

**Universidad ORT Uruguay**  
**Facultad de Ingeniería**

**Obtención y caracterización de extractos de  
*Stevia rebaudiana* y Kombucha para el desarrollo  
de un ingrediente cosmético multifuncional**

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología

**Cristian Salvetto - 231354**

**Tutoras: Josefina Louge, Mariana Umpierrez**

**2023**

## Declaración de autoría

Yo, Cristian Salvetto, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto final de la carrera Licenciatura en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Cristian Salvetto

10 de octubre de 2023

## **Agradecimientos**

A mi familia y amigos, que representan un pilar fundamental que me acompaña en todo momento, en las buenas y en las no tan buenas, les agradezco por siempre estar ahí y ser mi sostén, motivándome siempre a dar lo mejor de mí.

A mis tutoras, Josefina Louge y Mariana Umpierrez, por todo el apoyo brindado durante este trabajo, por la confianza, por todos los conocimientos que me regalaron, así como su optimismo para siempre afrontar las cosas de la mejor manera.

A Ori y Lu, por acompañarme y dejarme ser parte de este proyecto, por el equipo que formamos, apoyándonos y complementándonos para lograr cada objetivo.

A mis compañeros y amigos de biotec, que hicieron el trabajo de todos los días más llevadero, compartiendo alegrías por resultados buenos, así como frustraciones por esos que no dieron tan bien, gracias por su buena onda y compañerismo.

A coordinadores, profesores y funcionarios del laboratorio de Biotecnología de ORT, que siempre estuvieron a disposición para resolver consultas y problemas, gracias por su generosidad, tiempo y amabilidad.

## Resumen

La industria biocosmética deriva de la cosmética tradicional, y busca resolver algunas de las problemáticas asociadas a la misma, como el uso de ingredientes químicos o el uso ineficiente de recursos. La biocosmética es una industria en pleno crecimiento en la que distintas marcas cosméticas han enfocado el desarrollo de nuevos productos y formulaciones.

Distintas plantas han mostrado propiedades beneficiosas para la salud humana, entre ellas la *Stevia rebaudiana* (stevia). Por otra parte, lo mismo sucede con la kombucha obtenida de la fermentación de té por parte de un SCOBY, por sus siglas en inglés (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Tanto la stevia como la kombucha son fuentes de compuestos como polifenoles, saponinas, flavonoides, vitaminas, compuestos triterpénicos, entre otros. A estas sustancias se les atribuyen propiedades de interés, como lo son la capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras.

En este marco, y con el objetivo de desarrollar nuevos ingredientes para formulaciones biocosméticas, se diseñó una estrategia para la extracción de polifenoles y saponinas de stevia, así como el cultivo de kombucha. Se llevaron a cabo cuatro métodos de extracción, utilizando dos mezclas de solventes y dos condiciones de incubación. Los solventes utilizados fueron agua, glicerol y etanol, mientras que las condiciones de incubación variaron en su duración y la temperatura utilizada. Todos los métodos de extracción fueron eficaces, siendo el mejor el método que empleó agua, etanol y glicerol a una temperatura de 45 °C durante 4 horas. Además, se evaluó el efecto de la sonicación de las muestras, este paso no benefició la extracción de estas sustancias. Por otro lado, se realizaron cultivos de kombucha a partir de infusiones de té blanco y de té blanco con stevia.

Se llevó a cabo una caracterización de las muestras obtenidas, realizando distintas técnicas, como test afrosimétrico, cuantificación de polifenoles, análisis del espectro de absorción UV-Vis y cuantificación de saponinas. Los resultados obtenidos posicionaron a las muestras de stevia extraída con agua, glicerol y etanol a 45 °C, y kombucha a partir de té blanco y stevia como las más prometedoras dado que son las más ricas en polifenoles y saponinas. Posteriormente se analizó la capacidad bioactiva de las muestras cuantificando tanto la actividad antioxidante como antimicrobiana de las mismas. Todas las muestras presentaron actividad antioxidante, siendo esta mayor en las muestras de stevia. Por otra parte, las muestras no mostraron actividad antimicrobiana.

Se realizó también la caracterización de la población microbiana del SCOBY mediante la secuenciación de regiones codificantes para ARNr 16s y regiones ITS, identificándose 10 especies bacterianas y 3 especies de levaduras.

Los resultados muestran el gran potencial de estos compuestos para su uso en biocosmética y sientan las bases para futuras investigaciones en las que se trabaje con extractos botánicos.

## **Palabras Clave**

Actividad antioxidante; biocosmética; extractos botánicos; glicerol; kombucha; liofilización; polifenoles; saponinas; scoby; secuenciación; stevia.

## Abreviaturas

°C	grados Celsius;
a.c	antes de Cristo;
Abs	absorbancia;
ABTS	ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico);
ADN	ácido desoxirribonucleico;
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal;
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo, del inglés <i>American Type Culture Collection</i> ;
BLASTn	herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos, del inglés <i>nucleotid Basic Local Alignment Search Tool</i> ;
cc	centímetros cúbicos;
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio, del inglés <i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i> ;
EtOH	etanol;
fig	figura;
g/L	gramos por cada litro;
GAE	equivalentes de ácido gálico, del inglés <i>Gallic Acid Equivalents</i> ;
Glic	glicerol;
GMP	buenas prácticas de manufactura, del inglés <i>Good Manufacturing Practices</i> ;
hs	horas;

IBD	Instituto de Biodinámica;
ITS	espaciador transcrito interno, del inglés <i>Internal Transcribed Spacer</i> ;
K	muestra de kombucha fermentada a partir de té blanco;
KS	muestra de kombucha fermentada a partir de té blanco y <i>Stevia rebaudiana</i> ;
LB	medio de lisogenia, del inglés <i>Lysogenia Broth</i> ;
M	molar;
m/v	masa sobre volumen;
MHA	medio Agar Mueller-Hinton;
mL	mililitros;
mm	milímetros;
mM	milimolar;
MRS	medio de Man, Rogosa y Sharpe;
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica, del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i> ;
nm	nanómetros;
pb	pares de bases;
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> ;
PDA	medio agar de papa y dextrosa, del inglés <i>Potato Dextrose Agar</i> ;
pH	potencial de hidrógeno;
rpm	revoluciones por minuto;

SCOBY	cultivo simbiótico de bacterias y levaduras, del inglés <i>Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast</i> ;
SG4	muestra de <i>Stevia rebaudiana</i> extraída con glicerol y agua durante 4 horas;
SG72	muestra de <i>Stevia rebaudiana</i> extraída con glicerol y agua durante 72 horas;
SGE4	muestra de <i>Stevia rebaudiana</i> extraída con glicerol, agua y etanol durante 4 horas;
SGE72	muestra de <i>Stevia rebaudiana</i> extraída con glicerol, agua y etanol durante 72 horas;
TAE	solución <i>buffer</i> de Tris, acetato y EDTA;
TSA	medio agar de triptona y soja, del inglés <i>Tryptone Soy Agar</i> ;
TSB	medio para caldo de triptona y soja, del inglés <i>Tryptone Soy Broth</i> ;
U	actividad enzimática, cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 $\mu\text{M}$ de producto por minuto;
ufc	unidades formadoras de colonias;
USP	farmacopea de Estados Unidos, del inglés <i>United States Pharmacopeia</i> ;
UV-Vis	ultravioleta-visible, rango de luz que abarca longitudes de onda de 200 a 800 nm;
v/v	volumen sobre volumen;
YPD	medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa, del inglés <i>Yeast extract, Peptone and Dextrose</i> ;
$\mu\text{g}$	microgramos;
$\mu\text{L}$	microlitros;

$\mu\text{m}$       micrómetros.

# Índice de contenido

1. Introducción.....	14
1.1. Biocosmética .....	14
1.2. Glicerol como solvente de extracción .....	15
1.3. Extractos vegetales de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	16
1.4. Kombucha y su utilización como postbiótico .....	16
1.5. Caracterización molecular de microorganismos eucariotas y procariotas por secuenciación de regiones ITS y regiones codificantes para ARNr 16S.....	19
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo general .....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Metodología.....	22
3.1. Materiales .....	22
3.2. Obtención de muestras.....	22
3.2.1. Extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	22
3.2.2. Cultivo de Kombucha.....	23
3.3. Caracterización de muestras obtenidas.....	24
3.3.1. Test afrosimétrico .....	24
3.3.2. Medición de espectros de absorción UV-VIS .....	24
3.3.3. Cuantificación de saponinas .....	24
3.3.4. Cuantificación de polifenoles .....	25
3.3.5. Evaluación de capacidad antioxidante.....	26
3.4. Caracterización de cultivo <i>starter</i> .....	26
3.4.1. Procesamiento de SCOBY.....	26
3.4.2. Cultivo de SCOBY procesado en medio sólido .....	26
3.4.3. Identificación macroscópica y aislamiento de colonias .....	27

3.4.4. Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de colonias aisladas .....	27
3.4.5. Caracterización molecular de colonias aisladas .....	28
3.5. Evaluación de capacidad antimicrobiana .....	30
3.5.1. Evaluación de capacidad antimicrobiana en medio sólido .....	31
3.5.2. Ensayo de inhibición de crecimiento en medio líquido.....	31
3.6. Liofilización de extractos .....	32
4. Resultados y discusión .....	33
4.1. Obtención de muestras.....	33
4.2. Caracterización de las muestras obtenidas .....	34
4.2.1. Test afrosimétrico .....	34
4.2.2. Espectros de absorción UV-VIS.....	35
4.2.3. Cuantificación de saponinas .....	37
4.2.4. Cuantificación de polifenoles .....	39
4.2.5. Evaluación de capacidad antioxidante.....	41
4.3. Caracterización de SCOBY .....	43
4.3.1. Procesamiento de SCOBY.....	43
4.3.2. Identificación macroscópica y aislamiento de colonias .....	44
4.3.3. Pruebas microbiológicas.....	44
4.3.4. Caracterización de cultivo starter con técnicas moleculares .....	45
4.5. Evaluación de actividad antimicrobiana.....	48
4.5.1. Evaluación de capacidad antimicrobiana en medio sólido.....	48
4.5.2. Ensayo de inhibición de crecimiento en medio líquido.....	49
4.6. Liofilización de extractos .....	51
5. Conclusiones.....	52
6. Referencias bibliográficas .....	54
7. Anexos.....	61

7.1. Anexo 1 .....	61
7.1.1. Tabla 8. Resultados test de afrosimétrico.....	61
7.2. Anexo 2 .....	62
7.2.1. Protocolo de extracción de ADN genómico.....	62
7.2.2. Curvas de crecimiento microbiano.....	63

# 1. Introducción

## 1.1. Biocosmética

La biocosmética es una industria basada en el uso de materias primas derivadas de seres vivos para la formulación de productos cosméticos, buscando reducir de esta manera el impacto ambiental que genera la cosmética tradicional. Los biocosméticos, es decir, los productos biocosméticos se caracterizan por estar formulados en su mayoría por ingredientes naturales y/o veganos, estos pueden derivar de plantas, hongos, u otros microorganismos, reemplazando así el uso de productos basados en fósiles o de síntesis química. Estos productos están diseñados para uso tópico (facial o corporal), oral y/o capilar, por lo que es de gran importancia que sus ingredientes sean seguros y no presenten toxicidad (1).

Los productos de origen natural han tomado gran relevancia en el mercado de la industria cosmética actual. Existe una tendencia creciente por parte de los consumidores al uso de estos productos debido a la calidad y eficacia de los ingredientes utilizados para su formulación. La creciente demanda por productos de origen vegetal o natural se ve enmarcada en un contexto social que cada vez se ve más comprometido con la preservación del ambiente y el desarrollo sostenible. Por este motivo, los biocosméticos representan una gran opción de cuidado personal, que cuida y respeta al planeta durante todo su proceso (2).

Dentro de la industria de la cosmética, la biocosmética aún representa una parte minoritaria del mercado (7200 millones de dólares en 2022) en comparación con la de cosméticos tradicionales (262.200 millones de dólares en 2022), sin embargo, existen estudios de mercado que confirman una tendencia al crecimiento de la cosmética natural, proyectando un aumento del 15% en los próximos años, contra el 5% de crecimiento de otros productos convencionales de cuidado personal (2).

Los productos de cosmética natural deben cumplir ciertos requisitos para poder ser certificados como tales. ECOCERT, una empresa fundada en Francia en 1991, se encarga de desarrollar operaciones de control y certificación, otorgando dos tipos de certificados para productos cosméticos: "Cosmético Natural", y "Cosmético Natural y Ecológico" (2).

En primer lugar, en un Cosmético Natural al menos el 95% del total de los ingredientes, incluyendo el agua, deben ser naturales o de origen natural. El 5% restante como máximo puede estar compuesto por ingredientes de síntesis, pero estos deben pertenecer a una lista restringida que incluye ciertos conservantes y sustancias auxiliares. Como mínimo, el 5% del total de los ingredientes debe proceder de la agricultura biológica, que a su vez representa al menos el 50% de los ingredientes de origen vegetal (2). Mientras que en un Cosmético Natural y Ecológico al menos el 95% del total de los ingredientes debe ser natural o de origen natural. El 5% restante como máximo puede consistir en ingredientes

de síntesis, siempre que estén en la lista restringida. Como mínimo, el 10% del total de los ingredientes debe proceder de la agricultura biológica, que debe representar al menos el 95% de los ingredientes de origen vegetal (2).

La certificación "Cosmético Natural y Ecológico" es más estricta y requiere que una mayor proporción de ingredientes provenga de la agricultura biológica. Ambas certificaciones destacan la importancia de utilizar ingredientes naturales y minimizar el uso de sustancias sintéticas en los productos cosméticos (2).

Por otra parte, ECOCERT también controla y certifica a los productores. Existe un estricto control de las buenas prácticas de manufactura (GMP), siguiendo y controlando además tanto los procesos productivos, como la obtención y almacenamiento de las materias primas (3). En Latinoamérica existe el Instituto Biodinámica (IBD), con sede en Brasil, es un organismo que también otorga certificados. Posee una normativa de certificación para el Mercosur, la misma sigue las normas más avanzadas del exterior para productos cosméticos (3).

El mercado de la biocosmética está en una etapa de gran crecimiento, un artículo publicado por *BBC Research* estimó que el tamaño de mercado de productos cosméticos de base biológica alcanzó unos 7.2 billones de dólares, estimando una tasa de crecimiento anual de 7%, alcanzando en 2027 valores cercanos a 10.5 billones de dólares. En el mismo artículo se mencionan algunas empresas que integran este rubro, entre las que se encuentran L'oreal S.A., Sephora USA Inc., Unilever, entre otras (4). Actualmente dichas empresas cuentan con distintos productos biocosméticos certificados en el mercado.

## **1.2. Glicerol como solvente de extracción**

La revalorización de subproductos de distintas industrias puede aportar un valor agregado a un producto en desarrollo. Un enfoque de economía circular y de reaprovechamiento del glicerol, que es un producto secundario de la industria del biodiesel, genera la oportunidad de integrar este compuesto a la cadena productiva, para de esta manera, crear productos limpios y amigables con el medio ambiente.

Por cada 10 toneladas de biodiesel, se genera aproximadamente 1 tonelada de glicerol crudo. Cabe destacar que este glicerol crudo contiene impurezas como agua, metanol, catalizadores, sales inorgánicas, ácidos grasos libres y residuos, sin embargo, puede ser de utilidad para la producción de biocosméticos, siempre y cuando cumpla con las especificaciones (5).

Actualmente, el glicerol representa una alternativa eficaz para la extracción de compuestos tales como los polifenoles. Se conoce que solventes alcohólicos como el etanol y el metanol son ampliamente utilizados para este tipo de extracciones. Sin embargo, la naturaleza no tóxica y su alta eficiencia de extracción lo posicionan como una interesante opción para la obtención de extractos bioactivos (6).

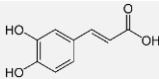

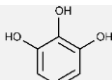
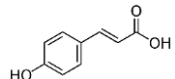
### 1.3. Extractos vegetales de *Stevia rebaudiana*

Hoy en día se observa un incremento en la demanda de plantas medicinales, impulsado por la creciente evidencia científica que respalda los beneficios para la salud derivados de los extractos y los compuestos fitoquímicos obtenidos de las plantas (7).

Una gran variedad de plantas fueron utilizadas a lo largo de la historia por sus distintas propiedades, entre ellas la *Stevia rebaudiana*, llamada también en este trabajo como "stevia". Esta planta se ha utilizado como endulzante natural debido a su sabor, sin embargo, también se le atribuyen propiedades medicinales, utilizándose como agente terapéutico frente a patologías como diabetes, hipertensión, obesidad, candidiasis, entre otros (7). En los extractos de hojas de stevia se pueden encontrar distintos compuestos con diferentes propiedades, siendo la capacidad antioxidante un punto importante a evaluar (8). Distintos estudios relacionan la actividad antioxidante a la acción de compuestos fenólicos presentes en los extractos de stevia (7).

En la investigación de Myint *et al.* 2020 se logró caracterizar los compuestos fenólicos presentes en extractos de hojas de stevia (tabla 1), entre ellos se encuentran el ácido cafeico, ácido gálico, pirogalol, ácido cumárico, entre otros. Además, ensayaron distintos métodos de extracción utilizando distintos solventes, la mayoría de las extracciones fueron realizados con agua, etanol y metanol (9).

Tabla 1. Polifenoles caracterizados en extractos de *Stevia rebaudiana* por Myint *et al.* 2020 (9).

Nombre	Estructura química	Fórmula química
Ácido cafeico		$C_9H_8O_4$
Ácido gálico		$C_7H_6O_5$
Pirogalol		$C_6H_6O_3$
Ácido cumárico		$C_9H_8O_3$

### 1.4. Kombucha y su utilización como postbiótico

La kombucha es una bebida refrescante originaria de China. Los primeros registros de su consumo datan del año 220 a.c. en la región de Manchuria. Esta bebida puede ser catalogada como analcohólica, ya que posee un contenido de etanol bajo (0.5%

aproximadamente). Tradicionalmente se produce a partir de infusiones de té negro azucaradas con sacarosa, que son fermentadas por un conjunto simbiótico de bacterias y levaduras llamado SCOBY, por sus siglas en inglés (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), este consorcio puede estar formado por especies de distintos géneros entre los que se encuentran *Acetobacter*, *Saccharomyces*, *Gluconobacter*, entre otros (10, 11).

Un cultivo típico de kombucha está formado por dos partes: una fase líquida y una fase sólida (figura 1). La primera está constituida por la infusión de té, en la que se pueden encontrar los microorganismos fermentativos, además de sus metabolitos y otros componentes como el azúcar agregado. Por otra parte, la fase sólida es generada por algunos microorganismos que componen el SCOBY, y está formada por fibras celulósicas que le dan una apariencia característica (12). La kombucha es considerada una bebida refrescante, con un sabor ácido, similar al de una sidra, pero con menor contenido alcohólico. El sabor viene dado por la generación de ácido láctico y otros metabolitos por parte de los distintos microorganismos que componen el SCOBY (12).

De manera similar a como sucede con el kéfir de la leche, la población del consorcio de kombucha no puede ser descrita con exactitud, ya que es variable entre los cultivos. Uno de los reportes más claros en los que se describe la composición del cultivo *starter* de kombucha es de Hesseltine en 1965. En ese ensayo él aisló un *Acetobacter sp.* (NRRL B-2357) y 2 levaduras (NRRL YB-4810, NRRL YB-4882) de una muestra de kombucha (12).



Figura 1 Frasco de cultivo clásico de kombucha (13). En la superficie se aprecia el SCOBY por encima de la infusión de té.

En la actualidad, el consumo de kombucha se ha expandido globalmente principalmente por sus propiedades benéficas para la salud que lo posicionan como un alimento funcional. Las principales propiedades adjudicadas a la kombucha son la prevención de enfermedades neurodegenerativas, reducción de presión arterial, actividad antioxidante,

efectos hipoglucémicos, actividad anticáncer y de detoxificación (14). Estas propiedades vienen dadas por la naturaleza de los metabolitos generados por el SCOBY, entre lo que se destacan polifenoles, ácidos orgánicos y vitaminas (10). La población que conforma el SCOBY es un factor clave para la determinación de las propiedades de la kombucha que se genera, dado que los metabolitos generados dependen directamente de esta. Además, el desarrollo del cultivo puede variar en gran medida dependiendo de distintas variables importantes como la temperatura, pH, oxígeno disuelto, tipo de azúcar que se agregue, tiempo de fermentación y la forma del recipiente (10). Este último parámetro ha sido de gran interés para los investigadores, ya que de él depende la superficie que está en contacto con el aire. Esto puede generar variaciones en las proporciones del consorcio, ya que, por ejemplo, las bacterias ácido acéticas son estrictamente aerobias (10).

Los ingredientes de origen botánico han sido empleados en el cuidado de la piel a lo largo de milenios debido a su accesibilidad y a la variedad de compuestos con propiedades biológicas que poseen (15). Una investigación reciente apunta al uso de nuevos sustratos para la producción de kombucha, basados en las diferentes propiedades que tienen botánicos distintos al té (16). Los resultados obtenidos son alentadores, ya que se obtuvieron productos con características de gran interés para su aplicación en cosméticos, como por ejemplo un aumento en el nivel de hidratación de la piel, un efecto positivo en el pH de la piel, aumento en la viabilidad y el metabolismo de las células de la piel, como los fibroblastos y los queratinocitos (16). Por otra parte, investigadores han reportado que la kombucha producida a partir de té blanco posee la mayor cantidad de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante (11).

Se ha reportado actividad antibacteriana por parte de la kombucha. Los investigadores reportaron la presencia de saponinas y flavonoides, moléculas que tienen propiedades antimicrobianas (17). Kombucha producida a partir de piña como sustrato fue evaluada como agente antimicrobiano, dando como resultado la inhibición de crecimiento de bacterias Gram positivo y Gram negativo (17).

Por otra parte, también se vio inhibida la actividad de enzimas como la colagenasa y elastasa, que están relacionadas con el envejecimiento celular y la formación de arrugas en la piel, lo que es de gran interés para la industria cosmética (16, 18). En adición, la kombucha mostró efectos prebióticos, es decir, que aportó beneficios a la microbiota natural de la piel. Esto es de vital importancia para el mantenimiento de un microbioma saludable de la piel, y representa una herramienta el tratamiento de algunas patologías asociadas a desbalances en la misma, como por ejemplo la dermatitis atópica (19). Estas características de la kombucha, sumadas a que son producto de un proceso de fermentación, la vuelven un postbiótico, lo que le añade un valor agregado para ser utilizada como un componente bioactivo en formulaciones de biocosméticos (20).

## 1.5. Caracterización molecular de microorganismos eucariotas y procariotas por secuenciación de regiones ITS y regiones codificantes para ARNr 16S

En el año 2003, Hebert *et al.* propusieron el concepto de "código de barras del ADN" con el objetivo de generar una herramienta confiable y estandarizada para la identificación de microorganismos, sea cual sea su entorno y naturaleza. Esta técnica fue pensada para aplicación en estudios relacionados con la biología evolutiva y ecología, y está basada en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) (21). Las regiones candidatas para amplificar deben cumplir distintos requisitos para poder ser utilizadas con este fin, estas son: A. contener una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie; B. poseer sitios conservados adyacentes, que permitan el diseño de *primers* universales, para su amplificación por PCR; y C. tener una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (22). Los ARNr (ácidos ribonucleicos ribosomales) poseen una variabilidad suficiente para permitir la diferenciación no solo entre organismos distantes, sino también entre aquellos más cercanos, lo que facilita la distinción entre especies, cepas o variedades. Además, el ARNr 16S, que tiene un tamaño relativamente largo de 1500 nucleótidos, minimiza las fluctuaciones estadísticas y su estructura secundaria conservada favorece el alineamiento preciso durante la comparación de secuencias (23).

El ARNr 16S está compuesto por nueve regiones (V1-V9) algunas conservadas y otras hipervariables, estas regiones hipervariables aportan la mayor cantidad de información útil para estudios de filogenética y taxonomía (24). Por otro lado, las regiones conservadas son de gran utilidad para el diseño de *primers* universales que permiten la amplificación de las diversas regiones hipervariables presentes en la mayoría de los ARNr 16S de los microorganismos que componen una comunidad (24).

El espaciador transcrito interno, o ITS por sus siglas en inglés (*Internal Transcribed Spacer*), es un fragmento del genoma llamado ADN espaciador. La amplificación y secuenciación de este fragmento es ampliamente utilizada como código de barras para la identificación molecular de especies de hongos. Tiene un tamaño aproximado de 600 pb de ADN, y debido a su variabilidad es utilizado para la generación de árboles filogenéticos además de para identificación molecular de especies de hongos (25).

Con el paso del tiempo, ha aumentado el acceso a las distintas tecnologías de secuenciación. El *gold standard* en tecnologías de secuenciación es el método desarrollado por Sanger en 1977. Este método se basa en la técnica de PCR, donde se utilizan los reactivos tradicionales, y además se agregan dideoxinucleótidos marcados al mix de PCR. El agregado de estos dideoxinucleótidos a la hebra copia generan un truncamiento (26). Los resultados de esta PCR se pueden observar mediante un

electroferograma obtenido de una electroforesis capilar, donde los fragmentos amplificados generan distintas señales debido a las distintas longitudes, estas señales son reconocidas por un lector, se traducen, y se obtiene así la secuencia nucleotídica de la región amplificada. La obtención de estas secuencias de ADN tiene distintas aplicaciones, una de ellas puede ser la identificación del organismo mediante técnicas bioinformáticas.

En la actualidad, la industria de la cosmética está en búsqueda de ingredientes innovadores que ofrezcan una mayor bioactividad y biodisponibilidad para su utilización en productos cosméticos naturales y orgánicos. Los biofermentos son precisamente eso, ingredientes innovadores obtenidos a partir de materias primas naturales, esto sumado a las propiedades benéficas para la salud que tiene la kombucha, la convierte en un postbiótico de gran interés. Por otro lado, a partir de stevia también se pueden producir activos cosméticos que llamen la atención de consumidores conscientes con la problemática ambiental existente (27).

En este trabajo se proponen una serie de ensayos que permiten extraer compuestos bioactivos y conocer la composición de los distintos extractos de stevia y de kombucha obtenida a partir de dos sustratos diferentes. Dado que las muestras vegetales y los cultivos de kombucha pueden presentar heterogeneidad, la información recabada puede ser útil para diseñar formulaciones biocosméticas que busquen la incorporación de extractos vegetales y/o postbióticos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Obtención y caracterización de extractos de *Stevia rebaudiana* y kombucha, y posterior evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes para la formulación de un ingrediente biocosmético multifuncional.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Obtener extractos de *Stevia rebaudiana* ricos en saponinas y polifenoles empleando distintos métodos y condiciones de extracción.
- Realizar cultivos de kombucha a partir de infusiones preparadas con distintos sustratos, identificar a los microorganismos presentes en el SCOBY utilizado.
- Caracterizar las muestras obtenidas evaluando su capacidad antimicrobiana y antioxidante mediante la realización de distintos ensayos analíticos.
- Diseñar y formular un ingrediente con fines bioactivos a partir de las pruebas llevadas a cabo.

## 3. Metodología

### 3.1. Materiales

Materiales biológicos:

Alcohol de cereales y glicerol vegetal calidad USP, adquiridos en Droguería Industrial Uruguaya. Hojas de *Stevia rebaudiana* y hojas de té blanco adquiridas en *Naturalherbs*.

Las cepas *A. brasiliensis*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Salmonella spp*, fueron obtenidas del cepario del laboratorio de Biotecnología de ORT y fueron manipuladas con el nivel de bioseguridad correspondiente.

El SCOBY fue donado de fuentes comerciales.

Materiales químicos:

Los reactivos generales se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, EUA), Dorwill (Argentina) y Merck (Alemania). Los medios de cultivo para bacterias y levaduras se obtuvieron de Oxoid (Inglaterra).

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio LB, medio MHA, medio MRS, medio PDA, medio TSA, medio TSB, medio YPD.

Otros reactivos utilizados durante el trabajo fueron: ABTS, *buffer* CTAB, *buffer* TAE 10X, *buffer* Taq, cristal violeta, fármaco comercial Venostasin (escina 50 mg), Geogard, *GoodView*, kit comercial de extracción de ADN *Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit*, lugol, marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix*, reactivo de Folin-Ciocalteu, safranina, Spectrastat™, vainillina, ácido ascórbico, ácido gálico.

### 3.2. Obtención de muestras

Se describe a continuación la metodología llevada a cabo para la obtención de las distintas muestras utilizadas a lo largo de este trabajo:

#### 3.2.1. Extractos de *Stevia rebaudiana*

Para realizar la extracción de los compuestos de interés a partir de stevia, se puso a punto un protocolo de extracción, para ello se evaluaron distintas condiciones de incubación, así como distintas mezclas de solventes.

Las mezclas de solventes evaluadas fueron:

1. H<sub>2</sub>O:Glicerol en partes iguales.

2. H<sub>2</sub>O:Glicerol:EtOH en la siguiente proporción: 50:30:20.

Además, se listan a continuación las condiciones de extracción:

1. Sonicación en baño de agua durante 15 minutos, y posterior incubación en agitador orbital a temperatura ambiente durante 72 horas.
2. Incubación en baño termostatzado a 45°C durante 4 horas.

Se partió de hojas secas de stevia, estas fueron procesadas hasta obtener un polvo fino. Luego, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL las mezclas de solventes a evaluar. En cada matraz se colocó 10% m/v del polvo de stevia, se homogeneizó la mezcla mediante agitación y se procedió a realizar las condiciones de extracción mencionadas anteriormente. Se realizaron triplicados para cada extracción.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una filtración de las muestras utilizando filtro de papel para descartar los restos vegetales.

Las muestras se denominaron según la mezcla de solventes y su condición de extracción de la siguiente manera: "SG" indica que la extracción fue realizada con la mezcla de solventes número 1, mientras que "SGE" indica que la extracción fue realizada con la mezcla de solventes número 2. Además, se indica la condición de extracción con un número, correspondiente al tiempo de incubación en horas. A modo de ejemplo, la muestra "SGE72" hace referencia a la extracción realizada con la mezcla de agua, glicerol y etanol en proporciones de 50:30:20 respectivamente, que incluyó un paso de sonicación y posterior incubación en agitador orbital a temperatura ambiente durante 72 horas.

### **3.2.2. Cultivo de Kombucha**

Para obtener la kombucha, se realizaron cultivos a partir de infusiones realizadas con distintos sustratos, estos fueron los siguientes:

1. Hojas de té blanco (5 g/L).
2. Hojas de té blanco (2,5 g/L) + hojas de stevia (2,5 g/L).

Para la obtención de la kombucha se siguió la metodología realizada por Dogan *et al.* 2022, con modificaciones mínimas (14). Para cada sustrato de infusión se realizaron triplicados. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer estériles, agregando 250 mL de infusión y 10% (m/v) de SCOBY. Luego los matraces fueron incubados a temperatura ambiente durante 14 días.

Se realizaron inspecciones visuales cada 48 horas con el objetivo de controlar posibles contaminaciones de los cultivos.

Una vez transcurridos los 14 días de incubación, se retiró el SCOBY de cada matraz y se procedió a filtrar la kombucha obtenida. En primer lugar, se utilizaron filtros de papel, y luego membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  con el objetivo de eliminar la biomasa restante.

Las muestras obtenidas fueron denominadas "K" y "KS", según el sustrato que se utilizó para obtener cada una. En primer lugar, "K" hace referencia a las muestras de kombucha obtenidas utilizando únicamente té blanco como sustrato de la infusión, mientras que "KS" hace referencia a las muestras de kombucha obtenidas utilizando té blanco y *Stevia rebaudiana* como sustrato de la infusión.

### **3.3. Caracterización de muestras obtenidas**

Una vez obtenidas las muestras, se propuso realizar una caracterización de estas, con el objetivo de conocer su composición. Para ello se realizaron distintos ensayos, que aportan información relevante sobre cada muestra.

En primera instancia se realizaron pruebas a modo de *screenings*. Estos *screenings*, o pruebas preliminares, son ensayos sencillos, y son de gran utilidad para obtener información sobre la presencia de compuestos de interés en las muestras obtenidas.

A continuación, se desarrollan los ensayos llevados a cabo para caracterizar las muestras.

#### **3.3.1. Test afrosimétrico**

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las muestras de generar espuma, se realizaron diluciones 1 en 3 de cada una con agua, ya que el etanol influye negativamente en la formación de espuma persistente. Se colocaron en tubos de ensayo, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se registró la altura a tiempo 0, 2, 10 y 20 minutos. Los resultados se consideran positivos si una vez transcurridos 10 minutos luego de realizada la agitación, la espuma generada persiste (28, 29).

#### **3.3.2. Medición de espectros de absorción UV-VIS**

Se realizaron mediciones del espectro de absorción de las muestras en el rango de longitudes de onda de 200 a 750 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UVmini 1240 y celdas de cuarzo. Además de las muestras, se midió el espectro de absorción de algunos compuestos tales como escina (saponina) y ácido gálico (polifenol), para contar con una referencia de los picos de absorción que tienen los mismos.

#### **3.3.3. Cuantificación de saponinas**

Para realizar la cuantificación de saponinas presentes en las muestras se llevó a cabo el método de vainillina-sulfúrico descrito por Le *et al.* 2018 (30). Se utilizó escina como saponina estándar, realizando tres curvas de calibración utilizando como solvente a las

matrices con las que se extrajeron las muestras (para evaluar las muestras de kombucha se realizó la curva de calibración haciendo diluciones en agua). Cada curva abarcó el rango de 0.2 a 1.8 mg/mL de escina.

Para esta prueba se prepararon las muestras a analizar por triplicado en tubos de ensayo con tapa a rosca. Utilizando una campana de extracción se colocaron en cada tubo 2,5 mL de ác. sulfúrico 72% (v/v), 250  $\mu$ L de vainillina 8% (m/v) en etanol, y 250  $\mu$ L de muestra. Los tubos fueron incubados en baño termostatzado a 60 °C durante 15 minutos y luego se procedió a sembrar 200  $\mu$ L de cada muestra en una placa de 96 pocillos. Se midió absorbancia a 560 nm utilizando un lector de placas *Multiskan FC* de *Thermo Scientific*. Los resultados obtenidos se procesaron mediante el *software GraphPad Prism 8.0.2*, los puntos de las curvas de calibración fueron ajustados a rectas, en cada una se interpolaron los valores de absorbancia registrados para las muestras correspondientes.

Cabe destacar que se utilizó un fármaco comercial en formato de cápsulas que contienen 50 mg de escina, no se observaron interferencias de los posibles excipientes que pueden encontrarse en las cápsulas.

### **3.3.4. Cuantificación de polifenoles**

Los polifenoles, al igual que las saponinas, son las moléculas de mayor interés en este trabajo. Por lo tanto, al igual que para saponinas, se propuso llevar a cabo un ensayo colorimétrico para poder cuantificar los niveles de polifenoles en las muestras obtenidas. El método que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu es un método extendido utilizado para la cuantificación de polifenoles (31).

Se llevó a cabo este ensayo siguiendo el protocolo realizado por Smolskait *et al.* 2015, con leves modificaciones (31). Para la realización de la curva estándar se utilizó ácido gálico en agua en el rango de 0,025 a 0,3125 mg/mL.

Se utilizó una placa de 96 pocillos, sembrando en cada pocillo 10  $\mu$ L de muestra, 100  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) y 80  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Luego se agitó la placa y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se registró la absorbancia a 765 nm del producto coloreado obtenido utilizando un lector de placas *TECAN Infinite M200 PRO*. Para cada muestra, así como para cada punto de la curva de calibración se realizaron triplicados.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron procesados en el *software GraphPad Prism 8.0.2*, ajustando a una recta los valores obtenidos para los puntos de la curva de calibración realizada, en la misma se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra, expresando los datos como mililitros de GAE (equivalentes de ácido gálico) por gramo de muestra.

### **3.3.5. Evaluación de capacidad antioxidante**

Se utilizó el método de ABTS (ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) para medir la actividad antioxidante de las muestras. Se siguió el protocolo realizado por Miller *et al.* 1993, con adaptaciones para poder ser realizado en placa de 96 pocillos (32). Como estándar se utilizó ácido ascórbico, en un rango de concentraciones de 25 a 225 µg/mL.

Se preparó la forma de radical libre del ABTS 14 horas antes de la medición. Para ello se preparó una solución 7 mM de ABTS con 2,45 mM de amonio persulfato en agua. Pasado el tiempo de incubación se realizó una dilución en etanol hasta obtener una absorbancia a 734 nm de  $0.7 \pm 0,025$ . Se utilizó una placa de 96 pocillos, sembrando en cada uno 3 µL de muestra y 300 µL de ABTS en forma de radical libre. Se realizó una incubación de 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se registró la absorbancia a 734 nm del producto coloreado obtenido utilizando un lector de placas *TECAN Infinite M200 PRO*.

El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos fueron procesados con el *software GraphPad Prism 8.0.2*. En el mismo se ajustaron los valores de absorbancia obtenidos para cada punto de las curvas a una recta, y se interpolaron los valores de cada muestra en la curva correspondiente para cada caso, expresando los resultados como miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra.

### **3.4. Caracterización de cultivo *starter***

Con el objetivo de conocer qué organismos conforman el SCOBY, se realizó una caracterización de este mediante técnicas microbiológicas y moleculares.

#### **3.4.1. Procesamiento de SCOBY**

En primer lugar, se procesaron 30 gramos del cultivo *starter* adicionando 20 mL de kombucha utilizando un *Stomacher BagMixer Interscience* de 400cc. Este equipo disgrega el SCOBY mecánicamente, de esta manera se logra obtener las bacterias y levaduras que lo conforman de manera libre en la solución.

#### **3.4.2. Cultivo de SCOBY procesado en medio sólido**

En condiciones de esterilidad, utilizando un rastrillo se sembraron 100 µL de diluciones  $1/1 \times 10^{-4}$ ,  $1/1 \times 10^{-5}$ ,  $1/1 \times 10^{-6}$ ,  $1/1 \times 10^{-7}$  y  $1/1 \times 10^{-8}$  del SCOBY procesado en placas de Petri. Se utilizó medio YPD para levaduras, TSA para bacterias y MRS para bacterias ácido lácticas.

Las placas de cada dilución se incubaron en estufa a 37°C durante 48 hs. Las placas con medio MRS fueron colocadas en una cámara de microaerofilia para poder alcanzar un bajo nivel de oxígeno.

### **3.4.3. Identificación macroscópica y aislamiento de colonias**

Luego de finalizada la incubación, se procedió a realizar una observación macroscópica de las colonias obtenidas para cada dilución. Se identificaron aquellas que presentaron la misma morfología tales como color, textura y forma.

Aquellas colonias de bacterias y levaduras que presentaron distinta morfología fueron aisladas en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo correspondiente para cada caso. Para ello, en cabina de flujo laminar y utilizando un ansa estéril, se picó cada colonia seleccionada y se sembró en una nueva placa para obtener de esta manera cultivos puros.

Las placas de los cultivos puros de cada microorganismo fueron incubadas en estufa a 37°C durante 48 hs.

### **3.4.4. Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de colonias aisladas**

En primer lugar, se llevó a cabo una tinción de Gram de cada cultivo puro de bacterias. Para ello se siguió un protocolo de tinción de Gram, que utiliza cristal violeta para teñir las bacterias, lugol para fijar el colorante, y safranina como colorante de contraste. Para poder determinar la clasificación de cada bacteria analizada, se utilizó un microscopio óptico, una coloración violeta púrpura evidencia un resultado de Gram Positivo, mientras que una coloración rosa evidencia un resultado de Gram negativo.

Por otra parte, se analizó la expresión o no expresión de dos enzimas por parte de las bacterias, lo que también permite su clasificación, estas fueron la enzima catalasa y enzima oxidasa. Para evaluar si la batería expresa la enzima catalasa por parte de las bacterias se utilizó peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de 10 volúmenes, que en contacto con esta enzima genera una reacción que produce burbujas. Para realizar la prueba se colocó una gota de  $H_2O_2$  en un portaobjetos, luego con un ansa se tomó una colonia bacteriana y se la puso en contacto con el peróxido de hidrógeno, la aparición de burbujas indica un resultado positivo, mientras que la ausencia de burbujas indica un resultado negativo. Por otro lado, para estudiar si la batería expresa la enzima oxidasa se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito para la enzima catalasa. En este caso se utilizó un reactivo que en contacto con la enzima oxidasa genera un producto coloreado, el procedimiento constó en colocar un trozo de papel sobre un portaobjetos y colocar una gota del reactivo, luego con un ansa se tomó una colonia bacteriana y se la puso en contacto con el reactivo, la generación de una mancha de color azul indica un resultado positivo para la presencia de la enzima oxidasa, la ausencia de color indica un resultado negativo.

### **3.4.5. Caracterización molecular de colonias aisladas**

Dado que los ensayos bioquímicos realizados no son suficientes para identificar las distintas bacterias aisladas, se realizó una caracterización molecular de las colonias aisladas, tanto de las bacterias como de las levaduras. Para ello se llevaron a cabo un conjunto de técnicas para poder obtener la secuencia nucleotídica de regiones ITS y 16S de los microorganismos, y así lograr identificarlos mediante BLASTn.

#### **3.4.5.1. Cultivo líquido**

En primera instancia se procedió a realizar un cultivo líquido a partir de los cultivos puros obtenidos anteriormente. En condiciones de esterilidad, se colocó con un ansa una colonia en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo líquido. Para levaduras se utilizó medio YPD mientras que para bacterias se utilizó TSB. En el caso de las bacterias anaerobias, el medio utilizado fue MRS líquido.

Las bacterias fueron incubadas durante 48 hs a 37 °C, mientras que las levaduras fueron incubadas 48 hs a 25°C. Para dicho ensayo se utilizó un agitador orbital de mesada.

#### **3.4.5.2. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de los cultivos líquidos obtenidos. Para ello previamente se trasvasó el contenido de cada tubo a un tubo plástico para poder ser centrifugado. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga *Thermo Scientific Sorvall ST 16R*. Se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar la extracción de ADN a partir de los *pellets* celulares obtenidos.

La extracción de ADN genómico de levaduras y bacterias aerobias se llevó a cabo siguiendo un protocolo que se basa en la utilización de distintos solventes para separar el ADN de otros compuestos celulares, el protocolo realizado se puede ver en el anexo 2. Por otra parte, para la extracción de ADN de las bacterias anaerobias se utilizó el kit comercial *Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit* de *Zymo Research*.

Las muestras de ADN obtenidas fueron conservadas en *freezer* a -20 °C.

#### **3.4.5.3. PCR tiempo final**

Se procedió a realizar amplificaciones de las regiones de interés en bacterias y levaduras mediante PCR en tiempo final utilizando un termociclador *SimpliAmp™ Thermal Cycler*. En la tabla 2 se puede visualizar tanto el nombre como la secuencia de los *primers* utilizados en este ensayo.

Tabla 2: *Primers* utilizados en PCR tiempo final:

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia nucleotídica (5'-3')
<b>ITS 1 (Forward)</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
<b>ITS 4 (Reverse)</b>	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<b>27F (Forward)</b>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
<b>1942R (Reverse)</b>	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Se llevaron a cabo distintos ciclados para cada reacción (tabla 3), ya que, si bien se utiliza la misma enzima polimerasa, los *primers* utilizados tienen distintas temperaturas de *melting*. Por otra parte, el tamaño de los amplicones es distinto.

Tabla 3: Ciclado para PCR de regiones 16s e ITS.

Etapa	16s (30 ciclos)		ITS (35 ciclos)	
	Tiempo, t (min:s)	Temperatura, T (°C)	Tiempo, t (min:s)	Temperatura, T (°C)
<b>Desnaturalización inicial</b>	05:00	95	03:00	95
<b>Desnaturalización</b>	00:30	94	00:30	95
<b>Annealing</b>	00:30	58	01:00	55
<b>Extensión</b>	00:40	72	01:30	72
<b>Extensión final</b>	10:00	72	10:00	72
<b>Hold</b>	∞	4	∞	4

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, en la tabla 4 se muestra la composición de los *mix* de PCR para la amplificación de las regiones 16s e ITS.

Tabla 4: Componentes de *mix* de PCR:

Componente	Volumen para 1 reacción (µL)
<b>Taq Buffer 10X</b>	2.5
<b>dNTPs (10 mM)</b>	0.5
<b>Primer forward (10 mM)</b>	0.5
<b>Primer reverse (10 mM)</b>	0.5
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1
<b>Taq polimerasa (50 U/µL)</b>	0.25
<b>ADN molde</b>	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18.75
<b>Volumen final</b>	25

#### 3.4.5.4. Electroforesis en gel de agarosa

Con el objetivo de evaluar el resultado de la PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se puede visualizar si el tamaño de los amplicones obtenidos corresponde con lo reportado. Se utilizó el marcador de peso *GeneRuler DNA Ladder Mix*, y *GoodView* como agente intercalante. Se reveló el gel utilizando un transiluminador *Life Technologies E-Gel® Imager*.

#### 3.4.5.5. Secuenciación de regiones 16s e ITS

Para poder obtener la secuencia nucleotídica de las regiones codificantes para ARNr 16s de las colonias bacterianas y ARNr ITS de las levaduras se optó por realizar una secuenciación utilizando el método de Sanger. Las muestras de ADN extraído anteriormente fueron enviadas a la empresa MacroGen Inc. para ser secuenciadas.

#### 3.4.5.6. Análisis bioinformático de secuencias obtenidas

A partir de los electroferogramas obtenidos como resultado de la secuenciación se realizó una técnica de alineamiento BLASTn. Se utilizaron las secuencias obtenidas como *query*, frente a la base de datos de NCBI, para de esta manera identificar a qué organismo pertenece la secuencia evaluada.

### 3.5. Evaluación de capacidad antimicrobiana

Como se mencionó anteriormente, las saponinas y, en menor medida, los polifenoles son moléculas que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Debido a esto se

buscó evaluar la actividad antibacteriana de las muestras de stevia y kombucha obtenidas anteriormente utilizando dos estrategias de cultivo.

### **3.5.1. Evaluación de capacidad antimicrobiana en medio sólido**

Se evaluó la capacidad antibacteriana en cultivo sólido, evaluando la formación de halos de inhibición de crecimiento. Para ello se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de suero isotónico con bacteria en placas de Petri conteniendo medio de cultivo MHA. Las bacterias evaluadas fueron *E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. aureus*, y *P. aeruginosa*. Para estandarizar la cantidad de bacterias inoculadas se utilizó la escala Mac Farland, preparando soluciones 0,5 de esta escala en suero fisiológico, lo que corresponde a una concentración de bacterias de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  ufc/mL. Para determinar la concentración bacteriana se midió absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm (densidad óptica a 600 nm,  $\text{OD}_{600}$ ), el valor de absorbancia debe encontrarse en el rango de 0.08 a 0.12.

Luego de sembrar las bacterias, se colocaron en la placa discos embebidos con las muestras a evaluar. Además, se utilizaron discos embebidos con el conservante comercial Geogard al 2% como control positivo de inhibición, y discos embebidos con la matriz de extracción de cada muestra como control negativo de inhibición. Se realizaron triplicados de cada cultivo.

### **3.5.2. Ensayo de inhibición de crecimiento en medio líquido**

Para evaluar la inhibición de crecimiento microbiano en medio líquido se realizó un cultivo de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* en placa de 24 pocillos. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de dos diluciones de una muestra compuesta por SGE4 y KS en partes iguales. Las diluciones evaluadas fueron la muestra al 1% y 2%.

Se utilizó medio LB inoculado con 0.5 Mac Farland de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, mientras que para *C. albicans* se utilizó medio YPD inoculando la misma dilución de microorganismo. Como se mencionó anteriormente, esta escala corresponde a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  ufc/ml. Para este ensayo se colocaron en cada pocillo 1260  $\mu\text{L}$  de medio inoculado, y 140  $\mu\text{L}$  de la muestra a evaluar.

Se realizaron distintos controles para validar el ensayo; como control positivo de crecimiento a los 1260  $\mu\text{L}$  de medio inoculado se le agregaron 140  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Por otra parte, los controles negativos de crecimiento fueron: 1260  $\mu\text{L}$  de medio inoculado con 140  $\mu\text{L}$  de Spectrastat™ 1,5% (control positivo de inhibición), y 1260  $\mu\text{L}$  de medio LB sin inóculo microbiano.

Se realizaron mediciones de la densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) cada 1 hora utilizando un lector de placas *TECAN Infinite M200 PRO*, a una temperatura de 37 °C.

Cabe destacar que en algunas ensayos se utilizó Spectrastat™ 2% como control positivo de inhibición.

### **3.6. Liofilización de extractos**

Se buscó obtener un liofilizado de una muestra compuesta por SGE4 y KS en partes iguales, además de SGE4 y KS por separado. Para ello se realizó un paso previo a la liofilización que consistió en congelar la muestra. Se utilizó el liofilizador de laboratorio *Telstar LyoQuest*, con condiciones similares a las utilizadas por Lemus-Mondaca *et al* (7).

Se midió y registró la masa de un vial de liofilización y se colocaron 3 mL de la muestra en él. Se volvió a registrar la masa, esta vez con la muestra incluida y se colocó en *freezer* a -80 °C durante 24 hs. Finalmente se colocó el vial en el liofilizador a una presión de vacío de 0.1 mbar y una temperatura de -50 °C. Una vez transcurridas 72 hs se retiró el vial del equipo y se registró su masa.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Obtención de muestras

Con el fin de obtener extractos de stevia se incubaron hojas molidas de la planta en distintas condiciones. Una vez finalizada la incubación, se logró obtener extractos vegetales de stevia, los cuales, junto a las muestras de kombucha, representaron el principal material de estudio utilizado durante este trabajo. Los extractos a simple vista no mostraron contaminación por microorganismos. Una vez filtrados se almacenaron en *freezer* a -20 °C a modo de *stock*. A partir de este *stock* se separaron alícuotas para realizar los ensayos, dichas alícuotas fueron conservadas en heladera a 4 °C durante un mes. Para evitar trabajar con muestras degradadas, una vez transcurrido este tiempo, se descartaron las alícuotas y se descongelaron nuevas.

Por otra parte, los cultivos kombucha fueron realizados exitosamente, el cultivo *starter* logró reproducirse, obteniendo un SCOBY con un grosor de aproximadamente 1 cm que ocupó toda la superficie del líquido. No se observaron contaminaciones por microorganismos a simple vista. Luego de retirar el SCOBY y realizar los pasos de filtración se separaron las muestras en alícuotas y fueron conservadas en *freezer* a -20 °C a modo de *stock*. Al igual que con las muestras de stevia, se descongelaron alícuotas de kombucha para realizar los ensayos, dichas alícuotas fueron conservadas en heladera a 4 °C durante un mes.

El pH final de las muestras de kombucha obtenidas se encontró entre 2.06 y 2.34. Lo cual es levemente menor a lo reportado en bibliografía (13). Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de fermentación disminuye el pH debido a la formación de ácidos orgánicos, en fermentaciones mayores a 10 días se obtienen valores de pH menores a 2,5 (11).

Para hacer referencia a las muestras se seguirá la siguiente nomenclatura: las muestras de stevia extraídas con agua y glicerol en partes iguales se denominan SG, mientras que las extraídas con agua, glicerol y etanol en proporciones 50:30:20 se denominan SGE. Para diferenciar según la condición de extracción se le agrega el tiempo de incubación en horas (4 o 72). Por otra parte, a las muestras de kombucha obtenidas a partir de té blanco se las denomina con la letra K, mientras que a las obtenidas a partir de té blanco y stevia como KS.

## **4.2. Caracterización de las muestras obtenidas**

### **4.2.1. Test afrosimétrico**

Este ensayo se basa en la capacidad de las saponinas de generar espuma debido a sus propiedades tensoactivas. Esta técnica es de utilidad para determinar cualitativamente la presencia de saponinas en las muestras. Cabe destacar que este no es un método cuantitativo, es un ensayo que es útil para indicar la presencia o ausencia de saponinas en la muestra. También es importante destacar que la generación de espuma persistente puede atribuirse a la presencia de saponinas, sin embargo, la no generación de espuma persistente no refleja la ausencia de estas moléculas, ya que se ha reportado que la capacidad de disminuir la tensión superficial no siempre se correlaciona con la capacidad de generar espuma (33).

Tal como se observa en la figura 2, las muestras de stevia incubadas por 72 horas (SG72 y SGE72) fueron las que mayor nivel de espuma generaron a tiempo cero. Una vez transcurridos 10 minutos todas las muestras mostraron niveles de espuma mayores a 2 mm, lo que supone un resultado positivo para todas las muestras. La altura de la espuma de las muestras de SG4 y SG72 son mayores a la de sus pares extraídas con etanol (SGE4 y SGE72), está reportado que el agregado de etanol a mezclas acuosas influye negativamente en la formación de espuma persistente, y si bien se realizaron diluciones para mitigar este efecto, tal como se reporta en bibliografía, no se puede asegurar que las muestras que no tienen etanol tienen una cantidad mayor de saponinas (34). Para ello sería necesario realizar una técnica cuantitativa.

Por otra parte, las muestras de kombucha también arrojaron resultados positivos, lo que indica la presencia de saponinas. Cabe destacar que la espuma generada por KS es casi cuatro veces mayor a la generada por K, lo que puede deberse a que la stevia utilizada como sustrato en la fermentación aporta grandes cantidades de saponinas. Sin embargo, la espuma generada por KS disminuye su altura más rápidamente que K, a tiempo final la espuma de ambas muestras tuvo la misma altura, los valores para cada tiempo se encuentran tabulados (ver tabla 8 en anexo 1).

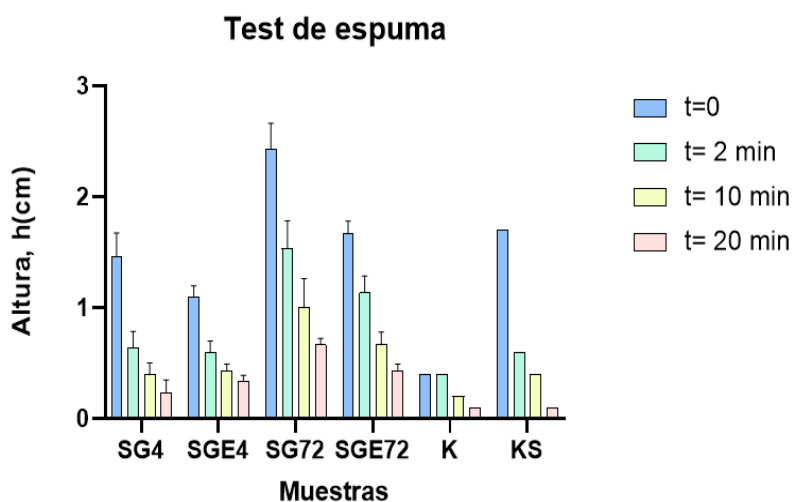
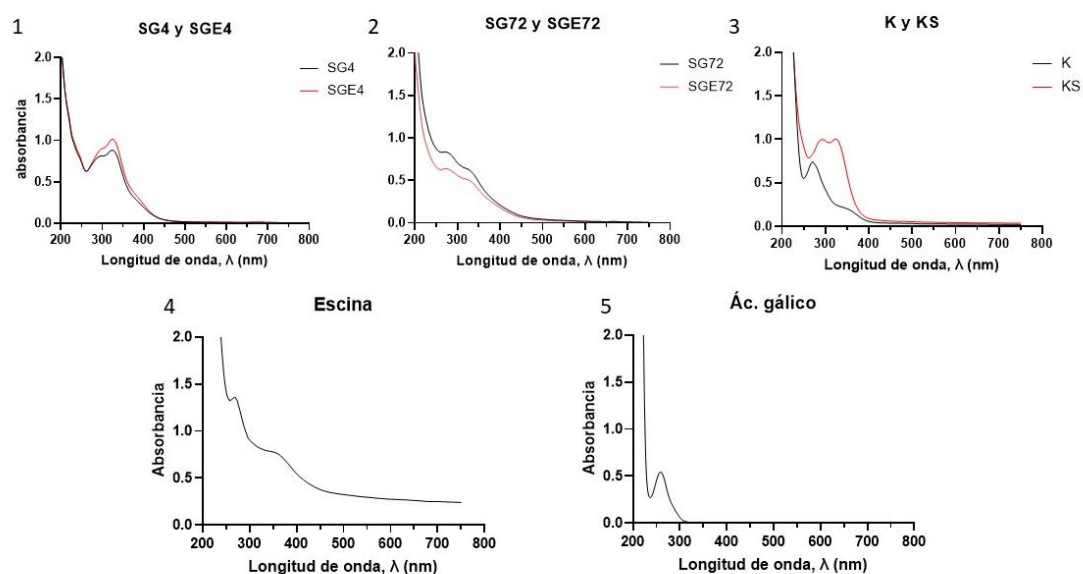


Figura 2 Resultados de *test* afrosimétrico (test de espuma). En celeste, verde, amarillo y rosa la altura de la espuma de cada muestra a tiempo 0, 2 minutos, 10 minutos y 20 minutos respectivamente. SG4: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 4 horas a 45 °C, SGE4: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 4 horas a 45 °C, SG72: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente, SGE72: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 72 horas a temperatura ambiente, K: muestra de kombucha a partir de té blanco, KS: muestra de kombucha a partir de té blanco y stevia. Se observa un resultado positivo para todas las muestras, dado que la espuma generada es persistente.

Por tanto, mediante este *screening*, se logró corroborar la presencia de saponinas en las muestras, lo que es acorde a lo reportado en bibliografía (17, 35).

#### 4.2.2. Espectros de absorción UV-VIS

Con el objetivo de caracterizar los extractos y determinar la presencia de diferentes moléculas con potencial bioactivo como polifenoles, los cuales absorben por debajo de los 400 nm, se realiza un *screening* que consta en realizar barridos del espectro de absorción UV-VIS. Se le denomina barrido del espectro de absorción a la medición de la absorbancia de una muestra en un rango de longitudes de onda desde 200 a 700 nm aproximadamente. Los resultados se muestran en la figura 3.



**Figura 3** Espectros de absorción UV-VIS entre 200-750 nm. SG4: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 4 horas a 45 °C, SGE4: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 4 horas a 45 °C, SG72: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente, SGE72: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 72 horas a temperatura ambiente, K: muestra de kombucha a partir de té blanco, KS: muestra de kombucha a partir de té blanco y stevia. (1) Espectros de absorción de SG4 y SGE4 (2) Espectros de absorción de SG72 y SGE72 (3) Espectros de absorción de K y KS (4) Espectros de absorción de Venostasin (escina 50mg) (5) Espectros de absorción de Ac. gálico.

Se analizaron los picos obtenidos, estos se encontraron en un rango de longitudes de onda acordes a lo esperado (entre 250 y 400 nm), ya que está reportado que los polifenoles, triterpenos y saponinas absorben en este rango (36).

Cabe resaltar que no se observan picos de absorción en el rango entre 400 y 700 nm, donde absorben compuestos como las clorofilas, que pueden estar presentes en extractos botánicos (37). Se observaron diferencias entre las muestras correspondientes a cada método de extracción (fig. 3 (1) y fig. 3 (2)), si bien todas presentan picos u hombros en ese rango de longitud de onda, su forma es distinta, lo que indica diferencias entre cada condición de extracción evaluada.

El ácido gálico, utilizado como estándar de compuesto fenólico, muestra un claro pico de absorción a 270 nm, tal como está reportado en bibliografía (38). Por otra parte, la escina no muestra picos claros de absorción, sin embargo, se observan hombros a 270 y 360 nm.

En los barridos correspondientes a los extractos SG4 y SGE4 se ve un pico máximo de absorción en la longitud de onda de 325 nm, éste es más notorio que en las muestras SG72 y SGE72, que presentan un hombro similar al de la escina en dicha longitud de onda. Esto denota un mayor efecto de la temperatura de extracción más que de los solventes utilizados, no se encontraron reportes que evidencien que temperaturas mayores mejoren

la extracción de estos compuestos (39). Sin embargo, en la bibliografía consultada los extractos que mayor actividad antioxidante mostraron fueron los extraídos entre 40 y 50°C (39).

Los barridos espectrofotométricos de las muestras de kombucha también muestran diferencias. Tal como se ve en la figura 3, la muestra KS absorbe en el rango de 240 a 300 nm, observándose dos picos claros. En el caso de K, se observa un único pico de absorción a 275 nm. El espectro de absorción de KS es similar al de las muestras SG4 y SGE4, lo que sugiere que la utilización de stevia como sustrato para la kombucha aporta compuestos que no se observan en el espectro de absorción de K.

Tanto el *test* afrosimétrico como los barridos espectrofotométricos fueron considerados pruebas preliminares, o *screenings*. Los resultados obtenidos en estos son prometedores, ya que evidencian la presencia de los compuestos de interés en las muestras obtenidas (17, 35).

#### 4.2.3. Cuantificación de saponinas

Dado que las saponinas son moléculas de gran interés en este trabajo, es de vital importancia conocer la concentración de estas en las muestras obtenidas. Realizar una cuantificación de estas es necesario para poder lograr una caracterización eficaz. Existen varias opciones para cuantificar este tipo de moléculas, sin embargo, en este caso se optó por el método vainillin-sulfúrico. Este es un método colorimétrico, sencillo y confiable, que se basa en la interacción del ácido sulfúrico y la vainillina con las saponinas y compuestos triterpénicos para la obtención de un producto coloreado.

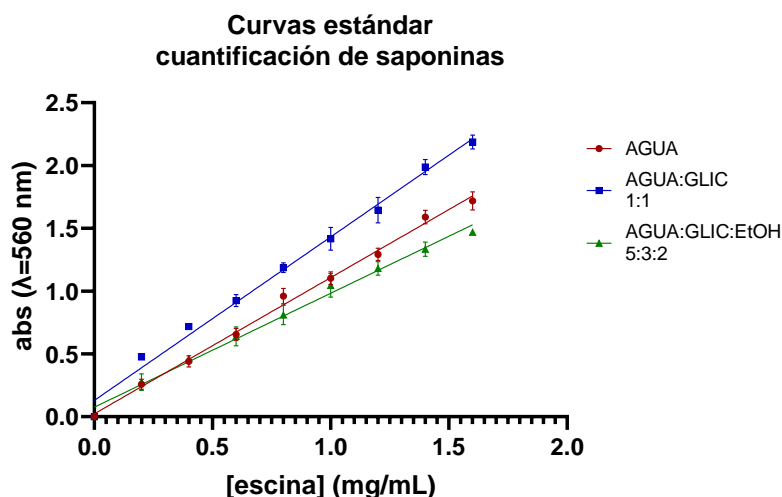
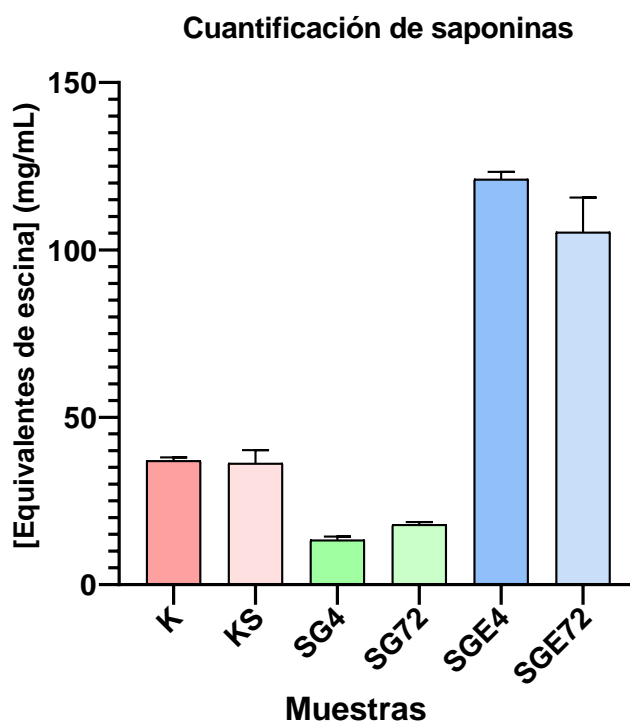


Figura 4 Curvas estándar para cuantificación de saponinas obtenidas con el *software GraphPad Prism 8.0.2*. En rojo la curva de calibración utilizando agua como disolvente de escina ( $y=1,085x+0,02241$ ,  $R^2=0,9907$ ). En azul la curva de calibración utilizando agua y glicerol en partes iguales como disolventes de escina ( $y=1,302x+0,1291$ ,  $R^2=0,9871$ ). En verde la curva de calibración utilizando agua:glicerol:etanol en proporción de 5:3:2 como disolventes de escina ( $y=0,9077x+0,07521$ ,  $R^2=0,9824$ ).

Este ensayo permitió comprobar la presencia de saponinas en todas las muestras, además de que pudieron ser cuantificadas en las mismas. Si bien es un método ampliamente utilizado para la cuantificación de saponinas, otros compuestos con estructuras químicas similares a estas pueden arrojar un resultado positivo (40, 41).

Se realizaron distintas curvas de calibración con distintas diluciones de escina en las distintas matrices de extracción. Los  $R^2$  obtenidos fueron mayores a 0.98 (fig. 4), lo que permitió interpolar correctamente los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra. Los resultados fueron expresados en miligramos de equivalentes de escina por mililitro de muestra. Con respecto a estos, los extractos de stevia fueron las que mayor cantidad de saponinas y compuestos triterpénicos mostraron en comparación con el resto de las muestras evaluadas, siendo el promedio de los triplicados de SGE4 mayor al promedio de los triplicados de SGE72. Los niveles de saponinas cuantificados pueden observarse en la figura 5.



**Figura 5** Cuantificación de saponinas y compuestos triterpénicos en las muestras obtenidas expresados como miligramos de equivalentes de escina por mililitro de muestra. SG4: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 4 horas a 45 °C, SGE4: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 4 horas a 45 °C, SG72: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente, SGE72: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 72 horas a temperatura ambiente, K: muestra de kombucha a partir de té blanco, KS: muestra de kombucha a partir de té blanco y stevia. Las muestras de stevia extraídas con etanol poseen mayor concentración de saponinas.

Las muestras de stevia (SG4, SGE4, SG72, SGE72) mostraron resultados distintos entre sí, en este caso las muestras extraídas utilizando 20% de etanol (SGE4 y SGE72) mostraron concentraciones de saponinas aproximadamente 10 veces mayores que las

muestras extraídas únicamente con agua y glicerol (SG4 y SG72). Lo que reafirma que las extracciones hidroalcohólicas son una excelente técnica para la extracción de estos compuestos.

Se observaron diferencias entre los resultados obtenidos en test de espuma, barridos y cuantificación colorimétrica. Los dos primeros fueron realizados a modo de *screening* para evaluar la presencia de estas moléculas en las muestras, mientras que el ensayo de cuantificación nos aporta información sobre la cantidad de saponinas en las muestras, por lo tanto, representa un resultado más confiable. La cuantificación de saponinas en las muestras de kombucha es de gran importancia en este trabajo, ya que los emulsionantes naturales representan un gran valor en la cosmética natural. Su utilización en futuras formulaciones puede añadirle un importante valor agregado a los productos que actualmente utilizan emulsionantes químicos (42).

#### 4.2.4. Cuantificación de polifenoles

Cuantificar el contenido total de compuestos fenólicos en las muestras obtenidas fue de gran relevancia en este trabajo, ya que se estima que asociada a la cantidad de polifenoles está la actividad antioxidante, eje central del trabajo. Por lo que los resultados obtenidos con esta técnica fueron importantes para poder evaluar a todas las muestras obtenidas, y junto con los resultados anteriores y los de cuantificación de actividad antioxidante, poder seleccionar las mejores muestras.

Cabe destacar que para este ensayo se esperó obtener altos niveles de polifenoles, por lo que evaluaron diluciones 1/100 de las muestras. Debido a esto se realizó una única curva de calibración con agua, a diferencia de otros ensayos realizados en este trabajo, donde se realizaron distintas curvas de calibración, disolviendo el estándar en la matriz utilizada en cada extracción.

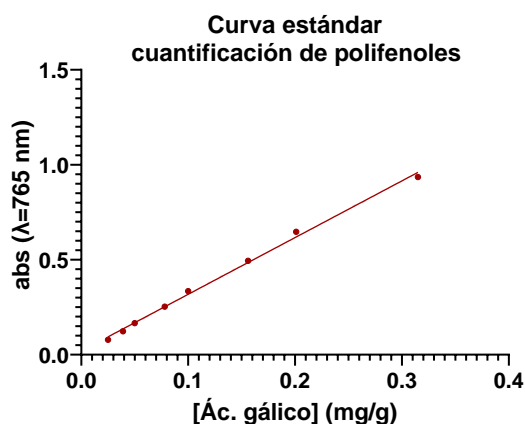
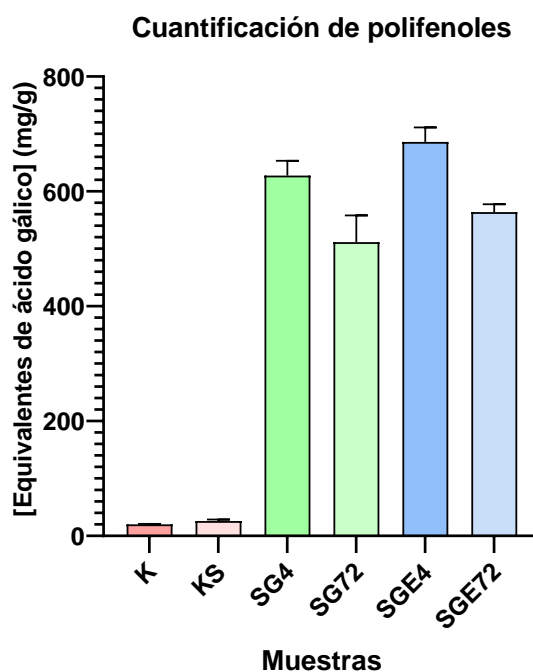


Figura 6 Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles obtenida con el *software GraphPad Prism 8.0.2* ( $y = 2,987x + 0,01911$ ,  $R^2 = 0.9967$ ).

En primer lugar, la curva de calibración realizada tuvo un  $R^2 = 0.9967$  (fig. 6). Las muestras fueron interpoladas utilizando el programa *GraphPad Prism 8.0.2*. Obteniendo así los resultados de la cantidad de polifenoles presentes en cada muestra, expresados como miligramos de GAE por gramo de muestra.

Como se observa en la figura 7, los niveles de polifenoles presentes en las muestras de stevia son significativamente más altos que en las muestras de kombucha. Los valores encontrados en bibliografía difieren con los obtenidos, en el caso de la stevia, la concentración de GAE en miligramos por gramo de extracto en extractos hidroalcohólicos y acuosos son de 61.5 y 56.74 respectivamente, mientras que los resultados obtenidos en este trabajo son aproximadamente un orden más altos (43, 44). En el caso de la kombucha, la bibliografía consultada muestra una concentración de GAE en miligramos por gramo de kombucha son de 0.14, la cuantificación de compuestos fenólicos totales en este trabajo resultó en concentraciones dos órdenes más altas (44). Cabe mencionar que se utilizó el mismo método de cuantificación que en los artículos consultados.



**Figura 7** Cuantificación de polifenoles de muestras obtenidas expresada como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. SG4: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 4 horas a 45 °C, SGE4: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 4 horas a 45 °C, SG72: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente, SGE72: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 72 horas a temperatura ambiente, K: muestra de kombucha a partir de té blanco, KS: muestra de kombucha a partir de té blanco y stevia. Las muestras de stevia poseen niveles de polifenoles muy superiores a las muestras de kombucha.

En el caso de las muestras de stevia, los extractos realizados con la condición 2, es decir, los que fueron incubados 4 horas a 45°C, presentan niveles más altos de compuestos

fenólicos que los extractos realizados utilizando la condición 1. Este resultado es coherente con los barridos espectrofotométricos, aunque en la cuantificación de polifenoles la diferencia entre ambas condiciones de extracción es muy pequeña, los barridos muestran diferencias mayores, por lo que la diferencia de los picos no parece deberse a la concentración de compuestos fenólicos totales.

Las muestras de kombucha mostraron niveles bajos de compuestos fenólicos, aproximadamente 25 veces menores que los extractos de stevia. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, los niveles cuantificados son mayores que los reportados en bibliografía.

#### 4.2.5. Evaluación de capacidad antioxidante

Se utilizó el método de ABTS para medir la actividad antioxidante de las muestras. Esta propiedad resulta de gran interés, ya que como se mencionó anteriormente, se busca formular un ingrediente bioactivo para productos cosméticos. En cosmética, y en particular en biocosmética, los productos con actividad antioxidante son de gran valor, debido a sus efectos beneficiosos para la piel.

Se realizaron curvas de calibración con ácido ascórbico, que mostraron  $R^2$  mayores a 0.98 (figura 8). No se observa interferencia de las matrices de extracción en las distintas curvas realizadas. Se interpolaron los valores obtenidos de las muestras analizadas con el programa *GraphPad Prism 8.0.2*.

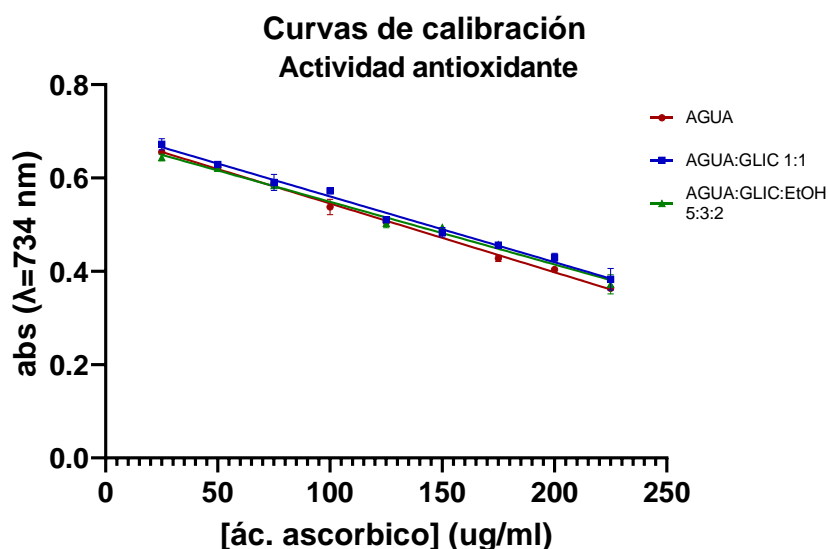
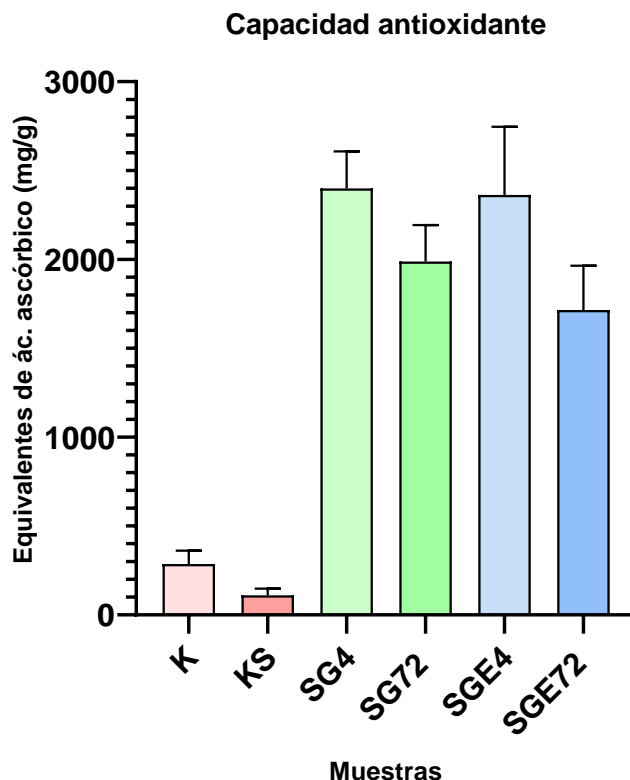


Figura 8 Curvas estándar para cuantificación de la actividad antioxidante obtenidas con el *software GraphPad Prism 8.0.2*. En rojo la curva de calibración utilizando agua como disolvente del ácido ascórbico ( $y=-0,001473x+0,6925$ ). En azul la curva de calibración utilizando agua y glicerol en partes iguales como disolventes del ácido ascórbico ( $y=-0,001409x+0,7012$ ). En verde la curva de calibración utilizando agua:glicerol:etanol en proporción de 5:3:2 como disolventes del ácido ascórbico ( $y=-0,001342x+0,6831$ ).

Los resultados obtenidos para las muestras son comparables a los obtenidos en la cuantificación de compuestos fenólicos totales, ya que las muestras de stevia tienen una actividad antioxidante significativamente mayor que las muestras de kombucha. Existen artículos en los que se observa el mismo comportamiento, tal como se esperaba, se observó una relación entre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante (9).



**Figura 9** Cuantificación de actividad antioxidante de las muestras obtenidas expresada como miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra. SG4: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 4 horas a 45 °C, SGE4: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 4 horas a 45 °C, SG72: muestra de stevia extraída con agua y glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente, SGE72: muestra de stevia extraída con agua, glicerol y etanol durante 72 horas a temperatura ambiente, K: muestra de kombucha a partir de té blanco, KS: muestra de kombucha a partir de té blanco y stevia. Las muestras de stevia poseen niveles de actividad antioxidante superiores a las muestras de kombucha.

En los resultados obtenidos en la cuantificación de compuestos fenólicos totales se observó que las muestras de stevia extraídas con etanol contenían mayores niveles de polifenoles (figura 7), sin embargo, los resultados del ensayo de ABTS (figura 9) indicaron que las muestras con mayor actividad antioxidante son las muestras SG4 y SGE4, es decir, que las muestras con mayor actividad son aquellas incubadas 4 horas a 45°C. Las muestras de stevia incubadas 72 horas a temperatura ambiente arrojaron diferencias, mostrando mayor actividad las muestras extraídas con agua:glicerol en partes iguales.

Con las muestras de kombucha también se observaron diferencias, la kombucha obtenida de la fermentación de infusiones de té blanco como sustrato únicamente tuvo más del doble de la actividad que mostró la que utilizó té blanco y stevia como sustrato de fermentación.

Tabla 5. Tabla comparativa de cantidades promedio de polifenoles vs promedios de actividad antioxidante

<b>Muestra</b>	<b>Polifenoles (mg/g)</b>	<b>Actividad antioxidante (equivalentes de ác. Ascórbico/mL)</b>
<b>SG4</b>	627,43 ± 25,97	2399,83 ± 208,71
<b>SGE4</b>	686,25 ± 25,15	2361,47 ± 383,74
<b>SG72</b>	511,53 ± 46,47	1988,13 ± 204,98
<b>SGE72</b>	563,93 ± 13,68	1713,85 ± 249,85
<b>K</b>	20,12 ± 0,79	286,62 ± 75,18
<b>KS</b>	25,91 ± 2,59	110,36 ± 37,26

Los resultados obtenidos son alentadores para la formulación de un ingrediente cosmético con características bioactivas. La capacidad antioxidante, vinculada a la inactivación de radicales libres, está relacionada con la concentración de polifenoles en las muestras. Se pueden observar en la tabla 5 los resultados de la cuantificación de polifenoles junto a los de actividad antioxidante. Los polifenoles muestran además capacidad antienvjecimiento, dada por la prevención de senescencia celular, señalización antioxidante, promoción de la actividad mitocondrial, entre otras (45).

La utilización de estos extractos en productos de uso tópico-dérmico puede considerarse de carácter cosmeceútico. Esto quiere decir que, se le aporta a un cosmético características terapéuticas (46). Distintos extractos botánicos ricos en polifenoles y otros compuestos naturales son considerados cosmeceúticos debido a sus características, la formulación de estos se ha visto aumentada con en los últimos años (47).

### **4.3. Caracterización de SCOBY**

El cultivo *starter* o SCOBY, tal como se mencionó anteriormente, es una comunidad microbiana, compuesta por distintas bacterias y levaduras que fermentan ciertos azúcares presentes en el té, y generan metabolitos que aportan distintas propiedades con potencial bioactivo a la kombucha.

#### **4.3.1. Procesamiento de SCOBY**

El cultivo *starter* fue procesado correctamente, si bien no se logró disgregar en totalidad el SCOBY, se rompieron fibras del *biofilm* celulósico, obteniendo así un líquido con gran

turbidez. Esta turbidez indica que se obtuvieron células en suspensión, cumpliéndose así el objetivo de esta técnica.

#### **4.3.2. Identificación macroscópica y aislamiento de colonias**

Las placas de las diluciones sembradas fueron analizadas macroscópicamente, identificando así las distintas morfologías, colores y texturas de las colonias crecidas. De esta manera se pudo realizar una primera clasificación de las colonias obtenidas. Las placas de medio TSA fueron las que más crecimiento presentaron, se identificaron en ellas 11 tipos de bacterias. En las placas de medio MRS se observó poco crecimiento bacteriano, las colonias obtenidas presentaron características muy similares, sin embargo, se logró identificar 2 tipos de colonias que presentaban diferencias en tamaño, lo que indicaba distintas velocidades de crecimiento en las condiciones de incubación.

Por otra parte, en las placas de medio YPD se identificaron 4 tipos de colonias de levaduras distintas.

Se observaron diferencias en los tipos de colonias bacterianas obtenidos para cada dilución sembrada, esto evidencia que, de no haberse realizado cultivos de distintas diluciones, podría haberse apantallado la presencia de algunas colonias bacterianas obtenidas en los cultivos con muestras más diluidas.

Se realizó un cultivo puro por duplicado de estos microorganismos identificados, se utilizaron los mismos medios de cultivo de la parte anterior teniendo en cuenta la naturaleza de cada microorganismo. Esto permitió aislar a los distintos tipos de bacterias y levaduras, obteniendo así placas de cultivos puros, que fueron de gran utilidad para realizar los siguientes ensayos. Cabe destacar que la morfología observada se mantuvo en los cultivos puros.

En resumen, se obtuvieron 13 tipos de colonias de bacterias y 4 tipos de colonias de levaduras presuntamente distintas. Para poder obtener más información sobre la identidad de estos microorganismos es necesario realizar otras pruebas como pueden ser identificación con pruebas microbiológicas o identificación molecular con técnicas de secuenciación (48).

#### **4.3.3. Pruebas microbiológicas**

Se realizaron pruebas bioquímicas a las bacterias aisladas anteriormente con el objetivo de obtener información sobre ellas. Estas pruebas permiten conocer características importantes como lo son la composición de su envoltura celular, y la expresión o no por parte de las bacterias de dos enzimas.

Tal como se menciona en el apartado 3.4.4, se realizó una tinción de Gram, esta técnica microbiológica es ampliamente utilizada debido a su sencillez y eficacia, se basa en la

diferencia en la composición de la envoltura celular de las bacterias. Estas se clasifican como Gram positivo o Gram negativo, la principal diferencia entre ambas es el grosor de la capa de peptidoglicano que las recubre, en las bacterias Gram positivo esta capa es mayor que en las Gram negativo, lo que permite diferenciar ambos tipos según el colorante que adquieran. En las tablas 6 y 7 pueden observarse los resultados obtenidos durante la observación macroscópica, así como en las pruebas microbiológicas.

Tabla 6. Análisis macroscópico de bacterias.

N° DE COLONIA	CANTIDAD DE COLONIAS	COLORACIÓN	FORMA Y TEXTURA
1	2	Anaranjado	Uniforme brillante
2	1	Amarillo	Rugosa mate
3	1	Rosa	Uniforme brillante
4	1	Amarillo +	Uniforme brillante
5	3	Blanco	Uniforme brillante
6	4	Rosa tenue	Uniforme brillante
7	2	Blanco traslúcido	Uniforme mate
8	12	Amarillo	Uniforme mate
9	19	Amarillo	Uniforme mate
10	22	Amarillo ++	Uniforme mate
12	1	Blanco	Uniforme brillante
A1	5	Blanco	Uniforme brillante
A2	3	Blanco	Uniforme brillante

Se identificaron cocos y bacilos, de los cuales algunos de ellos presentaron resultado Gram positivo, mientras que otros Gram negativo. Además, por otro lado, se evaluó la expresión de dos enzimas por parte de las bacterias. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Once bacterias dieron resultado positivo al *test* de catalasa, mientras que las dos restantes arrojaron resultados negativos. El *test* de oxidasa no fue válido ya que los controles positivos para la presencia de oxidasa realizados no arrojaron resultados coherentes, esto indica que el reactivo utilizado no funcionó correctamente. Los resultados de secuenciación son necesarios para corroborar el resultado de estos ensayos.

#### 4.3.4. Caracterización de cultivo starter con técnicas moleculares

##### 4.3.4.1. Extracción de ADN y PCR tiempo final.

A partir de los cultivos puros en medio sólido se hicieron repiques en medio líquido, estos se centrifugaron para la obtención de *pellets* celulares. Posteriormente se realizó la

extracción de ADN de cada uno para luego amplificar por PCR la región 16s o ITS dependiendo del caso. En la figura 10 se observan los resultados de PCR visualizados en un gel de agarosa. Se obtuvieron bandas del tamaño esperado para las regiones amplificadas, además, se observó que las bandas correspondientes a las muestras tienen el mismo tamaño en pb que los controles positivos realizados. No se observó presencia de bandas en los controles negativos de ambas PCR, validando de esta manera los resultados obtenidos. Esto demostró que tanto la extracción de ADN como la PCR fueron exitosas, permitiendo obtener las regiones 16s e ITS amplificadas correctamente.

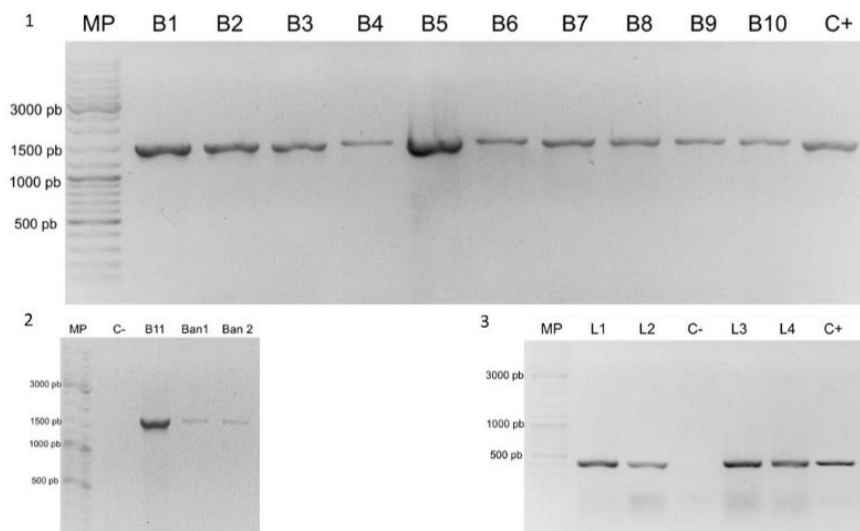


Figura 10 Geles de agarosa con resultados de PCR. (1) De izquierda a derecha: -Carril 1: marcador de peso molecular. -Carril 2: bacteria 1, -Carril 3: bacteria 2, -Carril 4: bacteria 3, -Carril 5: bacteria 4, -Carril 6: bacteria 5, -Carril 7: bacteria 6, -Carril 8: bacteria 7, -Carril 9: bacteria 8, -Carril 10: bacteria 9, -Carril 11: bacteria 10, -Carril 12: control positivo de amplificación (ARNr 16s). (2) De izquierda a derecha: -Carril 1: marcador de peso molecular. -Carril 2: control negativo de amplificación, -Carril 3: bacteria 11, -Carril 4: bacteria anaerobia 1, -Carril 5: bacteria anaerobia 2. (3) De izquierda a derecha: -Carril 1: marcador de peso molecular. -Carril 2: levadura 1, -Carril 3: levadura 2, -Carril 4: control negativo de amplificación, -Carril 5: levadura 3, -Carril 6: levadura 4, -Carril 7: control positivo de amplificación (ITS).

#### 4.3.4.2. Secuenciación Sanger de regiones 16s e ITS

Tal como se mencionó en la metodología, se contrataron los servicios de la empresa Macrogen Inc. para la secuenciación de las muestras obtenidas por PCR. Se obtuvieron archivos en formato fasta para cada muestra analizada, además del electroferograma correspondiente para cada una. De esta manera fue posible analizar los resultados de secuenciación, a modo de corroborar la relación entre la lectura realizada por el equipo y las señales observadas en el electroferograma, y así depurar los resultados.

#### 4.3.4.3. Identificación por homología de secuencia mediante BLASTn

La herramienta BLASTn de NCBI permitió identificar qué microorganismos integraron el SCOBY utilizado para los cultivos de kombucha. Se obtuvieron valores de homología

mayores a 97% en todos los casos, esto refleja la similitud entre la secuencia *query* y la secuencia consenso reportada para cada microorganismo identificado. Luego de analizados los resultados de BLASTn se observó que colonias catalogadas como diferentes en primera instancia, resultaron ser la misma especie. Los resultados de secuenciación obtenidos no concuerdan con lo reportado en bibliografía sobre las bacterias que conforman el SCOPY (49). La variación de las bacterias identificadas respecto a las reportadas en bibliografía podría deberse a diferencias entre los distintos consorcios de kombucha o por contaminaciones adquiridas durante la manipulación, sin embargo, los cultivos realizados mostraron un aspecto saludable, acorde a un cultivo típico de kombucha.

Tabla 7. resultados de BLASTn, tinción de Gram y test de catalasa.

Muestra	Identidad	Porcentaje de homología	Número de acceso	Tinción de Gram (+ ó -)	Prueba de catalasa
B1	<i>Dermacoccus profundus</i>	99.83%	<a href="#">NR_043262.1</a>	Cocos +	+
B2	<i>Kytococcus sedentarius</i>	99.65%	<a href="#">NR_074714.2</a>	Cocos +	+
B3	<i>Roseomonas mucosa</i>	99.91%	<a href="#">NR_028857.1</a>	Cocos -	+
B4	<i>Micrococcus aloeverae</i>	97.23%	<a href="#">NR_134088.1</a>	Cocos +	+
B5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.18%	<a href="#">NR_036904.1</a>	Cocos +	+
B6	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i>	99.54%	<a href="#">NR_025643.1</a>	Cocos +	+
B7	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	99.72%	<a href="#">NR_027616.1</a>	Bacteria filamentosa +	+
B8	<i>Micrococcus aloeverae</i>	99.90%	<a href="#">NR_134088.1</a>	Cocos +	+
B9	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.66%	<a href="#">NR_116578.1</a>	Cocos +	+
B10	<i>Micrococcus aloeverae</i>	96.97%	<a href="#">NR_134088.1</a>	Cocos +	+
B11	<i>Staphylococcus caprae</i>	99.90%	<a href="#">NR_024665.1</a>	Cocos -	+
BAN1	<i>Ralstonia pickettii</i>	99.66%	<a href="#">NR_043152.1</a>	Bacilos +	-
BAN2	<i>Ralstonia pickettii</i>	99.72%	<a href="#">NR_043152.1</a>	Bacilos +	-
L1	<i>Pichia kluyveri</i>	97.87%	<a href="#">NR_138210.1</a>	N/A	N/A
L2	<i>Saccharomyces mikatae</i>	98%	<a href="#">NR_111354.1</a>	N/A	N/A
L4	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	97.98%	<a href="#">NR_165974.1</a>	N/A	N/A
L5	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	97.82%	<a href="#">NR_165974.1</a>	N/A	N/A

Por otra parte, en distintos artículos fueron descritos los mismos géneros de levaduras identificadas en este trabajo, como lo son *Pichia*, *Saccharomyces* y *Brettanomyces* (50–52).

Entre las levaduras identificadas se encuentra *Brettanomyces bruxellensis*, que aporta el sabor característico de la kombucha, además favorece la producción por parte de bacterias ácido acéticas y de ácido glucorónico, compuestos que posee propiedades desintoxicantes (53). Adicionalmente, *Saccharomyces mikatae* es una levadura fermentadora de glucosa, sacarosa y otros azúcares, se reportó su presencia en la industria del vino, aportando metabolitos claves que dan sabor al mismo (54). *Pichia kluyveri* es una levadura utilizada para la fermentación de azúcares no reductores, existe una patente en la que se la utiliza para la obtención de una bebida de baja graduación alcohólica con muy buenas propiedades organolépticas (55). La identificación de estas levaduras en el SCOBY de kombucha es de gran importancia, ya que su presencia aporta propiedades benéficas para el producto final.

Tal como se mencionó anteriormente, las bacterias identificadas difieren a lo reportado en bibliografía (49). Algunas de las bacterias identificadas forman parte del microbioma de la piel, entre ellas se encuentran *Dermaococcus*, *Kytococcus*, *Micrococcus* y *S. epidermidis* (56–59). Esta última, se puede encontrar comúnmente en la piel y puede tener muchos efectos beneficiosos, sin embargo, en altas cantidades puede producir infecciones (60). Por otra parte, algunas de las bacterias identificadas forman parte del ambiente, como por ejemplo *Roseomonas*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Ralstonia pickettii*, entre otras (58, 61–64). Debido a esto, la presencia de dichas bacterias en el SCOBY puede deberse a que forman parte del consorcio original o debido a contaminaciones adquiridas durante las distintas etapas del trabajo, ya sea en el momento de la inoculación de las infusiones, remoción del SCOBY al finalizar la fermentación, durante el procesamiento en *Stomacher*, plaqueo de las diluciones realizadas, o durante la extracción y amplificación de ADN.

## **4.5. Evaluación de actividad antimicrobiana**

### **4.5.1. Evaluación de capacidad antimicrobiana en medio sólido**

Este ensayo tuvo como objetivo evaluar si las muestras obtenidas tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de distintas bacterias. Se realizaron cultivos sólidos en placas de Petri con *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* y *P. aeruginosa*. Tal como se puede ver en la figura 11, no se observaron halos de inhibición de crecimiento, por lo tanto, las muestras no mostraron capacidad antimicrobiana en este ensayo. Esto puede deberse a que la concentración de compuestos antibacterianos en los extractos crudos no fue suficiente para dar un resultado positivo de inhibición en el ensayo de difusión en medio sólido. Se

descartan contaminaciones en las muestras ya que se observa un crecimiento bacteriano homogéneo.

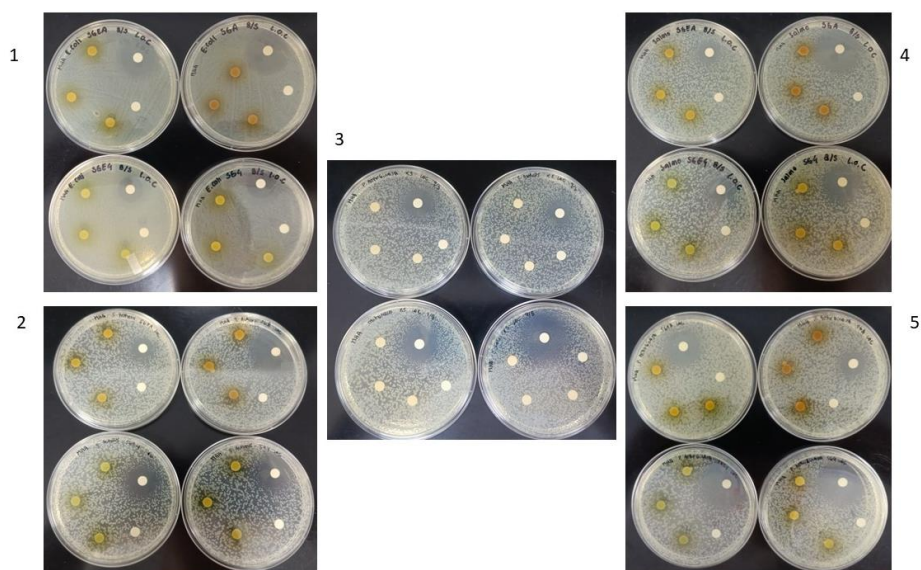


Figura 11. Placas de agar con discos conteniendo las muestras a analizar. (1) Placas de *E. coli* frente a muestras de stevia. (2) Placas de *S. aureus* frente a muestras de stevia. (3) Placas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella spp* frente a muestras de kombucha. (4) Placas de *Salmonella spp* frente a muestras de stevia. (5) Placas de *P. aeruginosa* frente a muestras de stevia.

El control negativo no mostró capacidad antibacteriana, por lo que se descarta un efecto de la matriz de extracción en el crecimiento bacteriano. El control positivo de inhibición funcionó correctamente, ya que se observan halos de inhibición alrededor de los discos correspondientes. En resumen, las muestras no arrojaron resultados alentadores para la inhibición de crecimiento bacteriano, por este motivo se plantea la realización de ensayos de inhibición de crecimiento en medio líquido para evaluar la capacidad antimicrobiana.

#### 4.5.2. Ensayo de inhibición de crecimiento en medio líquido

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de las muestras, se decidió formular una nueva muestra con posible efecto antimicrobiano formada por SGE4 y KS en relación 1:1.

Esta prueba fue de utilidad para evaluar el comportamiento de cada microorganismo en las condiciones ensayadas. Las diluciones ensayadas de la muestra no consiguieron inhibir el crecimiento de los microorganismos evaluados. Sólo se pudo validar el ensayo de *Candida albicans*, ya que en el resto se observó crecimiento bacteriano en alguno de los controles negativos, lo que indica contaminación.

En las curvas de crecimiento de la figura 12, tanto como en las anexadas en la sección 7.2.2 se pudo observar que las curvas correspondientes a las diluciones de la muestra se encontraron en su mayoría por encima de la curva de crecimiento control. A partir de

estos resultados se llegó a la conclusión de que la muestra en las diluciones ensayadas tiene un efecto prebiótico, opuesto al comportamiento esperado. Este efecto puede deberse a que la concentración de saponinas y polifenoles no fue suficiente para inhibir el crecimiento, y éste pudo beneficiarse con la presencia de azúcares en las muestras, que pudieron ser fuentes de carbono para los microorganismos evaluados.

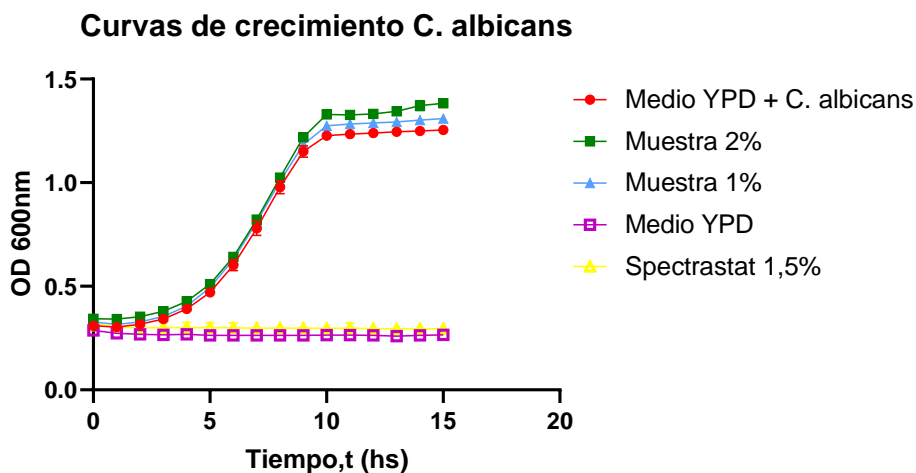


Figura 12 Curvas de crecimiento de *Cándida albicans* en medio YPD a 37 °C. Rojo: control positivo de crecimiento de *Candida albicans*. Verde: crecimiento de la levadura con el agregado de muestra al 2%. Azul: crecimiento de la levadura con el agregado de muestra al 1%. Violeta: control negativo de crecimiento, medio YPD sin *Cándida albicans*. Amarillo: control negativo de crecimiento, *Cándida albicans* en YPD con Spectrastat 1,5%

Para poder obtener resultados aceptables es necesario volver a realizar el ensayo hasta conseguir resultados válidos. Para ello se puede seguir utilizando la misma metodología o se pueden realizar ajustes para evitar posibles contaminaciones. Otra posibilidad puede ser realizar cultivos separados en matraces o tubos, y registrar la OD<sub>600</sub> periódicamente.

Luego de repetir estos ensayos, es posible que el efecto prebiótico por parte de la muestra se mantenga, lo cual puede ser beneficioso para su utilización como activo biocosmético. Este efecto prebiótico junto a la capacidad antioxidante de las muestras puede representar características atractivas para la formulación de un producto de aplicación tópica dérmica, ya que puede ser útil para balancear el microbioma de la piel, evitando disbiosis. Para evaluar esto se deberían realizar ensayos con bacterias reportadas en la composición del microbioma natural de la piel.

Por otra parte, cabe destacar que estas muestras poseen propiedades antioxidantes, por lo que pueden agregarse a formulaciones biocosméticas en concentraciones mayores a las ensayadas en este experimento, por lo que sería interesante repetir este ensayo con muestras menos diluidas.

#### 4.6. Liofilización de extractos

Una vez transcurridas las 48 horas de liofilización no se obtuvo la muestra en estado sólido en forma de polvo, sino que se llegó a un líquido viscoso. Esto puede atribuirse a la presencia de 15% de glicerol en la muestra, lo que impidió llegar a un sólido, tal como se esperaba. El porcentaje de liofilización fue de 67%, calculado como:

$$\text{porcentaje de liofilización} = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} * 100$$

Para evaluar el efecto del glicerol en la muestra conformada por SGE4 y KS en partes iguales se evaluó la liofilización de cada una de las muestras por separado. En los resultados se obtuvo que la muestra SGE4 tuvo un porcentaje de liofilización de 63%, levemente menor a la muestra evaluada (SGE4:KS en proporción 1:1). Mientras que KS tuvo un porcentaje de liofilización de 88%. Si bien los porcentajes de liofilización podrían aumentar alargando el tiempo de operación, se observa claramente que la muestra de kombucha se liofiliza en mayor cantidad, evidenciando que el glicerol tiene un efecto negativo en la liofilización.

## 5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se puede concluir que se comprobó la presencia de polifenoles y saponinas en las muestras de kombucha y extractos de stevia con los que se trabajó. Además, se concluye que estos compuestos son de gran importancia para la industria biocosmética.

Si bien en las muestras de kombucha se cuantificaron los distintos compuestos de interés, lo que es coherente con lo reportado en bibliografía, sus niveles son menores que en las muestras de stevia. Esto posiciona a los extractos de stevia como las muestras más prometedoras para su aplicación en productos antioxidantes, ya que según los resultados de la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu, estos son los más ricos en polifenoles.

En cuanto a la metodología realizada, se concluye que las estrategias de extracción de los compuestos de interés fueron eficaces, logrando obtener un protocolo que permite revalorizar un desecho de la industria del biodiesel como lo es el glicerol. El proceso de sonicación no aportó ventajas frente al aumento en la temperatura de extracción, siendo ésta un factor clave para la extracción de compuestos fenólicos.

La utilización de un 20% de etanol como solvente de extracción resultó en un aumento en la concentración de saponinas frente a los extractos que fueron obtenidos utilizando únicamente agua y glicerol.

Los *screenings* realizados permitieron conocer la composición de las muestras de manera rápida y sencilla, constituyen técnicas de bajo costo que son de gran utilidad para realizar una caracterización preliminar de extractos botánicos. La información proporcionada por los mismos se puede utilizar como guía para tomar decisiones en cuanto a los procesos de extracción.

Los ensayos colorimétricos son técnicas confiables, que permitieron cuantificar la presencia de los compuestos de interés en cada muestra. Tanto el método de vainillina-sulfúrico, como el método que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron de gran utilidad, son técnicas ampliamente utilizadas en este tipo de trabajos debido a su reproducibilidad y confiabilidad. De igual manera sucede con el método de ABTS para la cuantificación de actividad antioxidante, arrojó resultados coherentes, permitiendo relacionar la cantidad de polifenoles en las muestras con el potencial de inactivar radicales libres.

Por otro lado, las técnicas microbiológicas y moleculares permitieron la caracterizar el SCOBY de kombucha. Se identificaron 10 bacterias y 3 levaduras. Si bien el reactivo utilizado en el *test* de la enzima oxidasa no funcionó correctamente, se pudo realizar una identificación bacteriana mediante la secuenciación de regiones codificante para ARNr

16s y regiones ITS. Las bacterias identificadas no se correspondieron con las reportadas en bibliografía, lo que puede indicar que se pudieron adquirir contaminaciones a lo largo del proceso.

Los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana de las muestras no arrojaron resultados positivos para la inhibición del crecimiento con las diluciones ensayadas, ya que las cepas evaluadas mostraron resistencia. Es necesario evaluar a las muestras concentraciones mayores para de esta manera confirmar o descartar su comportamiento antimicrobiano. Los resultados obtenidos en medio líquido no fueron válidos debido que se registró crecimiento en los controles negativos, sin embargo, arrojaron la posibilidad de la utilización de la muestra como bioactivo cosmético con propiedades probióticas.

En conclusión, la metodología diseñada fue de utilidad tanto para lograr extractos ricos en polifenoles y saponinas, como para corroborar la actividad antioxidante reportada por parte de los extractos. Se plantea como perspectivas a futuro la realización de pruebas que permitan evaluar la aplicación de estos extractos en productos postbióticos cosmeceúticos debido a su bioactividad. Estas pruebas pueden ser: ensayos de de inhibición de crecimiento en medio líquido con bacterias presentes naturalmente en la piel, evaluación de actividad antiinflamatoria, así como también evaluar posibles efectos citotóxicos en células humanas, que impidan la aplicación de estos extractos botánicos en formulaciones biocosméticas.

## 6. Referencias bibliográficas

- (1) Goyal N, Jerold F. Biocosmetics: technological advances and future outlook. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023;30(10):25148–25169.
- (2) Teresa M. *Cosmética natural y ecológica*. OFFARM Ámbito cosmético. VOL 27. España; 2008.
- (3) Mosquera T. *La investigación en la cosmética natural*. Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana. 2015; 978-9978-10-230-5
- (4) BBC Research. *Bio-based Products in the Cosmetics Industry: Global Markets*. BBC Publishing. 2022 Nov.
- (5) Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*. 2009;50(1):14–34.
- (6) Nastasi JR, Daygon VD, Kontogiorgos V, Fitzgerald MA. Qualitative Analysis of Polyphenols in Glycerol Plant Extracts Using Untargeted Metabolomics. *Metabolites*. 2023;13(4).
- (7) Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Rojas P, Stucken K, Delporte C, Valenzuela-Barra G, Jagus R, Agüero M, Pasten A. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential of *Stevia rebaudiana* leaves: effect of different drying methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018;11:37–46.
- (8) Zaidan U, Mohamad N, Amran N, Shamsi S, Gani S. Biochemical evaluation of phenolic compounds and steviol glycoside from *Stevia rebaudiana* extracts associated with in vitro antidiabetic potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;18.
- (9) Myint K zar, Wu K, Xia Y, Fan Y, Shen J, Zhang P, Gu J. Polyphenols from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves and their functional properties. *Journal of Food Science*. 2020;85(2):240–248.
- (10) Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Renard T, Rollan S, Taillandier P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive

compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*. 2019;83:44–54.

(11) Nyhan L, Lynch K, Sahin A, Arendt E. Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*. 2022;2(1):73–101.

(12) Jayabalan R, Malbaša R V., Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(4):538–550.

(13) Gülhan MF. A New Substrate and Nitrogen Source for Traditional Kombucha Beverage: *Stevia rebaudiana* Leaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2023;195(7):4096–4115.

(14) Doğan C, Doğan N. Kombucha Beverage: Comparative Study Based on Bioactive Properties and Antimicrobial Potentials of Different Plant Infusion. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*. 2022

(15) Ferreira M, Magalhães M, Oliveira R, Sousa-Lobo J, Almeida I. Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics. *Molecules*. 2021;26(12).

(16) Ziemlewska A, Nizioł-Łukaszewska Z, Zagórska-Dziok M, Bujak T, Wójciak M, Sowa I. Evaluation of Cosmetic and Dermatological Properties of Kombucha-Fermented Berry Leaf Extracts Considered to Be By-Products. *Molecules*. 2022;27(7).

(17) Rezaldi F, Desmak Pertiwi F, Hidayanto F. Potensi Buah Nanas Madu Subang (*Ananas comasus*) sebagai Antibakteri Gram Positif Negatif Melalui Metode Bioteknologi Fermentasi Kombucha Berdasarkan Konsentrasi Gula Aren Berbeda. *The Tropical Journal of Biopharmaceutical*. 2022(2):119–126.

(18) Eun Lee K, Bharadwaj S, Yadava U, Gu Kang S. Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and in vitro approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2019;34(1):927–936.

- (19) Koh L, Ong R, Common J. Skin microbiome of atopic dermatitis. *Allergology International*. 2022;71(1):31–39.
- (20) da Silva Vale A, de Melo G, de Oliveira A, de Carvalho D, Herrmann L, Karp S, Soccol V, Soccol C. Production, Formulation, and Application of Postbiotics in the Treatment of Skin Conditions. *Fermentation*. 2023;9(3).
- (21) Hebert P, Cywinska A, Ball S, DeWaard J. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003;270(1512):313–321.
- (22) Kress W, Erickson D. DNA barcodes: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2012;858:3–8.
- (23) del Rosario M, Mendoza M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;22(4):238–245.
- (24) Baker G, Smith J, Cowan D. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;55(3):541–555.
- (25) Al-Abedy A. Morphological and molecular identification of *Cladosporium sphaerospermum* isolates collected from tomato plant residues. *Brazilian Journal of Biology*. 2022.
- (26) Janitz M. Next-generation genome sequencing: towards personalized medicine. Wiley-VCH; 2008.
- (27) Kapoor R, B Singh A, Misra R. Green Cosmetics - Changing Young Consumer Preference and Reforming Cosmetic Industry. *International Journal of Recent Technology and Engineering*. 2019;8(4):12932–12939.
- (28) Portilla A. Extracción y cuantificación de saponinas de amole (*Sicyos deppei* G.) para la elaboración de jabón ecológico. [Tesis de grado] México: BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA; 2014.

- (29) Mora-Ocación M, Morillo A, Manjarres EH. Extraction and Quantification of Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Genotypes from Colombia. *International Journal of Food Science*. 2022.
- (30) Le A, E. Parks S, H. Nguyen M, D. Roach P. Improving the Vanillin-Sulphuric Acid Method for Quantifying Total Saponins. *Technologies*. 2018;6(3):84.
- (31) Smolskait L, Venskutonis P, Talou T. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT*. 2015;60(1):462–471.
- (32) Miller' N, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan' V, Milner' A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. 1993.
- (33) Góral I, Wojciechowski K. Surface activity and foaming properties of saponin-rich plants extracts. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020;279.
- (34) Miyashita M, Akamatsu M, Sakai K, Sakai H. Improving foam stability of ethanol/water mixture with anionic surfactant and long-chain alcohol. *Chemistry Letters*. 2020;49(5):453–456.
- (35) Tadhani M, Subhash R. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. *J. Med Sci.*, 6 (3): 321-326
- (36) Sharma P, Singh V, Maurya S, Kamal MA, Poddar N. Antimicrobial and Antifungal Properties of Leaves to Root Extracts and Saponin Fractions of *Chlorophytum borivilianum*. *Current Bioactive Compounds*. 2020;17(6).
- (37) Lim A, Haji Manaf N, Tennakoon K, Chandrakanthi R, Lim L, Bandara J, Ekanayake P. Higher performance of DSSC with dyes from *Cladophora* sp. As mixed cosensitizer through synergistic effect. *Journal of Biophysics*. 2015;2015.
- (38) Nguang SL, Yeong YL, Pang SF, Gimbin J. Optimisation of Gallic Acid and Quercetin Extraction from *Phyllanthus Niruri*. 2018.

- (39) Opriş O, Lung I, Soran M, Stegarescu A, Cesco T, Ghendov-Mosanu A, Podea P, Sturza R. Efficient Extraction of Total Polyphenols from Apple and Investigation of Its SPF Properties. *Molecules*. 2022;27(5).
- (40) Gafner S, Blumenthal M, Foster S, Cardellina JH, Khan IA, Upton R. Botanical Ingredient Forensics: Detection of Attempts to Deceive Commonly Used Analytical Methods for Authenticating Herbal Dietary and Food Ingredients and Supplements. *Journal of Natural Products*. 2023;86(2):460–472.
- (41) Yu XL, He Y. Optimization of tea-leaf saponins water extraction and relationships between their contents and tea (*Camellia sinensis*) tree varieties. *Food Science and Nutrition*. 2018;6(6):1734–1740.
- (42) Gunsha L. Elaboración de un emulsionante cosmético a base de las saponinas del agua de lavado de quinua (*Chenopodium quinoa*) en erpe. [Tesis de grado] Ecuador: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO; 2013.
- (43) Shukla S, Mehta A, Mehta P, Bajpai VK. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012;64(7–8):807–811.
- (44) La Torre C, Fazio A, Caputo P, Plastina P, Caroleo MC, Cannataro R, Cione E. Effects of long-term storage on radical scavenging properties and phenolic content of kombucha from black tea. *Molecules*. 2021;26(18).
- (45) Luo J, Si H, Jia Z, Liu D. Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. *Antioxidants*. 2021;10(2):1–20.
- (46) Kligman D. Cosmeceuticals. *DERMATOLOGIC ASPECTS OF COSMETICS. DERMATOLOGIC CLINICS VOL. 18*. 2000;10
- (47) Taofiq O, González-Paramás A, Barreiro M, Ferreira ICFR, McPhee D. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules*. 2017;22(2).

- (48) Prescott L. M., Harley J. P. *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5ta edición. Editorial McGraw-Hill. 2002.
- (49) Kaashyap M, Cohen M, Mantri N. Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients*. 2021;13(12).
- (50) Maysers' P, Fromme' S, Leitzmann' C, Grunder' K. The yeast spectrum of the "tea fungus Kornbucha" Das Hefespektrum des "Teepilzes Kombucha." 1995.
- (51) Teoh AL, Heard G, Cox J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;95(2):119–126.
- (52) Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*. 2014;38:171–178.
- (53) Maciuca OM, Sánchez-Juanes F, Menéndez E. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en bebidas probióticas: el caso de la kombucha. *FarmaJournal*. 2022;7(2):29–39.
- (54) Bellon J, Schmidt S, Solomon M. Desarrollo de levaduras híbridas *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces mikatae* y su potencial para producir estilos alternativos de vino. Australian Wine Research Institute; 2023.
- (55) Barrera J, Cordon J, Coronel A, Fernández C, Santos C. **CEPA DE PICHIA KLUYVERI Y SUS APLICACIONES**. España: OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS, 2013.
- (56) Clingerman E, Mathews K, Youker R. **ISOLATION OF NOVEL SPECIES FROM THE GENUS DERMACOCCUS BY PHENOTYPIC AND PHYLOGENETIC ANALYSES**. 2019.
- (57) Veintimilla C, Valerio M, Mornese S, Machado M, Rincón C, Martínez-Sellés M, Pinilla B, Delgado A, García-Leoni ME, Muñoz P. Experiencia clínica del uso de

dalbavancina en endocarditis infecciosa (EI). *Cirugía Cardiovascular*. 2020;27(4):164–165.

(58) Huang CH, Wang CL, Liou JS, Lee AY, Blom J, Huang L, Watanabe K. Reclassification of *Micrococcus aloeverae* and *Micrococcus yunnanensis* as later heterotypic synonyms of *Micrococcus luteus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(11):3512–3518.

(59) Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, Boettcher P. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *Journal of Dairy Science*. 2005;88(5):1694–1704.

(60) Cau L, Williams MR, Butcher AM, Nakatsuji T, Kavanaugh JS, Cheng JY, Shafiq F, Higbee K, Hata TR, Horswill AR, et al. *Staphylococcus epidermidis* protease EcpA can be a deleterious component of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021;147(3):955-966.e16.

(61) Katsunori Fa, Hiroshi M, Keiichi G, Yuko K, Motonobu H, Masafumi F. *Roseomonas stagni* sp. nov., isolated from pond water in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 167–171 (2008)

(62) Khattab AI, Babiker EH, Saeed HA. *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2016;5(3):27–32.

(63) Coenye T, Goris J, De Vos P, Vandamme P, LiPuma JJ. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(4):1075–1080.

(64) Yoon JH, Lee KC, Weiss N, Kang KH, Park YH. *Jeotgalicoccus halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Jeotgalicoccus psychrophilus* sp. nov., isolated from the traditional Korean fermented seafood jeotgal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(2):595–602.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo 1

#### 7.1.1. Tabla 8. Resultados test de afrosimétrico.

	Tiempo, t (minutos)			
Muestra	0	2	10	20
SG4	1,5	0,6	0,4	0,2
SGE4	1,1	0,6	0,4	0,3
SG72	2,4	1,5	1,0	0,7
SGE72	1,7	1,1	0,7	0,4
K	0,4	0,4	0,2	0,1
KS	1,7	0,6	0,4	0,1

## **7.2. Anexo 2**

### **7.2.1. Protocolo de extracción de ADN genómico.**

1. Tomar el tubo con el pellet celular y agregar 700  $\mu$ l de Buffer CTAB precalentado a 65°C. Pipetear varias veces (15 a 20) hasta que se forme una suspensión homogénea e incubar a 65°C 30-45 min.)
2. En campana: agregar 600 $\mu$ l de cloroformo y agitar
3. Centrifugar a velocidad máxima por 15 minutos
4. En campana; remover la fase acuosa superior (conteniendo el ADN), aproximadamente 400 $\mu$ l y colocarla en un tubo limpio rotulado
5. Agregar 400 $\mu$ l de de isopropanol frío para precipitar el ADN. Invertir el tubo 2 o 3 veces. Incubar por 20 minutos en el freezer a -20°C
6. Centrifugar a máxima velocidad 10 minutos
7. Remover el sobrenadante y lavar con 600  $\mu$ l de etanol 70%
8. Centrifugar a máxima velocidad 10 min.
9. Remover cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente o en estufa a 37°C aprox. 10 min.
10. Resuspender el pellet en 100 $\mu$ l de agua MilliQ estéril libre de DNasa.

## 7.2.2. Curvas de crecimiento microbiano.

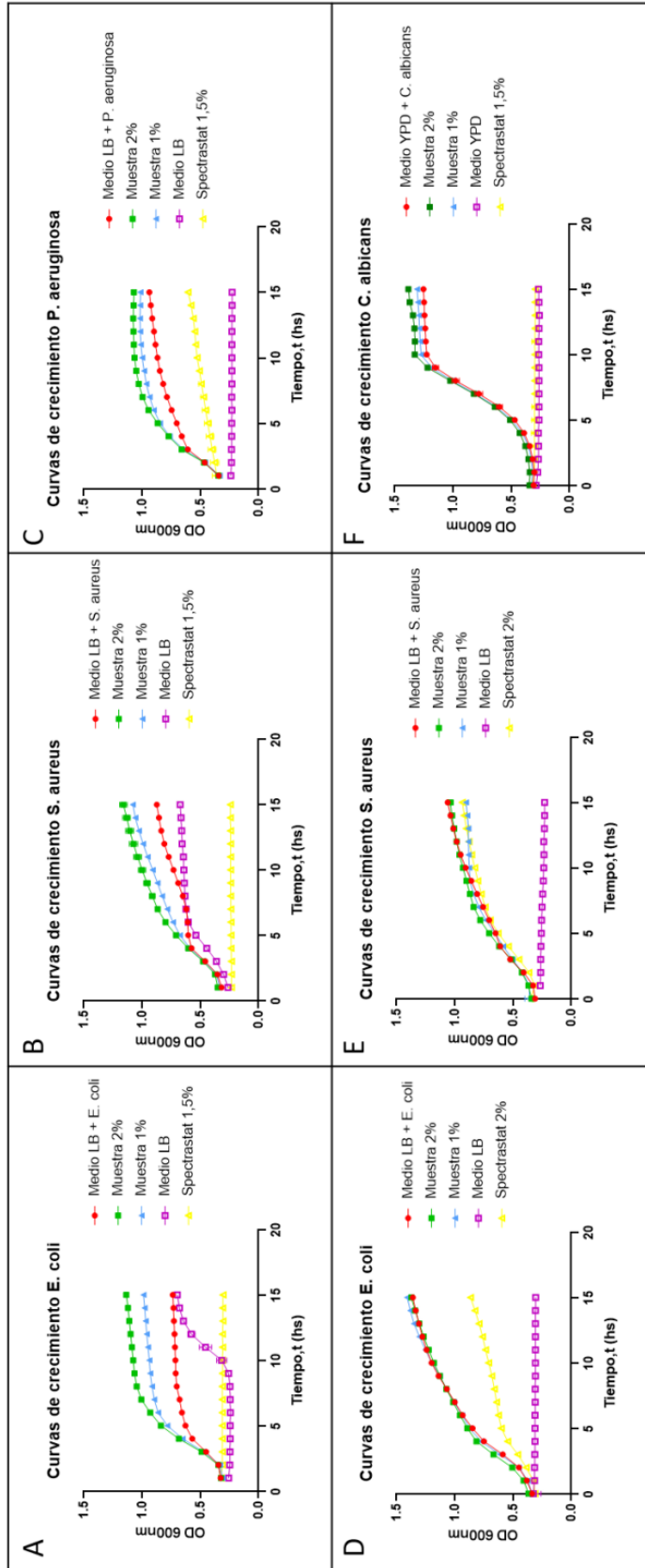


Figura 13. Curvas de crecimiento microbiano. (A) Curvas de crecimiento de *E. coli*. (B) Curvas de crecimiento de *S. aureus*. (C) Curvas de crecimiento de *P. aeruginosa*. (D) Repetición de curvas de crecimiento de *E. coli*. (E) Repetición de curvas de crecimiento de *S. aureus*. (F) Curvas de crecimiento de *C. albicans*. Rojo: control positivo de crecimiento (medio de cultivo + microorganismo). Verde: muestra al 2% (medio de cultivo + microorganismo + muestra al 2%). Azul: muestra al 1% (medio de cultivo + microorganismo + muestra al 1%). Violeta: control negativo de crecimiento (medio de cultivo sin microorganismo). Amarillo: control negativo de crecimiento (microorganismos con el agregado de un inhibidor de crecimiento).