. (2011). A simple room temperature synthesis of mesoporous silica nanoparticles for drug storage and pressure pulsed delivery. *Journal of Porous Materials*, 18(2), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10934-010-9375-3>
- Mehra, R., Meyer, A. S., y Kepp, K. P. (2018). Molecular dynamics derived life times of active substrate binding poses explain K_m of laccase mutants. *RSC Advances*, 8(64), 36915–36926. <https://doi.org/10.1039/c8ra07138a>
- Méndez-Pérez, T. (2018). *Evaluación de la actividad enzimática en sistemas inmovilizados de aldosa reductasa* [Tesis de maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Miao, H., Li, M., Sun, X., Xia, J., Li, Y., Li, J., Wang, F., y Xu, J. (2022). Effects of pore size and crosslinking methods on the immobilization of myoglobin in SBA-15. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 827552. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.827552>
- Morales-Cabral, M. G. (2016). *Obtención de un método enzimático para la producción de xilitol con una enzima óxido reductasa de origen no microbiano* [Tesis de maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Nam, L., Coll, C., Erthal, L. C. S., Torre, C. D. la, Serrano, D., Martínez-Mañez, R., Santos-Martínez, M. J., y Ruiz-Hernández, E. (2018). Drug delivery nanosystems for the localized treatment of glioblastoma multiforme. *Materials*, 11(5), 779. <https://doi.org/10.3390/ma11050779>
- Queiroz, S. S., Jofre, F. M., Mussatto, S. I., y Felipe, M. das G. A. (2022). Scaling

- up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111789. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111789>
- Saikia, D., Deka, J. R., Wu, C. E., Yang, Y. C., y Kao, H. M. (2019). pH responsive selective protein adsorption by carboxylic acid functionalized large pore mesoporous silica nanoparticles SBA-1. *Materials Science and Engineering C*, 94, 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.043>
- Trott, O., y Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Umai, D., Kayalvizhi, R., Kumar, V., y Jacob, S. (2022). Xylitol: Bioproduction and applications-a review. *Frontiers in Sustainability*, 3, 826190. <https://doi.org/10.3389/frsus.2022.826190>
- Zhang, Y., Zhu, L., Wu, G., Wang, X., Jin, Q., Qi, X., y Zhang, H. (2021). Design of amino-functionalized hollow mesoporous silica cube for enzyme immobilization and its application in synthesis of phosphatidylserine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 202, 111668. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111668>

