



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS**



**DETERMINACIÓN DEL MICROBIOMA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  
DE UNA INFUSIÓN FERMENTADA A PARTIR DE CASCARILLA DE  
CACAO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA**

**PRESENTA  
Q.F.B SEBASTIÁN CERVERA PEREYRA**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE  
DR. JOSÉ ARNOLD GONZÁLEZ GARRIDO (UJAT-DACB)**

**EN CODIRECCIÓN  
DR. CARLOS JAVIER LÓPEZ VICTORIO (UJAT-DACB)**

CUNDUACÁN, TABASCO. A: 31 DE MAYO 2026

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## II. DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE ORIGINALIDAD

En la Ciudad de Cunduacán, Tabasco, el día 02 del mes Febrero del año 2026, el que suscribe Sebastián Cervera Pereyra egresado del Programa de Maestría en Ciencias en Química Aplicada con número de matrícula 232A27001, adscrito a la División Académica de Ciencias Básicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la Tesis presentada para la obtención del grado de Maestro y titulada **“Determinación de microbioma y actividad antioxidante de una infusión fermentada a partir de cascarilla de cacao”** dirigida por el Dr. José Arnold González Garrido y el Dr. Carlos Javier López Victorio.

### DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente

Villahermosa, Tabasco a 09 de febrero de 2026.



Q.F.B Sebastián Cervera Pereyra

### III. AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN



División  
Académica  
de Ciencias  
Básicas



#### DIRECCIÓN

Cunduacán; Tabasco a 15 de abril de 2026

**Q.F.B. SEBASTIÁN CERVERA PEREYRA**  
**EGRESADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**EN QUÍMICA APLICADA**  
**PRESENTE**

Por medio de la presente y de la manera más atenta, me dirijo a Usted para informarle que se le **AUTORIZA** la impresión del trabajo de Tesis titulada **"DETERMINACIÓN DEL MICROBIOMA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UNA INFUSIÓN FERMENTADA A PARTIR DE CASCARILLA DE CACAO"** bajo la Dirección del Dr. José Arnold González Garrido y Dr. Carlos Javier López Victorio de la DACB.

La Comisión revisora conformada por la Dra. Patricia Mendoza Lorenzo, Dr. Carlos Javier López Victorio, Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, M.C. Daniel Alejandro Vázquez Cahuich y Dr. Cuauhtémoc Alvarado Sánchez aprobó el documento en virtud de reunir los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Química Aplicada** bajo la modalidad de titulación por Tesis.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL**  
**DIRECTORA**



C.C.P.- Archivo.

Dir'Dra.HPV/JP'LAR/jkal\*\*

Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.  
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6702,6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

#### IV. CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS

Villahermosa, Tabasco a 09 de febrero de 2026.

Por medio de la presente se manifiesta la colaboración como autor Q.F.B Sebastián Cervera Pereyra, director Dr. José Arnold Gonzalez Garrido y codirector Carlos Javier López Victorio en la producción, creación y/o realización de la obra denominada **“Determinación del microbioma y actividad antioxidante de una infusión fermentada a partir de cascarilla de cacao”**.

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

#### COLABORADORES



Q.F.B Sebastián Cervera Pereyra



Dr. José Arnold González Garrido



Dr. Carlos Javier López Victorio

#### TESTIGOS



Q.F.B Diana Cristel Jerónimo Contreras



Q.F.B Hannia Esmeralda Pereyra Gutiérrez

## V. CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo de grado, por Defensa de Tesis, denominado **“DETERMINACIÓN DEL MICROBIOMA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UNA INFUSIÓN A PARTIR DE CASCARILLA DE CACAO”**, del cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco del Trabajo antes mencionado, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación del Trabajo mencionado y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, a los 10 días del mes de Mayo del año 2026.

**AUTORIZÓ**



Sebastián Cervera Pereyra

Egresado de la Maestria en Ciencias en Química Aplicada

Matrícula: 232A27001

## **VI. AGRADECIMIENTOS**

Con especial agradecimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI-México) por el financiamiento de la Beca de Maestría.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## VII. ÍNDICE DE CONTENIDO

|         |                                                                                                       |      |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| II.     | DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE ORIGINALIDAD.....                                                           | I    |
| III.    | AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN .....                                                                       | II   |
| IV.     | CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS .....                                                                     | III  |
| V.      | CARTA DE AUTORIZACIÓN.....                                                                            | IV   |
| VI.     | AGRADECIMIENTOS.....                                                                                  | V    |
| VII.    | ÍNDICE DE CONTENIDO.....                                                                              | VI   |
| VIII.   | ÍNDICE DE TABLAS.....                                                                                 | IX   |
| IX.     | ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                               | X    |
| X.      | TÍTULO .....                                                                                          | XI   |
| XI.     | RESUMEN .....                                                                                         | XII  |
| XII.    | ABSTRACT .....                                                                                        | XIII |
| XIII.   | Palabras claves .....                                                                                 | XIV  |
| XIV.    | INTRODUCCIÓN .....                                                                                    | 1    |
| XV.     | MARCO TEÓRICO .....                                                                                   | 2    |
| XV.I    | Obesidad.....                                                                                         | 2    |
| XV.II   | Diagnóstico de la obesidad.....                                                                       | 2    |
| XV.III  | Tipos de tejido adiposo .....                                                                         | 3    |
| XV.IV   | La obesidad y su asociación con inflamación.....                                                      | 4    |
| XV.V    | Obesidad e hipertensión .....                                                                         | 6    |
| XV.VI   | Microbiota intestinal, estado de eubiosis-disbiosis y su asociación con enfermedades metabólicas..... | 6    |
| XV.VII  | Tratamiento terapéutico de la disbiosis intestinal .....                                              | 8    |
| XV.VIII | Microbioma.....                                                                                       | 8    |
| XV.IX   | Probióticos .....                                                                                     | 8    |
| XV.X    | Prebióticos .....                                                                                     | 8    |
| XV.XI   | Simbióticos.....                                                                                      | 9    |
| XV.XII  | Postbióticos.....                                                                                     | 9    |
| XV.XIII | Alimentos funcionales.....                                                                            | 10   |



|               |                                                                                                                                        |           |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| XV.XIV        | Composición y actividad metabólica del SCOBY.....                                                                                      | 12        |
| XV.XV         | Capacidad antioxidante de los polifenoles y flavonoides.....                                                                           | 14        |
| XV.XVI        | Polifenoles y flavonoides de la cascarilla de semilla de cacao (CSC).....                                                              | 15        |
| <b>XVI.</b>   | <b>JUSTIFICACIÓN.....</b>                                                                                                              | <b>17</b> |
| <b>XVII.</b>  | <b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>                                                                                                 | <b>18</b> |
| <b>XVIII.</b> | <b>HIPÓTESIS .....</b>                                                                                                                 | <b>18</b> |
| <b>XIX.</b>   | <b>OBJETIVO GENERAL .....</b>                                                                                                          | <b>18</b> |
| <b>XX.</b>    | <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>                                                                                                      | <b>18</b> |
| <b>XXI.</b>   | <b>METODOLOGÍA.....</b>                                                                                                                | <b>19</b> |
| XXI.I         | Tipo de investigación .....                                                                                                            | 19        |
| XXI.II        | Materiales.....                                                                                                                        | 19        |
| XXI.II.I      | Material vegetal .....                                                                                                                 | 19        |
| XXI.II.II     | Consortio microbiano .....                                                                                                             | 19        |
| XXI.II.III    | Material Químico .....                                                                                                                 | 19        |
| XXI.III       | Preparación del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao y fermento de té negro. ....                                    | 20        |
| XXI.IV        | Obtención de las muestras .....                                                                                                        | 20        |
| XXI.IV.I      | Muestras para análisis fisicoquímico y de actividad antioxidante .....                                                                 | 20        |
| XXI.IV.II     | Muestras para Análisis Metagenómico.....                                                                                               | 20        |
| XXI.V         | Diseño experimental .....                                                                                                              | 20        |
| XXI.VI        | Determinación de Metales pesados (As, Cu, Pb y Cd) en la Cascarilla de Semilla de Cacao.....                                           | 22        |
| XXI.VII       | Determinación de pH .....                                                                                                              | 22        |
| XXI.VIII      | Determinación de Acidez Total .....                                                                                                    | 22        |
| XXI.IX        | Determinación del Contenido Total de Azúcares .....                                                                                    | 23        |
| XXI.X         | Cuantificación del Contenido Total de Azúcares Reductores .....                                                                        | 23        |
| XXI.XI        | Determinación de Porcentaje de Alcohol.....                                                                                            | 24        |
| XXI.XII       | Determinación del Contenido Total de Polifenoles .....                                                                                 | 24        |
| XXI.XIII      | Determinación del Contenido Total de Flavonoides.....                                                                                  | 24        |
| XXI.XIV       | Determinación de la Actividad Antioxidante a través del método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)<br>25                              | 25        |
| XXI.XV        | Determinación de la Capacidad Antioxidante a través del método 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-<br>6-ácido sulfónico) (ABTS) ..... | 25        |
| XXI.XVI       | Determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) del liofilizado de la fase líquida del<br>fermento de infusión de CSC. .... | 26        |
| XXI.XVII      | Caracterización del microbioma de una bebida fermentada a partir de cascarilla de semilla de cacao<br>26                               | 26        |
| XXI.XVII.I    | Extracción ADN genómico .....                                                                                                          | 27        |

|              |                                                                                                                                    |           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| XXI.XVII.II  | Preparación de las bibliotecas, secuenciación de amplicones gen ARNr 16s y de la región<br>secuencia transcrita interna (ITS)..... | 27        |
| XXI.XVII.III | Análisis Bioinformático.....                                                                                                       | 28        |
| XXI.XVIII    | Análisis estadístico.....                                                                                                          | 28        |
| XXII.        | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                                                                                 | <b>29</b> |
| XXIII.       | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>                                                                                         | <b>41</b> |
| XXIV.        | <b>REFERENCIAS CITADAS.....</b>                                                                                                    | <b>42</b> |
| XXV.         | <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                                 | <b>54</b> |
| XXV.I        | CURVAS DE CALIBRACIÓN.....                                                                                                         | 54        |
| XXV.II       | ALOJAMIENTO DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....                                                                       | 56        |

## VIII. ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Descripción de las variables del diseño experimental.....                                                                                                       | 21 |
| <b>Tabla 2.</b> Perfil nutricional.....                                                                                                                                         | 29 |
| <b>Tabla 3.</b> Contenido de metales pesados en la cascarilla de semilla de cacao .....                                                                                         | 30 |
| <b>Tabla 4.</b> Cambios en el pH, acidez titulable, contenido de azúcares totales, contenido azúcares reductores y contenido de alcohol durante el proceso de fermentación..... | 31 |
| <b>Tabla 5.</b> Contenido total de polifenoles, flavonoides y potencial antioxidante de las bebidas fermentadas .....                                                           | 33 |
| <b>Tabla 6.</b> Clasificación taxonómica de hongos y bacterias en las bebidas fermentadas                                                                                       | 36 |

## IX. ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Categorización de la obesidad de acuerdo al Índice de Masa Corporal .....                             | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Cambios del tejido adiposo en la obesidad .....                                                       | 5  |
| <b>Figura 3.</b> Sitios de acción de los flavonoides que interactúan con los radicales libres. 15                      |    |
| <b>Figura 4.</b> Cascarilla de Semilla de Cacao (CSC), un subproducto agroindustrial .....                             | 16 |
| <b>Figura 5.</b> Curva concentración-respuesta del liofilizado de la fase líquida del fermento de infusión de CSC..... | 36 |
| <b>Figura 6.</b> Contenido Total de Azúcares Reductores.....                                                           | 54 |
| <b>Figura 7.</b> Contenido Total de Polifenoles.....                                                                   | 54 |
| <b>Figura 8.</b> Contenido Total de Flavonoides.....                                                                   | 55 |
| <b>Figura 9.</b> Capacidad Antioxidante por el Método ABTS .....                                                       | 55 |

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**X. TÍTULO**

**DETERMINACIÓN DEL MICROBIOMA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  
DE UNA INFUSIÓN FERMENTADA A PARTIR DE CASCARILLA DE  
DE CACAO**

## XI. RESUMEN

En la industria del cacao solo se aprovecha aproximadamente el 20 %, esto ha conducido a buscar alternativas para el aprovechamiento de los subproductos, estos representan aproximadamente el 80 % del fruto que poseen propiedades beneficiosas para la salud. Este trabajo tuvo como objetivo elaborar y caracterizar una bebida funcional a partir del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao (CSC). Al analizar el contenido de metales pesados con el fin de evaluar la seguridad del sustrato, los resultados indican que no se detectaron niveles de arsénico, plomo ni cadmio en el sustrato de CSC; sin embargo, se identificó la presencia de cobre dentro de los límites permisibles (<15 mg/kg), esto significa, el sustrato no representa riesgo para la salud. Los resultados muestran que la fermentación en el día seis presenta la mayor actividad y capacidad antioxidante, esto se ha asociado al contenido de polifenoles y flavonoides totales, asimismo la secuenciación metagenómica de la región intersecuencia ITS y del gen ARNr 16s, identificó y determinó la abundancia de microorganismos con potencial probiótico como los géneros de hongos *Brettanomyces* (75.15 %) y *Pichia* (15.96 %), y los géneros de bacterias fueron *Acetobacter* (13.28 %), *Komagataeibacter* (5.21 %), lo que permite posicionar este fermento como una bebida funcional. En este sentido, el consumo del fermento de infusión de cascarilla de semilla cacao tiene beneficios para la salud, además de contribuir disminuyendo el impacto de desechos agroindustriales. Cabe destacar que se identificó *Sphingobium* (0.78 %) un género bacteriano que no ha sido reportado antes en estos fermentos.

## XII. ABSTRACT

In the cocoa industry, only about 20% is used, which has encouraged the development of other options for the revaluation of by-products, which constitute about 80% of the fruit and exhibit beneficial health properties. This study aimed to produce and characterize a functional beverage from the fermentation of cocoa bean shell (CBS) infusion. When analyzing the heavy metal content to assess the safety of the substrate, the results indicate that no levels of arsenic, lead, or cadmium were detected in the CBS substrate; however, the presence of copper was identified within the permissible limits ( $<15$  mg/kg), therefore the substrate does not pose a health risk. The results show that fermentation on day six presents the highest antioxidant activity and capacity, which is linked to the total content of polyphenols and flavonoids. Likewise, metagenomic sequencing of the ITS interspace region and the 16S rRNA gene identified and determined the abundance of microorganisms with probiotic potential, such as the fungal genera *Brettanomyces* (75.15%) and *Pichia* (15.96%), and the bacterial genera *Acetobacter* (13.28%) and *Komagataeibacter* (5.21%), which allows this ferment to be positioned as a functional beverage. In this sense, the consumption of cocoa bean shell infusion ferment has health benefits, in addition to contributing to reducing the impact of agro-industrial waste. It should be noted that *Sphingobium* (0.78%), a bacterial genus that has not been reported before in these ferments, was identified.

### **XIII. Palabras claves**

Actividad antioxidante, Subproducto del cacao, Bebida funcional, Metagenómica, Probióticos

### **Keywords**

Antioxidant activity, Cocoa by-products, Functional beverage, Metagenomics, Probiotics



#### **XIV. INTRODUCCIÓN**

La búsqueda de estrategias de producción sostenibles que beneficien la salud y el medio ambiente es una prioridad mundial. Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) 2.1 y 3.4 de la Asamblea General de las Naciones Unidas (ONU) proponen reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles (ENT). El desarrollo de estas enfermedades está influenciado por la urbanización, el uso de antibióticos, los alimentos y bebidas altamente procesados y las desigualdades socioeconómicas (Max & Mashauri, 2024). Un cambio en la diversidad microbiana en las ENT es un requisito previo para el desarrollo de un estado de disbiosis en el microbiota intestinal humana (Logan et al., 2016), es decir, una disminución de la diversidad y abundancia microbiana (Al Bander et al., 2020; Hrnčir, 2022).

La presencia de ciertas bacterias se asocia con moléculas inflamatorias que interfieren en la simbiosis (Tilg et al., 2020). Las afecciones inflamatorias se asocian con la obesidad, la aterosclerosis, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la enfermedad inflamatoria intestinal (Bandopadhyay & Ganguly, 2022; Singh et al., 2021). Diversas bacterias pueden desencadenar una cascada de vías inflamatorias en las que intervienen interleucinas y otras citocinas (Belizário & Faintuch, 2018). Sin embargo, esto puede modificarse o mejorarse mediante el consumo de alimentos ricos en probióticos que restauran el estado de eubiosis (Filidou et al., 2024; Mayorgas et al., 2021).

Además de contener nutrientes, las bebidas fermentadas contienen sustancias o microorganismos vivos con efectos biológicos beneficiosos para la salud y la prevención de enfermedades (Temple, 2022). Los fermentos son una fuente de probióticos, como en el caso del fermento del té negro, cuyo consumo se asocia con efectos terapéuticos (Selvaraj and Gurumurthy, 2024). Otros té, infusiones y sustratos han utilizado el cultivo iniciador de este fermento de té negro mejorando su potencial probiótico, como en el caso del té verde (Cardoso et al., 2020), infusiones de hierbas, la especie vegetal *Malvaviscus arboreus* (Silva et al., 2021), la soja y la leche de soja (Kanurić et al., 2018; Tu et al., 2019) y el zumo de uva roja (Ayed et al., 2017). En este estudio, se desarrolló un fermento utilizando un residuo agroindustrial de la industria del chocolate y un SCOBY utilizado en la fermentación del té negro. Además, se lleva a cabo una caracterización

fisicoquímica y microbiológica del fermento, junto con una evaluación de su actividad antioxidante.

## **XV. MARCO TEÓRICO**

### **XV.I Obesidad**

En las últimas cuatro décadas se ha triplicado la obesidad a nivel mundial y continúa aumentando en muchas partes del mundo. De acuerdo con el Atlas Mundial de Obesidad en 2023 se reportaron 890 millones de obesos adultos con una prevalencia en el mundo de 16%, se estima que esta cifra aumente a 25% para 2035 (WOA, World Obesity Atlas, 2023). La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud ("OMS," 2024). Lo anterior debido principalmente a un desbalance entre el consumo calórico y el gasto energético.

### **XV.II Diagnóstico de la obesidad.**

El Índice de Masa Corporal (IMC) es un método de evaluación fácil y económico para el diagnóstico de obesidad: se calcula dividiendo el peso en kilogramos (kg) entre la estatura en metros al cuadrado ( $m^2$ ); es decir,  $\text{peso (kg)}/\text{estatura (m}^2\text{)}$  ("OMS," 2024). Este índice es un marcador indirecto de la grasa, y existen mediciones adicionales, como el perímetro de la cintura, que pueden ayudar a diagnosticar la obesidad (Rivera Dommarco, 2018). Además, a nivel mundial el IMC esta herramienta permite la detección y monitoreo de la prevalencia de la obesidad, debido a que es igual para ambos sexos y para los adultos de todas las edades (Wilding & Ralston, 2022). La OMS clasifica a los pacientes adultos de acuerdo al IMC, es decir,  $\text{IMC} < 18.5 \text{ kg/m}^2$ , bajo peso;  $\text{IMC } 18.5 \text{ a } 24.9 \text{ kg/m}^2$ , normopeso;  $\text{IMC } 25.0 \text{ a } 29.9 \text{ kg/m}^2$ , sobrepeso;  $\text{IMC } 30.0 \text{ a } 34.9 \text{ kg/m}^2$ , obesidad Clase I;  $\text{IMC } 35.0 \text{ a } 39.9 \text{ kg/m}^2$ , obesidad Clase II; y  $\text{IMC} > 40.0 \text{ kg/m}^2$ , Obesity Clase III (Weir & Jan, 2021).

El IMC de  $30 \text{ kg/m}^2$  es el punto de corte para la obesidad, que se ha asociado con comorbilidades (Konstantinidi & Koutelidakis, 2019), principalmente debido a un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, dislipidemia, enfermedad cardiovascular (ECV) y algunos tipos de cáncer (Iacobini et al., 2019).

**Figura 1.** Categorización de la obesidad de acuerdo al Índice de Masa Corporal.



*Nota.* La imagen representa el IMC, una razón numérica que se calcula con base al peso y la estatura de las personas para conocer si el peso de una persona es el adecuado, esto de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), recuperado de (Soto Ramírez & Pérez Bravo, 2011)

### **XV.III Tipos de tejido adiposo**

En la obesidad, la distribución de la grasa corporal es un factor determinante en el desarrollo de los efectos perjudiciales del exceso de adiposidad. Cuando la ingesta energética es mayor de lo necesario, se almacena en forma de grasa y glucógeno dentro tejido adiposo subcutáneo (TAS) y en los órganos. El tejido adiposo visceral (TAV) está fuertemente asociado con la insulinoresistencia, la dislipidemia y la tensión arterial alta, independientemente del (TAS) y el IMC. Clásicamente, existen dos tipos de tejido adiposo, el blanco y el marrón, que difieren en morfología y función (Saxton et al., 2019). El tejido adiposo blanco (TAB) se distribuye ampliamente por todo el cuerpo humano, es endocrinamente activo, proporciona almacenamiento de energía en forma de lípidos y soporte mecánico para órganos y músculos circundantes, mientras que el tejido adiposo

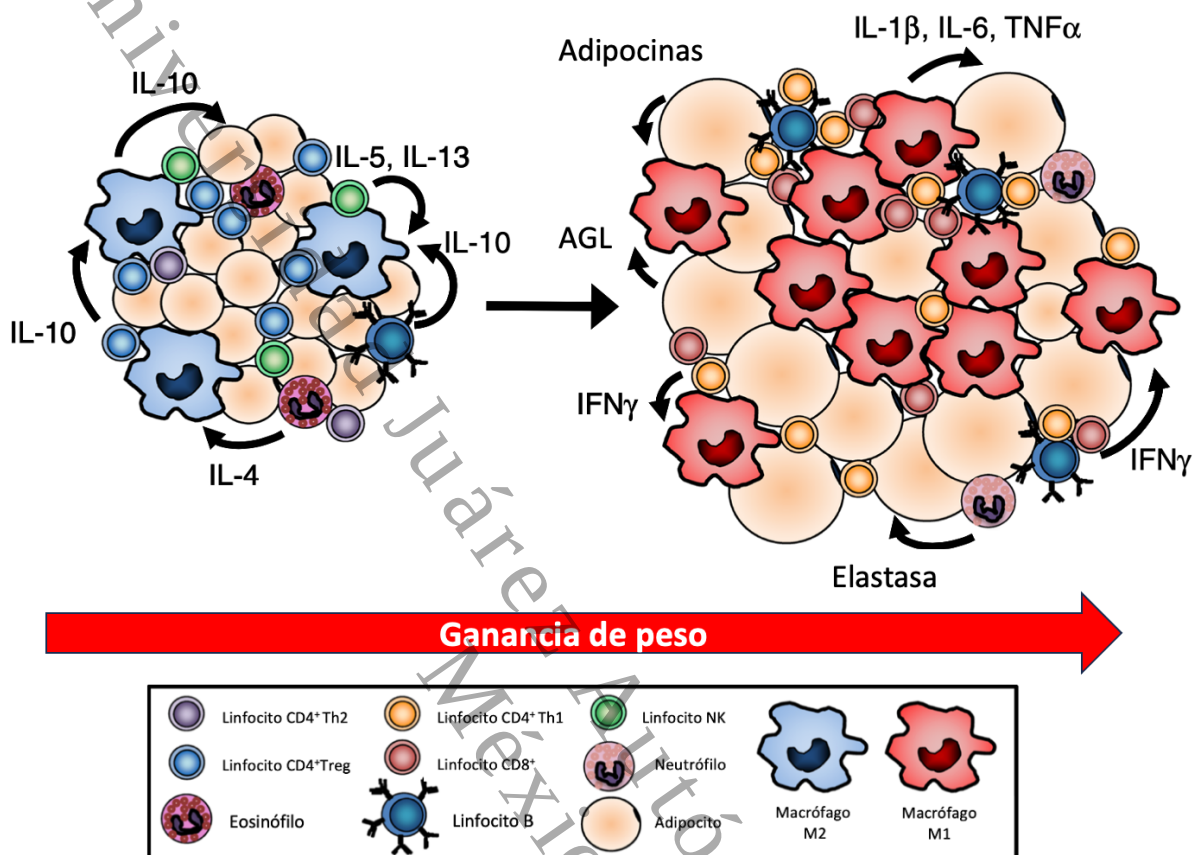
marrón (TAM) produce calor tras la estimulación  $\beta$ -adrenérgica o la exposición al frío, un proceso conocido como termogénesis adaptativa (Busebee et al., 2023).

#### **XV.IV La obesidad y su asociación con inflamación**

El exceso de acumulación de grasa conduce a hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, que se caracteriza por la aparición de adipocitos disfuncionales inflamados junto con la infiltración de células inmunes en la fracción vascular del estroma. De hecho, algunos estudios han sugerido que el tamaño de los adipocitos, en lugar del número, es un fuerte predictor de disfunción metabólica. En este sentido, los adipocitos inflamados secretan citocinas proinflamatorias, tanto locales como sistémicamente, que a su vez interrumpen la función normal del microambiente circundante y de los órganos remotos. Desde este punto de vista, el tejido adiposo puede considerarse un órgano inmune y secretor, y la obesidad como una enfermedad inmune inflamatoria (Kawai et al., 2021).

Una característica única de las respuestas de la expansión de TAB es una inflamación crónica de bajo grado que se asocia con la obesidad y alteraciones en el metabolismo, actualmente se ha denominado "metainflamación". En los seres humanos, el TAB se puede clasificar en dos depósitos principales: el TAV y el TAS. Sin embargo, cada uno tiene perfiles secretores únicos. De hecho, el TAV contiene más macrófagos infiltrados en comparación con TAS en ratones y humanos obesos. Debido a lo anterior, el TAV expresa mayores niveles de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-6 (IL-6), mientras que la secreción de las adipocinas leptina y adiponectina es mayor en los depósitos de TAS, por lo que TAV experimenta un grado mucho más alto de hipertrofia que en TAS, esto se ha descrito en humanos y en modelos animales. Además, la expresión de varios receptores como la angiotensina II (ANG II) y los  $\beta$ -adrenoceptores son mayores en el TAV. Es probable que estas diferencias expliquen las variaciones en la función endocrina y el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad (Jin et al., 2023).

**Figura 2.** Cambios del tejido adiposo en la obesidad



*Nota.* Consecuencias endocrino-metabólicas de la inflamación del tejido adiposo debido a factores relacionados al estilo de vida, mala alimentación y sedentarismo, esto induce a la hipertrofia del tejido adiposo y la infiltración de células inmunes productoras de citocinas proinflamatorias. Adaptado de (Revelo et al., 2014).

El Atlas de la Federación Internacional de Diabetes en 2021 ("IDFA, International Diabetes Federation Atlas," 2021), reporta que sin contar los riesgos de mortalidad asociados a la pandemia de COVID-19, se estima que aproximadamente 6,7 millones de adultos de entre 20 y 79 años murieron como resultado de la diabetes o sus complicaciones en 2021. Esto equivale al 12.2% del total muertes a nivel mundial para este grupo de edad. La obesidad, en particular cuando se asocia a una mayor distribución de la grasa abdominal e intraabdominal y a un mayor contenido de triglicéridos intrahepáticos e intramusculares, es un factor de riesgo importante para la prediabetes y DM2, ya que causa resistencia a la insulina y disfunción de las células  $\beta$  (Klein et al.,

2022). Una serie de estudios realizados en modelos de ratón y en personas han demostrado alteraciones en la biología del tejido adiposo que vinculan la obesidad con la resistencia a la insulina y la disfunción de las células  $\beta$  (Garvey et al., 2022; Shimobayashi et al., 2018).

#### **XV.V Obesidad e hipertensión**

La Organización Mundial de la Salud define la hipertensión (tensión arterial alta), como un trastorno donde la presión de los vasos sanguíneos es crónicamente alta (de 140/90 mmHg o más). En 2023 se estimó que este padecimiento causa anualmente 7.5 millones de muertes en el mundo y contribuye a 13% de la mortalidad por todas las causas ("OMS," 2023). La hipertensión relacionada con la obesidad se inicia debido a la compresión renal por la grasa perirrenal/sinusal y también mediante la producción de adipocitoquinas como leptina, resistina, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , etc., (Parvanova et al., 2024) que conducen a un estado proinflamatorio, a una sobreestimulación en el Sistema Nervioso Simpático sistémico/renal y a la activación del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, estos factores aumentan la reabsorción renal de sodio y retención de agua lo que resulta en la expansión e hipertensión del volumen intravascular (Mi-Hyang & Sang-Hyun, 2023; Shariq & McKenzie, 2020).

#### **XV.VI Microbiota intestinal, estado de eubiosis-disbiosis y su asociación con enfermedades metabólicas**

Los seres humanos albergan una compleja comunidad microbiana en el tracto gastrointestinal, conocida como microbiota intestinal. Esta comunidad mantiene una relación simbiótica con el hospedador, esta relación se denomina estado de eubiosis y es determinada por el equilibrio entre epitelio intestinal, microbiota intestinal y sistema inmune del huésped. El balance simbiótico entre el microbiota intestinal y el sistema inmune contribuye a mantener la homeostasis no inflamatoria. Este estado de tolerancia inmune se deriva de múltiples mecanismos, como la barrera de moco que minimiza el contacto entre el microbiota intestinal y las células del epitelio intestinal, y la secreción de péptidos antimicrobianos como lisozima, defensinas e inmunoglobulina A (Di Vincenzo et al., 2023). A pesar de la ausencia de inflamación, el sistema inmune modula y ejerce constantemente presión sobre el microbiota intestinal. De hecho, la ausencia de uno de sus componentes, como la inmunoglobulina A, puede conducir al crecimiento

excesivo de las bacterias anaerobias, o componentes del sistema inmunitario innato (Karczewski et al., 2014).

También la microbiota intestinal participa en diversos procesos metabólicos al contribuir enzimas que no están codificadas por el genoma humano (Rowland et al., 2018) que utilizan para la producción del complejo de vitaminas B (biotina, cobalamina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, riboflavina y tiamina), vitamina K, aminoácidos, neurotransmisores (acetilcolina, dopamina, serotonina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico), ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acético, láctico, propionico y butírico, estos últimos además de servir como fuente de energía para la síntesis de moco por parte de las células epiteliales del intestino, crean un ambiente ácido que evita la proliferación de microorganismo patógenos (Rosendo-Silva et al., 2023; Xiao et al., 2021; Zakaria Gomaa, 2020), asimismo el microbiota intestinal humano es un elemento crucial para la digestión, catabolizando polisacáridos, péptidos y, en menor medida, grasas a nutrientes utilizables por el huésped (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019).

Con relación a lo anterior el microbioma se define como el conjunto de genomas que existen en un microbiota (Belizário & Faintuch, 2018). El estudio del microbioma es una herramienta demasiado útil para la identificación y cuantificación de las especies que componen en este caso el microbiota (Milani et al., 2017). Un cambio en la heterogeneidad de géneros que constituyen el microbiota intestinal, conlleva a una transición del estado sano de eubiosis a un estado patológico de disbiosis, ocasionado por diversos factores como mala alimentación, susceptibilidad genética, uso de fármacos (antibióticos), consumo de drogas, estrés, infecciones, consumo de alcohol, contaminación ambiental, entre otros. La disbiosis se ha asociado con el desarrollo o aumento de la gravedad de enfermedades como obesidad, diabetes mellitus tipo 1 y 2 (DM1 y DM2), aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares (ECV), enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) hasta su evolución a esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), enfermedades neurodegenerativas y enfermedad inflamatoria intestinal (Di Vincenzo et al., 2023).

### **XV.VII Tratamiento terapéutico de la disbiosis intestinal.**

Actualmente existen dos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la disbiosis, el enfoque que involucra la administración de probióticos y prebióticos que se comercializan en farmacias. Y por otro lado la terapia que incluye cambios en el estilo de vida, como hacer ejercicio, dormir mejor y una dieta saludable (García Lucas et al., 2021; Santiago P et al., 2015). Sin embargo, una dieta saludable también mantiene un microbiota deseable, esto incluye la ingesta de alimentos prebióticos para sostener un microbiota intestinal sano, que en resumidas palabras son polisacáridos u oligosacáridos no digeribles por el cuerpo humano, pero si por el microbiota, esto propicia el incremento en la diversidad de bacterias beneficiosas y promueve el estado de eubiosis (Gibson et al., 2017).

### **XV.VIII Microbioma**

Se define como el conjunto de genomas (ADN) de los microorganismos (bacterias, hongos arqueas, y virus) que residen en un hábitat en específico incluyendo las condiciones ambientales de un determinado nicho ecológico.

### **XV.IX Probióticos**

Este término se refiere a microorganismos vivos que, cuando se administran en dosis apropiadas, otorgan un beneficio de salud del huésped contribuyendo al equilibrio microbiano intestinal del huésped, por ejemplo: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* AH1206, *Lactobacillus acidophilus* (Sanders et al., 2019). Hasta ahora, los probióticos se han investigado por su capacidad para superar el funcionamiento intestinal, el alivio de la intolerancia a la lactosa, la mejora de la función inmunológica, las acciones anticancerígenas, antidiabéticas, antioxidantes, antienvjecimiento, y antimicrobianas (Nataraj et al., 2020).

### **XV.X Prebióticos**

De acuerdo a la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) los prebióticos hacen referencia a "un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos huésped que confieren un beneficio de salud" (Sanders et al., 2019). Estos son componentes alimenticios no digeribles que contribuyen beneficios al huésped al estimular selectivamente la proliferación y/o actividad de ciertas bacterias en el colon con efecto de mantener el estado de eubiosis y la salud del huésped. Otros compuestos



que no están clasificados como carbohidratos pero que se recomiendan como prebióticos son los flavonoles derivados del cacao. Los prebióticos generalmente no se hidrolizan en el intestino y consisten en bajos grados de polimerización (2-20 unidades) en los que los monómeros son generalmente glucosa, galactosa, fructosa y/o xilosa. Los prebióticos más estudiados incluyen fructooligosacáridos (FOS), isomaltooligosacáridos (IMO) y xilooligosacáridos (XOS) (Kumar Yadav et al., 2022).

Los prebióticos son generalmente ingredientes alimentarios que no solo estimulan la proliferación de microorganismos probióticos yacen en el intestino humano, sino que también estimulan el sistema inmune. Estos microorganismos son capaces de modular la microflora intestinal de forma positiva y reducir las bacterias patógenas que liberan compuestos tóxicos en el intestino humano (Gibson et al., 2017).

#### **XV.XI Simbióticos**

Los simbióticos se refieren a la mezcla de prebióticos y probióticos para la mejora de la salud humana o animal. Recientemente, la ISAAP ha actualizado el concepto de simbióticos catalogándolos en dos tipos, complementarios y sinérgicos. Un simbiótico complementario consiste en un probiótico y un prebiótico que juntos confieren uno o más beneficios para la salud, pero no requieren funciones codependientes. Un simbiótico sinérgico contiene un sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos coadministrados (Kumar Yadav et al., 2022).

#### **XV.XII Postbióticos**

También conocidos como metabióticos, biogénicos o simplemente metabolitos/sobrenadantes libres de células (SFC, supernatant free-cell, hace referencia a metabólicos bacterianos que poseen actividad biológica benéfica para el huésped. Estos son productos o subproductos solubles resultado del metabolismo de bacterias vivas o liberados después de la lisis bacteriana. Dichos metabolitos solubles se han recolectado de varias cepas de bacterias que incluyen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), enzimas, péptidos, ácidos teicoicos, muropéptidos derivados de peptidoglicano, endo y exopolisacáridos, proteínas de la superficie celular, biosurfactantes, vitaminas, aminoácidos plasmalógenos y ácidos orgánicos (Nataraj et al., 2020).

Es por ello, han llamado la atención debido a su clara estructura química, parámetros de dosis seguras, larga vida útil y el contenido de varias moléculas de señalización que pueden tener actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, inmunomoduladoras, antiobesogénicas, antihipertensivas, hipocolesterolémicas, antiproliferativas y antioxidantes (Aguilar-Toalá et al., 2018).

#### **XV.XIII Alimentos funcionales**

Otra alternativa es la ingesta de alimentos funcionales dentro del marco de una buena alimentación. Dentro de este contexto un alimento funcional es un alimento o bebida que además de cumplir con las necesidades nutricionales, también demuestra actividad biológica y puede contener microorganismos (Temple, 2022). En este sentido se ha comprobado que las uvas, cacao, té negro, cúrcuma, ajo, y algunos alimentos y bebidas fermentos son alimentos funcionales (Granato & Barba, 2020). En este proyecto nos enfocaremos en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), este cultivo simbiótico se caracteriza por ser una fuente de probióticos y es utilizado para la elaboración de la bebida hongo del té (Antolak et al., 2021). Además de los probióticos que residen dentro de la bebida de té negro fermentada (Qi Chong & Wen La, 2023), el té negro por sí mismo contiene moléculas bioactivas de naturaleza flavonoide como catequinas (C), epicatequina (EC), epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) (Jayabalan et al., 2014; Villarreal Soto & Beaufort, 2019), que se ha descrito poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, hipocolesterolémica, antihipertensiva, hipoglucemiante, antimicrobiana, y hepatoprotectora (Morales, 2020). También el té negro se considera una forma de té completamente fermentado ya que el proceso de elaboración crea un tamaño de partícula pequeño de las hojas de té y una mayor superficie para la oxidación enzimática de polifenoles y catequinas. Durante la fermentación del té verde a té negro, las quinonas reaccionan con las catequinas lo que lleva a la formación de dímeros y polímeros conocidos como teaflavinas y tearubiginas, que son los principales compuestos de polifenol presentes en el té negro (Cardoso et al., 2020; Kaewkod et al., 2019).

Aunque las levaduras y las bacterias, particularmente las bacterias del ácido acético (BAA), son los microbios más predominantes en SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria

and Yeast), la variación en los recuentos de células microbianas también afecta la cinética de fermentación, esto conduce un cambio en la diversidad de los metabolitos producidos y en los efectos beneficios para la salud de la bebida fermentada de té negro. Debido a lo anterior la calidad, la composición química y los efectos totales de la salud beneficiosos de la bebida fermentada de té negro dependen de varios parámetros de fermentación, como la comunidad microbiana de que constituye SCOBY, tiempo, temperatura de fermentación, y materias primas (Kitwetcharoen et al., 2023). En este sentido el uso de otros sustratos utilizando SCOBY como cultivo iniciador para la fermentación ya ha sido documentado, algunas infusiones herbales han sido utilizadas durante muchos años como bebidas promotoras de la salud, y de acuerdo a informes de literatura, esta actividad promotora se puede mejorar después del proceso de fermentación con SCOBY (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2020). Otros ejemplos incluyen infusiones de hierbas, flores de malva de cera (*Malvaviscus arboreus*), café, hojas de roble, eucalipto, hojas de laurel, jugos de frutas, leche y productos de soja, que han demostrado ser buenas alternativas para la fermentación con SCOBY.

Los sustratos mencionados destacan debido a su composición química rica en moléculas bioactivas, a las cuales se le ha relacionado varios efectos fisiológicos, además de posibles efectos biológicos asociados con actividades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, gastroprotectoras y anticarcinogénicas. De modo que, los estudios para investigar las bebidas fermentadas con SCOBY preparada a partir de diferentes sustratos han sido estimulados, principalmente para desarrollar nuevas bebidas con propiedades más atractivas (Alencar Silva et al., 2021; de Miranda & Fernandes Ruiz, 2022). Sin embargo, otros sustratos con diferentes niveles de nutrientes pueden influir en el crecimiento de diversas especies de microorganismos. Además, la región de origen del SCOBY presenta cambios en la composición microbiana de este modo es importante destacar el impacto de los sustratos y la procedencia del SCOBY en su composición microbiana (Qi Chong & Wen La, 2023). Lo anterior concuerda con lo reportado por otros autores, es decir, la bebida de té negro fermentada de diferentes orígenes demuestra cambios en la actividad antioxidante y concentraciones de polifenoles debido a las

diferencias en el microbioma, temperatura, y tiempo de fermentación (de Oliveira et al., 2022).

#### **XV.XIV Composición y actividad metabólica del SCOBY.**

Estudios previos han indicado que el té negro posee efectos antioxidantes, hipoglucemiantes (Shahbazi & Hashemi Gahrue, 2018), antihipertensivos, hipolipemiantes (Xia & Tan, 2018), antibacterianos, anticancerígenos y antiobesidad, que se atribúan principalmente a sus abundantes polifenoles (She- Ching & Gow-Chin, 2007). El microbiota juega un papel importante en durante la preparación del té negro fermentado, que implica una serie de reacciones que modifican los componentes químicos y, por tanto, afectan el sabor y las bioactividades del té (Hu & Shi, 2022). El fermento de té negro es una bebida ácida, ligeramente dulce y carbonatada proveniente de la fermentación aeróbica generada originalmente a partir de té negro, sacarosa y del SCOBY (Landis & Fogarty, 2022). El fermento del té negro es una combinación de tres tipos de fermentación: alcohólica, láctica y acética, esto debido a la presencia de varias levaduras y bacterias que coexisten en el medio (Villarreal-Soto et al., 2018). Tanto el inóculo inicial como el té en sí contienen bacterias del ácido acético (BAA), levaduras osmófilas y, a veces, bacterias del ácido láctico (BAL) (Laurey & Britton, 2020), estos microorganismos se encuentran insertados en una red de celulosa que constituye la matriz polimérica extracelular (biopelícula) que se encuentra en la interfase líquido-aire (Laavanya & Shirkole, 2021). Se ha descrito que BAA como *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*, también BAL como *Lactobacillus* y *Lactococcus* son los géneros bacterianos dominantes y los géneros de levaduras comúnmente identificadas incluyen *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Kloeckera*, *Saccharomyces* y *Torulaspora* (Villarreal-Soto et al., 2018), del mismo modo se ha demostrado que la bacteria *Komagataeibacter rhaeticus* y la levadura *Brettanomyces bruxellensis* son los microorganismo más comunes en las comunidades del fermento del té negro (Landis & Fogarty, 2022). Durante la fermentación, la sacarosa del medio se hidroliza a monosacáridos de glucosa y fructosa, por la enzima invertasa ( $\beta$ - fructofuranosidasa) de levaduras (de Miranda & Fernandes Ruiz, 2022). Estas sintetizan etanol y dióxido de carbono como metabolitos provenientes de monosacáridos de glucosa y fructosa (Tran et al., 2020). Luego las BAA metabolizan

los productos de descomposición de las invertasas de levadura, incluidas la glucosa, la fructosa y el etanol. Se sabe que las BAA convierten monosacáridos y alcoholes en varios ácidos orgánicos, como los ácidos acético, gálico, succínico y málico (Gomes et al., 2018). Los géneros *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* son bacterias productoras de la celulosa, ácido glucónico y glucurónico mediante una reacción de oxidación con la enzima glucosa deshidrogenasa (Ramachandran & Fontanille, 2006).

En resumen, la producción de ácido acético y etanol regulan el proceso de fermentación. Asimismo, el ácido acético promueve que la levadura produzca etanol, mientras que el etanol estimula el crecimiento y la producción de BAA. Al mismo tiempo, las BAA son responsables de la síntesis de celulosa a partir de glucosa y fructosa, que soporta el SCOBY (Qi Chong & Wen La, 2023). Casi simultáneamente la oxidación enzimática de la D-glucosa en la posición C6 y el grupo aldehído de la  $\beta$ -D-glucosa en la posición C1 mediada por BAA, da como resultado cantidades significativas de ácido glucurónico y D-glucano- $\delta$ -lactona respectivamente. Este último metabolito se hidroliza en ácido glucónico mediante enzimas microbianas (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2020). Además de estos compuestos, el fermento de té negro contiene polifenoles (catequinas, teaflavinas y flavanoles), también ácidos orgánicos o AGCC (p. ej. fólico, láctico, carbónico, oxálico, málico, malónico, tartárico, succínico, pirúvico, ácidos cítrico y úsnico), vitaminas solubles en agua (p. ej., B1, B2, B3, B6, B12 y C), así como vitamina E, enzimas (amilasa e invertasa), aminoácidos, proteínas, purinas y minerales (Kaashyap & Cohen, 2021). En algunas circunstancias, las BAL metabólicamente activas pueden producir una cantidad significativa de ácido láctico. Además de los metabolitos antes mencionados, otra parte de constituyentes químicos presentes en la este fermento provienen del propio sustrato, donde sus estructuras pueden modificarse y transformarse en nuevos componentes durante la fermentación (Qi Chong & Wen La, 2023).

Debido a lo anterior los alimentos fermentados pueden interferir con el microbioma intestinal a través de su propio microbioma, aunque aún no está claro cómo se producen estos cambios o de otro modo mediante los nutrientes presentes en su matriz (Leeuwendaal & Stanton, 2022). Se sabe que las células del colón utilizan los AGCC

producidos como fuente de energía, inclusive la producción de AGCC por bacterias en cualquier nicho aumentará el nivel de acidificación del medio ambiente, inhibiendo la proliferación de bacterias menos tolerantes a los ácidos, lo cual es ventajoso en los intestinos ya que las BAL generalmente inhiben el crecimiento de patógenos a través de este mecanismo (Pessione, 2012). Más importante aún, se ha demostrado que los AGCC estimulan la producción de moco (principalmente compuesto de proteínas mucina) por las células caliciformes epiteliales del huésped que actúa como fuente de energía y lugar de unión para los microbios intestinales (van Paassen & Vincent, 2009). Asimismo, el microbiota intestinal influye en la biodisponibilidad de los polifenoles ingeridos a través de enzimas bacterianas (p. ej., esterazas, desmetilasas), transformándolas en formas capaces de absorberse a través de la pared intestinal (Murota & Nakamura, 2018).

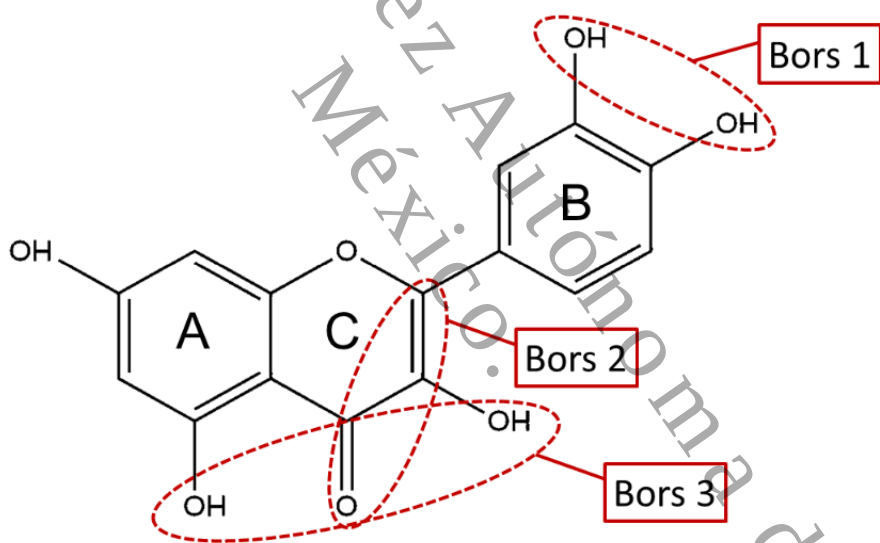
#### **XV.XV Capacidad antioxidante de los polifenoles y flavonoides**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas representan un gran grupo de al menos 10.000 compuestos diferentes que contienen al menos un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo unido. Los polifenoles que se detectan con mayor frecuencia en frutas y verduras son los ácidos fenólicos y los flavonoides (Brglez Mojzer & Knez Hrncić, 2016). Estos flavonoides, estructuralmente están conformados sobre un esqueleto de quince carbonos que consta de dos anillos de carbono aromáticos, benzopirano (anillos A y C) y benceno (anillo B), se subdividen en 13 clases, se identifican de acuerdo el nivel de oxidación y la secuencia de sustitución del anillo C, de manera similar las moléculas particulares de cada clase se identifican en función de la secuencia de sustitución de los anillos A y B; las clases más descritas son antocianidinas, flavonoles, isoflavonas, flavonas, flavanonas y flavanoles. La actividad antioxidante de los flavonoides está determinada en función del patrón de sustitución de los grupos funcionales alrededor de la estructura de la estructura tricíclica (anillos A, B y C) (Kumar & Pandey, 2013). En este sentido, la configuración, sustitución y número total de grupos hidroxilo son factores cruciales en los mecanismos de actividad antioxidante, como la capacidad de eliminación de radicales libres y la aptitud de quelación de cationes metálicos. Se han propuesto tres criterios para explicar el comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos, conocidos como criterios de Bors (Bors et al., 1990). El primero es la presencia de un grupo catecol en el anillo B (Bors 1), que aumenta la

estabilidad del radical antioxidante resultante. El segundo es la presencia de un doble enlace 2,3 combinado con un grupo 4-oxo en el anillo C (Bors 2), que facilita la deslocalización de los electrones. El tercero es la presencia de grupos OH en las posiciones 3 y 5 en combinación con un grupo 4-oxo, que permite la deslocalización de electrones mediante enlaces de hidrógeno (Bors 3). Los tres criterios de Bors se resumen en la *Figura 3* (Platzer et al., 2021).

Su mecanismo de acción consiste en eliminar ERO/ERN (Reactive Oxygen / Reactive Nitrogen Species) provenientes del metabolismo celular y prevenir el daño a moléculas biológicamente relevantes, como el ADN, las proteínas, los lípidos de membrana de las células (Sánchez & Laca, 2023).

**Figura 3.** Sitios de acción de los flavonoides que interactúan con los radicales libres



*Nota.* Relación estructura-actividad de acuerdo a los criterios de Bors. Bors 1: grupo catecol en el anillo B; Bors 2: enlace doble 2,3 y grupo 4-oxo en el anillo C; Bors 3: grupos OH en la posición 3 y grupo 5 OH en los anillos A y C y grupo 4-oxo en el anillo C.

#### **XV.XVI Polifenoles y flavonoides de la cascarrilla de semilla de cacao (CSC)**

Se ha descrito que el cacao se encuentra dentro de los alimentos con mayor cantidad de antioxidantes fenólicos, pero es particularmente rico en flavonoides, específicamente

flavanoles, también llamados flavan-3-oles. Además del grano de cacao, los subproductos del cacao también muestran alto contenido de antioxidantes fenólicos (Katz & Doughty, 2011). Por ejemplo, al comparar las semillas de cacao con la cascarilla de semilla de cacao (CSC), los valores del contenido total de polifenoles (CTP) de CSC son similares a descritos para semillas de cacao que oscilan entre 5,77 y 49,56 mg EAG/g. Con respecto a otros tipos de subproductos del cacao, se ha descubierto que los valores de CTP de las mazorcas de cacao son ligeramente más altos que los de CSC, mientras que los valores de contenido total de flavonoides (CTF) son casi 2 veces mayores en CSC que en las mazorcas de cacao (Rojo-Poveda & Barbosa-Pereira, 2020). Aunado a lo anterior, como resultado de pasos de procesamiento como la fermentación y el tostado, los compuestos fenólicos migran de los cotiledones de las semillas del cacao

**Figura 4.** *Cascarilla de Semilla de Cacao (CSC), un subproducto agroindustrial*

a la CSC, generando CSC enriquecidas con polifenoles (Sánchez & Laca, 2023). Análisis más específicos, como la cromatografía líquida de alta rendimiento (HPLC) combinada con detección ultravioleta o espectrometría de masas, han demostrado que las procianidinas y las catequinas son los principales polifenoles presentes en este subproducto. En particular, (-)-epicatequina es el flavan-3-ol más abundante y comúnmente reportado contenido en CSC, seguido por (+)-catequina y sus dímeros, procianidina B1 (epicatequina-(4 $\beta$   $\rightarrow$  8)-catequina), y procianidina B2 (epicatequina-(4 $\beta$   $\rightarrow$  8)-epicatequina) (Rojo-Poveda & Barbosa-Pereira, 2020). También se han encontrado en el CBS otros polifenoles, como el ácido protocatéquico, la quercetina y sus derivados, el ácido cafeico, los dímeros, trímeros y tetrámeros de procianidina, entre otros (Grillo & Boffa, 2019).





*Nota.*

Esta imagen ejemplifica la parte de *Teobroma cacao* L. utilizada para realizar el fermento de infusión de CSC.

## XVI. JUSTIFICACIÓN

La fermentación es un método antiguo, funcional y económico utilizado para preservar alimentos en todo el mundo, teniendo un papel importante en la sostenibilidad, el aprovechamiento alimentario y en la producción de alimentos funcionales. Asimismo, la Organización de las Naciones Unidas en 2015, planteó en el Objetivo 12 de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible (ODS), garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles, acción clave para mantener los medios de subsistencia de las actuales y futuras generaciones. Esto propone, la adopción de un modelo de economía circular que implica promover prácticas para la reutilización, el reacondicionamiento y reciclaje de productos para minimizar los residuos y el agotamiento de los recursos (“ONU,” 2015).

De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en 2021 el estado de Tabasco fue el principal productor de cacao a nivel nacional (“SIAP,” 2021). En este sentido, durante el procesamiento del cacao, la semilla es separada de la cascarilla, esta última no continúa en el proceso de producción del chocolate y se convierte en un subproducto agroindustrial con elevadas concentraciones de moléculas bioactivas (flavan-3-oles), compuestos con propiedades promotoras para la salud. Debido a lo

anterior y aunado a que no existen reportes del uso de la infusión de cascarilla de semilla cacao en combinación con los probióticos del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) para elaborar un nuevo alimento funcional destinado al tratamiento no farmacológico de la disbiosis intestinal, que además ayude a disminuir la gravedad o el desarrollo de enfermedades asociadas a este desequilibrio a través de los microorganismos y moléculas bioactivas que contiene este fermento. Por lo tanto, con este enfoque pretendemos aportar valor agregado a este desecho agroindustrial que acuerdo con datos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural en 2021, cada año se producen aproximadamente 3,531 toneladas de cascarilla de semilla de cacao, como resultado de la producción de 29,429 toneladas de granos de cacao ("SADER," 2021). Esta cascarilla representa aproximadamente un 12% del peso de la semilla de cacao que se genera en el estado de Tabasco, todo lo anterior abre la oportunidad para establecer una estrategia para a partir de este subproducto desarrollar un nuevo alimento funcional en beneficio de la sociedad.

#### **XVII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La fermentación de la infusión de cascarilla de semilla de cacao aumenta la actividad antioxidante y favorece la presencia de microorganismos probióticos?

#### **XVIII. HIPÓTESIS**

La fermentación de infusión de cascarilla de semilla de cacao incrementa la actividad antioxidante y contiene microorganismos con potencial probiótico.

#### **XIX. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el microbioma por secuenciación metagenómica y actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao.

#### **XX. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el método para la obtención del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao.

- Determinar características fisicoquímicas del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao.
- Analizar el contenido de fenoles y flavonoides totales del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao.
- Evaluar la actividad y capacidad antioxidante del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao por método DPPH y ABTS, respectivamente.
- Caracterizar el microbioma del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao por método de secuenciación metagenómica.

## XXI. METODOLOGÍA

### XXI.I Tipo de investigación

Experimental

### XXI.II Materiales

#### XXI.II.I Material vegetal

En este estudio se utilizó la cascarilla de semilla de *Teobroma cacao* L., obtenida de los productores de Cacep® Chocolates de la Hacienda Cacaotera “Jesús María”, ubicada en la ranhería Sur 5a Sección, camino vecinal Comalcalco-Tulipán, Comalcalco, Tabasco para la elaboración de la bebida fermentada. Además, como control se empleó el Té Negro (*Camellia sinensis*) de la marca Healthy SuperFood®.

#### XXI.II.II Consortio microbiano

Se utilizó el SCOBY de la marca MANDOLÍN® Puebla, México.

#### XXI.II.III Material Químico

El reactivo fenólico de Folin y Ciocalteu, ácido gálico (AG), alcohol etílico, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), persulfato de potasio, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) y epicatequina (EC) se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Company EE. UU. El nitrito de sodio, el cloruro de aluminio, el tartrato de sodio y potasio, el carbonato de sodio, la dextrosa anhidra y las soluciones tampón de pH 4 y 7 se adquirieron de J.T Baker Chemical Company, EE. UU. El hidróxido de sodio, alcohol metílico, agua destilada, agua inyectable, fenoltaleína, biftalato de potasio y la albúmina sérica bovina, estos últimos reactivos y productos químicos, fueron de grado analítico.

### **XXI.III Preparación del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao y fermento de té negro.**

La infusión fermentada de cascarilla de semilla de cacao se preparó de acuerdo a la metodología establecida para el fermento de té negro (control) por Cardoso et al. (2020) (Cardoso et al., 2020). Se adicionaron 12 g/L de cada sustrato en agua purificada (Bonafont®, México) a 95 °C durante 5 min y se eliminaron los residuos por filtración. Posteriormente, se añadieron 50 g/L de azúcar (sacarosa) a la infusión/té. Después de enfriar, se añadió 3% (m/v) de SCOBY (MANDOLÍN®, México) y 100 mL/L de fase líquida de un lote de fermentación anterior. La fermentación se realizó a 30 °C durante 10 días.

### **XXI.IV Obtención de las muestras**

#### ***XXI.IV.I Muestras para análisis fisicoquímico y de actividad antioxidante***

Las muestras se transfirieron a microtubos (1.5 mL, Eppendorf, Alemania) y luego centrifugadas a 1,500 rpm durante 15 minutos para después almacenarlas a -20 °C hasta su posterior determinación de proteínas, fenoles totales, flavonoides totales, azúcares reductores, además de la evaluación de la actividad antioxidante por método de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Por otro lado, para el análisis de acidez titulable y cenizas se separó la fase líquida de cada fermento mediante filtración (papel filtro grado 1, Whatman, Inglaterra).

#### ***XXI.IV.II Muestras para Análisis Metagenómico***

Se utilizaron 200 mL de la fase líquida de fermento de té negro (control) y de infusión de cascarilla de semilla de cacao fermentada para la obtención del ADN de los microorganismos presentes. Luego, se centrifugaron estos 200 mL a 1500 rpm durante 15 min, el sedimento resultante después de centrifugar se usó para la extracción de ADN genómico.

### **XXI.V Diseño experimental**

Muestra problema: Infusión Cascarilla de Semilla de Cacao fermentada (CSC).

Control: Fermento de Té Negro (TN).

Se seleccionaron dos tipos de diseños experimental, el factorial y de series cronológicas múltiples de acuerdo a (Hernández Sampieri et al., 2014), este enfoque permite analizar el cambio en la respuesta de la variable dependiente en función de la variable independiente (0, 3, 6 y 10 día de fermentación) como se muestra en la Tabla 1, y

compararon las observaciones del punto inicial (infusión/tea, día 0) contra los resultados observados durante el transcurso de la fermentación (día 3, 6 y 10). Estas comparaciones se realizaron de forma individual entre cada bebida fermentada evaluada (muestra problema y control).

**Tabla 1.** Descripción de las variables del diseño experimental

| Factor (Variable independiente)          | Respuesta (Variable dependiente)       | Unidad experimental  |
|------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | pH                                     | Escala de pH (0-14)  |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Acidez Total                           | g de ácido acético/L |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Contenido Total de Azúcar              | °Brix-g /dL          |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Contenido Total de Azúcares Reductores | g/L                  |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Contenido de Alcohol                   | Porcentaje (%)       |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Contenido Total de Polifenoles         | mg EAG/L             |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Contenido Total de Flavonoides         | mg EEC/L             |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Actividad Antioxidante                 | Porcentaje (%)       |
| Días de fermentación (0, 3, 6, y 10)     | Capacidad Antioxidante                 | µM ET                |
| Log Concentración [mg/mL]<br>Liofilizado | Actividad Antioxidante                 | Porcentaje (%)       |

\*EAG Equivalentes de Ácido Gálico, EEC Equivalentes de Epicatequina, ET Equivalentes de Trolox

## **XXI.VI Determinación de Metales pesados (As, Cu, Pb y Cd) en la Cascarilla de Semilla de Cacao**

Se utilizó el método descrito por Jakubczyk et al. (2022) para la cuantificación de As, Cu, Pb y Cd en el sustrato de la muestra problema. Se pesaron 0,2 g de cascarilla de semilla de cacao, posteriormente la muestra se transfirió a un vaso de precipitado, luego se adicionaron 9 mL de  $\text{HNO}_3$  al 65% y se dejó incubar por 30 min. Una vez finalizado el tiempo, se agregaron 3 mL de solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%. Transcurrido esto, la muestra se colocó en el recipiente de digestión y se calentaron en el sistema de digestión por microondas (MLS 1200 mega, Milestone, Italia) durante 35 min a 180 °C (15 min de rampa a 180 °C y se mantuvieron a 180 °C durante 20 min) para su mineralización. Al final del proceso, la muestra se retiró del microondas y se dejó reposar en la campana de extracción. Posteriormente, la muestra se aforó a 50 ml con agua destilada y la suspensión se filtró (papel filtro grado 390,84 g/m<sup>2</sup>, Munktell, Alemania) antes de la determinación por Espectroscopia de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) (Avio 500, PerkinElmer, EE.UU.). Se tomó un volumen de 2 mL de cada digestión. Posteriormente, las muestras se enriquecieron con 0,5 mg/L de Ytrio, un patrón interno, 1 mL de Tritón al 1% y se aforó a 10 mL con ácido nítrico al 0,075%. Las muestras en blanco se prepararon añadiendo 500 µL de  $\text{HNO}_3$  concentrado a tubos sin muestra y posteriormente se diluyeron de la misma manera descrita anteriormente. El estándar de referencia XXI y 7A (controles de calidad) se prepararon con diferentes concentraciones de elementos inorgánicos de la misma manera que en el blanco y las muestras. Los resultados se expresaron en mg/kg (Jakubczyk et al., 2022).

## **XXI.VII Determinación de pH**

Los valores de pH de todas las muestras se determinaron de acuerdo a Ahmed et al. (2020), utilizando un medidor electrónico de pH (HI98107, Hanna Instruments, EE.UU.). Los resultados se expresaron de acuerdo a la escala del pH (0-14) (Ahmed et al., 2020).

## **XXI.VIII Determinación de Acidez Total**

La acidez total de las bebidas fermentadas se determinó de acuerdo con lo descrito en la NMX-F-102-S. (1978); NMX-FF-010. (1982); Tran et al. (2020). Se empleó una alícuota de 10 mL de muestra y se aforó a 50 mL con agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ , luego se

agregaron dos gotas de fenolftaleína al 1% como indicador de pH, la acidez se determinó por titulación con NaOH 0,1N, hasta la presencia de un color rosa tenue. El resultado fue expresado como g de ácido acético por litro (g AcOH/L). Utilizando la siguiente fórmula 1 (NMX-F-102-S, 1978; NMX-FF-010, 1982; Tran et al., 2020)

$$Acidez = \frac{(100) (N) (V_1)}{V_0} 0.06$$

Donde:

$V_0$  = Volumen en mL de la muestra

$V_1$  = Volumen en mL de la disolución NaOH 0.1 N consumida en la determinación

N = Concentración normal de la disolución NaOH

0.06 = Factor de conversión para AcOH

#### **XXI.IX Determinación del Contenido Total de Azúcares**

La cantidad de azúcares totales se midió de acuerdo a Alencar et al. (2021) utilizando un refractómetro Brix digital (BM-05-S, Nohawk, China). Esta metodología consistió en la calibración previa del refractómetro con 200  $\mu$ L de agua destilada sobre el sensor óptico; posteriormente se limpió el sensor, y se añadieron 200  $\mu$ L de muestra para la cuantificación del contenido de azúcares totales. Los resultados se expresaron como grados Brix-gramos por decilitro ( $^{\circ}$ Brix-g/dL) (Alencar Silva et al., 2021).

#### **XXI.X Cuantificación del Contenido Total de Azúcares Reductores**

Para la evaluación de los azúcares reductores totales, se utilizó una técnica de espectrofotometría descrita por Baliyan et al. (2022). Se preparó una solución de tartrato sódico potásico al 60% (solución A) en agua destilada y una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) al 5% en NaOH 0.75 M (solución B). Posteriormente se preparó la solución DNS combinando las soluciones (A), (B) y agua destilada en una proporción de 5:2:3. Como estándar se utilizó dextrosa (0 – 2 g/L). Para las determinaciones se añadieron 20  $\mu$ L de muestra (blanco, problema o estándar), 580  $\mu$ L de agua destilada y 400  $\mu$ L de solución DNS a cada tubo de ensayo. La reacción inicio con el calentamiento a 100  $^{\circ}$ C en baño María (12501-10, Oakton, EE.UU.) durante 10 minutos. Las absorbancias fueron determinadas a 540 nm empleando un espectrofotómetro (Genesys

10S, Thermo Scientific, EE. UU.). Los resultados se expresaron como gramos por decilitro (g/L) (Baliyan et al., 2022).

#### **XXI.XI Determinación de Porcentaje de Alcohol**

El contenido de alcohol se midió con un densímetro alcoholímetro (Yosoo, China), de acuerdo con Jakubczyk et al. (2020); Reyes-Flores et al. (2023). Se colocó 250 mL del fermento en una probeta graduada, el densímetro alcoholímetro se sumergió en el líquido depositado y el resultado se leyó en la escala de Gay-Lussac, expresándose los valores en porcentaje de alcohol (% alcohol) (Jakubczyk et al., 2020; Reyes-Flores et al., 2023).

#### **XXI.XII Determinación del Contenido Total de Polifenoles**

El contenido fenólico total se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu de acuerdo a lo descrito por Reyes-Flores et al. (2023); Singleton et al. (1999). El ácido gálico fue utilizado como estándar (0 – 1000 mg/L). Se utilizó 10 µL de cada muestra o estándar y se mezclaron con 25 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 N, se dejó reaccionar la mezcla durante 8 min, después se añadieron 75 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5% y 90 µL de agua. Tras incubar a temperatura ambiente a lo largo de 2 h en oscuridad, se midieron las absorbancias a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, EE.UU.). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L) (Reyes-Flores et al., 2023; Singleton et al., 1999).

#### **XXI.XIII Determinación del Contenido Total de Flavonoides**

La cantidad total de flavonoides se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico con cloruro de aluminio según el método descrito por Kim et al., 2003; Tu et al., 2019; Zhishen et al., 1999. Se utilizó epicatequina para elaborar la curva estándar (0 – 200 mg/L). Se dispensaron 20 µL muestra, estándar o blanco, luego se mezclaron con 80 µL de agua destilada y 75 µL de NaNO<sub>2</sub> al 5%. Se incubó la mezcla por 5 min a temperatura ambiente, luego se añadieron 6 µL de AlCl<sub>3</sub> al 10%, después de 6 min de reposo a temperatura ambiente, se agregaron 40 µL de NaOH 1 M, 48 µL de agua destilada y se observó el desarrollo de color rosado, se agitó la mezcla antes de leer la absorbancia a 510 nm utilizando un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific, EE.UU.). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de epicatequina por litro (mg EEC/L)

(D.-O. Kim et al., 2003; Zhishen et al., 1999).



#### **XXI.XIV Determinación de la Actividad Antioxidante a través del método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

La actividad antioxidante se examinó con un método espectrofotométrico utilizando el radical sintético 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) de acuerdo Bekir et al. (2013); Villarreal-Soto et al. (2020). Se adicionaron 20 µL de muestra con 180 µL de disolución metanólica de DPPH 0.2 mM. Posteriormente se agitó la mezcla de reacción y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. La disminución de la absorbancia se midió a 520 nm con un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Scientific, EE.UU.). El blanco se realizó utilizando el mismo procedimiento mezclando agua destilada con solución de DPPH (Bekir et al., 2013; Villarreal-Soto et al., 2020). Los valores de absorbancia del blanco y de la muestra se usaron para calcular el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH mediante la fórmula 3:

$$\% \text{ actividad antioxidante} = \frac{100 (\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs blanco}}$$

Donde:

Abs blanco = Absorbancia del ensayo con solución DPPH y agua destilada.

Abs muestra = Absorbancia del ensayo con solución DPPH y muestra.

#### **XXI.XV Determinación de la Capacidad Antioxidante a través del método 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS)**

La capacidad antioxidante de las muestras se determinó por su capacidad para inhibir el radical 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS<sup>•+</sup>), de acuerdo a los descrito por Re et al. (1999); Cardoso et al. (2020). El catión radical ABTS<sup>•+</sup> se generó mezclando 7,0 mM de solución de ABTS en H<sub>2</sub>O y 2,45 mM de solución de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) en H<sub>2</sub>O (concentración final) y dejando reposar la mezcla en la oscuridad a temperatura de laboratorio durante 12-16 h antes de su utilización. A continuación, la solución de ABTS<sup>•+</sup> se diluyó con agua destilada hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,70 ± 0,02 a 734 nm, y el factor de dilución resultante se utilizó para preparar la solución de reacción. Se utilizó 2 µL de muestra con 198 µL de solución de ABTS<sup>•+</sup> e inmediatamente, se incubó la mezcla a temperatura de laboratorio durante 6 min en

oscuridad. Por último, se midió la reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> a 734 nm con un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific, EE.UU.). También se realizó un blanco utilizando el mismo procedimiento mezclando agua destilada con solución de ABTS<sup>•+</sup>. La fórmula empleada para calcular el porcentaje de inhibición de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> fue la misma que la utilizada para el ensayo de actividad antioxidante por el método DPPH. Se utilizó Trolox para construir la curva estándar (0 – 10 µM), y los resultados se expresaron en µM equivalentes de Trolox (µM ET) (Cardoso et al., 2020; Re et al., 1999).

#### **XXI.XVI Determinación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) del liofilizado de la fase líquida del fermento de infusión de CSC.**

Para la liofilización de las bebidas fermentadas se empleó el método reportado por Mariana et al. (2022), 200 mL de bebidas fermentadas se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 min, y posteriormente el sobrenadante se resguardó en un ultracongelador a -30 °C durante 72 h. Después de este tiempo, para el proceso de secado se utilizó un liofilizador (10N/C, Scientz, China) a -55 °C, a una presión de vacío ≤ 20 µmHg durante 72 h. Las muestras liofilizadas se almacenaron posteriormente a -20 °C, sin exposición al oxígeno ni a la humedad. Posteriormente, para la evaluación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH, los productos liofilizados se reconstituyeron en agua destilada para la preparación de solución madre y se determinó la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) mediante un análisis de regresión no lineal de acuerdo a *Bekir et al.* Donde el valor obtenido es el porcentaje de inhibición en función del log [concentración] utilizando el software estadístico (Prism 5, GraphPad, EE.UU.). La IC<sub>50</sub> se expresó en miligramos por mililitro (mg/mL), definida como la concentración del material de ensayo necesaria para inducir una disminución del 50% de la concentración inicial del radical DPPH (Bekir et al., 2013; Mariana et al., 2022).

#### **XXI.XVII Caracterización del microbioma de una bebida fermentada a partir de cascarilla de semilla de cacao**

Para determinar la composición bacteriana y fúngica de los fermentos elaborados, se analizaron las regiones hipervariables V3 y V4 del gen ARN ribosomal 16s (ARNr 16s) de bacterias (Illumina, 2013) y la región intersecuencia ITS1 e ITS2 de hongos (White et al., 1990)

#### XXI.XVII.I Extracción ADN genómico

Se utilizó un total de 200 mL de bebida fermentada en tubos Falcon estériles y se sometieron a centrifugación a 7000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante, el sedimento resultante se resuspendió en 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), posteriormente se introdujo en tubos estériles y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos a temperatura de laboratorio. A continuación, se desechó el sobrenadante y el sedimento resultante se utilizó para la extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante del kit (QIAamp Power Fecal Pro-DNA, Qiagen, Alemania). Tras la extracción, se utilizó 1 µL de cada muestra de ADN para su cuantificación en un nanofotómetro (NP80, Implen, Alemania).

#### XXI.XVII.II Preparación de las bibliotecas, secuenciación de amplicones gen ARNr 16s y de la región secuencia transcrita interna (ITS)

Las bibliotecas para la secuenciación de amplicones bacterianos se prepararon utilizando los cebadores específicos para la región V3 y V4 del gen 16S rRNA F-5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCAGCAG 3' y R-5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3' (Illumina, 2013). La región ITS1 del ARN ribosómico se amplificó utilizando los cebadores ITS1F 5-GAACCAGCGGATGGATCA-3 e ITS2R 5-GCTGCGTTCTTCATC- GATGC-3, como se ha descrito anteriormente (White et al., 1990). Además, los cebadores utilizados en la PCR (Polymerase Chain Reaction) inicial abarcan una región correspondiente a los adaptadores Illumina. La presencia de este adaptador permite realizar una segunda PCR, en la cual se acoplan las secuencias de indexación de acuerdo a procedimientos descritos anteriormente (Fuhrman, 2012).

En la segunda PCR, la indexación se realiza utilizando oligonucleótidos duales únicos para cada muestra. El volumen de amplificación fue de 25 µL, 12.5 ng del ADN extraído se empleó como molde en la reacción inicial de PCR, y la mezcla maestra (KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, Roche, Sudáfrica) estuvo compuesta de 0,5 U de ADN polimerasa de alta fidelidad, 0.3 mM de dNTP, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada iniciador y 1X de tampón enzimático para PCR. La primera reacción de PCR realizó a 95 °C por 3

minutos, seguida de 25 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. La segunda reacción de PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 95 °C por 3 minutos, 10 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 66 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. La concentración final de ADN del conjunto de bibliotecas se estimó utilizando un nanofotómetro (NP80, Implen, Alemania). El conjunto de bibliotecas normalizado se secuenció en el sistema (NovaSeq, Illumina, EE. UU.) y se utilizó un protocolo de extremos pareados de 250 pb.

#### **XXI.XVII.III Análisis Bioinformático**

El análisis de datos de la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16s e ITS se realizó utilizando un software bioinformático (Geneious Prime Versión 2025.1.3, Dotmatics, EE. UU.). En primer lugar, los datos de secuencia sin procesar se filtraron por calidad con FastQC (Andrews, 2010), que elimina las lecturas con una puntuación Phred media <30, y las secuencias se importaron al pipeline Geneious ("Geneious Academy," 2025; Kears et al., 2012) para obtener las unidades taxonómicas operativas (OTUs). A continuación, se filtraron las secuencias con un tamaño de amplicón de entre 150 y 260 pb y se agruparon en OTUs. Se asignó la taxonomía a nivel de especie y género a cada característica de OTU mediante la alineación con las bases de datos SILVA 16S rRNA versión 13.8 (Quast et al., 2012) y fungal ITS UNITE versión 7.0 (Nilsson et al., 2019), utilizando una longitud de palabra de 24 y un umbral de similitud del 98 %.

#### **XXI.XVIII Análisis estadístico**

Todos los datos registrados son el resultado de tres experimentos independientes y los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{x} \pm DE$ ).

Se empleó la prueba de ANOVA de una vía para determinar las diferencias intergrupales seguido de una prueba Tukey post hoc. Los valores de  $p \leq 0,05$  se consideran estadísticamente significativos. Todas las pruebas se realizaron utilizando el software estadístico (Prism 5, GraphPad, EE. UU.).

## XXII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 2.** Perfil nutricional

| Tamaño de porción<br>100g      | Cascarilla de semilla<br>de cacao<br>( <i>Theobroma cacao</i> L<br>var. criollo) * | Té negro ( <i>Camellia<br/>sinensis</i> ) * |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Contenido energético<br>(Kcal) | 365                                                                                | 0                                           |
| Carbohidratos (g)              | 24                                                                                 | 0                                           |
| Proteínas (g)                  | 22                                                                                 | 0                                           |
| Grasas (g)                     | 20                                                                                 | 0                                           |

\* Los datos provienen de las etiquetas de los productos.

Como se observa en la Tabla 2, la cantidad de macronutrientes en el sustrato de cascarilla de semilla de cacao (CSC) es mayor, con respecto al sustrato de té negro (TN). El té negro utilizado no posee contenido energético, similar al té negro utilizado en otros reportes (de Oliveira Duarte et al., 2024; Ruiz et al., 2023). Sin embargo, un reporte de TN con macronutrientes (Jayabalan et al., 2007), indica favorecer la formación de metabolitos de la fermentación. Estas diferencias en los niveles de macronutrientes entre los sustratos, se asocia positivamente con el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo en la fermentación (Dysin et al., 2023; Ojo & de Smidt, 2023). En este sentido, la cascarilla de semilla de cacao presenta condiciones que sugieren favorecer el crecimiento de los microorganismos.

**Tabla 3.** Contenido de metales pesados en la cascarilla de semilla de cacao

| Muestra                           | Elemento | [mg/kg] | Límite permisible<br>[mg/kg] |
|-----------------------------------|----------|---------|------------------------------|
| Cascarilla de<br>semilla de cacao | As       | <LD     | 0.5                          |
|                                   | Cu       | 0.144   | 15                           |
|                                   | Pb       | <LD     | 1                            |
|                                   | Cd       | <LD     | 0.9                          |

Las concentraciones se determinaron mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). El límite de detección (LD) es [0,001 mg/kg]. Los límites permisibles de acuerdo a (Assa et al., 2018; Batallas Valarezo et al., 2021; Ordoñez-Araque et al., 2020)

El sustrato de CSC, como subproducto de la industria del chocolate, ha sido objeto de estudio en relación con la migración de compuestos de la semilla a la cascarilla durante las etapas de fermentación, secado y tostado (Adabel González-Alejo et al., 2019). Con el fin de evaluar la seguridad del sustrato, se realizó un análisis del contenido de metales pesados. Los hallazgos presentados en la Tabla 3, indican que no se detectaron niveles de arsénico, plomo ni cadmio en el sustrato de CSC; sin embargo, se identificó la presencia de cobre.

De acuerdo a Assa et al. (2018) describe el límite permisible del cobre para productos derivados del cacao es de 50 mg/kg (Assa et al., 2018). Por lo tanto, se concluye que la concentración de cobre en este sustrato no representa un riesgo para la salud.

**Tabla 4.** Cambios en el pH, acidez titulable, contenido total de azúcares, contenido total de azúcares reductores y contenido de alcohol durante el proceso de fermentación

| Tipo de bebida                                         | Puntos en el tiempo de fermentación (Días) | pH                          | Acidez Total [g ácido acético/L] | Contenido Total de Azúcares [°Brix-g/dL] | Contenido Total de Azúcares Reductores [g /L] | Contenido de Alcohol [%] |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|
| Fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao | 0                                          | 4.80 ± 0.19                 | 0.41 ± 0.04                      | 5.50 ± 0.08                              | 0.10 ± 0.00                                   | 0.0 ± 0.0                |
|                                                        |                                            | 3.68 ± 0.26*** <sup>1</sup> | 1.29 ± 0.20** <sup>1</sup>       | 5.11 ± 0.13                              | 0.16 ± 0.01*** <sup>1</sup>                   | 0.16 ± 0.05              |
|                                                        | 3                                          | 3.37 ± 0.15*** <sup>1</sup> | 1.71 ± 0.19*** <sup>1</sup>      | 4.86 ± 0.23** <sup>1</sup>               | 0.31 ± 0.02*** <sup>1</sup>                   | 0.30 ± 0.15              |
|                                                        |                                            | 2.98 ± 0.15*** <sup>1</sup> | 5.28 ± 0.35*** <sup>1</sup>      | 4.61 ± 0.35*** <sup>1</sup>              | 0.97 ± 0.06*** <sup>1</sup>                   | 0.42 ± 0.08              |
|                                                        | 6                                          | 5.85 ± 0.32                 | 0.50 ± 0.19                      | 5.47 ± 0.11                              | 0.09 ± 0.01                                   | 0.0 ± 0.0                |
|                                                        |                                            | 3.42 ± 0.23*** <sup>2</sup> | 1.33 ± 0.14*** <sup>2</sup>      | 5.00 ± 0.27** <sup>2</sup>               | 0.27 ± 0.04*** <sup>2</sup>                   | 0.12 ± 0.04              |
|                                                        | 10                                         | 3.18 ± 0.11*** <sup>2</sup> | 3.66 ± 0.34*** <sup>2</sup>      | 4.84 ± 0.39** <sup>2</sup>               | 0.45 ± 0.03*** <sup>2</sup>                   | 0.20 ± 0.10              |
|                                                        |                                            | 3.03 ± 0.09*** <sup>2</sup> | 3.91 ± 0.18*** <sup>2</sup>      | 4.48 ± 0.36*** <sup>2</sup>              | 0.70 ± 0.02*** <sup>2</sup>                   | 0.28 ± 0.13              |
| Fermento de té negro                                   | 0                                          | 5.85 ± 0.32                 | 0.50 ± 0.19                      | 5.47 ± 0.11                              | 0.09 ± 0.01                                   | 0.0 ± 0.0                |
|                                                        | 3                                          | 3.42 ± 0.23*** <sup>2</sup> | 1.33 ± 0.14*** <sup>2</sup>      | 5.00 ± 0.27** <sup>2</sup>               | 0.27 ± 0.04*** <sup>2</sup>                   | 0.12 ± 0.04              |
|                                                        | 6                                          | 3.18 ± 0.11*** <sup>2</sup> | 3.66 ± 0.34*** <sup>2</sup>      | 4.84 ± 0.39** <sup>2</sup>               | 0.45 ± 0.03*** <sup>2</sup>                   | 0.20 ± 0.10              |
|                                                        | 10                                         | 3.03 ± 0.09*** <sup>2</sup> | 3.91 ± 0.18*** <sup>2</sup>      | 4.48 ± 0.36*** <sup>2</sup>              | 0.70 ± 0.02*** <sup>2</sup>                   | 0.28 ± 0.13              |

Los resultados fueron expresados como la media ± DE (n = 3). \* p≤0.05, \*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001 indican medias que son estadísticamente diferentes entre la infusión/té y los diferentes tiempos de fermentación, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey. <sup>1</sup>Infusión, <sup>2</sup>Té.

En la evaluación de las características fisicoquímicas de la fermentación de acuerdo a la Tabla 4, se detectó una disminución significativa del pH, acompañada de un aumento notable en la acidez titulable a lo largo del proceso fermentativo. De acuerdo con (Kitwetcharoen et al., 2023), se recomienda no exceder diez días de fermentación o evitar que el pH descienda por debajo de 2.5 para garantizar la seguridad en el consumo humano de este tipo de fermentos. En nuestras condiciones experimentales, observamos que, en el día 6 de fermentación, en el fermento de infusión de CSC presentaba valores de pH y acidez titulable más apropiados para el consumo humano en comparación con el día 10. Es relevante señalar que un pH inferior a 2.5 puede propiciar el desarrollo de acidosis metabólica (Ojo & de Smidt, 2023), mientras que un pH superior a 4.2 aumenta el riesgo de contaminación con microorganismos indeseables (Nyhan et al., 2022).

En la literatura sobre la evaluación del fermento de infusión de CSC, se ha encontrado un solo un reporte que refleja valores similares de pH (3.3) en el día seis de fermentación (de Oliveira Duarte et al., 2024). En cuanto a los valores de pH y acidez total nuestros resultados para el fermento de TN, son congruentes con los de otros estudios previos (Kaewkod et al., 2019; Kallel et al., 2012; Vázquez-Cabral et al., 2017). Sin embargo, las discrepancias observadas en los valores de pH y acidez titulable de los fermentos pueden atribuirse a la variabilidad en la composición microbiana, la cual está influenciada por las características geográficas de cada región (Antolak et al., 2021; Kitwetcharoen et al., 2023).

Al evaluar el contenido y metabolismo de la sacarosa, observamos una disminución significativa en su concentración hasta el décimo día de fermentación, tanto en fermento de TN como en el fermento de infusión de CSC. Este descenso es acompañado de un incremento considerable en el contenido de azúcares reductores. Aunque ambos fermentos presentaron un consumo similar de sacarosa, el fermento de infusión de CSC generó una mayor cantidad de azúcares de acuerdo a la Tabla 4, congruente con lo reportado por Oliveira Duarte et al. (2024) (de Oliveira Duarte et al., 2024). Además, un estudio realizado en condiciones similares (Cardoso et al., 2020), reporta que el fermento de TN mostró una disminución parecida en la concentración de sacarosa (3.5 g/dL), con



una mayor producción de azúcares reductores (2.5 g/L) al décimo día de fermentación. Estos hallazgos son consistentes con el comportamiento de otros fermentos de TN que presentan diferentes concentraciones iniciales de sacarosa (Ramakrishnan, 2022; Reyes-Flores et al., 2023; S. Wang et al., 2020).

De acuerdo a lo indicado por (Nummer, 2013), el porcentaje de alcohol en el tipo de fermentación evaluado no debe exceder el 0.50%. En nuestra evaluación del contenido alcohólico, el porcentaje no supera el límite permitido como se observa en la Tabla 4. Estos resultados son consistentes con los reportados por (Cardoso et al., 2020; Reyes-Flores et al., 2023; S. Wang et al., 2020) para el fermento de TN al décimo día de fermentación, donde se registraron niveles de alcohol de 0.04%, 0.03% y 0.49%, respectivamente.

**Tabla 5.** *Contenido total de polifenoles, flavonoides y potencial antioxidante de las bebidas fermentadas*

| Tipo de bebida                                         | Puntos en el tiempo de fermentación (Días) | Contenido Total de Polifenoles [mg EAG/L] | Contenido Total de Flavonoides [mg EEC/L] | DPPH [%]            | ABTS [ $\mu$ M ET]  |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao | 0                                          | 169.5 $\pm$ 2.97                          | 57.09 $\pm$ 8.81                          | 29.3 $\pm$ 2.30     | 2.12 $\pm$ 0.14     |
|                                                        | 3                                          | 182.0 $\pm$ 14.39                         | 56.77 $\pm$ 2.58                          | 37.6 $\pm$ 1.64***1 | 3.15 $\pm$ 0.07***1 |
|                                                        | 6                                          | 184.9 $\pm$ 12.76                         | 54.12 $\pm$ 4.02                          | 41.0 $\pm$ 1.71***1 | 3.26 $\pm$ 0.13***1 |
|                                                        | 10                                         | 183.4 $\pm$ 13.79                         | 53.89 $\pm$ 1.17                          | 37.4 $\pm$ 2.25***1 | 2.77 $\pm$ 0.21     |

|                            |    |                               |                              |                             |                             |
|----------------------------|----|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Fermento<br>de té<br>negro | 0  | 350.1 ± 35.24                 | 106.5 ± 9.94                 | 73.1 ± 3.10                 | 8.53 ± 0.10                 |
|                            | 3  | 405.9 ± 19.82 <sup>***2</sup> | 137.6 ± 4.11 <sup>***2</sup> | 89.8 ± 1.51 <sup>***2</sup> | 9.40 ± 0.38                 |
|                            | 6  | 415.0 ± 22.29 <sup>***2</sup> | 136.7 ± 11.0 <sup>***2</sup> | 91.9 ± 1.20 <sup>***2</sup> | 9.71 ± 0.74 <sup>***2</sup> |
|                            | 10 | 404.3 ± 18.49 <sup>***2</sup> | 130.5 ± 8.77 <sup>***2</sup> | 89.4 ± 3.98 <sup>***2</sup> | 8.30 ± 0.41                 |

Los resultados fueron expresados como la media ± DE (n = 3). \* p≤0.05, \*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001 indican medias que son estadísticamente diferentes entre la infusión/té y los diferentes tiempos de fermentación, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey. <sup>1</sup>Infusión, <sup>2</sup>Té.

EAG Equivalentes de Ácido Gálico, EEC Equivalentes de Epicatequina, ET Equivalentes de Trolox, DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, ABTS 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato

En la evaluación del contenido de polifenoles y flavonoides totales, como se observa en la Tabla 5, existe un incremento significativo en estos compuestos únicamente en el fermento de TN a partir del tercer día fermentación. Nuestros resultados concuerdan con los reportados en otros estudios (Cardoso et al., 2020; Reyes-Flores et al., 2023; Saimaiti et al., 2022), que documentan valores similares en de polifenoles al sexto día de fermentación (1090, 700, 206 mg EAG/L, respectivamente) y el contenido de flavonoides (136 y 80 mg EQ/L) (Chakravorty et al., 2016; Sun et al., 2015), coincidiendo en que la fermentación aumenta la concentración de estos compuestos. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de polifenoles y flavonoides totales entre la infusión y el fermento de infusión de CSC de acuerdo a la Tabla 5. Sin embargo, al evaluar la actividad y capacidad antioxidante, se detectó un aumento significativo en el efecto antioxidante durante el proceso de fermentación en ambas bebidas analizadas,

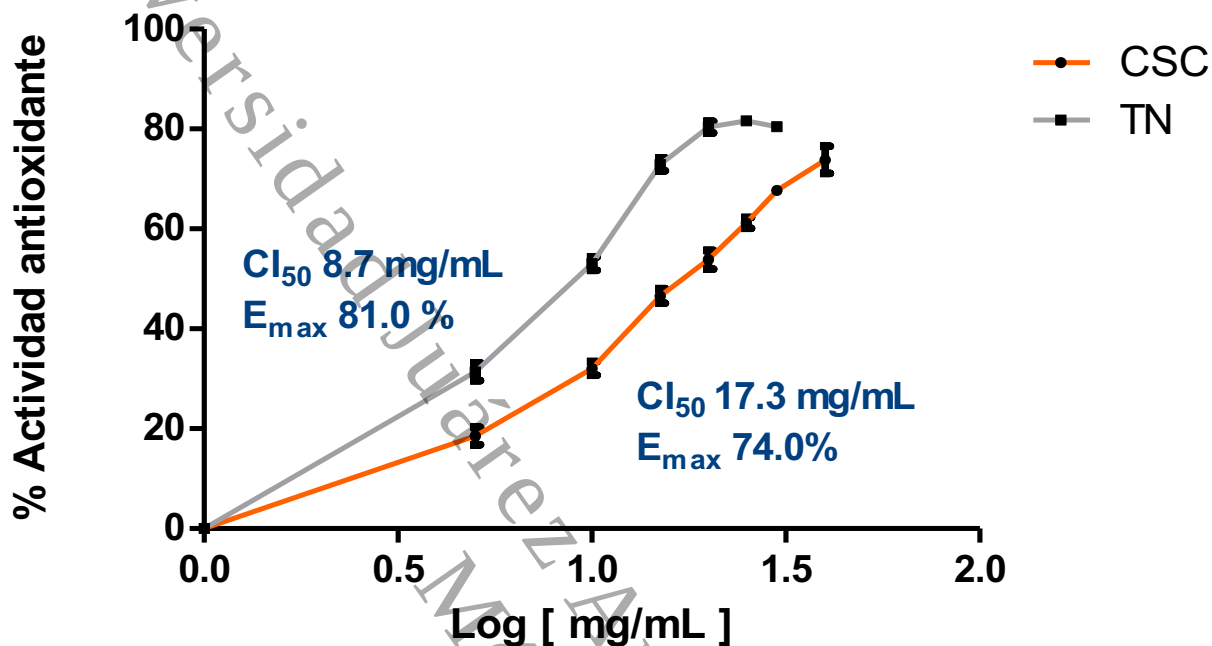
alcanzando la máxima actividad y capacidad antioxidante en ambos fermentos en el día 6.

En lo que respecta a la actividad antioxidante del fermento de TN, nuestros resultados son coherentes con diversos estudios (Ahmed et al., 2020; Selvaraj & Gurumurthy, 2024; Tzu-Ying et al., 2015) que informan valores similares en el sexto día de fermentación, alcanzando 86, 88 y 90%, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que el fermento de infusión de CSC también podría experimentar un aumento en su actividad antioxidante, posiblemente debido a la producción de metabolitos postbióticos como el ácido ascórbico y el ácido D-sacárido 1,4-lactona (DSL), los cuales han demostrado propiedades antioxidantes en investigaciones previas (Antolak et al., 2021; Kitwetcharoen et al., 2023). Sin embargo, una limitación de este estudio es que no se evaluó el contenido específico de estos compuestos en el fermento. Además, es relevante señalar que no existen reportes previos sobre la actividad antioxidante del fermento de infusión de CSC, lo que abre un campo prometedor para futuras investigaciones.

Es importante destacar que no se han reportado estudios previos sobre la actividad antioxidante del fermento de infusión de CSC, lo cual representa una oportunidad significativa para futuras investigaciones en este ámbito. En este contexto, se liofilizaron los fermentos en ambas condiciones al sexto día de fermentación, y se determinó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) como se observa en la Figura 1. Los resultados determinan que la  $CI_{50}$  del fermento de té negro es 2.1 veces más potente que la del fermento de infusión de CSC. En términos cuantitativos, se encontró que la  $CI_{50}$  del fermento de TN liofilizado es de 8.7 mg/mL, mientras que la del fermento de infusión de CSC es de 17.3 mg/mL. Este resultado es diferente con el valor reportado previamente ( $CI_{50}$  de 1.27 mg/mL) para el fermento de TN en el sexto día de fermentación (Chakravorty et al., 2016)

De acuerdo, a las propiedades fisicoquímicas descritas anteriormente, se eligió el día seis de fermentación para la caracterización de los microorganismos.

**Figura 5.** Curva concentración-respuesta del liofilizado de la fase líquida del fermento de infusión de CSC



*Nota.* Este gráfico representa el efecto antioxidante, destacando los efectos máximos similares del fermento de infusión de CSC comparado con el control TN.

**Tabla 6.** Clasificación taxonómica de hongos y bacterias en las bebidas fermentadas

| Identificación                    | % Abundancia relativa                                  |                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|
|                                   | Fermento de infusión de cascavilla de semilla de cacao | Fermento de té negro |
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | 35.37                                                  | 24.00                |
| <i>Brettanomyces anomalus</i>     | 31.24                                                  | 39.17                |
| <i>Brettanomyces spp.</i>         | 8.57                                                   | 9.77                 |
| <i>Pichia ethanolica</i>          | 6.73                                                   | 6.80                 |
| <i>Pichia spp.</i>                | 5.77                                                   | 6.10                 |
| <i>Pichia deserticola</i>         | 3.46                                                   | 3.44                 |

|                                       |       |       |
|---------------------------------------|-------|-------|
| <i>Aspergillus sydowii</i>            | 0.06  | -     |
| <i>Aspergillus tennesseensis</i>      | 0.06  | -     |
| Otros microorganismos                 | 8.74  | 10.72 |
| <i>Acetobacter tropicalis</i>         | 5.90  | -     |
| <i>Acetobacter musti</i>              | 4.38  | -     |
| <i>Acetobacter spp.</i>               | 3.0   | 5.87  |
| <i>Komagataeibacter medellinensis</i> | 3.37  | -     |
| <i>Komagataeibacter rhaeticus</i>     | 0.67  | -     |
| <i>Komagataeibacter nataicola</i>     | 0.67  | -     |
| <i>Komagataeibacter oboediens</i>     | 0.17  | -     |
| <i>Komagataeibacter spp.</i>          | 0.33  | 15.77 |
| <i>Sphingobium yanoikuye</i>          | 0.78  | 0.50  |
| <i>Pseudomonas monteilii</i>          | 0.52  | 0.50  |
| <i>Agrobacterium rubi</i>             | 0.78  | -     |
| <i>Kozakia spp.</i>                   | 0.78  | -     |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>     | 0.26  | -     |
| <i>Rhizobium rosettiformans W3</i>    | 0.17  | -     |
| <i>Bacillus zhangzhouensis</i>        | 0.17  | -     |
| <i>Methylophilus spp.</i>             | -     | 0.17  |
| <i>Neorhizobium galegae</i>           | -     | 0.14  |
| Otros microorganismos                 | 78.05 | 77.05 |

Los resultados, en la Tabla 6, demuestran la diversidad taxonómica de los microorganismos presentes en las bebidas fermentadas evaluadas. Al analizar los fermentos se observó que el género más abundante fue *Brettanomyces* (72.94, 75.15 % en el fermento de TN y de infusión de CSC, respectivamente), seguido de *Pichia* (16.34 ,15.96 % en el fermento TN y de infusión de CSC, respectivamente) lo que coincide con reportes previos para el fermento de TN (Huang et al., 2022; Reva et al., 2015) y de infusión de CSC (de Oliveira Duarte et al., 2024; Santos et al., 2025), sin embargo, la abundancia en la composición fúngica identificada fue diferente a las reportadas por otras

investigaciones para el fermento de TN (Arikan et al., 2020; Chakravorty et al., 2016; Gaggia et al., 2019), en donde los géneros *Candida* y *Zygosaccharomyces* fueron los más abundantes. Por otra parte, es relevante mencionar que la levadura *Brettanomyces* exhibe efecto probiótico porque posee gran resistencia a la temperatura corporal humana, a condiciones gastrointestinales, y una gran capacidad de adhesión al epitelio intestinal, así como actividad antioxidante que está asociado al contenido de (1→3), (1→6)-β-D-glucano y fracciones proteicas que se encuentran en las paredes celulares (Areal-Hermida et al., 2024; Jaehrig et al., 2007). Otra levadura identificada en los fermentos de TN y de infusión de CSC es *Pichia*, este género tiene potencial probiótico porque puede prosperar en el tracto gastrointestinal, además de producir exopolisacáridos que inducen la apoptosis en células de cáncer colorrectal, asimismo este género produce una micocina o toxina asesina con actividad antimicrobiana contra patógenos como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* (Bajaj et al., 2013; Rahbar Saadat et al., 2020; Shruthi et al., 2022; Tullio, 2024), esto puede explicar la ausencia de estas bacterias en los fermentos evaluados como se observa en la Tabla 6. Por otro lado, el género *Aspergillus* solo fue identificado en el fermento de infusión de CSC en una abundancia <1 %, este género ha sido identificado en otro reporte en el fermento de TN (Huang et al., 2022), además se ha descrito su presencia en otros alimentos fermentados como lafun, kiswa khao mak y ogi (Tamang et al., 2016), se sabe que este género aporta carbohidrasas que favorecen el proceso de fermentación tales como α-amilasa, amiloglucosidasa, celulasa, β-galactosidasa, hemicelulasa, invertasa, lipasa, maltasa, pectinasa y proteasas (da Silva Vale et al., 2023; Tamang & Shin, 2016).

En cuanto a la diversidad bacteriana, se encontró que en el fermento de TN el género más abundante fue *Komagataeibacter* (15.77%) seguido de *Acetobacter* (5.87 %), coincidiendo con lo reportado previamente para este fermento (Harrison & Curtin, 2021; Huang et al., 2022), mientras que para el fermento de infusión de CSC *Acetobacter* fue el género más abundante (13.28%) seguido de *Komagataeibacter* (5.21%), lo que representa un patrón inverso al reportado para este mismo fermento (de Oliveira Duarte et al., 2024), sin embargo, este patrón es congruente con lo descrito por otras

investigaciones en el fermento de TN (de Oliveira Duarte et al., 2024; Phung et al., 2023), estos dos géneros pertenecen al grupo de bacterias ácido acéticas (BAA), responsables de la síntesis de ácidos orgánicos, como ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido succínico a partir de glucosa y fructosa, además de sintetizar ácido acético a partir del etanol producido por las levaduras (Kitwetcharoen et al., 2023). Estos resultados se pueden correlacionar con los presentados en la Tabla 4 en donde se expresan los niveles de producción de etanol. La producción de etanol en el caso del fermento de infusión de CSC fue de 0.3%, cuando la abundancia de *Acetobacter* es mayor con respecto al control y produce 1.7 g de ácido acético/L, mientras que en el fermento de TN fue 0.2% cuando la proporción de *Komagataeibacter* es mayor con respecto al fermento de infusión de CSC y se produce 2.1 veces más ácido acético, lo que sugiere una mayor capacidad del *Komagataeibacter* para producir ácido acético (Gomes et al., 2018; Qiu et al., 2021). Lo anterior justifica por qué el fermento de TN es más ácido comparado con el fermento de infusión de CSC en el día 6. Asimismo, en la Tabla 4 se muestra que el fermento de TN exhibe 2.2 veces más el efecto antioxidante respecto al fermento de infusión de CSC, esto puede explicarse a la mayor proporción de *Komagataeibacter* en el fermento de TN, esta bacteria ha sido previamente asociado con la producción de DSL una molécula con actividad antioxidante (Chong & La, 2023; Kitwetcharoen et al., 2023). Otro rasgo de las BAA identificadas es su capacidad de producir biopelículas de celulosa. Adicionalmente se identificaron algunos géneros con una abundancia <1%, entre ellos se detectó la presencia de *Sphingobium yanoikuyae*, *Pseudomonas monteillii* en ambos fermentos. También se identificaron los géneros *Methylophilus* y *Neorhizobium* únicamente en el fermento de TN. Para el caso del fermento de infusión de CSC se determinó la presencia de bacterias como *Agrobacterium*, *Kosakia*, *Bacillus*, y *Rhizobium*, en esta misma proporción. Actualmente este sería el primer reporte de la presencia de *Sphingobium yanoikuyae*, *Methylophilus*, *Neorhizobium*, *Agrobacterium* y *Rhizobium* en estos fermentos, con excepción de *Rhizobium* que ha sido reportado en otro fermento de TN (Huang et al., 2022). Aunque la proporción de estas bacterias es pequeña es relevante señalar que algunas especies de *Sphingobium* y *Pseudomonas* tienen la capacidad de degradar diferentes contaminantes, incluidos hidrocarburos (Fahde et al., 2023; Lobo et al., 2024; López et

al., 2022; Sato et al., 2023). Debido a la presencia de contaminación por hidrocarburos en Tabasco (G. Chan-Quijano et al., 2020; Pérez Muñoz et al., 2019), esto sugiere que la bacteria *Sphingobium yanoikuyae* es propia de esta región geográfica, por lo tanto, esta es la causa de la presencia en la bebida, aunque en baja proporción, lo que puede indicar que el consumo de esta bebida puede ayudar a disminuir la cantidad de hidrocarburos en las poblaciones expuestas a estos contaminantes. Además, se ha descrito la presencia del género *Pseudomonas* en otros fermentos de TN en una abundancia similar a la determinada en ambos fermentos evaluados (Andreson et al., 2022; Huang et al., 2022). Cabe de señalar, las bacterias *Neorhizobium* y *Agrobacterium* conservan como ancestro común el género *Rhizobium* (Mousavi et al., 2014), como se había mencionado antes este género ha sido descrito previamente en otro fermento de TN (Huang et al., 2022). Asimismo, el género *Kosakia* pertenece a las BAA (He et al., 2022) y el género *Bacillus* se ha utilizado como probiótico en alimentos y bebidas fermentadas, debido a su tolerancia y capacidad de supervivencia en el tracto gastrointestinal, incluida la capacidad de formar biopelículas y producir antimicrobianos como bacteriocinas, sustancias inhibitoras similares a las bacteriocinas (p. ej., subtilina y coagulina) y antibióticos (p. ej., surfactina y bacilisina) (Elshaghabee et al., 2017), ambas bacterias han sido reportadas por otros autores en el fermento de TN (Andreson et al., 2022; Kaashyap & Cohen, 2021; Phung et al., 2023) y en el fermento de infusión de CSC únicamente se ha identificado previamente el género *Bacillus* (de Oliveira Duarte et al., 2024).

El proceso de fermentación es el producto de la relación simbiótica entre bacterias y levaduras, uno de los pasos iniciales es la utilización de la sacarosa. Las cepas de levaduras descritas anteriormente secretan la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa capaz de hidrolizar la sacarosa, liberando glucosa y fructosa al medio (Antolak et al., 2021), lo que resulta en la producción de dióxido de carbono, glicerol y etanol por estas mismas levaduras, utilizando la fructosa como sustrato preferente mediante glucólisis (J. Kim & Adhikari, 2020; Laurey & Britton, 2020). A su vez, las BAA utilizan el etanol producido por las levaduras para sintetizar ácido acético, a cambio, el ácido acético estimula la producción de etanol por las levaduras (Chong & La, 2023). La actividad antimicrobiana



del etanol y el ácido acético, combinada con la disminución del pH durante la fermentación, previene la contaminación por bacterias patógenas o moho. Al mismo tiempo las BAA utilizan fructosa, glucosa, etanol y glicerol para producir una red de celulosa (B. Wang et al., 2022). Además del ácido acético y la celulosa bacteriana, las BAA son responsables de la producción de ácido glucurónico y ácido glucónico a partir de la oxidación enzimática de la glucosa (Antolak et al., 2021; Ojo & de Smidt, 2023; Selvaraj & Gurumurthy, 2024). A pesar de no determinarse la presencia de estos dos últimos ácidos, se ha considerado como perspectiva una futura evaluación de los mismos.

Por lo descrito anteriormente se determina que si se cumplió la hipótesis, es decir, la fermentación de la infusión de cascarilla de semilla de cacao incrementó la actividad antioxidante y favoreció el crecimiento de microorganismos con potencial probiótico.

### **XXIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

La fermentación en el día seis de la infusión de cascarilla de semilla de cacao, presentó la mayor actividad y capacidad antioxidante, esto está relacionado con su contenido de polifenoles y flavonoides totales. Asimismo, se estudió el microbioma debido a que los fermentos son considerados una fuente de probióticos, teniendo en cuenta que la actividad probiótica es un efecto biológico. La secuenciación de alto rendimiento determinó la presencia de microorganismos con potencial probiótico como hongos de los géneros *Brettanomyces* y *Pichia* y bacterias del género *Acetobacter* y *Komagataeibacter*, estos hallazgos posicionan al fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao como una bebida funcional. También, fue identificado el género bacteriano *Sphingobium*, cabe destacar que este microorganismo no ha sido descrito su presencia en este tipo de fermentos, además no existen reportes que describan su potencial probiótico, lo cual abre la puerta para futuras investigaciones. Esta investigación tiene una perspectiva científicamente relevante en el contexto del desarrollo de una nueva bebida funcional, que promueve el beneficio de la salud de los consumidores y simultáneamente se alinea con la reducción de los impactos ambientales y la garantía del uso eficiente de los desechos agroindustriales.

## XXIV. REFERENCIAS CITADAS

- Adabel González-Alejo, F., Barajas-Fernández, J., & García-Alamilla, P. (2019). *Extraction of soluble compounds from cocoa shell with supercritical CO<sub>2</sub>. A methylxantines and fat case Extracción de compuestos solubles de la cascarilla de cacao con CO<sub>2</sub> supercrítico. Caso de metilxantinas y grasa*. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1073>
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Ahmed, R. F., Hikal, M. S., & Abou-Taleb, K. A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*, 65, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.aas.2020.04.001>
- Al Bander, Z., Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7618. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>
- Alencar Silva, K., Matsue Uekane, T., & de Miranda, J. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032>
- Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjäry, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., Kütt, M.-L., & Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109715. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715>
- Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. In *Babraham Institute*. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(1541), 1–8. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Areal-Hermida, L., Coelho, P., Pichardo-Gallardo, Á., Prudêncio, C., & Sieiro, C. (2024). Potential probiotic and functional properties of *Brettanomyces* strains isolated from kombucha tea. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1415616>
- Arıkan, M., Mitchell, A. L., & Finn, R. D. (2020). Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of Food Science*, 85(2), 455–463. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14992>
- Assa, A., Noor, A., Yunus, M. R., Misnawi, & Djide, M. N. (2018). Heavy metal concentrations in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) originating from East Luwu, South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 979, 012011. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/979/1/012011>
- Ayed, L., Abid, S. Ben, & Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Ann Microbiol*, 67, 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645–656. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>

- Baliyan, S., Mukherjee, R., & Priyadarshin, A. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules MDPI*, 27(1326), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bandopadhyay, P., & Ganguly, D. (2022). *Gut dysbiosis and metabolic diseases* (pp. 153–174). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2022.06.031>
- Batallas Valarezo, M., Preciado Alvarado, M., & Pesantez Franco, F. (2021). Evaluación de cadmio y plomo en almendras de cacao por espectroscopia de absorción atómica. *CIENCIA UNEMI*, 14(37), 49–59. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss37.2021pp49-59p>
- Bekir, J., Mars, M., & Souchard, J. P. (2013). Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 470–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.036>
- Belizário, J. E., & Faintuch, J. (2018). Microbiome and Gut Dysbiosis. *Experientia Supplementum*, 109, 459–476. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13)
- Bors, W., Heller, W., & Michel, C. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343–355. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I)
- Brglez Mojzer, E., & Knez Hrncić, M. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules MDPI*, 901(21), 1–3. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Busebee, B., Ghush, W., & Cifuentes, L. (2023). Obesity: A Review of Pathophysiology and Classification. *Mayo Clinic Proceedings*, 98(12), 1842–1857. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2023.05.026>
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., & dos Santos D'Almeida, C. T. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., & Chatzinotas, A. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chong, A. Q., & La, S. W. (2023). Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. *Microorganism*, 1344(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344>
- da Silva Vale, A., Venturim, B. C., da Silva Rocha, A. R. F., Martin, J. G. P., Maske, B. L., Balla, G., De Dea Lindner, J., Soccol, C. R., & de Melo Pereira, G. V. (2023). Exploring Microbial Diversity of Non-Dairy Fermented Beverages with a Focus on Functional Probiotic Microorganisms. *Fermentation*, 9(6), 496. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060496>
- de Miranda, J., & Fernandes Ruiz, L. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87, 503–508. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- de Oliveira Duarte, F. A., Ramos, K. K., Gini, C., Morasi, R. M., Silva, N. C. C., & Efraim, P. (2024). Microbiological characterization of kombucha and biocellulose film produced with black tea and cocoa bean shell infusion. *Food Research International*, 190, 114568. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114568>

- de Oliveira, Í. A. C., de Oliveira Rolim, V. A., & Lopes Gaspar, R. P. (2022). The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production. *Fermentation*, 8(185), 1–9. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>
- Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., & Petito, V. (2023). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
- Dysin, A. P., Egorov, A. R., Godzishhevskaya, A. A., Kirichuk, A. A., Tskhovrebov, A. G., & Kritchenkov, A. S. (2023). Biologically Active Supplements Affecting Producer Microorganisms in Food Biotechnology: A Review. *Molecules*, 28(3), 1413. <https://doi.org/10.3390/molecules28031413>
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Emiljanowicz, K. E., & Malinowska-Pańczyk, E. (2020). Kombucha from alternative raw materials - The review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(19), 3185–3194. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>
- Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmassi, B., & Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture*, 13(7), 1279. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071279>
- Filidou, E., Kandilogiannakis, L., Shrewsbury, A., Kolios, G., & Kotzampassi, K. (2024). Probiotics: Shaping the gut immunological responses. *World Journal of Gastroenterology*, 30(15), 2096–2108. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i15.2096>
- Fuhrman, J. A. (2012). Metagenomics and its connection to microbial community organization. *F1000 Biology Reports*, 4. <https://doi.org/10.3410/B4-15>
- G. Chan-Quijano, J., L. Torres-López, K., Martínez-Rabelo, F., & B. González-Conzuelo, M. (2020). Soil contamination by petroleum in Tabasco, Mexico, and its environmental repercussions. *Gaia Scientia*, 14(3). <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2020v14n3.54490>
- Gaggia, F., Baffoni, L., & Galiano, M. (2019). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients MDPI*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- García Lucas, P., Val Lorente, M. Á., & Egea Auría, M. (2021). Disbiosis intestinal, primer nivel de medidas no farmacológicas para tratar la enfermedad. La dieta y el estrés. *Revista Sanitaria de Investigación*, 2(9).
- Garvey, W. T., Batterham, R. L., & Bhatta, M. (2022). Two-year effects of semaglutide in adults with overweight or obesity: the STEP 5 trial. *Nature Medicine*, 28, 2083–2091. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02026-4>
- Geneious Academy. (2025). In *Dotmatics* . <https://www.geneious.com>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., & Sanders, M. E. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Food Science and Technology*, 1–4. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>

- Granato, D., & Barba, F. J. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 93–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Grillo, G., & Boffa, L. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, 115, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>
- Harrison, K., & Curtin, C. (2021). Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganism MDPI*, 9(1060), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
- He, Y., Xie, Z., Zhang, H., Liebl, W., Toyama, H., & Chen, F. (2022). Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879246>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2014). *Metodología de la Investigación* (Sexta). McGrawHill.
- Hrncir, T. (2022). Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms*, 10(3), 578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030578>
- Hu, T., & Shi, S. (2022). Modulation effects of microorganisms on tea in fermentation. *Frontiers in Nutrition*, 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.931790>
- Huang, X., Xin, Y., & Lu, T. (2022). A systematic, complexity-reduction approach to dissect the kombucha tea microbiome. *ELife*, 11, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.76401>
- Iacobini, C., Pugliese, G., Blasetti Fantauzzi, C., Federici, M., & Menini, S. (2019). Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism*, 92, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>
- IDFA, International Diabetes Federation Atlas. (2021). In *IDF*. [https://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2022/01/IDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021-comprimido.pdf](https://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2022/01/IDF_Atlas_10th_Edition_2021-comprimido.pdf)
- Illumina. (2013). *16S metagenomic sequencing library preparation preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system*. Illumina MiSeq System. <https://support.illumina.com>
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Fleischer, L.-G., & Kurz, T. (2007). In Vitro Potential Antioxidant Activity of (1→3),(1→6)-β-D-Glucan and Protein Fractions from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4710–4716. <https://doi.org/10.1021/jf063209q>
- Jakubczyk, K., Kałdunska, J., & Kochman, J. (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants MDPI*, 9(447), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Jakubczyk, K., Kupnicka, P., & Melkis, K. (2022). Effects of Fermentation Time and Type of Tea on the Content of Micronutrients in Kombucha Fermented Tea. *Nutrients MDPI*, 14(4828), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu14224828>
- Jayabalan, R., Malbasa, R. V., & Loncar, E. S. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538–542. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

- Jin, X., Qiu, T., & Li, L. (2023). Pathophysiology of obesity and its associated diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(6), 2403–2424. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.012>
- Kaashyap, M., & Cohen, M. (2021). Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. *Nutrients MDPI*, 4446(13), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>
- Kaewkod, T., Boyonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganism*, 7(700), 1–5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120700>
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
- Kanurić, K. G., Milanović, S. D., Ikonić, B. B., Lončar, E. S., Iličić, M. D., Vukić, V. R., & Vukić, D. V. (2018). Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.02.002>
- Karczewski, J., Poniedziałek, B., & Adamski, Z. (2014). The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity*, 47(8). <https://doi.org/10.3109/08916934.2014.938322>
- Katz, D. L., & Doughty, K. (2011). Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(10), 2780–2785. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kim, D.-O., Weon Jeong, S., & Y. Lee, C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 321–326.
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages MDPI*, 15(6), 1–19. <https://doi.org/doi:10.3390/beverages6010015>
- Kitwetcharoen, H., Phung, L. T., & Klanrit, P. (2023). Kombucha Healthy Drink—Recent Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. *Fermentation*, 9(48), 1–6. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010048>
- Klein, S., Gastaldelli, A., & Yki-Jarvinen, H. (2022). Why Does Obesity Cause Diabetes? *Cell Metabolism*, 34, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>
- Konstantinidi, M., & Koutelidakis, A. E. (2019). Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. *Medicines MDPI*, 94(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/medicines6030094>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

- Kumar Yadav, M., Kumari, I., & Singh, B. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 505–521. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>
- Laavanya, D., & Shirkole, S. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Landis, E. A., & Fogarty, E. (2022). Microbial Diversity and Interaction Specificity in Kombucha Tea Fermentations. *MSystems*, 7(3), 1–2. <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>
- Laurey, D., & Britton, S. J. (2020). Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1–3. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Leeuwendaal, N. K., & Stanton, C. (2022). Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. *Nutrients*, 1527(14), 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu14071527>
- Lobo, C. B., Molina, R. D. I., Moreno Mochi, P., Vargas, J. M., Jure, M. Á., & Juárez Tomás, M. S. (2024). Safety attributes of *Pseudomonas* sp. P26, an environmental microorganism with potential application in contaminated environments. *Environmental Pollution*, 348, 123818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123818>
- Logan, A. C., Jacka, F. N., & Prescott, S. L. (2016). Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(2), 13. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0590-5>
- Lopez, E. S., Elufisan, T. O., Bustos, P., Charles, C. P. M., Mendoza-Herrera, A., & Guo, X. (2022). Complete Genome Report of a Hydrocarbon-Degrading *Sphingobium yanoikuyae* S72. *Applied Sciences*, 12(12), 6201. <https://doi.org/10.3390/app12126201>
- Ma, L., Tu, H., & Chen, T. (2023). Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(2), 291. <https://doi.org/10.3390/nu15020291>
- Mariana, F. F., Michele, B. M., & Caroline, I. K. (2022). Effect of freeze-dried kombucha culture on microbial composition and assessment of metabolic dynamics during fermentation. *Food Microbiology*, 101(103889), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103889>
- Max, B. L., & Mashauri, H. L. (2024). Economic priorities over population health: A political dilemma in addressing noncommunicable diseases in developing countries. *Health Science Reports*, 7(3). <https://doi.org/10.1002/hsr2.1974>
- Mayorgas, A., Dotti, I., & Salas, A. (2021). Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(5). <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000188>
- Mi-Hyang, J., & Sang-Hyun, I. (2023). Obesity-related hypertension and chronic kidney disease: from evaluation to management. *Kidney Res Clin Pract*, 42(4), 431–444. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.23.072>
- Milani, C., Duranti, S., & Bottacin, F. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>
- Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology*, 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>

- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., & Lindström, K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(3), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
- Murota, K., & Nakamura, Y. (2018). Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(4), 600–606. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>
- Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- NMX-F-102-S. (1978). NMX-F-102-S-1978. In *Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas*. <https://studylib.es/doc/6078649/nmx-f-066-s-1978.-determinación-de-cenizas-en-alimentos>
- NMX-FF-010. (1982). NMX-FF-010-1982. In *Productos Alimenticios no Industrializados, para uso Humano-Fruta Fresca- Determinación de Acidez Titulable Método-Potenciométrico*. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/1982/nmx-ff-010-1982.pdf>
- Nnummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76(4), 8–11.
- Nyhan, L. M., Lynch, K. M., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2022). Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73–103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>
- Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. *Fermentation MDPI*, 9(472), 1–13. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(91), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- OMS. (2023). In *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
- OMS. (2024). In *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- ONU. (2015). In *Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Ordoñez-Araque, R., Lopez-Cortez, A., Casa-Lopez, F., Landines-Vera, E., & Fuentes, E. (2020). Análisis de cadmio, plomo, níquel y arsénico en plantas de cacao y derivados: Industria Alimentaria. *CienciaAmérica*, 9(4), 107–114. <https://doi.org/10.33210/ca.v9i4.351>
- Parvanova, A., Reseghetti, E., & Abbate, M. (2024). Mechanisms and treatment of obesity-related hypertension—Part 1: Mechanisms. *Clinical Kidney Journal*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfad282>



- Pérez Muñoz, Y., López Martínez, S., & Rodríguez Luna, A. R. (2019). Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*, 5(15), 134–152.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(86). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Phung, L. T., Kitwetcharoen, H., & Chamnipa, N. (2023). Changes in the chemical compositions and biological properties of kombucha beverages made from black teas and pineapple peels and cores. *Scientific Reports*, 13(7859), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34954-7>
- Platzer, M., Kiese, S., & Herfellner, T. (2021). How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? *Antioxidants*, 811(10), 1–3. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>
- Qi Chong, A., & Wen La, S. (2023). Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. *Microorganism*, 1344(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344>
- Qiu, X., Zhang, Y., & Hong, H. (2021). Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. *AMB Express*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01189-6>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., Movassaghpour, A. A., Talebi, M., & Pourghassem Gargari, B. (2020). Modulatory role of exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* as probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 64, 103675. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103675>
- Ramachandran, S., & Fontanille, P. (2006). Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2), 185–187.
- Ramakrishnan, I. (2022). *Microbial and Chemical Profiles of Kombucha Made from Freeze-dried SCOBY*. Cornell University.
- Re, R., Pellegrini, N., & Proteggente, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharensko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V., de Vera, J.-P., & Kozyrovska, N. O. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express*, 5(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0124-5>
- Revelo, X. S., Luck, H., Winer, S., & Winer, D. A. (2014). Morphological and Inflammatory Changes in Visceral Adipose Tissue During Obesity. *Endocrine Pathology*, 25(1), 93–101. <https://doi.org/10.1007/s12022-013-9288-1>
- Reyes-Flores, S., Pereira, T. S. S., & Ramírez-Rodrigues, M. M. (2023). Optimization of Hempseed-Added Kombucha for Increasing the Antioxidant Capacity, Protein Concentration, and Total Phenolic Content. *Beverages*, 9(2), 50. <https://doi.org/10.3390/beverages9020050>
- Rivera Dommarco, J. (2018). *La obesidad en México: estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control*.

- [https://www.insp.mx/resources/images/stories/2019/Docs/190213\\_LaObesidadenMexico.pdf](https://www.insp.mx/resources/images/stories/2019/Docs/190213_LaObesidadenMexico.pdf)
- Rojo-Poveda, O., & Barbosa-Pereira, L. (2020). Cocoa Bean Shell—A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients MDPI*, 1123(12). <https://doi.org/doi:10.3390/nu12041123>
- Rosendo-Silva, D., Viana, S., & Carvalho, E. (2023). Are gut dysbiosis, barrier disruption, and endotoxemia related to adipose tissue dysfunction in metabolic disorders? Overview of the mechanisms involved. *Internal and Emergency Medicine*, 18, 1293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03262-3>
- Rowland, I., Gibson, G., & Heinken, A. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*, 57, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Ruiz, M. A., García, D. A., & Ortega, J. T. M. (2023). Análisis bromatológicos de bebidas fermentadas con alto contenido de probióticos a base de kombucha. *Jóvenes de La Ciencia*, 21, 1–7.
- SADER. (2021). In *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/cacao-cultivo-con-historia-tangible-en-nuestro-presente>
- Saimaiti, A., Huang, S.-Y., & Xiong, R.-G. (2022). Antioxidant Capacities and Polyphenol Contents of Kombucha Beverages Based on Vine Tea and Sweet Tea. *Antioxidants MDPI*, 11(1655), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox11091655>
- Sánchez, M., & Laca, A. (2023). Cocoa Bean Shell: A By-Product with High Potential for Nutritional and Biotechnological Applications. *Antioxidants*, 1028(12), 1–8. <https://doi.org/10.3390/antiox12051028>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Santiago P, R. J., Díaz, J. J., & Rodríguez, L. (2015). Usos clínicos de probióticos en disbiosis y en diarrea aguda, Asociada a antibióticos y del viajero. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78(4), 135–138.
- Santos, L. de M., Roselino, M. N., Alves, J. de C., Viana, S. N. A., dos Reis Requião, E., dos Santos Ferro, J. M. R. B., de Souza, C. O., & Ribeiro, C. D. F. (2025). Production and characterization of kombucha-like beverage by cocoa (*Theobroma cacao*) by-product as raw material. *Future Foods*, 11, 100528. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100528>
- Sato, K., Take, S., Ahmad, S. A., Gomez-Fuentes, C., & Zulkharnain, A. (2023). Carbazole Degradation and Genetic Analyses of *Sphingobium* sp. Strain BS19 Isolated from Antarctic Soil. *Sustainability*, 15(9), 7197. <https://doi.org/10.3390/su15097197>
- Saxton, S. N., Clark, B. J., Withers, S. B., Eringa, E. C., & Heagerty, A. M. (2019). Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue. *Physiological Reviews*, 99(4), 1701–1763. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2018>
- Selvaraj, S., & Gurumurthy, K. (2024). Metagenomic, organoleptic profiling, and nutritional properties of fermented kombucha tea substituted with recycled substrates. *Frontiers in Microbiology*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1367697>

- Shahbazi, H., & Hashemi Gahruie, H. (2018). Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science Nutrition*, 6, 2268–2270. <https://doi.org/10.1002/fsn3.873>
- Shariq, O. A., & McKenzie, T. J. (2020). Obesity-related hypertension: a review of pathophysiology, management, and the role of metabolic surgery. *Gland Surgery*, 9(1), 80–93. <http://dx.doi.org/10.21037/gs.2019.12.03>
- She- Ching, W., & Gow-Chin, Y. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT*, 40, 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.008>
- Shimobayashi, M., Albert, V., & Woelnerhanssen, B. (2018). Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1538–1550. <https://doi.org/10.1172/JCI96139>
- Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., & Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34, e00716. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716>
- SIAP. (2021). In *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. [https://www.ecosur.mx/los-cacaotales-de-mexico-una-oportunidad-para-conservarla-biodiversidad-importancia-biologica-y-cultural/#:~:text=Actualmente%2C%20Tabasco%20es%20el%20principal,Chiapas%20\(SIAP%2C%202021\)](https://www.ecosur.mx/los-cacaotales-de-mexico-una-oportunidad-para-conservarla-biodiversidad-importancia-biologica-y-cultural/#:~:text=Actualmente%2C%20Tabasco%20es%20el%20principal,Chiapas%20(SIAP%2C%202021))
- Silva, K. A., Uekane, T. M., & de Miranda, J. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Singh, R., Zogg, H., Wei, L., Bartlett, A., Ghoshal, U. C., Rajender, S., & Ro, S. (2021). Gut Microbial Dysbiosis in the Pathogenesis of Gastrointestinal Dysmotility and Metabolic Disorders. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 27(1), 19–34. <https://doi.org/10.5056/jnm20149>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Soto Ramírez, A. S., & Pérez Bravo, F. M. (2011). *Gaceta CCH UNAM*. <https://gaceta.cch.unam.mx/es/no-es-dieta-sino-un-estilo-de-vida>
- Sun, T. Y., Li, J. S., & Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 709–718. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2015.01.009>
- Tamang, J. P., & Shin, D.-H. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Temple, N. J. (2022). A rational definition for functional foods: A perspective. *Frontiers in Nutrition*, 1–2. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.957516>
- Tilg, H., Zmora, N., Adolph, T. E., & Elinav, E. (2020). The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 40–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0198-4>

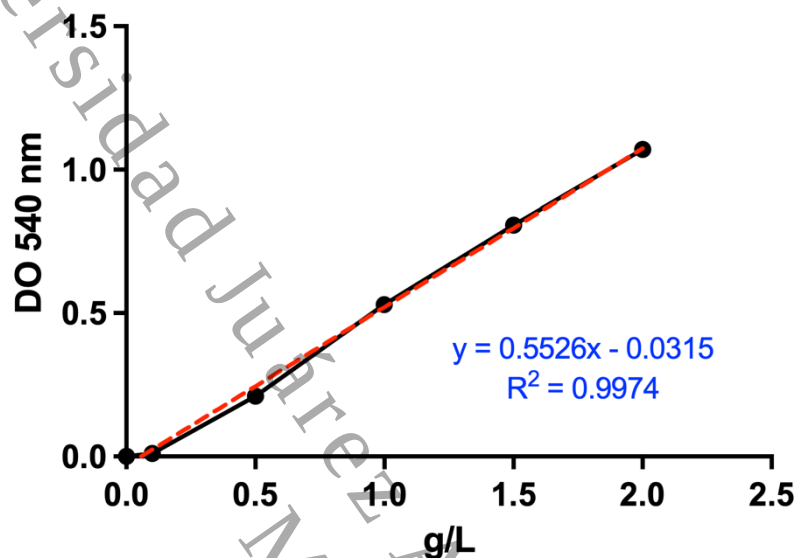
- Tran, T., Grandvalet, C., & Verdier, F. (2020). Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods MDPI*, 9(633), 1–6. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Tu, C., Tang, S., & Azi, F. (2019). Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*, 52, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.024>
- Tullio, V. (2024). Probiotic Yeasts: A Developing Reality? *Journal of Fungi*, 10(7), 489. <https://doi.org/10.3390/jof10070489>
- Tzu-Ying, S., Jia-Shiun, L., & Chinshuh, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal Food and Drug Analysis*, 23, 709–718. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.009>
- van Paassen, N. B., & Vincent, A. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*, 420(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20082222>
- Vázquez-Cabral, B. D., Larrosa-Pérez, M., & Gallegos-Infante, J. A. (2017). Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. *Chemico-Biological Interactions*, 272, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.001>
- Villarreal Soto, S. A., & Beaufort, S. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., & Bouajil, J. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–584. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., & Pace, M. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X.-X., & Mutukumira, A. N. (2022). Kombucha: Production and Microbiological Research. *Foods*, 11(21), 3456. <https://doi.org/10.3390/foods11213456>
- Wang, S., Zhang, L., & Qi, L. (2020). Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. *International Journal of Food Science and Technology*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14596>
- Weir, C. B., & Jan, A. (2021). *BMI Classification Percentile And Cut Off Points*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541070/>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 3, 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wilding, J., & Ralston, J. (2022). *World Obesity Atlas*. [https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/World\\_Obesity\\_Atlas\\_2022\\_WEB.pdf](https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/World_Obesity_Atlas_2022_WEB.pdf)
- WOA, World Obesity Atlas. (2023). In *WOF*. [https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/wof-files/World\\_Obesity\\_Atlas\\_2023\\_Report.pdf](https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/wof-files/World_Obesity_Atlas_2023_Report.pdf)
- Xia, Y., & Tan, D. (2018). Aqueous raw and ripe Pu-erh tea extracts alleviate obesity and alter cecal microbiota composition and function in diet-induced obese rats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09581-2>

- Xiao, L., Liu, Q., & Luo, M. (2021). Gut Microbiota-Derived Metabolites in Irritable Bowel Syndrome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.729346>
- Zakaria Goma, E. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

## XXV. ANEXOS

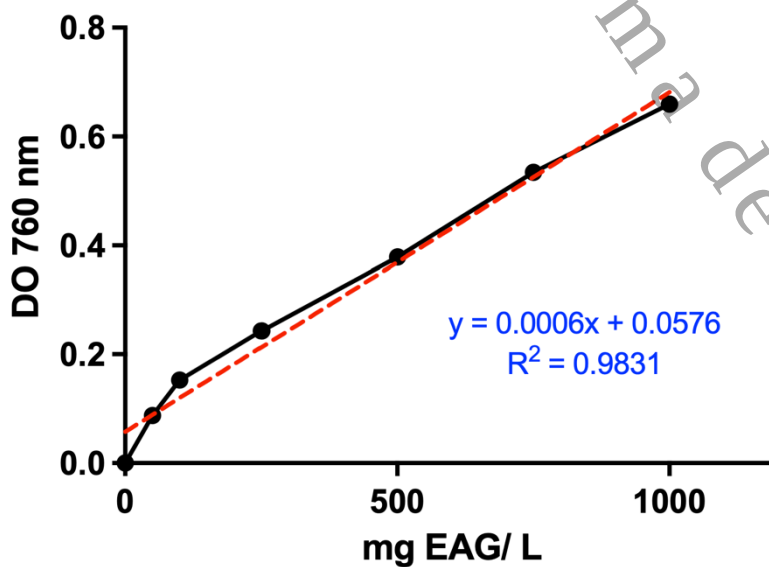
### XXV.I CURVAS DE CALIBRACIÓN

Figura 6. Contenido Total de Azúcares Reductores



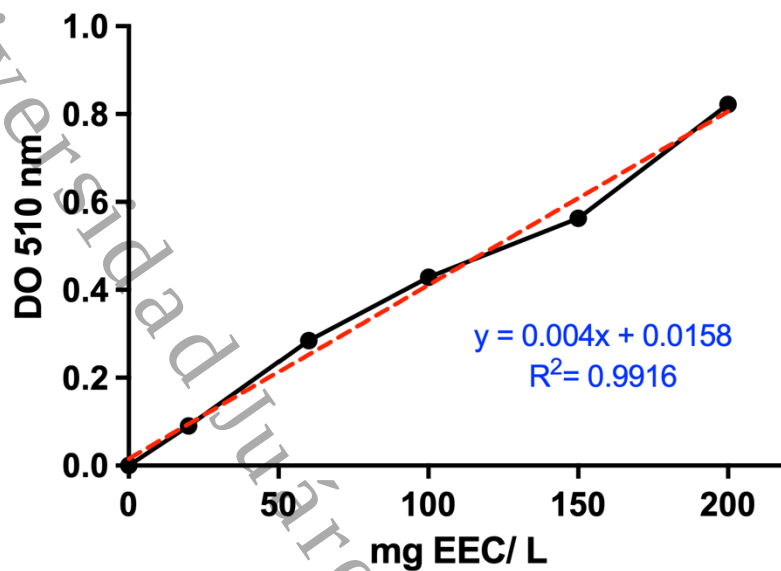
Nota. Elaboración propia.

Figura 7. Contenido Total de Polifenoles



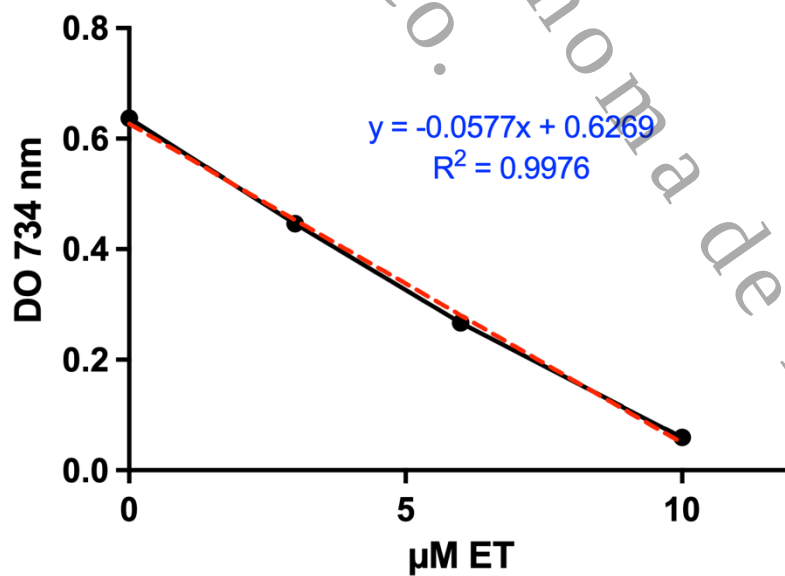
Nota. Elaboración propia.

**Figura 8.** *Contenido Total de Flavonoides*



*Nota.* Elaboración propia.

**Figura 9.** *Capacidad Antioxidante por el Método ABTS*



*Nota.* Elaboración propia.

## XXV.II ALOJAMIENTO DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

|                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Título de Tesis:</b>                       | Determinación del Microbioma y Actividad Antioxidante de una Infusión Fermentada a partir de Cascarilla de Cacao                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Autor (a) o autores (ras) de la Tesis:</b> | Q.F.B Sebastián Cervera Pereyra, Dr.José Arnold González Garrido y Dr. Carlos Javier López Victorio                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>ORCID:</b>                                 | <a href="https://orcid.org/0000-0002-7139-0929">https://orcid.org/0000-0002-7139-0929</a> , <a href="https://orcid.org/0000-0003-1135-4050">https://orcid.org/0000-0003-1135-4050</a> , <a href="https://orcid.org/0000-0002-0703-7266">https://orcid.org/0000-0002-0703-7266</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Resume n de la Tesis:</b>                  | <p>En la industria del cacao solo se aprovecha aproximadamente el 20 %, esto ha conducido a buscar alternativas para el aprovechamiento de los subproductos, estos representan aproximadamente el 80 % del fruto que poseen propiedades beneficiosas para la salud. Este trabajo tuvo como objetivo elaborar y caracterizar una bebida funcional a partir del fermento de infusión de cascarilla de semilla de cacao (CSC). Al analizar el contenido de metales pesados con el fin de evaluar la seguridad del sustrato, los resultados indican que no se detectaron niveles de arsénico, plomo ni cadmio en el sustrato de CSC; sin embargo, se identificó la presencia de cobre dentro de los límites permisibles (&lt;15 mg/kg), esto significa, el sustrato no representa riesgo para la salud. Los resultados muestran que la fermentación en el día seis presenta la mayor actividad y capacidad antioxidante, esto se ha asociado al contenido de polifenoles y flavonoides totales, asimismo la secuenciación metagenómica de la región intersecuencia ITS y del gen ARNr 16s, identificó y determinó la abundancia de microorganismos con potencial probiótico como los géneros de hongos <i>Brettanomyces</i> (75.15 %) y <i>Pichia</i> (15.96 %), y los géneros de bacterias fueron <i>Acetobacter</i> (13.28 %), <i>Komagataeibacter</i> (5.21 %), lo que permite posicionar este fermento como una bebida funcional. En este sentido, el consumo del fermento de infusión de cascarilla de semilla cacao tiene beneficios para la salud, además de contribuir disminuyendo el impacto de desechos agroindustriales. Cabe destacar que se identificó <i>Sphingobium</i> (0.78 %) un género bacteriano que no ha sido reportado antes en estos fermentos.</p> |



|                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Palabras<br/>claves<br/>de la<br/>Tesis:</b> | Actividad antioxidante, Subproducto del cacao, Bebida funcional, Metagenómica, Probióticos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Referencias<br/>citadas:</b>                 | <p>Adabel González-Alejo, F., Barajas-Fernández, J., &amp; García-Alamilla, P. (2019). Extraction of soluble compounds from cocoa shell with supercritical CO<sub>2</sub>. A methylxantines and fat case Extracción de compuestos solubles de la cascarilla de cacao con CO<sub>2</sub> supercrítico. Caso de metilxantinas y grasa. <a href="https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1073">https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1073</a></p> <p>Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., &amp; Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Trends in Food Science &amp; Technology, 75, 105–114. <a href="https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009">https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009</a></p> <p>Ahmed, R. F., Hikal, M. S., &amp; Abou-Taleb, K. A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. Annals of Agricultural Sciences, 65, 35–41. <a href="https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.04.001">https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.04.001</a></p> <p>Al Bander, Z., Nitert, M. D., Mousa, A., &amp; Naderpoor, N. (2020). The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(20), 7618. <a href="https://doi.org/10.3390/ijerph17207618">https://doi.org/10.3390/ijerph17207618</a></p> <p>Alencar Silva, K., Matsue Uekane, T., &amp; de Miranda, J. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. <a href="https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032">https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032</a></p> <p>Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjärv, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., Kütt, M.-L., &amp; Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. International Journal of Food Microbiology, 373, 109715. <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715">https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715</a></p> <p>Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. In Babraham Institute. <a href="https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/">https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</a></p> <p>Antolak, H., Piechota, D., &amp; Kucharska, A. (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). Antioxidants, 10(1541), 1–8. <a href="https://doi.org/10.3390/antiox10101541">https://doi.org/10.3390/antiox10101541</a></p> |

Areal-Hermida, L., Coelho, P., Pichardo-Gallardo, Á., Prudêncio, C., & Sieiro, C. (2024). Potential probiotic and functional properties of *Brettanomyces* strains isolated from kombucha tea. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1415616>

Arıkan, M., Mitchell, A. L., & Finn, R. D. (2020). Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of Food Science*, 85(2), 455–463. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14992>

Assa, A., Noor, A., Yunus, M. R., Misnawi, & Djide, M. N. (2018). Heavy metal concentrations in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) originating from East Luwu, South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 979, 012011. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/979/1/012011>

Ayed, L., Abid, S. Ben, & Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Ann Microbiol*, 67, 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>

Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645–656. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>

Baliyan, S., Mukherjee, R., & Priyadarshin, A. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules MDPI*, 27(1326), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>

Bandopadhyay, P., & Ganguly, D. (2022). Gut dysbiosis and metabolic diseases (pp. 153–174). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2022.06.031>

Batallas Valarezo, M., Preciado Alvarado, M., & Pesantez Franco, F. (2021). Evaluación de cadmio y plomo en almendras de cacao por espectroscopia de absorción atómica. *CIENCIA UNEMI*, 14(37), 49–59. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss37.2021pp49-59p>

Bekir, J., Mars, M., & Souchard, J. P. (2013). Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 470–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.036>

Belizário, J. E., & Faintuch, J. (2018). Microbiome and Gut Dysbiosis. *Experientia Supplementum*, 109, 459–476. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13)

Bors, W., Heller, W., & Michel, C. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343–355. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I)

Brglez Mojzer, E., & Knez Hrnčič, M. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules MDPI*, 901(21), 1–3. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>

Busebee, B., Ghusn, W., & Cifuentes, L. (2023). Obesity: A Review of Pathophysiology and Classification. *Mayo Clinic Proceedings*, 98(12), 1842–1857. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2023.05.026>

Cardoso, R. R., Neto, R. O., & dos Santos D’Almeida, C. T. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., & Chatzinotas, A. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

Chong, A. Q., & La, S. W. (2023). Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. *Microorganism*, 1344(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344>

da Silva Vale, A., Venturim, B. C., da Silva Rocha, A. R. F., Martin, J. G. P., Maske, B. L., Balla, G., De Dea Lindner, J., Soccol, C. R., & de Melo Pereira, G. V. (2023). Exploring Microbial Diversity of Non-Dairy Fermented Beverages with a Focus on Functional Probiotic Microorganisms. *Fermentation*, 9(6), 496. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060496>

de Miranda, J., & Fernandes Ruiz, L. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87, 503–508. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>

de Oliveira Duarte, F. A., Ramos, K. K., Gini, C., Morasi, R. M., Silva, N. C. C., & Efraim, P. (2024). Microbiological characterization of kombucha and biocellulose film produced with black tea and cocoa bean shell infusion. *Food Research International*, 190, 114568. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114568>

de Oliveira, Í. A. C., de Oliveira Rolim, V. A., & Lopes Gaspar, R. P. (2022). The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production. *Fermentation*, 8(185), 1–9. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>

Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., & Petito, V. (2023). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>

Dysin, A. P., Egorov, A. R., Godzishhevskaya, A. A., Kirichuk, A. A., Tskhovrebov, A. G., & Kritchenkov, A. S. (2023). Biologically Active Supplements Affecting Producer Microorganisms in Food Biotechnology: A Review. *Molecules*, 28(3), 1413. <https://doi.org/10.3390/molecules28031413>

Elshaghabee, F. M. E., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>

Emiljanowicz, K. E., & Malinowska-Pańczyk, E. (2020). Kombucha from alternative raw materials - The review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(19), 3185–3194. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>

Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmassi, B., & Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture*, 13(7), 1279. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071279>

Filidou, E., Kandilogiannakis, L., Shrewsbury, A., Kolios, G., & Kotzampassi, K. (2024). Probiotics: Shaping the gut immunological responses. *World Journal of Gastroenterology*, 30(15), 2096–2108. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i15.2096>

Fuhrman, J. A. (2012). Metagenomics and its connection to microbial community organization. *F1000 Biology Reports*, 4. <https://doi.org/10.3410/B4-15>

G. Chan-Quijano, J., L. Torres-López, K., Martínez-Rabelo, F., & B. González-Conzuelo, M. (2020). Soil contamination by petroleum in Tabasco, Mexico, and its environmental repercussions. *Gaia Scientia*, 14(3). <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2020v14n3.54490>

Gaggia, F., Baffoni, L., & Galiano, M. (2019). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients MDPI*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

García Lucas, P., Val Lorente, M. Á., & Egea Auría, M. (2021). Disbiosis intestinal, primer nivel de medidas no farmacológicas para tratar la enfermedad. La dieta y el estrés. *Revista Sanitaria de Investigación*, 2(9).

Garvey, W. T., Batterham, R. L., & Bhatta, M. (2022). Two-year effects of semaglutide in adults with overweight or obesity: the STEP 5 trial. *Nature Medicine*, 28, 2083–2091. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02026-4>

Geneious Academy. (2025). In Dotmatics . <https://www.geneious.com>

Gibson, G. R., Hutkins, R., & Sanders, M. E. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Food Science and Technology*, 1–4. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>

Granato, D., & Barba, F. J. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 93–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

Grillo, G., & Boffa, L. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, 115, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>

Harrison, K., & Curtin, C. (2021). Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganism MDPI*, 9(1060), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>

He, Y., Xie, Z., Zhang, H., Liebl, W., Toyama, H., & Chen, F. (2022). Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879246>

Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2014). *Metodología de la Investigación (Sexta)*. McGrawHill.

Hrncir, T. (2022). Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms*, 10(3), 578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030578>

Hu, T., & Shi, S. (2022). Modulation effects of microorganisms on tea in fermentation. *Frontiers in Nutrition*, 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.931790>

Huang, X., Xin, Y., & Lu, T. (2022). A systematic, complexity-reduction approach to dissect the kombucha tea microbiome. *ELife*, 11, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.76401>

Iacobini, C., Pugliese, G., Blasetti Fantauzzi, C., Federici, M., & Menini, S. (2019). Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism*, 92, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>

IDFA, International Diabetes Federation Atlas. (2021). In IDF. [https://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2022/01/IDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021-comprimido.pdf](https://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2022/01/IDF_Atlas_10th_Edition_2021-comprimido.pdf)

Illumina. (2013). 16S metagenomic sequencing library preparation preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Illumina MiSeq System. <https://support.illumina.com>

Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Fleischer, L.-G., & Kurz, T. (2007). In Vitro Potential Antioxidant Activity of (1→3),(1→6)-β-D-Glucan and Protein Fractions from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4710–4716. <https://doi.org/10.1021/jf063209q>

Jakubczyk, K., Kałdunska, J., & Kochman, J. (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants MDPI*, 9(447), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>

Jakubczyk, K., Kupnicka, P., & Melkis, K. (2022). Effects of Fermentation Time and Type of Tea on the Content of Micronutrients in Kombucha Fermented Tea. *Nutrients MDPI*, 14(4828), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu14224828>

Jayabalan, R., Malbasa, R. V., & Loncar, E. S. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538–542. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

Jin, X., Qiu, T., & Li, L. (2023). Pathophysiology of obesity and its associated diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(6), 2403–2424.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.012>

Kaashyap, M., & Cohen, M. (2021). Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. *Nutrients MDPI*, 4446(13), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>

Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganism*, 7(700), 1–5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120700>

Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>

Kanurić, K. G., Milanović, S. D., Ikonić, B. B., Lončar, E. S., Iličić, M. D., Vukić, V. R., & Vukić, D. V. (2018). Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1229–1234.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.02.002>

Karczewski, J., Poniedziałek, B., & Adamski, Z. (2014). The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity*., 47(8).  
<https://doi.org/10.3109/08916934.2014.938322>

Katz, D. L., & Doughty, K. (2011). Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(10), 2780–2785.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>

Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kim, D.-O., Weon Jeong, S., & Y. Lee, C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 321–326.

Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages MDPI*, 15(6), 1–19. <https://doi.org/doi:10.3390/beverages6010015>

Kitwetcharoen, H., Phung, L. T., & Klanrit, P. (2023). Kombucha Healthy Drink—Recent Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. *Fermentation*, 9(48), 1–6. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010048>

Klein, S., Gastaldelli, A., & Yki-Jarvinen, H. (2022). Why Does Obesity Cause Diabetes? *Cell Metabolism*, 34, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>

Konstantinidi, M., & Koutelidakis, A. E. (2019). Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. *Medicines MDPI*, 94(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/medicines6030094>

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

Kumar Yadav, M., Kumari, I., & Singh, B. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 505–521. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>

Laavanya, D., & Shirkole, S. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>

Landis, E. A., & Fogarty, E. (2022). Microbial Diversity and Interaction Specificity in Kombucha Tea Fermentations. *MSystems*, 7(3), 1–2. <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>

Laurey, D., & Britton, S. J. (2020). Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1–3. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>

Leeuwendaal, N. K., & Stanton, C. (2022). Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. *Nutrients*, 1527(14), 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu14071527>

Lobo, C. B., Molina, R. D. I., Moreno Mochi, P., Vargas, J. M., Jure, M. Á., & Juárez Tomás, M. S. (2024). Safety attributes of *Pseudomonas* sp. P26, an environmental



microorganism with potential application in contaminated environments. *Environmental Pollution*, 348, 123818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123818>

Logan, A. C., Jacka, F. N., & Prescott, S. L. (2016). Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(2), 13. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0590-5>

Lopez, E. S., Elufisan, T. O., Bustos, P., Charles, C. P. M., Mendoza-Herrera, A., & Guo, X. (2022). Complete Genome Report of a Hydrocarbon-Degrading *Sphingobium yanoikuyae* S72. *Applied Sciences*, 12(12), 6201. <https://doi.org/10.3390/app12126201>

Ma, L., Tu, H., & Chen, T. (2023). Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(2), 291. <https://doi.org/10.3390/nu15020291>

Mariana, F. F., Michele, B. M., & Caroline, I. K. (2022). Effect of freeze-dried kombucha culture on microbial composition and assessment of metabolic dynamics during fermentation. *Food Microbiology*, 101(103889), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103889>

Max, B. L., & Mashauri, H. L. (2024). Economic priorities over population health: A political dilemma in addressing noncommunicable diseases in developing countries. *Health Science Reports*, 7(3). <https://doi.org/10.1002/hsr2.1974>

Mayorgas, A., Dotti, I., & Salas, A. (2021). Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(5). <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000188>

Mi-Hyang, J., & Sang-Hyun, I. (2023). Obesity-related hypertension and chronic kidney disease: from evaluation to management. *Kidney Res Clin Pract*, 42(4), 431–444. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.23.072>

Milani, C., Duranti, S., & Bottacin, F. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology*, 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>

Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., & Lindström, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium*–

Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(3), 208–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>

Murota, K., & Nakamura, Y. (2018). Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(4), 600–606. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>

Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>

Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>

NMX-F-102-S. (1978). NMX-F-102-S-1978. In *Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas*.  
<https://studylib.es/doc/6078649/nmx-f-066-s-1978.-determinación-de-cenizas-en-alimentos>

NMX-FF-010. (1982). NMX-FF-010-1982. In *Productos Alimenticios no Industrializados, para uso Humano-Fruta Fresca- Determinación de Acidez Titulable Método-Potenciométrico*. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/1982/nmx-ff-010-1982.pdf>

Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76(4), 8–11.

Nyhan, L. M., Lynch, K. M., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2022). Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73–103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>

Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. *Fermentation MDPI*, 9(472), 1–13. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>

Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(91), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>

OMS. (2023). In Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>

OMS. (2024). In Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

ONU. (2015). In Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

Ordoñez-Araque, R., Lopez-Cortez, A., Casa-Lopez, F., Landines-Vera, E., & Fuentes, E. (2020). Análisis de cadmio, plomo, níquel y arsénico en plantas de cacao y derivados: Industria Alimentaria. *CienciAmérica*, 9(4), 107–114. <https://doi.org/10.33210/ca.v9i4.351>

Parvanova, A., Reseghetti, E., & Abbate, M. (2024). Mechanisms and treatment of obesity-related hypertension—Part 1: Mechanisms. *Clinical Kidney Journal*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfad282>

Pérez Muñoz, Y., López Martínez, S., & Rodríguez Luna, A. R. (2019). Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*, 5(15), 134–152.

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(86). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>

Phung, L. T., Kitwetcharoen, H., & Chamnipa, N. (2023). Changes in the chemical compositions and biological properties of kombucha beverages made from black teas and pineapple peels and cores. *Scientific Reports*, 13(7859), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34954-7>

Platzer, M., Kiese, S., & Herfellner, T. (2021). How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? *Antioxidants*, 811(10), 1–3. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>

Qi Chong, A., & Wen La, S. (2023). Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. *Microorganism*, 1344(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344>

Qiu, X., Zhang, Y., & Hong, H. (2021). Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. *AMB Express*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01189-6>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., Movassaghpour, A. A., Talebi, M., & Pourghassem Gargari, B. (2020). Modulatory role of exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* as probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 64, 103675. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103675>

Ramachandran, S., & Fontanille, P. (2006). Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2), 185–187.

Ramakrishnan, I. (2022). Microbial and Chemical Profiles of Kombucha Made from Freeze-dried SCOBY. Cornell University.

Re, R., Pellegrini, N., & Proteggente, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–2237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharenko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V, de Vera, J.-P., & Kozyrovska, N. O. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express*, 5(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0124-5>

Revelo, X. S., Luck, H., Winer, S., & Winer, D. A. (2014). Morphological and Inflammatory Changes in Visceral Adipose Tissue During Obesity. *Endocrine Pathology*, 25(1), 93–101. <https://doi.org/10.1007/s12022-013-9288-1>

Reyes-Flores, S., Pereira, T. S. S., & Ramírez-Rodrigues, M. M. (2023). Optimization of Hempseed-Added Kombucha for Increasing the Antioxidant Capacity, Protein Concentration, and Total Phenolic Content. *Beverages*, 9(2), 50. <https://doi.org/10.3390/beverages9020050>

Rivera Dommarco, J. (2018). La obesidad en México: estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control.

[https://www.insp.mx/resources/images/stories/2019/Docs/190213\\_LaObesidadenMexico.pdf](https://www.insp.mx/resources/images/stories/2019/Docs/190213_LaObesidadenMexico.pdf)

Rojo-Poveda, O., & Barbosa-Pereira, L. (2020). Cocoa Bean Shell—A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients MDPI*, 1123(12). <https://doi.org/doi:10.3390/nu12041123>

Rosendo-Silva, D., Viana, S., & Carvalho, E. (2023). Are gut dysbiosis, barrier disruption, and endotoxemia related to adipose tissue dysfunction in metabolic disorders? Overview of the mechanisms involved. *Internal and Emergency Medicine*, 18, 1293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03262-3>

Rowland, I., Gibson, G., & Heinken, A. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*, 57, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>

Ruiz, M. A., García, D. A., & Ortega, J. T. M. (2023). Análisis bromatológicos de bebidas fermentadas con alto contenido de probióticos a base de kombucha. *Jóvenes de La Ciencia*, 21, 1–7.

SADER. (2021). In Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/cacao-cultivo-con-historia-tangible-en-nuestro-presente>

Saimaiti, A., Huang, S.-Y., & Xiong, R.-G. (2022). Antioxidant Capacities and Polyphenol Contents of Kombucha Beverages Based on Vine Tea and Sweet Tea. *Antioxidants MDPI*, 11(1655), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox11091655>

Sánchez, M., & Laca, A. (2023). Cocoa Bean Shell: A By-Product with High Potential for Nutritional and Biotechnological Applications. *Antioxidants*, 1028(12), 1–8. <https://doi.org/10.3390/antiox12051028>

Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>

Santiago P, R. J., Díaz, J. J., & Rodríguez, L. (2015). Usos clínicos de probióticos en disbiosis y en diarrea aguda, Asociada a antibióticos y del viajero. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78(4), 135–138.

Santos, L. de M., Roselino, M. N., Alves, J. de C., Viana, S. N. A., dos Reis Requião, E., dos Santos Ferro, J. M. R. B., de Souza, C. O., & Ribeiro, C. D. F.

(2025). Production and characterization of kombucha-like beverage by cocoa (*Theobroma cacao*) by-product as raw material. *Future Foods*, 11, 100528. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100528>

Sato, K., Take, S., Ahmad, S. A., Gomez-Fuentes, C., & Zulkharnain, A. (2023). Carbazole Degradation and Genetic Analyses of *Sphingobium* sp. Strain BS19 Isolated from Antarctic Soil. *Sustainability*, 15(9), 7197. <https://doi.org/10.3390/su15097197>

Saxton, S. N., Clark, B. J., Withers, S. B., Eringa, E. C., & Heagerty, A. M. (2019). Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue. *Physiological Reviews*, 99(4), 1701–1763. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2018>

Selvaraj, S., & Gurumurthy, K. (2024). Metagenomic, organoleptic profiling, and nutritional properties of fermented kombucha tea substituted with recycled substrates. *Frontiers in Microbiology*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1367697>

Shahbazi, H., & Hashemi Gahruei, H. (2018). Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science Nutrition*, 6, 2268–2270. <https://doi.org/10.1002/fsn3.873>

Shariq, O. A., & McKenzie, T. J. (2020). Obesity-related hypertension: a review of pathophysiology, management, and the role of metabolic surgery. *Gland Surgery*, 9(1), 80–93. <http://dx.doi.org/10.21037/gs.2019.12.03>

She- Ching, W., & Gow-Chin, Y. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT*, 40, 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.008>

Shimobayashi, M., Albert, V., & Woelnerhanssen, B. (2018). Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1538–1550. <https://doi.org/10.1172/JCI96139>

Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., & Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34, e00716. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716>

SIAP. (2021). In Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.ecosur.mx/los-cacaotales-de-mexico-una-oportunidad-para->

conservarla-biodiversidad-importancia-biologica-y-cultural/#:~:text=Actualmente%2C%20Tabasco%20es%20el%20principal,Chiapas%20(SIAP%2C%202021).

Silva, K. A., Uekane, T. M., & de Miranda, J. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>

Singh, R., Zogg, H., Wei, L., Bartlett, A., Ghoshal, U. C., Rajender, S., & Ro, S. (2021). Gut Microbial Dysbiosis in the Pathogenesis of Gastrointestinal Dysmotility and Metabolic Disorders. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 27(1), 19–34. <https://doi.org/10.5056/jnm20149>

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Soto Ramírez, A. S., & Pérez Bravo, F. M. (2011). *Gaceta CCH UNAM*. <https://gaceta.cch.unam.mx/es/no-es-dieta-sino-un-estilo-de-vida>

Sun, T. Y., Li, J. S., & Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 709–718. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2015.01.009>

Tamang, J. P., & Shin, D.-H. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>

Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>

Temple, N. J. (2022). A rational definition for functional foods: A perspective. *Frontiers in Nutrition*, 1–2. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.957516>

Tilg, H., Zmora, N., Adolph, T. E., & Elinav, E. (2020). The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 40–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0198-4>

Tran, T., Grandvalet, C., & Verdier, F. (2020). Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods MDPI*, 9633(9), 1–6. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>

Tu, C., Tang, S., & Azi, F. (2019). Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*, 52, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.024>

Tullio, V. (2024). Probiotic Yeasts: A Developing Reality? *Journal of Fungi*, 10(7), 489. <https://doi.org/10.3390/jof10070489>

Tzu-Ying, S., Jia-Shiun, L., & Chinshuh, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal Food and Drug Analysis*, 23, 709–718. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.009>

van Paassen, N. B., & Vincent, A. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*, 420(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20082222>

Vázquez-Cabral, B. D., Larrosa-Pérez, M., & Gallegos-Infante, J. A. (2017). Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. *Chemico-Biological Interactions*, 272, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.001>

Villarreal Soto, S. A., & Beaufort, S. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., & Bouajil, J. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–584. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., & Pace, M. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>

Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X.-X., & Mutukumira, A. N. (2022). Kombucha: Production and Microbiological Research. *Foods*, 11(21), 3456. <https://doi.org/10.3390/foods11213456>



Wang, S., Zhang, L., & Qi, L. (2020). Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. *International Journal of Food Science and Technology*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14596>

Weir, C. B., & Jan, A. (2021). BMI Classification Percentile And Cut Off Points. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541070/>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 3, 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Wilding, J., & Ralston, J. (2022). World Obesity Atlas. [https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/World\\_Obesity\\_Atlas\\_2022\\_WEB.pdf](https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/World_Obesity_Atlas_2022_WEB.pdf)

WOA, World Obesity Atlas. (2023). In WOF. [https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/wof-files/World\\_Obesity\\_Atlas\\_2023\\_Report.pdf](https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/wof-files/World_Obesity_Atlas_2023_Report.pdf)

Xia, Y., & Tan, D. (2018). Aqueous raw and ripe Pu-erh tea extracts alleviate obesity and alter cecal microbiota composition and function in diet-induced obese rats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09581-2>

Xiao, L., Liu, Q., & Luo, M. (2021). Gut Microbiota-Derived Metabolites in Irritable Bowel Syndrome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.729346>

Zakaria Gomaa, E. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)



*“Donde hacer ciencia, es Básico”*