



Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo

PIDCB

Programa institucional de doctorado en ciencias Biológicas

Área temática: Biotecnología alimentaria

Facultad de Químico Farmacobiología

T e s i s

*“Elaboración y caracterización de un apósito de celulosa bacteriana
como sistema de administración tópica de antibióticos”*

Que presenta:

M.C. Rafael Contreras Chávez

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directora de tesis: Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Miembros del comité tutorial:

Dr. Juan José Alvarado Gil

Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert

Dra. María Carmen Bartolomé Camacho

Morelia, Michoacán, enero 2026.



AGRADECIMIENTOS

Principalmente, agradezco profundamente **a mi familia**, por cuidarme, protegerme y enseñarme tanto a lo largo de mi vida. Todo lo que soy se lo debo a ustedes; no pude haber crecido en un mejor hogar.

A mis asesores, la Dra. Ma. Guadalupe y el Dr. Héctor, por confiar en mí desde el primer día. Su guía, apoyo y ejemplo como grandes profesores y amigos fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de mi Comité de Tesis, el Dr. Juan José Alvarado Gil, la Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert y la Dra. María Carmen Bartolomé Camacho, por compartir generosamente su conocimiento, experiencia y valiosas observaciones.

Al **CONACYT**, por otorgarme la beca y proporcionar los medios necesarios para la realización de este proyecto.

A mi querida **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** (UMSNH), mi *alma mater*, por brindarme las instalaciones y el espacio académico donde se forjó gran parte de mi formación profesional.

Al **CINVESTAV**, unidades Querétaro y Mérida, por el invaluable apoyo técnico y académico proporcionado durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros del **LIDA**, por convertirse en mi familia científica y hacer del laboratorio un espacio de aprendizaje y colaboración.

Finalmente, **a mis amigos de toda la vida**, por cada momento compartido; valoro su amistad como uno de los tesoros más grandes de mi vida.



Tabla de contenido

I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. GENERAL ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
Perspectiva Histórica	5
Funciones Esenciales de los Apósitos	5
Clasificación de Apósitos	6
Limitaciones de los Apósitos Convencionales	6
Celulosa Bacteriana	7
Kombucha	8
Aplicaciones y avances en apósitos.....	10
Justificación del Proyecto	12
IV. HIPÓTESIS.....	13
V. OBJETIVOS.....	14
General	14
Específicos.....	14
VI. RESULTADOS	15
VI.I. Capítulo 1: Optimización por superficie de respuesta de la fermentación de kombucha para mejorar el rendimiento de celulosa bacteriana y sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y estructurales	15
Resumen	15
Abstract	16
Introducción.....	16
Materiales y métodos	19
Resultados y discusión	24
Literatura citada	46
VI. II. Capítulo 2: Estudios preliminares del proceso fermentativo, análisis cromatográfico y aislamiento microbiológico de la kombucha	56
Resumen	56
Abstract	56



Introducción.....	57
Materiales y métodos	58
Análisis estadístico.....	60
Resultados	61
Conclusión	67
Literatura citada	73
VI. III. Capítulo 3:Desarrollo y caracterización de apósitos basados en celulosa bacteriana funcionalizada como vehículo de liberación tópica de antibióticos	76
Resumen	76
Abstract	76
Introducción.....	77
Materiales y métodos	78
Análisis estadístico.....	80
Resultados	80
Conclusión	97
Literatura citada	97
VI. IV. Capítulo 4: preferencia del consumidor y análisis de estabilidad acelerada de apósitos elaborados a partir de celulosa bacteriana	101
Resumen	101
Abstract	101
Introducción.....	102
Materiales y métodos	103
Resultados	105
Conclusión	113
Literatura citada	114
VII. DISCUSIÓN GENERAL	117
VIII. PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES	119
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	120

I. RESUMEN GENERAL

La presente investigación se centra en la elaboración y caracterización de apósitos de celulosa bacteriana obtenida a partir de la fermentación de Kombucha, con el objetivo de explorar su potencial como sistema de administración tópica de antibióticos. La investigación propuso una alternativa ecológica y sostenible frente a los apósitos sintéticos convencionales, que suelen tener un impacto ambiental considerable debido al uso de plásticos no biodegradables. En lugar de estos materiales sintéticos, la celulosa bacteriana se presentó como un biopolímero altamente biocompatible y biodegradable, capaz de ofrecer propiedades como la retención de agua y una estructura porosa que facilita la cicatrización de heridas.

Además se abordó el proceso histórico del tratamiento de heridas, destacando la evolución de los métodos tradicionales hacia los apósitos modernos que promueven la curación en un ambiente húmedo. A lo largo de los años, la investigación ha llevado al desarrollo de apósitos más sofisticados. En este contexto, la celulosa bacteriana emergió como un material prometedor debido a sus excelentes propiedades mecánicas y fisicoquímicas, lo que la posicionó como una alternativa viable en el ámbito científico.

La investigación profundizó en la optimización del proceso de fermentación de Kombucha, que permitió la producción de celulosa bacteriana. A través de un diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta, se optimizaron los parámetros de fermentación, como el volumen de té inicial, la concentración de glucosa y la temperatura. Como resultado, se obtuvo un rendimiento óptimo de 65.14 g/L de SCOBY y 2.70 g/L de celulosa bacteriana (CB), superando los rendimientos reportados previamente en estudios similares. En cuanto a las propiedades mecánicas de la CB, se logró una resistencia a la tracción de 4 MPa y una elongación de 3.8%. La capacidad de hinchamiento fue de 400%, y la permeabilidad al vapor de agua (WVP) fue de $27 \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$.

En términos de funcionalización, los apósitos cargados con antibióticos como el ciprofloxacino y la cefatoxima mostraron una liberación del fármaco, lo que se tradujo en una reducción significativa de la carga bacteriana en los modelos de prueba. Esto indicó que los apósitos tienen el potencial biomedico. Las pruebas de estabilidad acelerada también demostraron que los apósitos mantuvieron sus propiedades

estructurales y funcionales bajo condiciones de alta temperatura y humedad, lo que validó su viabilidad para aplicaciones clínicas. En particular, se evidenció que los apósitos basados en celulosa bacteriana podían mantener la integridad mecánica y la capacidad de liberación de antibióticos incluso tras exposiciones prolongadas a condiciones adversas, lo que los hace adecuados para su uso en entornos hospitalarios. En cuanto a la preferencia del consumidor, se realizó un análisis sobre la aceptación de los apósitos basados en CB en comparación con los apósitos convencionales. Los resultados mostraron que un alto porcentaje de los consumidores prefirió los apósitos basados en debido a su mayor confort, flexibilidad y capacidad de adaptación a la piel.

Finalmente, la investigación también destacó la ventaja de utilizar Kombucha como fuente de celulosa bacteriana, ya que el proceso de fermentación no requiere condiciones especiales ni equipos costosos. El uso de té y azúcar como sustratos es económico y accesible, y la posibilidad de emplear subproductos de la industria agroalimentaria, como suero de leche y jugos residuales, para la producción de celulosa bacteriana contribuyó a la sostenibilidad del proceso.

En conclusión, los resultados de la tesis demostraron que la celulosa bacteriana obtenida de Kombucha tiene propiedades físico-químicas y mecánicas favorables para su uso en apósitos, con la capacidad de liberar antibióticos. El proceso de fermentación optimizado resultó en una producción eficiente de celulosa bacteriana, lo que la convierte en una alternativa ecológica y biocompatible frente a los apósitos sintéticos convencionales.

Palabras clave: Apósitos sintéticos, Ambiente húmedo, Antibióticos

II. GENERAL ABSTRACT

This research focuses on the development and characterization of bacterial cellulose dressings obtained from the fermentation of Kombucha, with the aim of exploring its potential as a topical antibiotic delivery system. The study proposed an ecological and sustainable alternative to conventional synthetic dressings, which often have a significant environmental impact due to the use of non-biodegradable plastics. Instead of these synthetic materials, bacterial cellulose was presented as a highly biocompatible and biodegradable biopolymer, capable of offering properties such as water retention and a porous structure that facilitates wound healing.

Additionally, the historical process of wound treatment was addressed, highlighting the evolution from traditional methods to modern dressings that promote healing in a moist environment. Over the years, research has led to the development of more sophisticated dressings. In this context, bacterial cellulose emerged as a promising material due to its excellent mechanical and physicochemical properties, positioning it as a viable alternative in the scientific field.

The study delved into optimizing the Kombucha fermentation process, which enabled the production of bacterial cellulose. Through an experimental design based on response surface methodology, fermentation parameters such as the initial tea volume, glucose concentration, and temperature were optimized. As a result, an optimal yield of 65.14 g/L of SCOBY and 2.70 g/L of bacterial cellulose (BC) was obtained, surpassing previously reported yields in similar studies. Regarding the mechanical properties of BC, a tensile strength of 4 MPa and an elongation of 3.8% were achieved. The swelling capacity was 400%, and the water vapor permeability (WVP) was $27 \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$.

In terms of functionalization, antibiotic-loaded dressings such as ciprofloxacin and cefotaxime showed drug release, which translated into a significant reduction in bacterial load in the test models. This indicated that the dressings have biomedical potential. Accelerated stability tests also demonstrated that the dressings maintained their structural and functional properties under high temperature and humidity conditions, validating their viability for clinical applications. In particular, it was evident that bacterial cellulose-based dressings could maintain mechanical integrity and antibiotic release capacity even after prolonged exposure to adverse conditions, making them suitable for use in hospital environments.



Regarding consumer preference, an analysis was conducted on the acceptance of BC-based dressings compared to conventional dressings. The results showed that a high percentage of consumers preferred the BC-based dressings due to their greater comfort, flexibility, and adaptability to the skin.

Finally, the research also highlighted the advantage of using Kombucha as a source of bacterial cellulose, as the fermentation process does not require special conditions or expensive equipment. The use of tea and sugar as substrates is economical and accessible, and the possibility of employing by-products from the agro-industrial industry, such as whey and residual juices, for bacterial cellulose production contributed to the sustainability of the process.

In conclusion, the results of the thesis demonstrated that bacterial cellulose obtained from Kombucha has favorable physicochemical and mechanical properties for use in dressings, with the ability to release antibiotics. The optimized fermentation process resulted in efficient bacterial cellulose production, making it an ecological and biocompatible alternative to conventional synthetic dressings.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Perspectiva Histórica

La historia del cuidado de heridas refleja el avance de la ciencia médica. En las civilizaciones antiguas, el tratamiento era empírico, utilizando mezclas de fibras vegetales, grasa y miel, que aprovechaban sin conocimiento las propiedades antimicrobianas de estos ingredientes. En la Grecia clásica, Hipócrates promovió la limpieza de las heridas con vino o vinagre, sentando las bases de la asepsia (Martínez-Correa *et al.*, 2020). Durante siglos, prácticas como emplastos y cataplasmas, basados en hierbas y aceites, eran utilizadas para proteger las heridas y absorber el exudado (Martínez-Correa *et al.*, 2020).

El siglo XX trajo innovaciones significativas, como el apósito adhesivo creado en 1920 por Earle Dickinson, lo que mejoró la accesibilidad al cuidado de heridas (Martínez-Correa *et al.*, 2020). Sin embargo, el hallazgo más transformador fue el principio de la “cura en ambiente húmedo”, desarrollado por George Winter en la década de 1960. Sus estudios demostraron que las heridas mantenidas en un ambiente húmedo cicatrizaban más rápido que las que se dejaban secar al aire, lo que desmintió el mito de que las heridas debían airearse para formar costra. La costra, en realidad, dificulta la migración de queratinocitos, mientras que un ambiente húmedo facilita este proceso crucial para la cicatrización (Vowden *et al.*, 2017; García *et al.*, 2021). Este cambio conceptual de la cura seca a la húmeda marcó la transición hacia una estrategia activa de modulación del microambiente de la herida, base sobre la que se desarrollan los apósitos avanzados contemporáneos.

Funciones Esenciales de los Apósitos

El apósito ideal ha evolucionado de ser una simple cobertura a un dispositivo terapéutico multifuncional, cuya principal función es crear y mantener un microambiente óptimo en la interfaz con la piel. Esto facilita la migración celular, la angiogénesis y la acción de los factores de crecimiento (Liu *et al.*, 2024; Moradifar *et al.*, 2025). Este ambiente debe mantener un equilibrio adecuado de humedad para prevenir la maceración de la piel y manejar el exceso de exudado (García *et al.*, 2021;

Selvaraj *et al.*, 2024). Además, el apósito actúa como una barrera selectiva, protegiendo contra microorganismos mientras permite el intercambio de gases esenciales como oxígeno y vapor de agua (Moradifar *et al.*, 2025). En cuanto a la mecánica, debe ser flexible y adaptable sin restringir el movimiento, y permitir una retirada atraumática para evitar dañar el tejido en regeneración (Selvaraj *et al.*, 2024). Finalmente, debe ser biocompatible, no tóxico ni alergénico, para evitar respuestas inflamatorias adversas (Liu *et al.*, 2024).

Clasificación de Apósitos

Un apósito es un material estéril o biocompatible que cubre una herida o lesión, protegiéndola de infecciones, controlando la pérdida de fluidos y facilitando la curación (Ding *et al.*, 2021). Los apósitos tradicionales, como las gasas y vendas, actúan principalmente como barrera mecánica y protección, absorbiendo exudado de forma no selectiva, pero carecen de la capacidad para mantener un ambiente húmedo óptimo, lo que puede secar el lecho de la herida y causar trauma al retirarlos, aumentando el riesgo de infección y los costos de mano de obra (Liu *et al.*, 2024; Moradifar *et al.*, 2025).

Por otro lado, los apósitos avanzados o bioactivos están diseñados para interactuar con el microambiente de la herida, promoviendo una curación activa. Estos incluyen materiales como hidrocoloides, hidrogeles, espumas de poliuretano, alginatos y películas transparentes, que mantienen un ambiente húmedo equilibrado, favoreciendo la epitelización y reduciendo el dolor. Además, ofrecen funciones adicionales como propiedades hemostáticas, rehidratación de heridas secas y alta capacidad de absorción para heridas muy exudativas (García *et al.*, 2021; Selvaraj *et al.*, 2024).

Limitaciones de los Apósitos Convencionales

Los apósitos modernos, especialmente los sintéticos, presentan desafíos significativos tanto en términos de sostenibilidad ambiental como de biocompatibilidad. La industria de la salud, especialmente en el manejo de heridas,

es un gran contribuidor a la contaminación por plásticos y productos petroquímicos, ya que muchos apósitos avanzados están hechos de materiales no biodegradables y derivan de recursos no renovables como el poliuretano y el polietileno (Health Care Without Harm Europe, 2019). Además de la acumulación de plásticos, la lixiviación de compuestos químicos como los agentes antimicrobianos (por ejemplo, plata o PHMB) puede contaminar suelos y cuerpos de agua, contribuyendo al desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos, una amenaza creciente para la salud pública (Nashwan *et al.*, 2020).

En respuesta a estos problemas, la investigación en biomateriales biodegradables y de origen renovable, como los polisacáridos naturales, se presenta como una solución viable. El uso de celulosa bacteriana (CB) derivada de subproductos agroindustriales se alinea con los principios de la economía circular y el desarrollo sostenible, ofreciendo una alternativa ecológica y biocompatible (Moreno-Díaz *et al.*, 2024).

Celulosa Bacteriana

La CB ha emergido como una opción prometedora para superar las limitaciones de los polímeros sintéticos en aplicaciones biomédicas, particularmente en el desarrollo de apósitos para heridas. Este biopolímero, sintetizado por bacterias del género *Komagataeibacter* (Carreño y Caicedo, 2022), presenta propiedades fisicoquímicas y biológicas excepcionales que lo convierten en una plataforma ideal para la próxima generación de materiales biomédicos. La CB es un homopolisacárido compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1,4), con una estructura nanoestructural única que le confiere propiedades sobresalientes. A diferencia de la celulosa vegetal, la CB se produce de forma natural sin contaminantes como la lignina, hemicelulosa o pectinas (Portela *et al.*, 2019; Martirani-VonAbercron *et al.*, 2023). Esta pureza y su alta cristalinidad proporcionan una excelente resistencia mecánica y un alto módulo de Young incluso en estado hidratado (Revin *et al.*, 2022). Además, su capacidad de retención de agua es ideal para mantener el ambiente húmedo (Martirani-VonAbercron *et al.*, 2023).

La biocompatibilidad y biodegradabilidad de la CB son otras de sus propiedades destacadas. Este material es no tóxico, no pirogénico y, por lo tanto, minimiza el riesgo

de respuestas inmunes adversas (Portela *et al.*, 2019). Además, su capacidad de moldearse durante su síntesis permite la fabricación de membranas con geometrías complejas, lo que facilita su uso en aplicaciones biomédicas avanzadas (Carreño y Caicedo, 2022).

Aunque comparten la misma fórmula química, la CB y la celulosa vegetal difieren significativamente en sus propiedades, especialmente en aplicaciones biomédicas. La celulosa vegetal requiere procesos químicos intensivos y energéticos para eliminar impurezas como la lignina y hemicelulosa, mientras que la CB se obtiene mediante un proceso biológico de fermentación a temperatura y presión ambiente, lo que resulta en un producto de alta pureza sin necesidad de tratamientos químicos agresivos (Portela *et al.*, 2019).

Estructuralmente, las nanofibrillas de CB son considerablemente más finas (20-100 nm) que las fibras de celulosa vegetal (10-50 μm), lo que le confiere una mayor área superficial y mejores propiedades mecánicas como una mayor resistencia a la tracción (Martirani-VonAbercron *et al.*, 2023). Además, la red tridimensional de la CB le permite retener más agua y presenta una porosidad que es inalcanzable para la celulosa vegetal no procesada, la cual debe ser modificada para alcanzar propiedades similares (Martirani-VonAbercron *et al.*, 2023).

La CB se presenta como un biopolímero altamente eficiente y versátil para aplicaciones biomédicas, especialmente en el desarrollo de apósitos para heridas, debido a su alta pureza, capacidad de retención de agua, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Su superioridad sobre la celulosa vegetal, tanto en términos estructurales como en propiedades mecánicas, la posiciona como una alternativa clave para reemplazar los polímeros sintéticos, brindando no solo una solución más eficaz sino también sostenible.

Kombucha

La CB puede ser producida no solo por cepas puras de bacterias en biorreactores controlados, sino también a través del cultivo de Kombucha, un sistema de fermentación tradicional que ofrece una alternativa más sostenible, económica y accesible. Este enfoque aborda barreras clave para la adopción a gran escala de la CB como biomaterial.

La Kombucha es una bebida fermentada obtenida a partir de té endulzado y un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras conocido como SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast). El SCOBY es una biopelícula gelatinosa que alberga un consorcio microbiano auto-sostenible (May *et al.*, 2019). Durante la fermentación, las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, que luego son fermentadas para producir etanol y dióxido de carbono, lo que genera la efervescencia característica de la bebida. Las bacterias del ácido acético, principalmente del género *Komagataeibacter*, utilizan la glucosa para sintetizar celulosa y ácido acético, que da el sabor avinagrado al líquido. La celulosa producida se autoensambla en la interfaz aire-líquido, formando una nueva capa en la biopelícula del SCOBY, la cual sirve tanto como producto como soporte físico para la comunidad microbiana, protegiéndola de la contaminación externa (Landis *et al.*, 2022).

La producción de celulosa a partir de Kombucha tiene ventajas sustanciales desde una perspectiva de sostenibilidad y viabilidad económica. En comparación con los métodos convencionales que requieren biorreactores estériles y equipos costosos, el proceso de fermentación de Kombucha se realiza a temperatura ambiente, en condiciones no estériles y con una tecnología de bajo costo (Wang *et al.*, 2022; Gagliardi *et al.*, 2025). Además, los principales sustratos, té y azúcar, son económicos y ampliamente disponibles. El consorcio microbiano de Kombucha es versátil, lo que permite el uso de subproductos y residuos de la industria agroalimentaria, como suero de leche, jugos de frutas residuales y melazas, para producir CB (Sabatini *et al.*, 2025; Gagliardi *et al.*, 2025).

La celulosa obtenida de Kombucha (KBC) mantiene las propiedades deseables de la CB producida por métodos convencionales, como alta pureza, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Gagliardi *et al.*, 2025). Por estas razones, Kombucha no solo es una fuente de CB, sino también una plataforma sostenible de bio-fabricación que podría transformar la producción de biomateriales avanzados.

Aplicaciones y avances en apósitos

El interés en la CB para aplicaciones biomédicas ha crecido en los últimos años debido a su estructura única que mimetiza la matriz extracelular (ECM) y su excelente biocompatibilidad. Los estudios recientes destacan su potencial no solo en aplicaciones pasivas, sino también en la modificación y funcionalización para crear biomateriales activos y responsivos. En ciencia de materiales, la CB se ha establecido como un andamio (scaffold) ideal, mostrando su capacidad para soportar la adhesión, proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares, como osteoblastos para la regeneración ósea, condrocitos para la reparación de cartílago y células endoteliales para la vascularización de tejidos (Revin *et al.*, 2022). La capacidad de modular su porosidad y arquitectura durante su biosíntesis permite adaptar el andamio a las necesidades de cada tipo de tejido, como se evidencia en los criogeles de CB que facilitan la infiltración celular y el transporte de nutrientes, superando limitaciones de las membranas de CB densas.

Una tendencia destacada en la investigación actual es la creación de composites "CB-plus". Dado que la CB nativa carece de propiedades antimicrobianas intrínsecas, se ha intensificado su funcionalización para combatir infecciones, mediante la incorporación de nanopartículas de plata o cobre, o su mezcla con biopolímeros antimicrobianos como el quitosano (Portela *et al.*, 2019; Orlando *et al.*, 2020). Estos composites buscan un efecto sinérgico: la CB actúa como andamio estructural y ambiente húmedo, mientras que el agente antimicrobiano previene o trata la colonización bacteriana. Ensayos *in vitro* y modelos animales han mostrado que estos composites tienen baja citotoxicidad y no inducen respuestas inflamatorias significativas, lo que respalda su seguridad para aplicaciones clínicas (Martirani-VonAbercron *et al.*, 2023).

El desarrollo de apósitos biodegradables y sostenibles también ha avanzado debido a la creciente preocupación por el impacto ambiental de los residuos médicos. Además de la CB, otros biopolímeros como el quitosano y el alginato han mostrado un gran potencial para aplicaciones en apósitos. El quitosano, por ejemplo, presenta propiedades bacteriostáticas intrínsecas debido a su carga catiónica, es biocompatible, biodegradable y acelera la cicatrización (Yarahmadi *et al.*, 2024). El alginato, derivado de algas pardas, es útil para heridas con exudado moderado a alto

y tiene propiedades hemostáticas, lo que lo hace ideal para heridas sangrantes (Solanki *et al.*, 2012). Los composites de CB y quitosano combinan la resistencia mecánica y la capacidad de retención de agua de la CB con las propiedades antimicrobianas del quitosano, mejorando las propiedades de los apósitos (Portela *et al.*, 2019).

Una estrategia clave para la liberación de antibióticos es transformar el apósito en un sistema terapéutico activo que libere fármacos para combatir infecciones o promover la regeneración tisular. La carga del antibiótico puede hacerse por adsorción, encapsulación o modificación química. La adsorción es la técnica más simple, aunque puede llevar a una liberación rápida (burst release) del fármaco. Para un control más sostenido de la liberación, se emplean modificaciones en la matriz, como la mezcla de CB con quitosano, lo que ralentiza la liberación del fármaco (Cacicedo *et al.*, 2020). La modificación química de la CB, como la funcionalización de sus grupos hidroxilo, también permite la unión covalente de fármacos, proporcionando una liberación controlada (Orlando *et al.*, 2020).

Los antibióticos como el ciprofloxacino y la cefatoxima han demostrado ser eficaces cuando se incorporan en apósitos. El ciprofloxacino, una fluoroquinolona de amplio espectro, es eficaz contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas comunes en infecciones de heridas (Contardi *et al.*, 2017; Okoye y Okolie, 2025). Estudios han mostrado que los apósitos cargados con ciprofloxacino reducen la carga bacteriana y aceleran la cicatrización de heridas infectadas (Roy *et al.*, 2014; Carayon *et al.*, 2022; Ju *et al.*, 2024). La cefatoxima, una cefalosporina de tercera generación, también ha mostrado eficacia en heridas infectadas, con estudios que documentan su liberación sostenida y su potente actividad antibacteriana (Jiang *et al.*, 2021). La combinación de estos antibióticos podría ser una estrategia terapéutica sinérgica para mejorar el tratamiento de infecciones de heridas (Jang *et al.*, 2014).

En cuanto a la producción de CB, la Kombucha se está explorando como una alternativa más económica y accesible. La fermentación de Kombucha es un proceso de baja tecnología que no requiere condiciones estériles ni equipos costosos. Además, el consorcio microbiano de Kombucha puede utilizar subproductos de la industria agroalimentaria, como suero de leche y residuos de frutas, lo que reduce los costos y promueve la sostenibilidad (Gagliardi *et al.*, 2025). Este enfoque de valorización de residuos no solo reduce los costos, sino que también se alinea con los principios de la economía circular

Finalmente, la caracterización de la CB es esencial para entender su estructura y propiedades funcionales. Técnicas como la microscopía electrónica de barrido (SEM), la espectroscopía infrarroja (FTIR) y la difracción de rayos X (XRD) son fundamentales para evaluar la morfología, composición química y estructura cristalina de la CB, lo que permite diseñar apósitos optimizados (Pasaribu *et al.*, 2020; Ju *et al.*, 2024). Estas técnicas proporcionan información crucial para mejorar la eficacia y la seguridad de los apósitos de CB en aplicaciones biomédicas.

Justificación del Proyecto

Este proyecto de investigación se fundamenta en la convergencia de una necesidad clínica no resuelta, un avance en la ciencia de materiales y una oportunidad para el desarrollo de tecnología sostenible. El diseño y la caracterización de un sistema de celulosa bacteriana para la administración tópica de antibióticos abordan simultáneamente los desafíos en el tratamiento de infecciones, las limitaciones de los materiales actuales y la creciente demanda de procesos de fabricación más ecológicos.

En el ámbito clínico, el plástico ha sido uno de los materiales más utilizados debido a su bajo costo, resistencia y capacidad para crear un entorno estéril, lo que lo convierte en una opción atractiva para hospitales y clínicas. Sin embargo, los plásticos derivados de combustibles fósiles tienen un impacto ambiental significativo, ya que, tras su uso, terminan fácilmente en el medio ambiente, afectando la biodiversidad. Aunque el avance científico ha permitido el desarrollo de materiales naturales, como la celulosa bacteriana, que ofrecen mejores propiedades, la disponibilidad limitada, el posible riesgo de transmisión de enfermedades y los costos elevados siguen siendo barreras importantes. Por lo tanto, es fundamental seguir explorando nuevos compuestos con actividad antiinflamatoria, además de desarrollar materiales innovadores que no solo mejoren la atención médica, sino que también contribuyan a reducir la contaminación ambiental.



IV. HIPÓTESIS

La celulosa bacteriana posee propiedades mecánicas y fisicoquímicas, como su alta capacidad de retención de agua, biocompatibilidad y estructura porosa, que la hacen ideal para el desarrollo de apósitos capaces de vehiculizar antibiótico.

V. OBJETIVOS

General

Fabricar apósitos de hidrogel de celulosa bacteriana obtenida del té de Kombucha como vehículo de administración de antibióticos.

Específicos

1. Optimizar el proceso de fermentación del té de Kombucha para obtener celulosa microbiana.
2. Identificación de los microorganismos responsables de la producción de celulosa durante el proceso fermentativo de la Kombucha.
3. Fabricar apósitos de celulosa bacteriana obtenida de la fermentación del té de Kombucha.
4. Evaluar la resistencia, capacidad de retención de líquidos y estabilidad de los apósitos.
5. Evaluar el efecto de los compuestos depositados en el apósito en pruebas de antibiogramas.

VI. RESULTADOS

VI.I. Capítulo 1: Optimización por superficie de respuesta de la fermentación de kombucha para mejorar el rendimiento de celulosa bacteriana y sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y estructurales

Resumen

La Kombucha es una bebida fermentada de té obtenida a través de la actividad metabólica de una cultura simbiótica de bacterias acéticas y levaduras (SCOBY). Durante la fermentación, bacterias como *Komagataeibacter xylinus* sintetizan celulosa bacteriana (CB), un biopolímero conocido por su alta pureza, cristalinidad y biocompatibilidad. Este estudio tuvo como objetivo optimizar los parámetros de fermentación para aumentar el rendimiento de la CB y mejorar sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y estructurales. Se utilizó un diseño compuesto central basado en la metodología de superficie de respuesta para evaluar los efectos del volumen de té inicial (18–54 mL), la concentración de glucosa (18–36 g) y la temperatura de fermentación (25–35 °C) en diversas variables de respuesta. Se midieron los rendimientos de SCOBY (base húmeda) y CB purificada (base seca), así como su capacidad de hinchamiento, dispersión en agua, permeabilidad al vapor de agua, resistencia a la tracción, elongación y cristalinidad. Se realizaron optimizaciones individuales y simultáneas. La mejor condición individual dio como resultado 65,14 g/L de SCOBY y 2.70 g/L de CB, usando 5,72 mL de té inicial y 29.04 g de glucosa. La optimización simultánea produjo 70 g/L de SCOBY y 2.94 g/L de CB, utilizando 66.27 mL de té inicial, 22.37 g de glucosa y una temperatura de 38,4 °C. La CB optimizada presentó propiedades favorables: resistencia a la tracción (4 MPa), elongación (3,8%), capacidad de hinchamiento (400%), permeabilidad al vapor de agua ($27 \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$) y cristalinidad (59,89%). Estos resultados destacan el potencial de optimizar la fermentación de kombucha para obtener CB con características prometedoras para aplicaciones en agricultura, cosméticos y biomateriales.

Abstract

Kombucha is a fermented tea beverage produced by the metabolic activity of a symbiotic culture of acetic acid bacteria and yeasts (SCOBY). During fermentation, bacteria such as *Komagataeibacter xylinus* synthesize bacterial cellulose (BC), a biopolymer known for its high purity, crystallinity, and biocompatibility. This study was aimed at optimizing fermentation parameters to enhance BC yield and improve its properties. A central composite design was used to evaluate the effects of starter tea volume (18–54 mL), glucose concentration (18–36 g), and fermentation temperature (25–35 °C) on various response variables. The production of SCOBY and purified BC was measured, along with their swelling capacity, water dispersion, vapor permeability, tensile strength, elongation, and crystallinity. Both individual and simultaneous optimizations were performed. The best individual condition resulted in 65.14 g/L of SCOBY and 2.70 g/L of BC, with 5.72 mL of starter tea and 29.04 g of glucose. Simultaneous optimization led to 70 g/L of SCOBY and 2.94 g/L of BC, using 66.27 mL of starter tea, 22.37 g of glucose, and a temperature of 38.4 °C. The optimized BC exhibited favorable properties, including tensile strength (4 MPa), elongation (3.8%), swelling capacity (400%), water vapor permeability (27 g·s⁻¹·m⁻¹·MPa⁻¹), and crystallinity (59.89%). These results highlight the potential of optimizing kombucha fermentation to produce BC with promising characteristics for applications in agriculture, cosmetics, and biomaterials.

Introducción

La celulosa, el polímero natural más abundante en la Tierra, constituye entre el 40% y 50% de la biomasa planetaria. Su producción anual a través de la fotosíntesis es de aproximadamente 10¹² toneladas (Amorim *et al.*, 2023). Estructuralmente, la celulosa se compone de cadenas rígidas de unidades de β-D-glucopiranosas unidas por enlaces β-1,4-glucosídicos, lo que confiere alta estabilidad mecánica y química. Esta configuración molecular ha impulsado su uso en diversas industrias, como la farmacéutica, textil, cosmética, alimentaria y de empaques (Hussain *et al.*, 2024; Mehrotra *et al.*, 2023; Avcioglu *et al.*, 2022; Keshk, 2014). No obstante, la creciente demanda industrial de celulosa ha intensificado la presión sobre las fuentes

tradicionales basadas en plantas, contribuyendo a la deforestación y al desequilibrio ecológico (Lawson *et al.*, 2022; Keshk, 2014). Este contexto ha generado el interés por alternativas sostenibles para su producción, como el uso de bacterias productoras de celulosa, particularmente de los géneros *Komagataeibacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Sarcina* (Avcioglu *et al.*, 2022). Dentro de estos, *Komagataeibacter xylinus* (anteriormente *Acetobacter xylinum*) se ha identificado como un productor clave de celulosa bacteriana (BC), especialmente en sistemas fermentativos como el té kombucha (Yamada *et al.*, 2012a, 2012b).

El té kombucha, una bebida fermentada tradicional obtenida de té negro o verde azucarado, es un medio natural donde se produce una biopelícula rica en celulosa en la interfaz aire-líquido durante la fermentación, conocida como SCOBY (SCOBY: symbiotic culture of bacteria and yeasts). Esta biopelícula está compuesta principalmente de BC y microorganismos, y juega un papel esencial en la supervivencia microbiana. La presencia de bacterias aeróbicas en la superficie indica una producción activa de celulosa, lo que favorece la proximidad a zonas ricas en oxígeno, protegiendo así a los microorganismos de factores ambientales estresantes (Sigiro *et al.*, 2023). La celulosa generada en kombucha exhibe una estructura porosa tridimensional con propiedades superiores, como mayor resistencia mecánica, cristalinidad, retención de agua, biodegradabilidad y biocompatibilidad en comparación con la celulosa de origen vegetal (Soares *et al.*, 2021; Laavanya *et al.*, 2021). Estas características posicionan a la celulosa derivada de kombucha como un material prometedor para aplicaciones biomédicas, biotecnológicas y medioambientales (Gagliardi *et al.*, 2025).

En este contexto, la optimización de la producción de BC a partir de kombucha surge como una respuesta estratégica ante la creciente demanda de materiales biocompatibles, particularmente en los sectores biomédico y medioambiental (Cubas *et al.*, 2023). A pesar de que la BC puede sintetizarse usando cultivos puros en biorreactores, el uso de kombucha ofrece una plataforma económica, escalable y autorregulada (Venturelli *et al.*, 2025; Amorim *et al.*, 2023). El propósito de este estudio no es optimizar la formulación de la bebida, sino utilizar el consorcio microbiano presente de manera natural en el proceso de fermentación como un modelo para aplicaciones biotecnológicas. La fermentación de kombucha presenta ventajas sobre los sistemas tradicionales de biorreactores, como la reducción de

costos de producción mediante el uso de té azucarado como medio de cultivo (Hamed *et al.*, 2023; Behera *et al.*, 2022), y la robustez de la sinergia microbiana dentro del SCOBY asegura la estabilidad del proceso sin necesidad de condiciones asépticas o cultivos puros (Goh *et al.*, 2012).

Sin embargo, a pesar del creciente interés por kombucha y sus aplicaciones, aún existen pocos estudios que se centren en la optimización de las condiciones de fermentación para mejorar la producción de BC y su funcionalidad como material. Es bien sabido que los parámetros críticos de fermentación influyen significativamente en la actividad microbiana y la formación del producto. Sin embargo, los efectos combinados de estas variables sobre las propiedades estructurales y mecánicas del material final aún no han sido suficientemente estudiados (Zahan *et al.*, 2014). Algunos estudios previos han intentado optimizar la producción de BC en kombucha, pero la mayoría se centran en aspectos específicos, como las propiedades del té o condiciones aisladas. Por ejemplo, AL-Kalifawi & Hassan (2014) estudiaron los factores que influyen en el rendimiento de BC, pero sus hallazgos no abarcan una optimización integral de las condiciones de fermentación. Similarmente, Selvaraj & Gurumurthy (2024) emplearon melaza y polvo de té en el medio de fermentación de kombucha, optimizando el rendimiento de BC mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), aunque su estudio se centró principalmente en ingredientes individuales.

En este trabajo, se empleó la metodología RSM para optimizar sistemáticamente las condiciones de fermentación en kombucha, con el objetivo de maximizar el rendimiento tanto del SCOBY como de la BC purificada. Al mismo tiempo, se buscó mejorar y analizar las propiedades de la celulosa deshidratada, como la resistencia a la tracción, la capacidad de hinchazón, la permeabilidad al vapor de agua y la cristalinidad. Este enfoque optimizado ofrece una estrategia sostenible y rentable para la producción de BC funcional con amplia aplicabilidad.

Materiales y métodos

Producción de celulosa bacteriana (BC)

Para la producción de BC, se utilizó un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) de la marca Kombucha House (Ciudad de México). Según las pautas del fabricante, se preparó una infusión de té verde (base para el kombucha) añadiendo siete bolsas de té (2 g cada una, marca Therbal) a 4 L de agua esterilizada. A esta infusión se le agregó 250 g de sacarosa (marca Meyer). Después de enfriar la solución a 30 °C, se incorporaron 50 g de SCOBY y 250 mL de té fermentado (té que ha pasado por el proceso de fermentación y contiene microorganismos de fermentaciones anteriores, denominado té iniciador). El recipiente de vidrio se cubrió con un paño de algodón y se incubó a 25 °C durante 15 días. Al finalizar el proceso de fermentación, se recolectaron el BC y parte del té fermentado, que se utilizaron como cultivo iniciador para desarrollar la superficie de respuesta a partir de una muestra común. No se realizó control activo del pH durante la fermentación, pero se determinó que el pH inicial fue de aproximadamente 5.2 según la preparación del medio estándar.

Procesamiento y purificación de la celulosa

El proceso de purificación de la celulosa se siguió de acuerdo con el método de Nascimento *et al.* (2016), con algunas modificaciones. Primero, 100 g de pulpa de celulosa se trataron con 200 mL de agua caliente a 80 °C durante 1 h. Luego, la pulpa se sometió a un proceso de blanqueo con 200 mL de una solución de hidróxido de sodio al 5% (p/v) a 90 °C durante 60 min bajo agitación constante a 90 rpm. Posteriormente, el material se sumergió en 200 mL de una solución de ácido peracético a 60 °C durante 24 h con agitación. Finalmente, el material se enjuagó tres veces con 500 mL de agua destilada y se dializó contra agua destilada durante 36 h, obteniendo un gel de celulosa con un pH entre 6 y 7.

Secado de la celulosa y evaluación de sus propiedades

Para evaluar las características del BC, el material fue secado, lo que resultó en la formación de una estructura delgada hecha exclusivamente del gel de celulosa obtenido. Este proceso no tuvo como objetivo la producción de películas de celulosa como producto final, sino permitir la medición de sus propiedades físicas y mecánicas en el estado seco. El proceso siguió la metodología descrita por Ribeiro *et al.* (2021), con algunas modificaciones. Se homogenizaron 3 g de celulosa seca y purificada en 30 mL de agua destilada. La mezcla resultante se vertió en platos de Petri de 10 cm de diámetro. Posteriormente, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico a 35 °C durante 24 h. El proceso de secado se consideró completo cuando el peso de la muestra se mantuvo constante. El grosor promedio de la membrana obtenida fue de 0.55 ± 0.05 mm.

Caracterización de la celulosa seca

Rendimiento

El rendimiento total de BC y SCOBY para los diferentes procesos de fermentación se evaluó mediante métodos convencionales según Volova *et al.* (2022). El rendimiento de BC (X) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$X = g/L$$

donde g es el peso de la celulosa seca (g) por litro de medio.

Determinación de hinchazón y dispersión

La dispersibilidad de la celulosa se determinó midiendo la fracción dispersa por pérdida de masa bajo inmersión/agitación controlada. Se obtuvieron muestras de celulosa de 1 cm² con un grosor de 0.55 mm, que fueron secadas a 105 ± 1 °C durante 24 h para determinar el peso seco inicial (w_i). Luego, las muestras se sumergieron en agua destilada y se agitaron a 90 rpm durante 24 h a 25 °C. Después del proceso de

inmersión, los fragmentos restantes se recuperaron y se secaron nuevamente hasta que alcanzaron un peso constante (w_f). El porcentaje de dispersión se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ dispersion} = \frac{w_i - w_f}{w_i} \times 100$$

Para el análisis de hinchazón, las muestras secas de celulosa se pesaron antes del análisis para obtener el peso seco inicial (w_1) (Akhter *et al.*, 2019). Luego, las muestras se sumergieron en 50 mL de agua destilada a 25 °C durante 24 h. Posteriormente, las muestras se secaron suavemente con papel filtrante para eliminar el exceso de agua. Después, se registró el peso húmedo (w_2). El grado de hinchazón se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de hinchamiento (\%)} = \frac{w_2 - w_1}{w_1} \times 100$$

Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de la celulosa se determinó en triplicado según la norma ASTM D882-02(2017) con algunas modificaciones. Se utilizaron contenedores plásticos cilíndricos con un diámetro interno de 25.4 mm, que fueron llenados con 5 g de cloruro de calcio antes de ser sellados con la celulosa. Los contenedores se colocaron en un desecador a 25°C y 55% de humedad relativa. Se registró meticulosamente la ganancia de peso de los contenedores durante 24 horas y se derivó la pendiente mediante un análisis de regresión lineal de los datos de ganancia de peso versus tiempo. El WVP se calculó con la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{WVPRT * tm}{\Delta p} \times 100$$

donde WVPRT es la tasa de transmisión de vapor de agua a través de la celulosa, tm es el grosor promedio de la celulosa, y Δp es la diferencia de presión parcial de vapor de agua (MPa) entre ambos lados del BC.

Análisis de propiedades físicas y mecánicas de la celulosa seca

Resistencia a la tracción

La resistencia a la tracción y la elongación a la ruptura se determinaron en triplicado utilizando un analizador de textura Brookfield CT3 25K, según las normas ASTM D638-14 y ASTM D882-02 (ASTM D638-14, 2014; ASTM D882-02, 2017). La distancia inicial entre las mordazas fue de 30 mm y la velocidad del cabezal cruzado fue de 0.50 mm/seg. Estas condiciones se emplearon junto con tiras de BC de 10 mm de ancho y 50 mm de largo. La resistencia a la tracción se calculó con la siguiente ecuación:

$$TS = \frac{Fm}{A}$$

donde TS es la resistencia a la tracción (MPa), Fm es la fuerza máxima de ruptura (N), y A es el área transversal del BC (mm²). La elongación se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%E = \frac{(df - do)}{do} \times 100$$

donde *do* es la distancia inicial entre las mordazas en centímetros (cm) y *df* es la distancia en el momento de la ruptura.

Difracción de rayos X

Las fases cristalinas de la celulosa bacteriana (BC) se determinaron utilizando un difractómetro de rayos X Rigaku (XRD), modelo Dmax2100, con los siguientes parámetros: geometría óptica de haz paralelo (PB), tiempo de exposición de 0.5 segundos, tamaño de paso de 0.02 grados, voltaje de 40 kV y corriente de 30 mA; una fuente de radiación CoK α 1/2 ($\lambda_1 = 1.7889 \text{ \AA}$, $\lambda_2 = 1.7928 \text{ \AA}$), un rango angular de $2\theta = 4^\circ$ a 45° , y un ángulo de incidencia en la superficie de las muestras de 5° . Se determinó el porcentaje de cristalinidad de la celulosa bacteriana.

Cálculo del tamaño de cristalito

El difractograma se obtuvo mediante difracción de rayos X, seleccionando los picos relevantes para el análisis. El tamaño de cristalito se calculó utilizando la ecuación de Scherrer (Scherrer, 1918), que relaciona el ancho de los picos de difracción con las dimensiones de los cristalitos, utilizando la siguiente fórmula:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

En esta fórmula, D es el tamaño del cristalito (nm), β es el ancho completo a mitad de máxima (FWHM) del pico de difracción expresado en radianes, λ es el valor de la longitud de onda de la radiación Cu K α (1.5406 Å), y θ es el ángulo de difracción.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental y análisis estadístico para evaluar los efectos de la fuente de carbono, la temperatura y el volumen de té iniciador sobre la producción de celulosa. Cada variable se analizó en tres niveles: alto (+1), medio (0) y bajo (-1). Se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI para construir una metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño compuesto central (CCD), con un total de 17 corridas experimentales (Tabla 1). Las variables de respuesta analizadas incluyeron el rendimiento de SCOPY, el rendimiento de celulosa seca después de la purificación, hinchazón, dispersión, permeabilidad al vapor de agua, resistencia a la tracción, porcentaje de elongación y porcentaje de cristalinidad. La validación del modelo se realizó mediante el análisis de varianza con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. La ecuación polinómica de segundo orden derivada del diseño es la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$$

Donde Y es la respuesta predicha, β_0 es una constante, β_1 , β_2 , β_3 son los coeficientes lineales, β_{12} , β_{13} , β_{23} son los coeficientes de interacción, β_{11} , β_{22} , β_{33} son

los coeficientes cuadráticos, y A, B, y C son los códigos del proceso para té iniciador, glucosa y temperatura, respectivamente.

Tabla 1. Factores y niveles experimentales del diseño experimental para la producción de SCOBY y celulosa.

Corrida	Té de arranque (ml)		Glucosa (g)		Temperatura (°C)	
	Valor	Nivel	Valor	Nivel	Valor	Nivel
K1	36	0	27	0	30	0
K2	5.72	$-\alpha$	27	0	30	0
K3	36	0	27	0	30	0
K4	36	0	27	0	30	0
K5	18	-1	18	-1	25	-1
K6	66.27	$+\alpha$	27	0	30	0
K7	54	+1	36	+1	35	+1
K8	18	-1	36	+1	25	-1
K9	18	-1	36	+1	35	+1
K10	54	+1	18	-1	25	-1
K11	36	0	11.86	$-\alpha$	30	0
K12	36	0	27	0	21.59	$-\alpha$
K13	54	+1	36	+1	25	-1
K14	54	+1	18	-1	35	+1
K15	36	0	27	0	38.40	$+\alpha$
K16	18	-1	18	-1	35	+1
K17	36	0	42.13	$+\alpha$	30	0

Las ejecuciones experimentales se realizaron en volúmenes de 250 mL. Cada variable se analizó en tres niveles: alto (+1), medio (0) y bajo (-1), que incluían puntos de estrella ($+\alpha$, $-\alpha$). La K representa kombucha y el número representa el número de la ejecución experimental.

Resultados y discusión

Optimización general

Los resultados experimentales detallados de cada una de las 17 ejecuciones del diseño compuesto central se presentan en la Tabla 2, que muestra los valores obtenidos para las variables de respuesta analizadas. Los modelos polinómicos de segundo orden ajustados para predecir estas respuestas, junto con sus coeficientes

de regresión, se pueden consultar en la Tabla 3. Estos modelos facilitan la evaluación del impacto de las variables independientes —el volumen de té iniciador (A), los gramos de glucosa (B) y la temperatura en °C (C)— y sus interacciones en las características del BC producido. Como se ilustra en la Fig. 1, el material experimentó una serie de transformaciones, comenzando como SCOBY y progresando a través de la purificación de celulosa y la posterior formación de una biopelícula de celulosa. Esta biopelícula se caracterizó por su apariencia lisa, clara y transparente.

Tabla 2. Resultados experimentales para el rendimiento y propiedades de la celulosa bacteriana según el diseño experimental.

Corrida	Y SCOBY (g)	Y celulosa (g)	%H celulosa	S celulosa (%)	WVP g·m/m ² ·s·Pa	TS Mpa	%E	%C	TC (nm)
K1	29.9	0.30	136.86	8.34	8.03	3.33	3.90	12.5	4.47
K2	81.70	0.82	161.50	16.69	8.44	4.62	2.38	41.2	4.36
K3	30.23	0.35	143.82	7.66	9.10	3.66	2.19	34.7	4.21
K4	28.25	0.26	155.57	8.40	8.53	2.81	2.47	40.6	4.39
K5	36.78	0.49	210.74	16.21	12.27	4.63	3.33	23.4	4.36
K6	46.46	0.70	182.37	5.41	11.08	2.33	1.96	14.5	4.29
K7	15.11	0.06	207.51	12.49	28.39	0.53	1.71	55.7	4.55
K8	21.02	0.05	346.20	1.52	37.96	0.70	1.12	43.5	4.13
K9	30.59	0.09	374.70	6.48	7.15	0.61	1.42	19.6	4.41
K10	17.02	0.07	367.90	42.10	3.44	1.51	2.21	49.8	5.04
K11	64.32	0.70	161.17	1.17	7.36	3.40	2.57	49.5	4.25
K12	41.62	0.42	138.29	22.47	10.44	3.72	2.11	59.2	4.59
K13	37.80	0.36	136.26	11.95	6.44	4.24	3.41	54.5	4.42
K14	26.61	0.22	260.75	12.34	6.79	3.91	3.46	43.1	4.40
K15	47.42	0.53	130.17	13.83	16.17	3.93	3.23	26	4.58
K16	29.38	0.29	255.92	8.16	8.31	4.08	2.17	31.6	4.40
K17	55.25	0.43	105.68	14.70	8.99	4.19	3.60	54.1	4.47

Tabla con los resultados de los 17 experimentos correspondientes a la optimización de las concentraciones de variables para BC. R SCOBY: Rendimiento de Soby en base húmeda. R celulosa: Rendimiento de celulosa en base seca tras la purificación. %H: Porcentaje de hinchamiento. S: Dispersión. WVP: Permeabilidad al vapor de agua. TS: Resistencia a la tracción. %E: Porcentaje de elongación. %C: Porcentaje de cristalinidad. TC: Tamaño de los cristalitas. El porcentaje de cristalinidad y el tamaño de los cristalitas se calcularon con los difractogramas obtenidos con la lámpara de cobre (1.5406 Å).

Tabla 3. Modelos polinomiales de segundo orden para la optimización de la producción de celulosa bacteriana y SCOBY.

	Coeficientes de regresión estimados (β_n)							
	Y SCOBY (g)	Y celulosa (g)	H celulosa (%)	S celulosa (%)	WVP (g·m/m ² ·s·Pa)	TS (Mpa)	E (%)	C (%)
Constante (β_0)	-489.63	-7.72	2529.59	205.40	105.35	-	3.90	43.17
A: Té arranque	1.44	0.01	-26.53	-1.98	1.77	31.15	0.088	2.38
B: Glucosa	5.42	0.06	-11.43	-1.84	1.15	0.143	2.19	1.80
C: Temperatura	29.89	0.47	-113.91	-7.68	-10.23	2.045	2.47	-1.52
A ²	0.001	0.01	0.040	0.0041	-0.01	-0.01	3.33	-
AB	-0.006	0.01	0.132	0.0141	-0.02	0.01	1.96	0.009
AC	-0.054	-0.01	0.624	0.038	-0.03	-0.01	1.71	-0.01
B ²	-0.068	-0.01	0.075	-0.012	-0.008	-0.01	1.12	0.006
BC	-0.044	-0.01	0.044	0.056	0.001	-	1.42	-0.01
C ²	-0.44	-0.007	1.51	0.067	0.197	0.002	2.21	0.106

Y SCOBY: Rendimiento de Scoby en base húmeda. Y celulosa: Rendimiento de celulosa en base seca tras la purificación. %H: Porcentaje de hinchamiento. S: Dispersión. WVP: Permeabilidad al vapor de agua. TS: Resistencia a la tracción. %E: Porcentaje de elongación. %C: Porcentaje de cristalinidad. Los datos de la tabla representan los valores de las constantes utilizadas para la ecuación de predicción (ecuación 7) en cada variable de respuesta.

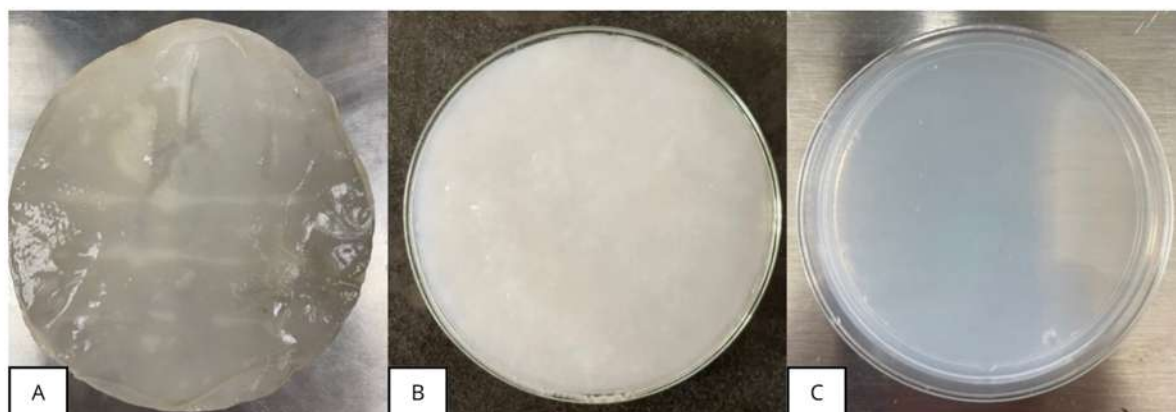


Fig. 1. Aspecto visual de los materiales obtenidos durante el proceso de producción de BC: (A) cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY); (B) BC purificado; y (C) biopelícula de celulosa formada.

El diseño experimental se formuló con tres niveles de factores: alto (+1), medio (0) y bajo (-1). Estos niveles correspondieron a los volúmenes de té iniciador (A), la concentración de glucosa (B) y la temperatura (C). La selección de estos niveles y rangos se basó en experimentaciones preliminares y en una revisión de la literatura científica que analiza estos parámetros críticos en la producción de celulosa bacteriana (BC). Por ejemplo, se ha reportado que el té kombucha crece en rangos de temperatura de 24 a 37 °C (Jayabalan *et al.*, 2014) o de 28 a 32 °C en algunas

cepas bacterianas aisladas (Uğurel *et al.*, 2024), aunque el proceso es viable en un rango más amplio, generalmente entre 20 °C y 40 °C (Cruz *et al.*, 2024; Alkhalifawi y Hassan, 2014). En cuanto a la fuente de carbono, si bien es crucial, la preferencia por los carbohidratos varía considerablemente dependiendo de la cepa. Varios estudios han reportado mayores rendimientos con glucosa como el carbohidrato predominante (Molina *et al.*, 2017). Es importante destacar que una proporción significativa de la investigación sobre la producción de BC se centra en el uso de cepas microbianas aisladas (Bagewadi *et al.*, 2023). Aunque este enfoque permite un mayor control experimental, el presente estudio utiliza el SCOBY de kombucha, un consorcio microbiano complejo compuesto por diversas bacterias y levaduras que coexisten de manera simbiótica. El uso de un sistema compuesto como el SCOBY presenta desafíos específicos, particularmente en lo que respecta al control preciso de las poblaciones microbianas y sus interacciones dinámicas. Sin embargo, la utilización de este sistema compuesto es de gran relevancia, ya que refleja las características naturales del kombucha y puede ofrecer beneficios derivados de las interacciones sinérgicas entre los diversos microorganismos. Estas sinergias pueden influir en la eficiencia metabólica global y, potencialmente, en las propiedades funcionales de la celulosa producida (Kalashnikova *et al.*, 2024). En relación con el volumen de té iniciador, que constituye una fracción sustancial de la carga microbiana inicial, los niveles evaluados se seleccionaron de acuerdo con los rangos típicamente empleados por los productores artesanales de kombucha.

Efectos principales en la optimización

Rendimiento

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a la producción de SCOBY reveló efectos estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) para el término cuadrático del volumen de té iniciador y el término lineal de la concentración de glucosa (Tabla 4). El modelo para el rendimiento de SCOBY mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 84, lo que indica una correlación entre los valores observados y los predichos. La estadística de Durbin-Watson (DW), utilizada para evaluar la presencia de autocorrelación entre los errores (Yetilmezsoy *et al.*, 2009), dio un valor de 1.51. Los valores inferiores a 2 indican autocorrelación positiva, mientras que los valores superiores a 2 sugieren

autocorrelación negativa (Adhikari, 2022). Valores cercanos a 2 indican un modelo bien ajustado. Para la producción de celulosa en base seca, el análisis de varianza también indicó efectos significativos ($p \leq 0.05$) para los factores volumen de té iniciador y concentración de glucosa (Tabla 4). El modelo mostró un valor de R^2 de 87 y una estadística DW de 1.57. Para validar el modelo de optimización, se realizaron experimentos bajo las condiciones óptimas predichas. Los resultados experimentales mostraron una discrepancia de menos del 10% en comparación con los valores predichos, lo que respalda la confiabilidad del modelo.

Las gráficas tridimensionales (3D) de la superficie de respuesta (ver Fig. 2a y 2e) representan visualmente la relación entre los factores y los rendimientos, indicando las regiones óptimas para maximizar la producción. La metodología de superficie de respuesta se implementó con éxito para identificar los puntos estacionarios correspondientes a los rendimientos máximos predichos, como se ilustra en la Tabla 5. Específicamente, las condiciones óptimas predichas para la producción de SCOBY fueron: 5.72 mL de té iniciador, 29.04 g de glucosa y una temperatura de 31 °C, lo que resultó en un rendimiento predicho de 65.14 g/L. Las condiciones óptimas para el rendimiento de celulosa en base seca fueron determinadas como: 66.27 mL de té iniciador, 31.32 g de glucosa y una temperatura de 28 °C, produciendo un rendimiento predicho de 2.70 g/L. Este rendimiento supera algunos valores reportados previamente, como los de Laavanya *et al.* (2021), con rangos entre 33 g/L y 510 g/L de masa de celulosa. En cuanto a la influencia de los factores mencionados, las gráficas de efectos principales para el rendimiento de SCOBY en base húmeda (WB) y para el rendimiento de celulosa en base seca (DB) (Fig. 3) facilitan una interpretación más profunda del impacto de los factores de fermentación. La concentración de glucosa demostró una influencia notable y compleja, manifestándose como una clara tendencia cuadrática que se observó consistentemente para ambos tipos de rendimiento (SCOBY WB y Celulosa DB). Las gráficas indican que, a partir de 18 g, un aumento en la concentración de glucosa inicialmente favorece la producción, alcanzando un rendimiento máximo en una zona óptima ubicada alrededor de 27-30 g. Sin embargo, superar este umbral y aumentar la glucosa hacia 36 g conduce a una disminución en ambos rendimientos. Este comportamiento sugiere un equilibrio: por un lado, la glucosa es el sustrato de carbono fundamental cuya disponibilidad activa las vías biosintéticas de celulosa (Leonarski *et al.*, 2021); por otro lado, las concentraciones suprapsiológicas pueden

desencadenar mecanismos inhibitorios. La literatura existente respalda sustancialmente esta inhibición a concentraciones elevadas de azúcar, atribuyéndola principalmente al estrés osmótico que afecta la viabilidad y funcionalidad celular, potencialmente inhibiendo la biosíntesis de celulosa (Digel *et al.*, 2023). Un efecto inhibitorio similar se ha observado en cepas de *Komagataeibacter* y *Medusomyces* debido al estrés osmótico a altas concentraciones de glucosa (Perdani *et al.*, 2025; Digel *et al.*, 2023). En consecuencia, el óptimo observado es presumiblemente el punto en el que la disponibilidad de sustrato para la síntesis se maximiza sin inducir significativamente estos efectos inhibitorios. En el caso del volumen de té iniciador, los efectos observados son particularmente interesantes debido a su divergencia entre los dos tipos de rendimiento medidos. Para el rendimiento de SCOBY en base húmeda (WB), la gráfica muestra una relación inversa casi lineal, lo que indica que aumentar el volumen del inóculo de 18 mL a 54 mL resulta en una disminución sustancial de la masa total recolectada en húmedo. Esta observación, que contrasta con la expectativa prevalente de que un mayor volumen de inóculo generaría una mayor biomasa total debido a una población inicial amplificada, puede explicarse dentro del marco de la biomasa húmeda. Es posible que una densidad celular inicial muy alta pueda generar una competencia intensa y un agotamiento más rápido de los nutrientes esenciales no carbonados, lo que podría limitar el crecimiento general o alterar la capacidad de retención de agua del hidrogel de celulosa formado (Rahman *et al.*, 2021; Aswini *et al.*, 2020).

Por otro lado, el rendimiento de celulosa (DB) mostró una tendencia positiva modesta con el aumento en el volumen de té iniciador. Este resultado sugiere que, a pesar de la reducción en la masa total en húmedo, la producción específica de celulosa (es decir, la cantidad neta de polímero seco generado) puede mantenerse o incluso mejorar con una mayor carga microbiana inicial. La literatura respalda esta observación, reportando que aumentar la proporción de inóculo dentro de ciertos límites puede mejorar significativamente el rendimiento de celulosa antes de alcanzar un punto óptimo (Rangaswamy *et al.*, 2015). Este hallazgo está alineado con la hipótesis de que una mayor concentración de bacterias activas puede mejorar la tasa y eficiencia de la síntesis de celulosa, promoviendo una producción más rápida y eficiente, siempre que otros factores no se conviertan en limitantes. Sin embargo, más allá de un cierto umbral, un inóculo excesivo puede causar una competencia intensa por los nutrientes, como se mencionó anteriormente (Rahman *et al.*, 2021; Aswini *et*

al., 2020). Esto indica la existencia de un equilibrio en el que la producción de celulosa se maximiza antes de que emerjan tales efectos inhibitorios, lo cual es consistente con el concepto de un tamaño óptimo de inóculo para una síntesis eficiente de celulosa bacteriana.

La temperatura ha demostrado ser un factor crítico, mostrando un efecto cuadrático notablemente similar y sustancial en ambos rendimientos (SCOBY WB y Celulosa DB), como se ilustra en las gráficas de efectos principales (Fig. 3). Los resultados de ambas gráficas demuestran de manera consistente que la producción es subóptima a 25 °C, se maximiza claramente en un rango estrecho alrededor de 30-32 °C y disminuye drásticamente a temperaturas más altas (aproximándose a 35 °C). Esta marcada dependencia térmica refleja directamente la fisiología de los microorganismos mesofílicos involucrados y la cinética de las enzimas responsables de la biosíntesis de celulosa (Elom *et al.*, 2022). Se ha demostrado que temperaturas por debajo del óptimo ralentizan las tasas metabólicas y enzimáticas. Por el contrario, temperaturas superiores al óptimo pueden causar estrés térmico y disminuir la eficiencia enzimática, lo que resulta en una menor producción.

Tabla 4. ANOVA para optimizar la producción de celulosa bacteriana y SCOBY.

	Y SCOBY (g)	Y celulosa (g)	H celulosa (%)	S celulosa (%)	WVP (g·m/m ² ·s·Pa)	TS (Mpa)	E (%)	C (%)
A:Té de arranque	0.4842	0.9124	0.3940	0.4195	0.0294	0.6600	0.5271	0.1350
B:Glucosa	0.0492	0.0413	0.6788	0.4008	0.1476	0.4737	0.9819	0.6489
C:Temperatura	0.9561	0.8808	0.0492	0.2643	0.0439	0.5917	0.6082	0.2849
A²	0.0458	0.0487	0.6650	0.7002	0.8091	0.5781	0.1461	0.9463
AB	0.9052	0.7758	0.5513	0.5827	0.6318	0.2815	0.4042	0.2432
AC	0.5988	0.5566	0.1442	0.4125	0.3699	0.4594	0.1180	0.3536
B²	0.4838	0.4204	0.8371	0.7743	0.3606	0.6022	0.2349	0.7748
BC	0.8271	0.7841	0.9555	0.5428	0.1559	0.8374	0.6808	0.9987
C²	0.8400	0.0486	0.2301	0.6323	0.0119	0.1715	0.0401	0.0384
R²	84.2835	87.4072	84.8363	42.2515	84.8112	43.8371	73.5786	70.1095
DW	1.5104	1.5756	1.4731	1.1223	1.6788	1.0651	1.3889	1.4646

Y SCOBY: Rendimiento de Scoby en base húmeda. Y celulosa: Rendimiento de celulosa en base seca tras la purificación. %H: Porcentaje de hinchamiento. S: Dispersión. WVP: Permeabilidad al vapor de agua. TS: Resistencia a la tracción. %E: Porcentaje de elongación. %C: Porcentaje de cristalinidad. Los datos de la tabla representan los valores del análisis de varianza de cada factor, tanto en términos lineales como cuadráticos, en cada variable de respuesta ($p < 0.05$).

Tabla 5. Objetivos y niveles de factores óptimos relacionados con la ecuación de regresión.

Factores óptimos						
Respuesta (Y)	Meta	Factores (x)			Valor óptimo	Valor experimental
		Te arranque (A) mL	Glucosa (B) g	Temperatura (C) °C		
Rendimiento SCOPY (g)	Max	5.72	29.04	31.65	65.24	63.3 ± 3.2
Rendimiento Celulosa (g)	Max	66.27	31.32	28.05	0.68	0.669 ± 0.2
Hinchamiento (%)	Max	5.72	27.70	21.59	491.92	471.2 ± 39
Dispersión (%)	Min	5.72	11.86	26.59	1	0.8 ± 0.2
WVP (g·m/m²·s·Pa)	Max	5.72	42.13	38.39	34.96	32.60 ± 3.2
TS (Mpa)	Max	5.72	11.86	34.10	4.71	3.91 ±3.1
Elongación (%)	Max	27.30	24.58	31.63	3.56	3.26 ± 0.4
Cristalinidad (%)	Max	44.63	42.13	21.59	98.78	98.78 ± 10.2

Tabla de objetivos y niveles del diseño experimental utilizado para alcanzar el valor óptimo según el objetivo definido. Rendimiento de SCOPY: rendimiento de scoby en base húmeda. Rendimiento de celulosa: rendimiento de celulosa en base seca tras la purificación. WVP: permeabilidad al vapor de agua. TS: resistencia a la tracción. Los valores experimentales se obtuvieron a partir de tres réplicas. Para la interpretación, una vez definido el objetivo de optimización, el valor experimental se obtuvo estableciendo los factores (x) en los niveles correspondientes, mientras que el valor óptimo se predijo mediante el modelo estadístico.

Las propiedades físico-químicas y mecánicas de las películas de celulosa fueron significativamente influenciadas por los factores de fermentación, según los resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$) (Tabla 4). Específicamente, el grado de hinchazón se vio sustancialmente afectado por el término lineal de la temperatura (C) ($R^2 = 80.46$, DW = 1.4). La permeabilidad al vapor de agua (WVP) mostró una dependencia considerable de los términos lineales y cuadráticos de la temperatura (C y CC) y del término lineal del té iniciador (A) ($R^2 = 84.8$, DW = 1.67) (Tabla 4). En cuanto al porcentaje de elongación, solo el término cuadrático de la temperatura (CC) resultó ser significativo ($R^2 = 73.57$, DW = 1.38) (Tabla 4). En contraste, no se detectaron efectos significativos ($p > 0.05$) de los factores sobre la dispersión o la resistencia a la tracción bajo las condiciones estudiadas (Tabla 4). La Tabla 5 presenta un resumen de las condiciones óptimas predichas, obtenidas mediante modelos de regresión, para cada variable de respuesta.

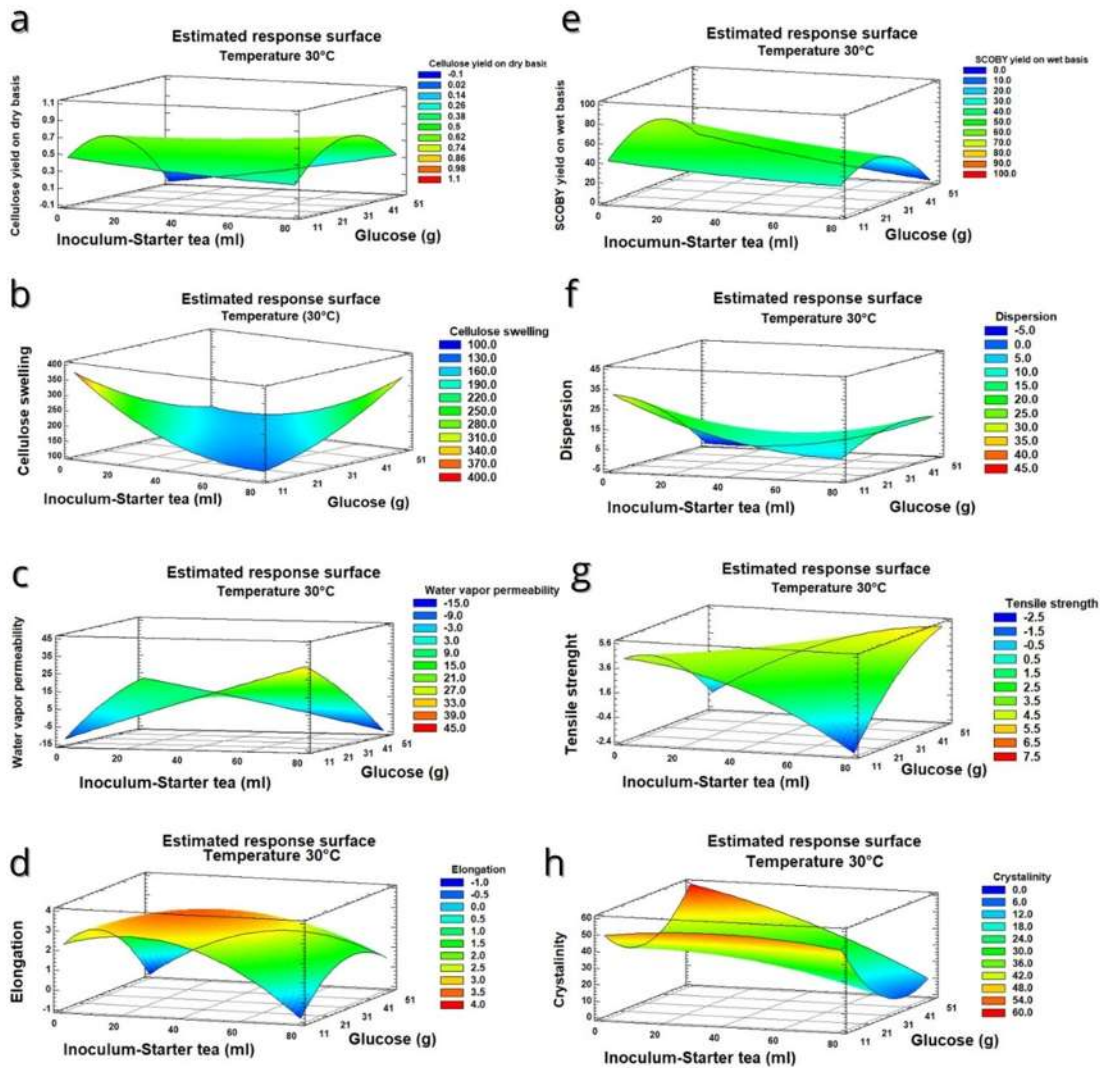


Fig. 2 Gráficas de superficie de respuesta de optimización del rendimiento de celulosa, SCOBY y caracterización de celulosa utilizando BC, té iniciador (ml) y glucosa (g) para una temperatura de 30 °C. (a) Rendimiento de celulosa en base seca, (e) Rendimiento de SCOBY en base húmeda, (b) hinchamiento de celulosa, (c) permeabilidad al vapor de agua, (d) elongación, (f) dispersión, (g) resistencia a la tracción y (h) porcentaje de cristalinidad.

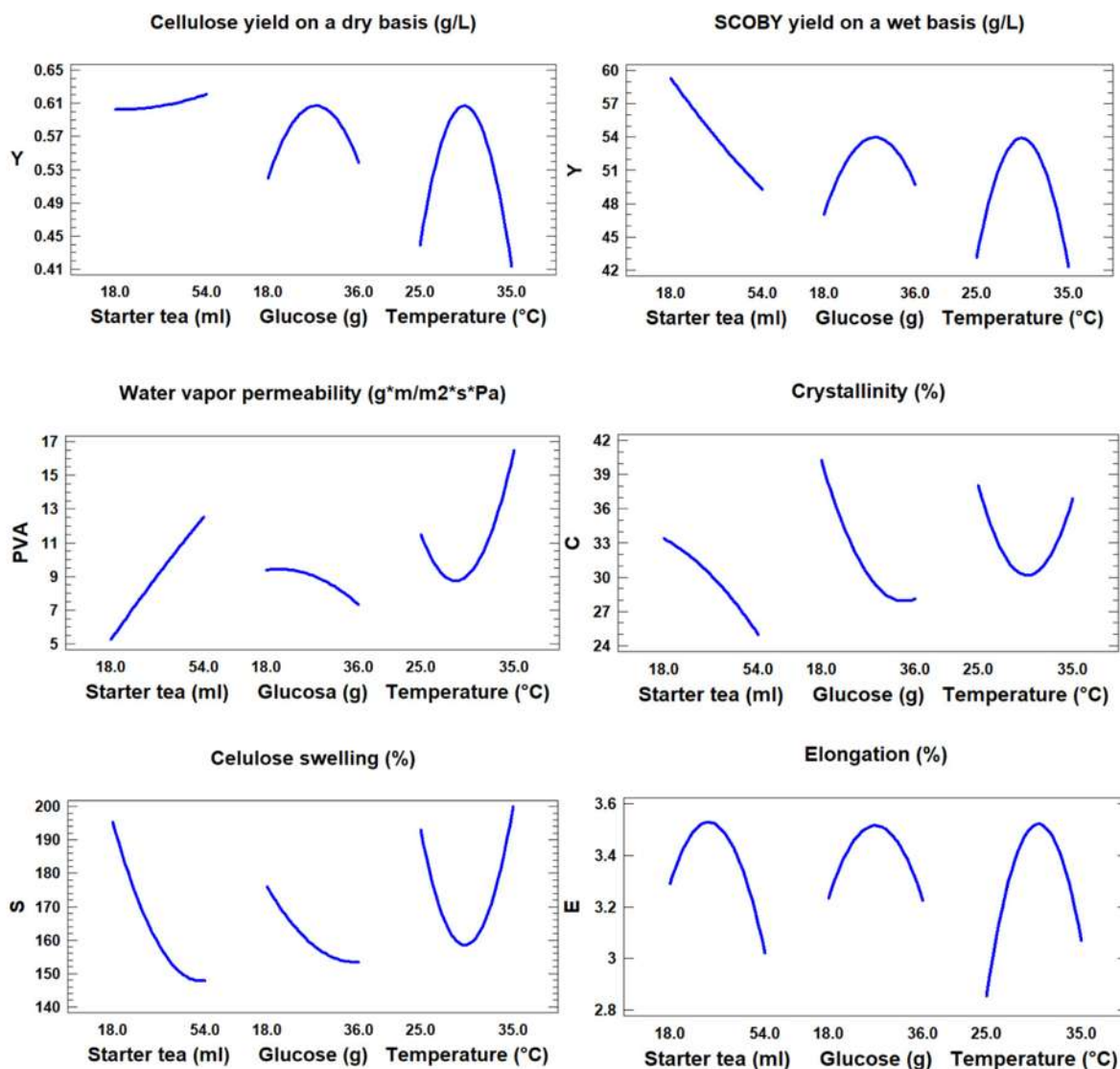


Fig. 3 Gráfico de efectos principales para las diferentes variables de respuesta optimizadas que tuvieron valores significativos en el estudio.

Influencia de la temperatura

El análisis reveló que la temperatura fue el factor predominante que influyó en las propiedades estudiadas. Las gráficas de efectos principales (Fig. 3) mostraron consistentemente un comportamiento cuadrático pronunciado para la hinchazón, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y la elongación, con un rendimiento óptimo (mínima hinchazón, mínima WVP, máxima elongación) observado en el rango de 28-32 °C. Esta dependencia térmica observada es indicativa de las características fisiológicas de los microorganismos mesófilos y de las propiedades cinéticas de

enzimas clave, como la celulosa sintasa (Lahiri *et al.*, 2021). Las temperaturas dentro del rango óptimo comúnmente reportado de 28-30 °C para las cepas productoras de celulosa bacteriana generalmente se asocian con la mayor actividad metabólica y enzimática, favoreciendo una red de celulosa más ordenada y funcional (Wang *et al.*, 2022). Sin embargo, algunas cepas, en particular ciertas *Komagataeibacter spp.* aisladas de kombucha, han demostrado termotolerancia, manteniendo el crecimiento y la síntesis de celulosa a temperaturas de hasta 37 °C (Sahoo *et al.*, 2020). Este rango más amplio (28-37 °C) sugiere que, aunque la mayoría de los cultivos funcionan mejor cerca del óptimo mesofílico, las cepas termotolerantes específicas pueden mantener una actividad adecuada a temperaturas más altas. Las desviaciones del rango óptimo no son simplemente una cuestión de cambiar la tasa de producción, sino que alteran fundamentalmente el contexto biológico y químico de la síntesis de celulosa. Basado en algunas evidencias, se puede establecer una cadena causal clara: el estrés térmico induce un cambio metabólico y microbiómico, lo que a su vez provoca una alteración estructural en el filme de celulosa, resultando finalmente en un cambio en sus propiedades físico-químicas (Altunordu *et al.*, 2025; De Filippis *et al.*, 2018; Aung *et al.*, 2022).

Influencia del té de inicio y glucosa

El volumen de té iniciador mostró un efecto estadísticamente significativo sobre la permeabilidad al vapor de agua (WVP), donde un mayor volumen de inóculo se correlacionó linealmente con un aumento en la permeabilidad, sugiriendo una influencia en la estructura de barrera de la película. Aunque las gráficas mostraron tendencias visuales para el té iniciador respecto a la hinchazón (negativa) y la elongación (cuadrática), estos efectos no fueron estadísticamente significativos según el ANOVA. De manera similar, la glucosa no demostró un impacto estadísticamente significativo en parámetros como la hinchazón, WVP o elongación en los modelos finales. Sin embargo, en este estudio, se observaron tendencias generales en las que las variaciones en la concentración de glucosa se correlacionaron con cambios en otras propiedades, incluidos aumentos en la resistencia a la tracción y la cristalinidad, así como disminuciones en hinchazón, permeabilidad al vapor de agua (WVP), elongación y dispersión. La literatura existente reconoce la influencia de la fuente de carbono en las propiedades finales (Lu *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2020; Lahiri *et al.*,

2021; Jakubczyk *et al.*, 2022), aunque los mecanismos son complejos; altas concentraciones pueden afectar negativamente el crecimiento y las propiedades físico-químicas y mecánicas resultantes, posiblemente a través del estrés osmótico o inhibición metabólica (Perdani *et al.*, 2025; Molina *et al.*, 2017). La formación de la película de celulosa y sus propiedades subsecuentes están inherentemente asociadas con los procesos metabólicos del consorcio de kombucha y las condiciones de cultivo (Aswini *et al.*, 2020; Nyhan *et al.*, 2022; Betlej *et al.*, 2023). Los efectos observados de los componentes de la fermentación sobre las propiedades mecánicas y de barrera están probablemente relacionados con la modulación del metabolismo microbiano y la activación diferencial de los operones de celulosa sintasa, lo que resulta en polímeros con características estructurales diferentes (Bimmer *et al.*, 2022; Buldum *et al.*, 2021). El desafío de realizar una investigación exhaustiva sobre el efecto aislado de cada componente, como la fuente de carbono, dentro de un sistema tan intrincado como el kombucha, subraya la necesidad de considerar las interacciones y el contexto más amplio del proceso de fermentación.

Cristalinidad

El análisis de varianza aplicado a los datos de cristalinidad de la celulosa indicó que los factores de fermentación tuvieron efectos estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) sobre esta propiedad. Específicamente, los términos lineales de la concentración de glucosa y el volumen de té iniciador fueron identificados como significativos, y solo el término cuadrático de la temperatura fue significativo (Tabla 4). El modelo de regresión resultante explicó aproximadamente el 70% de la variabilidad observada en la cristalinidad ($R^2 = 70.46$) y presentó una estadística DW de 1.46. El valor de R^2 , aunque indica una correlación significativa, también refleja la complejidad reconocida de la cristalinidad como propiedad estructural. Esta complejidad proviene de su dependencia de múltiples factores de fermentación interconectados (por ejemplo, cepa microbiana, composición del medio, temperatura, pH, etc.), lo que hace difícil su control preciso y optimización aislada sin afectar simultáneamente otros parámetros relevantes como el rendimiento o la morfología del material. A pesar de esta complejidad inherente, el análisis permitió identificar factores clave con influencia significativa y observar tendencias sobre cómo las condiciones

de fermentación estudiadas modulaban esta característica estructural de la celulosa obtenida.

La Fig. 4a presenta los espectros de difracción de rayos X de todas las muestras, en los cuales se identificaron picos de difracción en valores de 2θ de 14.5° , 16.7° y 22.8° . Estos picos permitieron asignar la presencia de la fase cristalina I α de la celulosa, de acuerdo con lo reportado por French (2014).

Se aplicó una estrategia de refinamiento secuencial utilizando el software MAUD (Fig. 4b). En una primera etapa, se refinaron de manera conjunta el factor de escala, el fondo y el ensanchamiento instrumental, junto con un tamaño de cristalito isotrópico para la celulosa I α . Posteriormente, se refinaron los parámetros de red a y b , seguidos del ángulo γ y el primer término de microdeformación. El parámetro del eje c se incorporó en una etapa posterior.

Una vez obtenido un ajuste satisfactorio, se introdujo la contribución de celulosa amorfa empleando un archivo .cif de celulosa II, con el tamaño de cristalito fijado en 12 Å. Finalmente, se refinaron los parámetros anisotrópicos de tamaño-deformación mediante el modelo de Popa, lo que permitió mejorar la descripción direccional de los cristalitos.

El refinamiento convergió adecuadamente, obteniéndose un factor de ajuste ($R_{wp} \approx 7.01\%$), lo que evidencia una correlación robusta entre las intensidades calculadas y experimentales. El análisis cuantitativo de fases indicó que la celulosa bacteriana producida bajo las condiciones optimizadas de fermentación de kombucha presenta una estructura semicristalina, compuesta aproximadamente por $\sim 62\%$ de celulosa I α y $\sim 38\%$ de celulosa amorfa.

Adicionalmente, el ensanchamiento anisotrópico de los picos se modeló siguiendo las reglas de Popa, lo que reveló una dependencia direccional en las dimensiones de los cristalitos y respalda la morfología nanofibrilar del material. El tamaño aparente promedio de los cristalitos fue de aproximadamente ~ 4 nm (40 Å), con una anisotropía consistente con la red organizada de microfibrillas de celulosa.

Se evaluó la inclusión de la fase celulosa I β ; sin embargo, no se observó una mejora estadísticamente significativa en la calidad del ajuste (los cambios en R_{wp} fueron despreciables) y la fracción refinada de I β resultó insignificante ($<1\%$). Por ello, se adoptó un modelo monofásico correspondiente a la celulosa I α , considerado la representación físicamente más robusta y coherente con la información cristalográfica reportada por French (2014).

La celulosa puede presentarse en distintas formas cristalinas, de las cuales el tipo I es el más común en la naturaleza. Las cadenas de glucosa se encuentran unidas mediante enlaces de hidrógeno que se extienden entre moléculas adyacentes, lo que confiere estabilidad a la estructura cristalina (Nishiyama et al. 2003). La coexistencia de sus subtipos, en proporciones variables dependiendo del origen de la celulosa, es frecuente y suele dar lugar a picos superpuestos en los análisis de difracción de rayos X (Sugiyama et al. 1991; Rajai et al. 1984).

Las fases cristalinas de las muestras de celulosa se muestran en la Fig. 4c, donde los picos de difracción fueron indexados de acuerdo con la celda unitaria triclinica de la celulosa I α (planos 100, 010, 001 y 110). La celulosa bacteriana se caracteriza típicamente por un alto contenido de la celda unitaria triclinica de una sola cadena (P1), correspondiente a la fase I α , mientras que la celulosa vegetal está dominada por la celda unitaria monoclinica de dos cadenas, asociada a la fase I β . Aunque la coexistencia de ambos alomorfos es común, su diferenciación resulta compleja debido a la marcada superposición de sus perfiles de difracción. Por ejemplo, las reflexiones características de la fase I α ($\approx 14.3^\circ$, 16.8° y 21.8°) se encuentran muy próximas a las de la fase I β (14.8° , 16.4° y 22.7°) (French 2014; Duchemin 2017). En este estudio, los resultados del refinamiento indicaron que el patrón de difracción se describe mejor mediante la estructura I α , en concordancia con la clasificación basada en el valor Z ($Z > 0$), sin resolverse picos distintivos atribuibles exclusivamente a la fase I β (Tabla 6).

El estudio identificó diversos factores influyentes, como la concentración de glucosa y el volumen de té iniciador, los cuales afectaron significativamente el porcentaje de cristalinidad ($p \leq 0.05$). En general, la presencia de altas concentraciones de bacterias y carbohidratos en el medio conduce a una disminución de la cristalinidad de la celulosa, fenómeno asociado al metabolismo bacteriano y al proceso de síntesis de este biopolímero. La biosíntesis de la celulosa ocurre en dos etapas principales: inicialmente, la glucosa se convierte en uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), que actúa como precursor para la formación de celulosa; posteriormente, las fibras de celulosa se ensamblan y son liberadas al medio una vez completado el proceso (Ho et al. 2025; Malci et al. 2024). Se ha observado que los microorganismos implicados poseen poros alineados en la membrana celular, con un diámetro aproximado de 3.5 nm, los cuales se encuentran rodeados internamente por el complejo enzimático de la celulosa sintasa.

En el sustrato de crecimiento, la celulosa se organiza inicialmente en pequeñas unidades estructurales con un diámetro cercano a 1.5 nm. Estas subfibrillas se agrupan posteriormente para formar microfibrillas que, al acumularse, dan lugar a fibras y cintas de celulosa (Villarreal et al. 2018). No obstante, bajo condiciones de alta concentración de glucosa, tanto el crecimiento celular como la producción de celulosa pueden verse inhibidos por la acumulación de ácidos (ceto)glucónicos, lo que provoca una disminución del pH del medio (Cazón et al. 2022).

Los resultados también mostraron que la temperatura influyó de manera significativa en la resistencia a la tensión y la elongación del material. Este efecto fue corroborado por el modelo de regresión (Tabla 2), el cual indicó que temperaturas elevadas favorecen una mejor alineación de las cadenas de celulosa y un incremento en la fuerza de los enlaces intercadena. Este comportamiento concuerda con reportes previos (Yu et al. 2024), que señalan que la optimización de la temperatura incrementa la cristalinidad y, en consecuencia, mejora las propiedades mecánicas del material.

Asimismo, se observó una correlación entre un mayor índice de cristalinidad y una menor permeabilidad al vapor de agua (WVP), atribuida a la reducción de la movilidad molecular y al aumento de la densidad estructural del material. Este efecto ha sido reportado también en otros biocompuestos, como nanocompuestos basados en PLA, donde la tasa de transmisión de vapor de agua disminuyó en un 44% en el estado cristalino, frente a solo un 24% en el estado amorfo (Trifol et al. 2020). En conjunto, estos resultados evidencian que los parámetros de optimización no solo impactan el desempeño del proceso, sino que también determinan las propiedades funcionales del material. La Tabla 6 presenta los valores de espaciamiento interplanar (*d-spacing*) obtenidos por XRD, utilizados para clasificar la celulosa como rica en α o dominada por β , de acuerdo con la ecuación propuesta por Wada et al. (2001):

$$Z = 1693d_1 - 902d_2 - 549$$

Donde $Z > 0$ es rico en α , y si $Z < 0$ es dominante en β .

Se observa que para todas las muestras, este valor de $Z > 0$, lo que corresponde a celulosa rica en α .

Tabla 6. Obtención del valor Z para determinar si las muestras de celulosa son ricas en $I\alpha$ o dominadas por $I\beta$.

Corrida	Espaciamiento interplanar (d)		
	d_1	d_2	Z
K1	0.6214	0.5464	10.2716
K2	0.6091	0.5294	4.8160
K3	0.6078	0.5294	2.6086
K4	0.6078	0.5273	4.4623
K5	0.6064	0.5294	0.2008
K6	0.6145	0.5370	6.9985
K7	0.6062	0.5280	1.1252
K8	0.6091	0.5280	5.8832
K9	0.6021	0.5202	1.2828
K10	0.6102	0.5302	5.9394
K11	0.6091	0.5302	3.9662
K12	0.6049	0.5245	2.0372
K13	0.6054	0.5241	3.2551
K14	0.6044	0.5221	3.3320
K15	0.6074	0.5272	3.8870
K16	0.6069	0.5236	6.1921
K17	0.6102	0.5322	4.1161

Un análisis más detallado de los efectos principales mostrados en la Fig. 3 revela una modulación apreciable ejercida por cada uno de los factores de fermentación. El volumen de té iniciador presentó una tendencia lineal, en la cual la cristalinidad disminuyó hasta valores inferiores al máximo observado en el té inicial. En contraste, tanto la concentración de glucosa como la temperatura exhibieron comportamientos no lineales, descritos por curvas en forma de U. En estos casos, el porcentaje de cristalinidad tiende a disminuir desde niveles bajos hasta alcanzar un mínimo en concentraciones intermedias de glucosa y temperatura, para posteriormente incrementarse de manera pronunciada a concentraciones o temperaturas más elevadas.

Las respuestas no monótonas observadas en este estudio reflejan la complejidad del efecto que cada parámetro ejerce sobre la estructura cristalina de la celulosa y, en consecuencia, sobre sus propiedades finales.

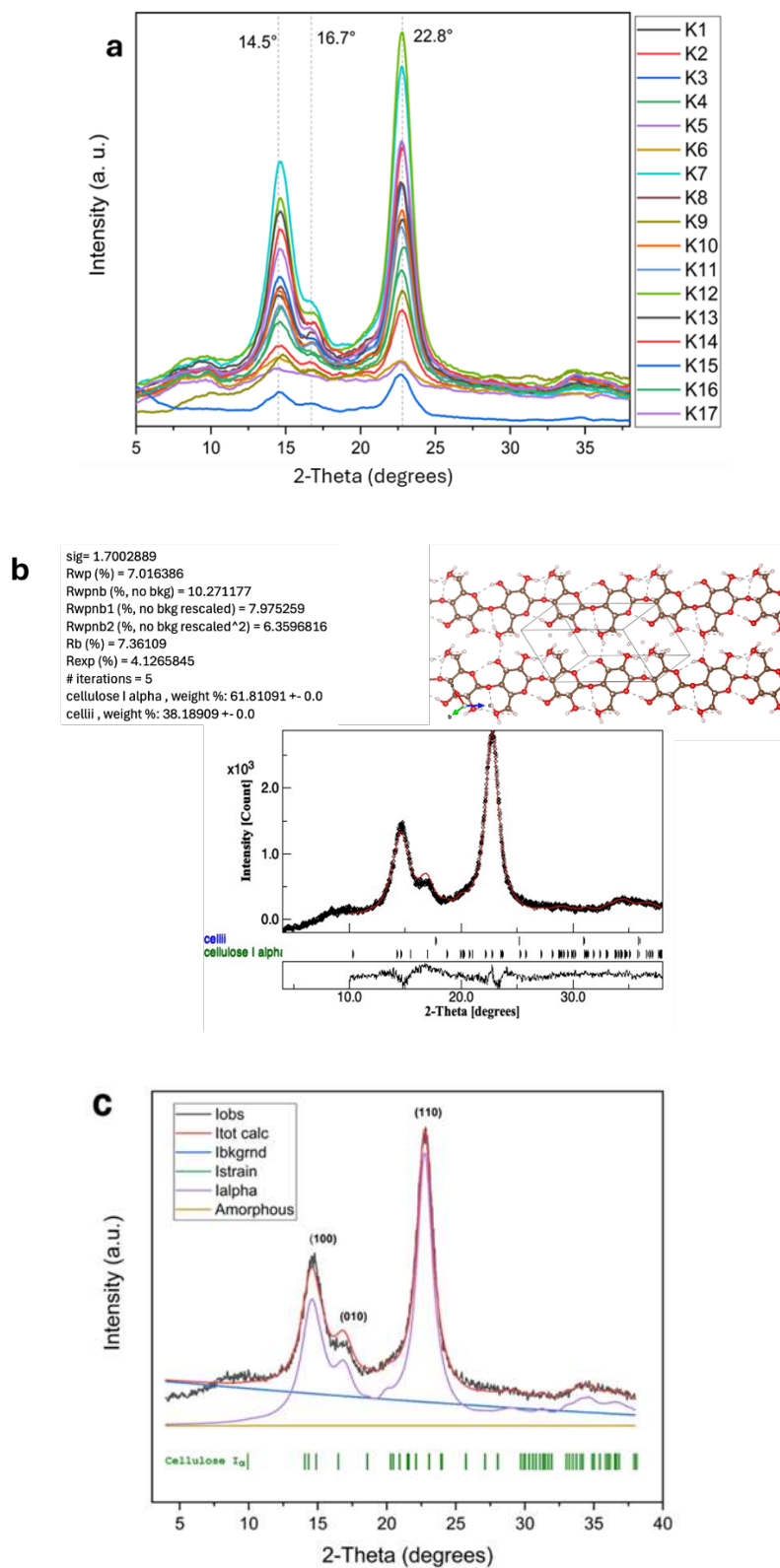


Fig. 4. a) Se presentan los espectros obtenidos con el tubo de Cu; b) Resultado del refinamiento secuencial de Rietveld de la muestra K12 realizado con el software MAUD, se muestra el ajuste del patrón de difracción de rayos X y la estructura cristalina refinada; y c) La fase cristalina de celulosa presentes en la muestra K12 que fueron identificadas e indexadas utilizando el software MAUD.

Optimización simultánea

Tras un análisis detallado de la metodología de superficie de respuesta (RSM), se identificó una fuerte correlación para predecir el rendimiento de SCOPY, el rendimiento de celulosa seca, el porcentaje de hinchazón, la permeabilidad al vapor de agua, el porcentaje de elongación y la cristalinidad. Sin embargo, los parámetros que mejor se ajustaron a la función de deseabilidad fueron la hinchazón de la celulosa y la permeabilidad al vapor de agua. Esto permitió establecer condiciones óptimas de acuerdo con los valores mínimos y máximos para las variables de respuesta seleccionadas, como se detalla en los criterios definidos. Como se ilustra en la Fig. 5, la superficie de respuesta 3D genera un valor de deseabilidad global de 0.85. El rango de la función de deseabilidad se expresa desde 0, lo que indica una respuesta completamente indeseable, hasta 1, lo que denota una respuesta completamente deseada (Derringer & Suich, 1980). El análisis preliminar de las gráficas de superficie de respuesta y los datos indica que se logró la optimización simultánea utilizando 66.27 mL de té iniciador, 22.37 g de glucosa y una temperatura de 28.4 °C. El modelo de deseabilidad predijo respuestas de 491.92% de hinchazón y 34.96 g·m/m²·s·Pa para la permeabilidad al vapor de agua (ver Tabla 7). Además, los valores predichos para las variables de respuesta mediante el proceso de optimización individual fueron comparados con los valores predichos por el proceso de optimización simultánea. Para validar los resultados predichos por la optimización simultánea, se realizaron experimentos de verificación en triplicado, obteniendo un porcentaje de hinchazón de 399.32% y una permeabilidad al vapor de agua de 27.09 g·m/m²·s·Pa (ver Tabla 7). La fuerte correlación entre estos resultados confirmó que el modelo era adecuado para reflejar la optimización simultánea esperada, como lo demuestra la diferencia de menos del 10% entre los valores predichos y los experimentales. Los hallazgos mostraron correlación con los datos obtenidos del análisis de optimización utilizando funciones de deseabilidad, lo que indica que el diseño compuesto central (CCD) con puntos estrella combinado con la función de deseabilidad para las dos respuestas seleccionadas puede optimizar eficazmente el proceso para los parámetros de caracterización objetivo.

La aplicación de la optimización mediante RSM (Tabla 8) ha generado una celulosa bacteriana (BC) que exhibe propiedades mecánicas y físico-químicas distintivas. El

rendimiento de SCOPY observado fue de 70 g/L y 2.94 g/L para BC. El resultado de la dispersión de celulosa (3.843) indica una resistencia satisfactoria del material, lo cual es imprescindible para aplicaciones donde el material debe mantener su integridad en ambientes húmedos. El valor de hinchazón (399.32%) indica una notable capacidad de absorción de agua, sugiriendo alta porosidad y flexibilidad. Con respecto a la resistencia a la tracción, que se midió en 4.00 MPa, y la elongación, que se midió en 3.84%, los hallazgos son notables. La permeabilidad al vapor de agua (27.093 g·m/m²·s·Pa) indicó que el material exhibió un grado moderado de permeabilidad. Además, los resultados obtenidos del análisis de XRD de la celulosa optimizada muestran que la estructura cristalina de la muestra sigue los patrones típicos previamente reportados (Fig. 6), donde los picos de difracción (14.6°, 16.8° y 22.9°) correspondientes a las fases cristalinas de la celulosa están claramente definidos. El valor de cristalinidad obtenido, 59.89%, es significativamente alto en comparación con otras formas de celulosa, reflejando un aumento en la organización de las cadenas moleculares tras el proceso de optimización. Este porcentaje de cristalinidad se encuentra dentro del rango esperado para materiales celulósicos que han sido optimizados mediante tratamientos físicos o químicos, y es consistente con los patrones cristalográficos típicos de la BC.

Un análisis comparativo de la literatura científica (ver Tabla 9) revela que la BC obtenida en la presente investigación, utilizando el consorcio de Kombucha, exhibe un perfil de propiedades distintivo. Este perfil destaca fortalezas notables y áreas para una posible optimización futura. En términos de rendimiento, la BC alcanzó un valor de 2.94 g/L después de 7 días. En el contexto más amplio de la producción de celulosa de kombucha, este rendimiento demuestra una posición competitiva, superando los rendimientos reportados para la cepa *Komagataeibacter* K2G56 (0.59 g/L) (China *et al.*, 2021) y *Gluconacetobacter entanii* en medio de cáscara de nuez (2.816 g/L) (Dórame *et al.*, 2019), así como otros estudios documentados, como el de Campano *et al.* (2016), en su artículo de revisión, donde se observan rendimientos más bajos en algunas cepas de *Komagataeibacter spp.* en kombucha de 0.251 g/L y ligeramente menores en algunas cepas aisladas en medios especiales como Hestrin-Schramm (HS) con rendimientos de 4.77 g/L (Campano *et al.*, 2016; Hamed *et al.*, 2023). Aunque este rendimiento es inferior al de cepas aisladas altamente optimizadas, que pueden superar los 10 g/L (Campano *et al.*, 2016; China *et al.*, 2021), es crucial resaltar que la optimización lograda en este estudio se refiere al consorcio completo

y no a una cepa aislada, lo que representa una característica distintiva. Una comparación de los resultados con los reportados en la literatura revela tanto similitudes como diferencias respecto a las propiedades del material. En cuanto a la resistencia a la tracción, los valores obtenidos en este estudio (aproximadamente 4 MPa) fueron más altos que los presentados por Betlej *et al.* (2020), quienes reportaron valores de resistencia a la tracción de hasta 0.20 MPa en muestras de celulosa obtenidas con microorganismos de kombucha. También presentaron valores de hasta 20 mm de elongación, lo que, comparable con nuestro trabajo, equivaldría a casi 2 mm (tomando en cuenta la metodología), lo que sugiere que la combinación específica de sustratos y fuentes de carbono utilizadas en nuestro estudio podría ejercer una influencia significativa sobre la elasticidad del material, lo que resultó en un 3.8% obtenido. En cuanto a la capacidad de hinchazón, el valor registrado fue considerablemente alto (399.32%), indicando una alta absorción de agua. Este parámetro no ha sido documentado de manera consistente en estudios previos, lo que sugiere que la optimización del medio de cultivo jugó un papel crucial en la mejora de esta propiedad. El aspecto más relevante es la confirmación de la alta cristalinidad (59.89%) en la BC producida por el consorcio de Kombucha utilizado. Este valor es equivalente o superior a los documentados en estudios selectos, que van del 60% al 80%, destacando la integridad estructural de la celulosa aislada (Rackov *et al.*, 2025; Feng *et al.*, 2024; Seddiqi *et al.*, 2021; Leonarski *et al.*, 2021; Dunlop *et al.*, 2020).

Tabla 7. Comparación de resultados obtenidos con optimización simultánea contra resultados reales.

Variable de respuesta	Valor óptimo previsto	Valor previsto de la optimización simultánea	Valores de optimización experimental ^a	Diferencia porcentual
Hinchamiento celulosa (%)	491.92	414.72	399.32±2.91	3.71
Permeabilidad al vapor de agua (g·m/m ² ·s·Pa)	34.96	28.42	27.09±2.90	4.67

Valores predichos en optimización simple y optimización simultánea. Así como valores obtenidos experimentalmente de dos variables de respuesta.

a. Los datos se obtienen del promedio de tres repeticiones.

Tabla 8. Caracterización final del tamaño optimizado del biofilm de celulosa.

Factor	Valor ^a
Rendimiento SCOBY	70g/L
Rendimiento BC	2.94 g/L
Dispersión (%)	3.84±1.49
Hinchamiento (%)	399.32±2.91
Fuerza de tensión (MPa)	4.00±0.14
Elongación (%)	3.84±0.90
Permeabilidad al vapor de agua (g·m/m ² ·s·Pa)	27.09±2.90
Cristalinidad	59.89%

a. Los datos se obtienen del promedio de tres repeticiones.

Tabla 9. Comparación entre las características de la celulosa obtenida de diferentes fuentes.

Fuente/Microorganismo	Medio de cultivo	Rendimiento (g/L)	Tiempo (días)	Referencias
Kombucha	Té de kombucha, fuente de carbono (glucosa)	2.94 g/L	7 días	Trabajo actual
Komagataeibacter (K2G36 and K2G30)	fuelle de carbono (sacarosa)	0.59 - 23 g/L	6-14 días	(China et al. 2021)
Gluconacetobacter entanii en cáscara de nuez	Cáscara de nuez como fuente de carbono	2.816 ± 0.040 g/L	28 días	(Dórame-Miranda et al. 2019)
Acinetobacter lowffii en Kombucha	Hestrin-Schramm (HS), te negro (BT) y te negro modificado. 6.0% azúcar comercial	4.77-4.61 g/L	10 días at 30 °C	(Hamed et al. 2023)
Komagataeibacter spp. en Kombucha	Múltiples medios de cultivo	Yields: ranged from 0.251 g/L to 7.2 g/L and up to 35.3 g/L for special conditions	3-14 días	(Campano et al 2016)
kombucha-fermented suero de soja	suero de soja y tofu 8.5% sacarosa	4.20 g	11 días	(Feng et al. 2024)
Kombucha (SCOBY) en diferentes té	Té verde, té negro, té rooibos	not specified	7-10 días	(Gaggia et al. 2019)

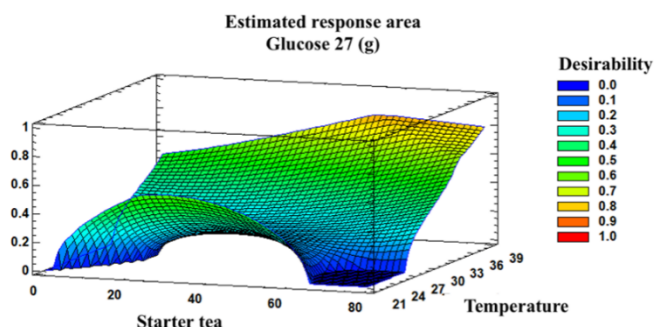


Fig. 5. Gráfica de superficie de respuesta para optimización simultánea. Efecto de la concentración (g) y la temperatura (°C) del té iniciador para una concentración de 27 g de glucosa.

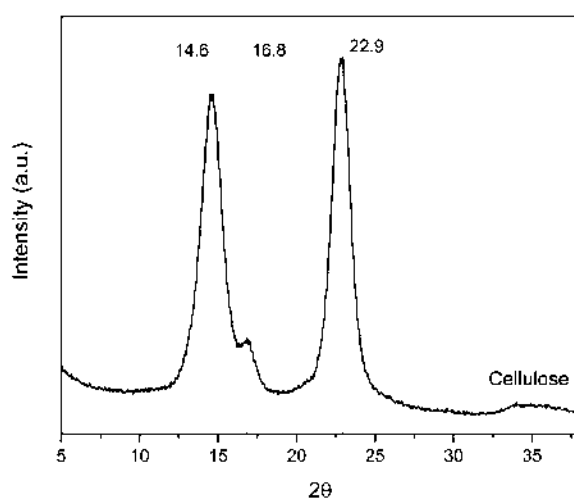


Fig. 6. XRD de la celulosa bacteriana optimizada (CB), donde se observan los picos de difracción característicos y la estructura cristalina triclinica correspondiente a la celulosa Ia, así como el valor de cristalinidad obtenido (59.89%).

Conclusión

Se validó un modelo predictivo utilizando RSM, lo que permitió la producción de celulosa bacteriana (CB) con características funcionales relevantes. A diferencia de los sistemas convencionales que dependen de cultivos puros en biorreactores para el control del producto, este trabajo demuestra que la optimización puede lograrse utilizando el consorcio simbiótico de kombucha. Este enfoque representa una mejora sustancial, ya que combina el entendimiento y control de las propiedades del material con las ventajas inherentes del sistema de kombucha: menores costos de producción y estabilidad adecuada del proceso. Bajo condiciones óptimas (66.27 mL de té

iniciador, 22.37 g de glucosa, 28.4 °C), se obtuvo un rendimiento de 2.94 g/L de CB con una resistencia a la tracción de 4.00 MPa y una cristalinidad de 59.89%. Así, se estableció un método que une la simplicidad de la fermentación tradicional con un control parcial del producto final. En cuanto a la reproducibilidad industrial, la variabilidad inherente del consorcio no es un obstáculo insuperable. La clave para garantizar la consistencia radica en implementar un control de calidad estricto mediante el mantenimiento de un cultivo primario (o madre) del cual se inicien todos los lotes de producción subsecuentes. Esta práctica asegura la estabilidad microbiana a lo largo del tiempo, garantizando que las propiedades funcionales optimizadas del material se conserven y evitando alteraciones que puedan afectar el producto final.

Literatura citada

Adhikari G. P. 2022. **Interpreting the basic results of multiple linear regression.**

Scholars' Journal **5**(1): 22–37.

Akhter, R., F. A. Masoodi, T. A. Wani y S. A. Rather. 2019. **Functional characterization of biopolymer based composite films: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents.** International Journal of Biological Macromolecules 137: 1245–55. Aquí el volume lo marcas sin cursiva

AL-Kalifawi E. J. y I. A. Hassan. 2014. **Factors influence on the yield of bacterial cellulose of kombucha (Khubdat Humza).** Baghdad Science Journal 11(3): 1420–1428.

Altunordu, H., N. Kayra, M. Kalkan, Ö. Üstün-Aytekin, E. Nikerel y A. AYTEKIN. 2025. **Enhancing Bacterial Cellulose Yield and Quality Through Controlled Stress Conditions in Komagataeibacter xylinus Fermentation.** Polymers for Advanced Technologies 36.

Amorim, L. F. A., L. Li, A. P. Gomes, *et al.* 2023. **Sustainable bacterial cellulose production by low cost feedstock: evaluation of apple and tea by-products as alternative sources of nutrients.** Cellulose 30: 5589–5606 (2023).

ASTM International 2014 Standard test method for tensile properties of plastics

(ASTM D638-14) ASTM International

ASTM International 2017 Standard test method for tensile properties of thin

plastic sheeting (ASTM D882-02(2017)) ASTM International

Aswini, K., N. O. Gopal y S. Uthandi. 2020. **Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1**. BMC Biotecnología 20: 46.

Aung T. y J. B. Eun. 2022. **Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (*Porphyra dentata*) during fermentation**. LWT- Food Science and Technology 154.

Avcioglu N.H. 2022. **Bacterial cellulose: recent progress in production and industrial applications**. World Journal of Microbiology and Biotechnology 38: 86.

Bagewadi, Z. K., V. Dsouza, D.A. Yaraguppi, S.I. Mulla, S. H.Deshpande y S. S. Shettar. 2023. **Low cost production of bacterial cellulose through statistical optimization and developing its composites for multipurpose applications**. Process Biochemistry 125: 47–60.

Behera B., D. Laavanya y P. Balasubramanian. 2022. **Techno-economic feasibility assessment of bacterial cellulose biofilm production during the Kombucha fermentation process**. Bioresource Technology 346.

Betlej I., R. Salerno-Kochan, K. J. Krajewski, J. Zawadzki y P. Boruszewski. 2020. **The influence of culture medium components on the physical and mechanical properties of cellulose synthesized by kombucha microorganisms**. Bioengineering and Resuscitation 15(2): 3125–3135.

- Bimmer M., M. Mientus, A. Klingl, A. Ehrenreich y W. Liebl. 2022. **The Roles of the Various Cellulose Biosynthesis Operons in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769**. Applied and Environmental Microbiology 88(7): 1–18.
- Buldum G. y A. Mantalaris. 2021. **Systematic Understanding of Recent Developments in Bacterial Cellulose Biosynthesis at Genetic, Bioprocess and Product Levels**. International Journal of Molecular Sciences 22(13): 7192.
- Campano C., A. Balea, A. Blanco y C. Negro. 2016. **Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review**. Cellulose 23: 57–91.
- Cazón P., G. Puertas y M. Vázquez. 2022. **Production and Characterization of Active Bacterial Cellulose Films Obtained from the Fermentation of Wine Bagasse and Discarded Potatoes by *Komagateibacter xylinus***. Polymers 14(23): 5194.
- China S., L. De Vero, K. Anguluri, M. Brugnoli, D. Mamlouk y M. Gullo. 2021. **Kombucha tea as a reservoir of cellulose producing bacteria: Assessing diversity among komagataeibacter isolates**. Applied Sciences 11: 1595.
- Cruz M. A., O. Flor-Unda, A. Avila, M. D. Garcia y L. Cerda-Mejía. 2024. **Advances in Bacterial Cellulose Production: A Scoping Review**. Coatings 14: 1401
- Cubas A. L. V., A. P. Provin, A. R. A. Dutra, C. Mouro y I. C. Gouveia. 2023. **Advances in the Production of Biomaterials through Kombucha Using Food Waste: Concepts, Challenges, and Potential**. Polymers 15(7): 1701.
- De Filippis F., A. D.Troise, P. Vitaglione y D. Ercolini. 2018. **Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation**. Food Microbiology 73: 11–16.

- Derringer G. y R. Suich. 1980. **Simultaneous Optimization of Several Response Variables**. Journal of Quality Technology 12(4): 214–219.
- Digel I., N. Akimbekov, E. Rogachev y N. Pogorelova. 2023. **Bacterial cellulose produced by Medusomyces gisevii on glucose and sucrose: biosynthesis and structural properties**. Cellulose 30: 11439–11453.
- Dórame-Miranda R. F., N. Gámez-Meza, L. Medina-Juárez, J. M. Ezquerra-Brauer, M. Ovando-Martínez y J. Lizardi-Mendoza. 2019. **Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter entanii 8 using pecan nutshell as carbon source and its chemical functionalization**. Carbohydrate Polymers 207: 91–99.
- Duchemin B. 2017. **Size, shape, orientation and crystallinity of cellulose I β by X-ray powder diffraction using a free spreadsheet program**. Cellulose 24: 2727–2741.
- Dunlop M. J., C. Clemons y R. Reiner. 2020. **Towards the scalable isolation of cellulose nanocrystals from tunicates**. Scientific Reports 10: 19090.
- Elom E. E., C. O. Okeh, U. Cv, P. C. Igwe, I. Yusuf y K. E. Aroh. 2022. **Optimum temperature for Bacterial cellulose production from cassava peel by acetic acid bacteria Isolated from palmwine in Abakaliki , Nigeria**. Energy, Ecology and Environment 40: 1865–1872.
- Feng X., Z. Ge y Y. Wang. 2024. **Production and characterization of bacterial cellulose from kombucha-fermented soy whey**. Food Production, Processing and Nutrition 6: 20.
- French A. D. 2014. **Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs**. Cellulose 21: 885–896.

- Gagliardi T. R., A. de Farias Nascimento y G. A. Valencia. 2025. **Kombucha Bacterial Cellulose: A Promising Biopolymer for Advanced Food and Nonfood Applications**. *Foods* 14(5): 738.
- Goh W. N., A. Rosma, B. Kaur, A. Fazilah, A. A. Karim y R. Bhat. 2012. **Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose**. *International Food Research Journal* 19(1): 109-117.
- Hamed R. M., M. M. Rashed y M. Alhaj. 2023. **Production of bacterial cellulose nanofibers (BCNF) from sweetened black tea: An eco-friendly approach for sustainable bio-production**. *Revista Mundial de Microbiología y Biotecnología*, 39:48.
- Hussain S., R. Akhter, S. S. Maktedar. 2024. **Advancements in sustainable food packaging: from eco-friendly materials to innovative technologies**. *Sustainable Food Technology* 2: 1297–1364
- Jakubczyk K., P. Kupnicka, K. Melkis, O. Mielczarek, J. Walczyńska, D. Chlubek y K. Janda-Milczarek. 2022. **Effects of Fermentation Time and Type of Tea on the Content of Micronutrients in Kombucha Fermented Tea**. *Nutrients* 14: 4828.
- Jayabalan, R., R. V. Malbaša, E. S. Lončar, J. S. Vitas y M. Sathishkumar. 2014. **A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4): 538–550.
- Kalashnikova O., E. Pankova, S. Sukhikh, O. Babich y I. Samusev. 2024. **Production of bacterial cellulose using a symbiotic consortium of bacteria and yeast on soybean molasses medium**. *Food Science and Technology* 205: 116480.

- Laavanya D., S. Shirkole, y P. Balasubramanian. 2021. **Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation.** Journal of Cleaner Production 295: 126454.
- Lahiri D., M. Nag, B. Dutta, A. Dey, T. Sarkar, S. Pati, H. A. Edinur, Z. Abdul Kari, N. H. Mohd Noor y R. R. Ray. 2021. **Bacterial cellulose: Production, characterization and application as antimicrobial agent.** International Journal of Molecular Sciences 22: 12984.
- Lawson L., L. M. Degenstein, B. Bates, W. Chute, D. King y P. I. Dolez. 2022. **Cellulose textiles from hemp biomass: Opportunities and challenges.** Sustainability 14(22): 15337.
- Leonarski E., K. Cesca, O. M. A. Borges, D. de Oliveira y P. Poletto. 2021. **Typical kombucha fermentation: Kinetic evaluation of beverage and morphological characterization 1 of bacterial cellulose.** Journal of Food Processing and Preservation 45: 16100.
- Lu T., H. Gao, B. Liao, J. Wu, W. Zhang, J. Huang, M. Liu, J. Huang, Z. Chang y M, Jin. 2020. **Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain based on whole-genome analysis.** Carbohydrate Polymers 232: 115788.
- Mehrotra R., S. Sharma, N. Shree y K. Kaur. 2023. **Bacterial cellulose: an ecological alternative as a biotextile.** Biosciences Biotechnology Research Asia 20: 449–63.
- Molina-Ramírez C., M. Castro, M. Osorio, M. Torres-Taborda, B. Gómez, R. Zuluaga, C. Gómez, P. Gañán, O. J. Rojas, y C. Castro. 2017. **Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the**

- Low pH Resistant Strain Komagataeibacter Medellinensis.** Materials 10: 639.
- Nascimento P., R. Marim, G. Carvalho y S. Mali. 2016. **Nanocellulose Produced from Rice Hulls and its Effect on the Properties of Biodegradable Starch Films.** Journal of Materials Research 19(1): 167–174.
- Nishiyama Y., J. Sugiyama, H. Chanzy, y P. Langan. 2003. **Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I α from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction.** Journal of the American Chemical Society 125: 14300–14306.
- Nyhan L. M., K. M. Lynch, A. W. Sahin y E. K. Arendt. 2022. **Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review.** Applied Microbiology 2: 73–103.
- Perdani C. G., I. Fidiawati Nurika y S. Gunawan. 2025. **Exploring the Impact of Sugar Type and Concentration on Bacterial Nanocellulose Production by Komagataeibacter saccharivorans Using Sapodilla as a Substrate.** BIO Web of Conferences 163.
- Rackov N., N. Janßen, A. Akkache, B. Drotleff, B. Beyer, E. Scoppola y S. Hathroubi. 2025. **Bacterial cellulose: Enhancing productivity and material properties through repeated harvest.** Biofilm 9: 100276.
- Rahman S. S. A., T. Vaishnavi, G. S. Vidyasri, K. Sathya, P. Priyanka, P. Venkatachalam y S. Karuppiah. 2021. **Production of bacterial cellulose using Gluconacetobacter kombuchae immobilized on Luffa aegyptiaca support.** Scientific Reports 11(1): 2912.
- Rangaswamy B. E., K. P. Vanitha y B. S. Hungund. 2015. **Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit.** International Journal of Polymer Science 280784.

- Ribeiro D. C. M., R. C. Rebelo, F. De Bon, J. F. J. Coelho y A. C. Serra. 2021. **Process Development for Flexible Films of Industrial Cellulose Pulp Using Superbase Ionic Liquids**. *Polymers* 13: 1767.
- Sahoo B. K., R. R. Mishra y B. C. Behera. 2020. **Isolation and Identification of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria from Waste Fruits**. *Asian Journal of Biological and Life sciences* 9(2): 209–213.
- Scherrer P. 1918. **Estimación del tamaño y estructura interna de partículas coloidales mediante Röntgen**. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Mathematisch-Physikalische Klasse*: 98-100.
- Seddiqi H., E. Oliaei, H. Honarkar H., et al. 2021. **Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications**. *Cellulose* 28: 1893–1931.
- Selvaraj S. y K. Gurumurthy. 2024. **Optimizing Bacterial Cellulose Production from Kombucha Tea Utilizing Molasses and Tea Dust in Growth Medium**. *International Journal of Polymer Science* 2024(1), 2240464.
- Sigiro L. M. y A. Maksum. 2023. **Utilization of Cellulose Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) with Sweet Tea Media as Methylene Blue and Brilliant Green Biosorbent**. *Journal of Materials Exploration and Findings* 2: 10–16.
- Soares M. G., M. De Lima, V. C. Reolon Schmidt. 2021. **Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review Trends**. *Journal of Food Science and Technology* 110: 539–550.

- Trifol J., D. Plackett, P. Szabo, A. E. Daugaard y M. Giacinti Baschetti. 2020. **Effect of Crystallinity on Water Vapor Sorption, Diffusion, and Permeation of PLA-Based Nanocomposites**. ACS omega 5(25): 15362–15369.
- Uğurel C. y H. Öğüt. 2024. **Optimization of Bacterial Cellulose Production by Komagataeibacter rhaeticus K23**. Fibers 12: 29
- Venturelli G., F. Villa, M. Petraretti, G. Guagliano, M. Levi y P. Petrini. 2025. **Bacterial Cellulose for Scalable and Sustainable Bio-Gels in the Circular Economy**. Gels 11(4): 262.
- Volova T. G., S. V. Prudnikova, E. G. Kiselev, I. V. Nemtsev, A. D. Vasiliev, A. P. Kuzmin y E. I. Shishatskaya. 2022. **Bacterial Cellulose (BC) and BC Composites: Production and Properties**. Nanomaterials 12(2): 192.
- Wada M., T. Okano y J. Sugiyama. 2001. **Allomorphs of native crystalline cellulose I evaluated by two equatorial d-spacings**. Journal of Wood Science 47(2): 124–128.
- Wang B., K. Rutherford-Markwick, X. X. Zhang y A. N. Mutukumira. 2022. **Kombucha: Production and Microbiological Research**. Foods 11(21): 3456.
- Yamada Y., P. Yukphan, H. T. Lan Vu, Y. Muramatsu, D. Ochaikul, S. Tanasupawat, y Y. Nakagaggwa. 2012a. **Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)**. The Journal of General and Applied Microbiology 58: 397–404.
- Yamada Y. y P. Yukphan, H. T. 2012b. **Subdivision of the genus Gluconacetobacter Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of Komagatabacter gen. nov., for strains accommodated to the Gluconacetobacter xylinus group in the α -proteobacteria**. Annals of Microbiology 62: 849–859.



- Yetilmezsoy K., S. Demirel y R. J. Vanderbei. 2009. **Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by Pistacia vera L.: Box-Behnken experimental design**. Journal of Hazardous Materials 171: 551–562.
- Yu Y., W. Wang y Y. Liu. 2024. **Enhancing the Mechanical Properties of Regenerated Cellulose through High-Temperature Pre-Gelation**. Materials 17 (19): 4886.
- Zahan K. A., N. Pa'e y I. Muhamad. 2014. **Process parameters for fermentation in a rotary disc reactor for optimum microbial cellulose production using response surface methodology**. BioResources 9(2): 1858–1872.

VI. II. Capítulo 2: Estudios preliminares del proceso fermentativo, análisis cromatográfico y aislamiento microbiológico de la kombucha

Resumen

El capítulo aborda un análisis detallado del proceso de producción de celulosa bacteriana a partir de la kombucha, prestando especial atención a la influencia de la fuente de carbono y la temperatura en la fermentación. En primer lugar, se realizó un experimento con tres fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y fructosa) para evaluar su impacto en la producción de Scoby (película de celulosa bacteriana). Posteriormente, un segundo experimento investigó cómo las variaciones de temperatura (25, 30 y 35 °C) afectaban este proceso. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y comparaciones de medias, encontrando que la glucosa y la temperatura de 35 °C favorecieron la producción de celulosa. Además, también se detalla un análisis cromatográfico de los compuestos volátiles en muestras de kombucha fermentada durante 7 y 30 días, así como en té verde, identificando principalmente ésteres como los compuestos responsables de las características sensoriales de la bebida. Además, se llevaron a cabo estudios microbiológicos para caracterizar las bacterias presentes en la kombucha y en la producción de celulosa, identificando cepas del género *Komagataeibacter* spp. como las principales productoras de celulosa.

Abstract

This chapter provides a detailed analysis of the bacterial cellulose production process from kombucha, paying particular attention to the influence of the carbon source and temperature on fermentation. First, an experiment was conducted with three carbon sources (glucose, sucrose, and fructose) to evaluate their impact on Scoby (bacterial cellulose film) production. A second experiment investigated how temperature variations (25, 30, and 35°C) affected this process. Results were analyzed using ANOVA and comparisons of means, finding that glucose and a temperature of 35°C favored cellulose production. A chromatographic analysis of volatile compounds in samples of kombucha fermented for 7 and 30 days, as well as in green tea, is also detailed, identifying mainly esters as the compounds responsible

for the beverage's sensory characteristics. In addition, microbiological studies were conducted to characterize the bacteria present in kombucha and in cellulose production, identifying strains of the genus *Komagataeibacter* spp. as the main cellulose producers.

Introducción

La kombucha es una bebida fermentada que se obtiene mediante la fermentación de té endulzado con una cultura simbiótica de bacterias y levaduras (SCOBY). Este proceso de fermentación no solo transforma el té en una bebida efervescente y ligeramente ácida, sino que también enriquece la kombucha con una variedad de compuestos bioactivos, incluyendo polifenoles, vitaminas del complejo B, ácidos orgánicos y aminoácidos, que contribuyen a sus propiedades antioxidantes y potenciales beneficios para la salud (Antolak *et al.*, 2021; Bishop *et al.*, 2022).

Uno de los subproductos más destacados de la fermentación de la kombucha es la celulosa bacteriana, un biopolímero producido principalmente por bacterias del género *Komagataeibacter*, como *Komagataeibacter xylinus* (anteriormente conocido como *Gluconacetobacter xylinus*). Esta celulosa se forma en la superficie del líquido fermentado, dando lugar a una película gelatinosa conocida como SCOBY. La celulosa bacteriana obtenida de la kombucha ha demostrado tener propiedades superiores en términos de pureza, resistencia y capacidad de retención de agua en comparación con la celulosa vegetal, lo que la hace prometedora para diversas aplicaciones en biotecnología, medicina y la industria alimentaria (Feng *et al.*, 2024; Absharina *et al.*, 2025).

El perfil de compuestos volátiles de la kombucha, que incluye ésteres, ácidos carboxílicos, alcoholes y aldehídos, es fundamental para su aroma y sabor característicos. Estos compuestos se generan durante la fermentación y su concentración varía con el tiempo, influenciada por las interacciones metabólicas entre las bacterias y las levaduras presentes en el SCOBY. El análisis cromatográfico de estos compuestos proporciona información valiosa sobre los cambios en la composición química de la bebida durante la fermentación (Wang *et al.*, 2023; Phung *et al.*, 2023).

Además, la identificación microbiológica de las cepas presentes en la kombucha es esencial para comprender los procesos de fermentación y la producción de

celulosa. A través de técnicas de aislamiento y caracterización, se han identificado diversas especies bacterianas y levaduras que contribuyen a la formación del SCOBY y a la producción de compuestos bioactivos. Estas investigaciones abren nuevas perspectivas para la mejora y optimización de la producción de kombucha y sus subproductos (La China *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2023).

Materiales y métodos

Obtención de celulosa bacteriana

Ver capítulo 1

Evaluación de la influencia de la fuente de carbono y temperatura

Se procedió a analizar el impacto de diferentes fuentes de carbono en el proceso de producción de celulosa utilizando la muestra previamente preparada. Para ello, se diseñó un experimento en el que se variaron las fuentes de carbono, específicamente glucosa, sacarosa y fructosa. Para optimizar el proceso y ajustarlo a la escala de experimentación, se redujo el volumen de las soluciones preparadas, siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 1. Las soluciones se dejaron reposar durante siete días a una temperatura constante de 30 °C.

Tabla 1. Condiciones generales para producción de celulosa bacteriana.

Condiciones generales a escala	
Fuente de Carbono	18 gr
Té de arranque	18 gr
Bolsa de té	1 bolsa (1.5gr)
Scoby de arranque	18 gr

Con el objetivo de evaluar el impacto de la temperatura en el proceso de producción, se diseñó un segundo experimento en el que se utilizaron tres condiciones térmicas: 25, 30 y 35 °C. Para este experimento, se siguieron los mismos procedimientos establecidos en la Tabla 1. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de comparación de medias y ANOVA para determinar las diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

Identificación del perfil de compuestos volátiles del té verde y kombucha

Se procedió a identificar el perfil de compuestos volátiles en dos muestras de kombucha, tomadas a los 7 y 30 días de fermentación, así como en una muestra de té verde (*Camellia sinensis*) utilizado como base para la preparación de la kombucha. Para ello, se filtraron 100 ml de cada muestra hasta 25 μ , las cuales fueron secadas en un horno con circulación de aire a 30 °C durante 24 h y luego almacenadas en viales de 3 ml cubiertos con papel aluminio. Las muestras fueron codificadas como K7, K30 y TV, respectivamente. Los análisis fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAM, utilizando un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (GC-MS) Agilent Technologies (modelo 7890B-5977A-MSD).

Aislamiento microbiológico de la kombucha

Para la caracterización de microorganismos presentes en la kombucha se tomaron 0.2 ml del té fermentado de kombucha tras 7 días de reposo a 30 °C y se colocaron en un tubo con caldo nutritivo por 48 h a 35 °C. Posteriormente, se realizó un sembrado masivo en cajas Petri de la muestra introduciendo el asa estéril en el medio y sembrado por el método de estría americana (por cuadrantes) empleando los siguientes medios de cultivo: Agar Soya Trypticase (AST), Agar Sales Manitol (ASM), Agar McConkey (AMC), Agar Papa Dextrosa (APD) y Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Así mismo, se realizó el vaciado en placa de 1 ml de kombucha y de 1 ml de caldo nutritivo inoculado previamente permitiendo el secado del líquido y sembrando en los mismos medios.

Todas las muestras se realizaron por triplicado y se incubaron a 35 °C. Las colonias obtenidas en las cajas Petri fueron aisladas por el método de estría americana luego de 3 ciclos de siembra para lograr un cultivo puro. Se comprobó que las colonias estaban aisladas mediante la morfología microscópica y colonial.

Identificación microbiológica de las cepas productoras de celulosa presentes en la kombucha

Para la identificación microbiológica de las cepas productoras de celulosa se tomaron de una a dos colonias previamente aisladas y se colocaron en 10 ml de kombucha y caldo nutritivo estériles. Tras 7 días de reposo a 30 °C se determinó aquellas cepas que presentaban un sobrenadante de tipo membranoso en forma de disco en su correspondiente tubo.

Identificación microbiológica de la kombucha

Para identificar género y especie de las principales cepas de importancia en el presente trabajo, se utilizó el kit de Biomerieux Api 20 E y reactivos complementarios con las pruebas: β -galactosidasa, arginina-dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, utilización del citrato, producción de H₂S, ureasa, triptófano desaminasa, producción de indol, producción de acetoina, gelatinasa; fermentación-oxidación de la glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melosa, amigdalina y arabinosa; oxidasa, y reducción de los nitratos en nitritos. Así como las pruebas bioquímicas en SIM (movilidad, indol, sulfuro de hidrógeno), TSI (agar triple azúcar hierro), agar citrato Simmons, prueba oxidación/fermentación y KIA (agar de hierro Kligler).

Análisis estadístico

Los resultados se informan como los valores medios y las desviaciones estándar de al menos mediciones duplicadas. Los análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.05$) y comparación de medias de Tukey.

Resultados

Los resultados obtenidos en el experimento inicial evidencian diferencias significativas en la producción de SCOBY (Fig. 1) al utilizar distintas fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y fructosa. La glucosa resultó ser la fuente más eficiente, produciendo un mayor peso de SCOBY (41.80 g) en comparación con la sacarosa (32.10 g) y la fructosa (27.90 g).

Estos hallazgos son consistentes con estudios recientes que indican que la glucosa es metabolizada eficientemente por las bacterias acéticas, como *Komagataeibacter xylinus*, para la producción de celulosa bacteriana (Chou *et al.*, 2024). En contraste, la sacarosa y la fructosa requieren una conversión enzimática adicional antes de ser utilizadas por las bacterias, lo que puede limitar su disponibilidad y eficiencia en la producción de celulosa (Sabatini *et al.*, 2025).

Además, la temperatura de incubación de 30°C utilizada en este estudio se alinea con condiciones óptimas reportadas en la literatura para la actividad de las bacterias acéticas, favoreciendo la producción de celulosa sin inducir estrés térmico (Bertsch *et al.*, 2021).

En términos de aplicaciones, los resultados sugieren que, para optimizar la producción de SCOBY y, por ende, de celulosa bacteriana, se debe priorizar el uso de glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, es importante considerar que la variabilidad en la composición del consorcio microbiano y las condiciones de fermentación pueden influir en la eficiencia del proceso (Oliveira *et al.*, 2022).

Tabla 2. Influencia de la fuente de carbono en la producción de Scoby.

Muestra	Identificador	Fuente de Carbono	Temperatura	Peso Scoby total final
Kombucha	S1	Sacarosa	30°C	32.10 ±0.62 ^B
Kombucha	G1	Glucosa	30°C	41.80 ±0.98 ^A
Kombucha	F1	Fructosa	30°C	27.90 ±1.63 ^C

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes. (Tukey $p < 0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.

En el segundo experimento realizado, se evaluó la influencia de la temperatura sobre la producción de celulosa utilizando glucosa como fuente de carbono. Los resultados obtenidos, como se muestra en la Tabla 3, revelaron que la temperatura más alta (35°C) favoreció significativamente la producción de SCOBY (Fig. 1), con un

peso final de 44.87 g, en comparación con las temperaturas de 30 °C (31.83 g) y 25 °C (26.02 g). Estos resultados sugieren que la temperatura tiene un impacto considerable en la actividad de los microorganismos responsables de la producción de celulosa. Este comportamiento es consistente con estudios previos que indican que temperaturas cercanas a los 30-35 °C promueven la actividad óptima de las bacterias del género *Komagataeibacter* (Wrona *et al.*, 2021). La temperatura de 35 °C, aunque más alta que la comúnmente utilizada de 30 °C, no parece inducir estrés térmico, como se había observado en investigaciones similares donde temperaturas superiores a 37 °C afectaron negativamente la actividad bacteriana (Wang *et al.*, 2022).

El aumento en la producción de celulosa con temperaturas más altas puede explicarse por un aumento en la velocidad metabólica de las bacterias, lo que resulta en una mayor síntesis de biopolímeros como la celulosa (Pang *et al.*, 2024). Sin embargo, es importante destacar que aunque la temperatura de 35 °C mostró los mejores resultados en términos de producción de SCOBY, el aumento de la temperatura podría llevar a un desequilibrio en la actividad de otras bacterias presentes en el consorcio, lo que requeriría un análisis más detallado para asegurar que las condiciones óptimas favorezcan la producción sin comprometer la diversidad microbiana esencial para la fermentación de kombucha.

Por otro lado, el comportamiento observado con la temperatura de 30 °C, aunque no tan eficiente como la de 35 °C, sigue siendo dentro de los rangos adecuados para la fermentación de kombucha, como ha sido ampliamente reportado en la literatura (Aung *et al.*, 2021). La temperatura de 25 °C resultó ser menos eficiente, lo que puede estar relacionado con una menor tasa de crecimiento bacteriano, lo que restringe la producción de celulosa.

Tabla 3. Influencia de la temperatura en la producción de Scoby.

Muestra	Identificador	Fuente de Carbono	Temperatura	Peso Scoby total final
Kombucha	S2	Glucosa	25°C	26.02 ±1.76 ^C
Kombucha	G2	Glucosa	30°C	31.83 ±0.92 ^B
Kombucha	F2	Glucosa	35°C	44.87 ±0.40 ^A

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes. (Tukey $p < 0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.



Fig 1. Membranas de celulosa producidas (SCOBY).

El análisis cromatográfico permitió la identificación de 42 compuestos volátiles, los cuales se clasificaron en nueve familias químicas (ésteres, cetonas, ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, aminas, hidrocarburos, lactonas y terpenos). Esta diversidad química es característica de la compleja interacción metabólica entre levaduras y bacterias que define la fermentación de la kombucha.

Coincidiendo con la literatura, los ésteres representaron la familia química predominante (Tabla 4). Estos compuestos son determinantes en el perfil sensorial de la bebida, aportando notas frutales y florales que definen su carácter organoléptico (Melo *et al.*, 2022). El incremento en la concentración y diversidad de ésteres con el tiempo de fermentación es una consecuencia directa de la actividad metabólica de las levaduras, donde alcoholes como el etanol son convertidos en sus correspondientes ésteres, principalmente acetato de etilo, mediante reacciones de esterificación (Gaggia *et al.*, 2022).

Un hallazgo de interés es la dinámica de la cafeína. Si bien fue el compuesto mayoritario en el té verde (materia prima), su concentración disminuyó notablemente en las muestras fermentadas (K7 y K30). Este decremento es consistente con su biotransformación por parte de la microbiota del SCOBY. Se ha demostrado que diversas bacterias y levaduras presentes en la kombucha utilizan la cafeína como fuente de nitrógeno, degradándola progresivamente a través de rutas de desmetilación para producir teobromina, teofilina y xantinas (Diez-Ozaeta *et al.*, 2022). Este proceso no solo reduce el contenido de cafeína, sino que también enriquece la bebida con otros metabolitos potencialmente bioactivos.

Por otro lado, la presencia de 5-hidroximetilfurfural (HMF) en todas las muestras es notable. El HMF es un conocido indicador de la calidad en alimentos, ya que su

formación se asocia a tratamientos térmicos o a largos periodos de almacenamiento a partir de la degradación de hexosas (reacción de Maillard y caramelización). El interés en el HMF radica en su naturaleza dual. Por un lado, se le atribuyen propiedades beneficiosas como actividad antioxidante e antiinflamatoria. No obstante, su potencial genotóxico y citotóxico ha sido objeto de un intenso debate científico. Aunque estudios más antiguos, como el de Archer *et al.* (1992), mostraron efectos adversos en roedores a dosis elevadas, la evaluación de riesgo actual es más matizada. Revisiones exhaustivas recientes concluyen que, si bien altas concentraciones de HMF pueden inducir citotoxicidad *in vitro*, la ingesta a través de la dieta normal generalmente se encuentra por debajo de los umbrales de riesgo toxicológico establecidos para el ser humano (Ankit *et al.*, 2020). Por lo tanto, su presencia en las concentraciones halladas en la kombucha debe ser monitoreada, pero probablemente no representa un riesgo significativo.

Tabla 4. Perfil de compuestos volátiles de la kombucha y té verde.

COMPOUND	TR	TV		K7		K30	
		Match	%	Match	%	Match	%
2,2-DIMETHOXYBUTANE	3.46			76.1	0.85		
2-PROPENOIC ACID, ETHENYL ESTER	3.46					77.6	0.26
O-ETHYLHYDROXYLAMINE	3.53			77.5	1.82	77.7	0.45
2-PROPANONE, 1-HYDROXY-	3.63			91.4	0.64	89.5	0.31
PROPANOIC ACID, 2-OXO-, METHYL ESTER	3.96			81.1	0.27		
2,3-BUTANEDIOL, [5-(R*,R*)]-	3.96					93	0.91
GLYCERALDEHYDE	4.47			95.6	8.14	94.6	6.28
3-FURALDEHYDE	4.67					94.8	0.22
3-FURANMETHANOL	5.05					88.3	0.25
1H-TETRAZOLE-1,5-DIAMINE	5.45			75.9	4.29		
DIHYDROXYACETONE	5.73			86.8	16.78	88.1	12.86
1,2-CYCLOPENTANEDIONE	6.31			97.5	1.98	98.5	2.16
2,4-DIHYDROXY-2,5-DIMETHYL-3(2H)-FURAN-3-ONE	7.37			88.9	0.20		
PROPANOIC ACID	7.46			75.5	0.52		
2H-PYRAN-2,6(3H)-DIONE	7.64			88.5	0.20	91.9	0.16
1,3-DIOXOL-2-ONE,4,5-DIMETHYL-	8.47			84.0	0.46	82.4	0.47
METHYL ACETOXYACETATE	8.70					77.8	0.36
2,5-PIPERAZINEDIONE, 3-METHYL-	8.82					82.7	0.12
3-FURANCARBOXYLIC ACID	9.04					95	0.26
D-ALANINE, N-PROPARGYLOXYCARBONYL-, ISOHEXYL ESTER	9.26			82.1	3.25	82.7	3.09
3-FURANCARBOXYLIC ACID, METHYL ESTER	9.41			95.6	1.03		
FURYL HYDROXYMETHYL KETONE	9.40					94	1.23
2-PROPANAMINE, N-METHYL-N-NITROSO-	10.34			78.8	1.16	81.1	0.75
4H-PYRAN-4-ONE, 2,3-DIHYDRO-3,5-DIHYDROXY-6-METHYL-	10.53			97.5	4.77	92.8	4.06
2(3H)-FURANONE, DIHYDRO-4-HYDROXY-	10.75			79.8	0.88		
GLYCERIN	10.78					76	1.49
2-PYRROLIDINONE, 5-(CYCLOHEXYLMETHYL)-	11.10			83.5	0.19		
(S)-5-HYDROXYMETHYL-2(5H)-FURANONE	11.10					79.9	0.14
5-OXOTETRAHYDROFURAN-2-CARBOXYLIC ACID, ETHYL ESTER	11.34					84.1	0.21
(S)-(+)-2',3'-DIDEOXYRIBONOLACTONE	11.84			81.2	0.45		
TETRAHYDROFURAN-5-ON-2-METHANOL, .ALPHA.-[.ALPHA.-METHOXY-(TETRAHYDROFURAN-5-ON-2-YLMETHOXY)]-	11.85					84.6	0.51
4-HEPTEN-3-ONE, 4-METHYL-	11.93					75.7	0.68
5-HYDROXYMETHYLFURFURAL	12.07			97.6	11.73	97.5	13.47
KETONE, METHYL 2-METHYL-1,3-OXOTHIOLAN-2-YL	12.31			86.9	0.59		
1,2,3-PROPANETRIOL, 1-ACETATE	12.32					85.4	4.07
2,3-DIOXABICYCLO[2.2.1]HEPTANE	12.57			89.2	0.16		
ACETAMIDE, N,N'-ETHYLENEBIS(N-NITRO-	13.02			80.8	1.67		
BUTANEDIOIC ACID, 2-HYDROXY-2-METHYL-, (S)-	14.05					80.5	2.08
FORMIC ACID, TETRAHYDROFURFURYL ESTER	14.69					76.5	2.56
3-DEOXY-D-MANNOIC LACTONE	18.57			81.90	22.93	79.8	19.75
CAFFEINE	21.50	97.0	100.00	92.40	0.63	92.5	0.19
N-HEXADECANOIC ACID	22.76			89.00	0.18		

Tabla obtenida en la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAM, utilizando un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (GC-MS) Agilent Technologies (modelo 7890B-5977A-MSD).

Caracterización microbiológica

Respecto a la caracterización microbiológica (Fig. 2) se obtuvieron un total de 73 aislados sin contar hongos filamentosos en 4 medios de cultivo. Se encontraron 14 en agar papa dextrosa, 7 en agar dextrosa Sabouraud, 5 en agar sal y manitol y 47 en agar soya tripticaseina. A todos los microorganismos se les realizó tinción de gram y se describieron sus características microscópicas y su morfología colonial. A todos los microorganismos se les realizó una prueba inoculándolos en caldo nutritivo con el fin de ver su capacidad de formación de biofilm y orientar la caracterización a los microorganismos productores de celulosa. Se encontraron 18 microorganismos con

capacidad de formar un biofilm en la superficie (B9, 15, 17, 18, 25, 28, 35, 37, 38, 47, 50, 51, 56, 79, 62, 63, 81 y 84) y solo 9 (Tabla 6) fueron capaces de generar celulosa bacteriana en su superficie (B9, 15, 17, 18, 50, 51, 62, 63 y 84). A los 18 biológicos se les aplicó una batería de pruebas bioquímicas, para fines prácticos y de lectura, en la Tabla 6 se reportan los 10 de interés. En su composición bacteriana la mayoría de los reportes indican bacterias del tipo ácido acéticas, sin embargo, la composición del té difiere de acuerdo con el lugar de origen y con el método de preparación. Los microorganismos encontrados se reportan en la Tabla 5. La Presencia de estos microorganismos coincide con lo reportado en la literatura donde se observan estos microorganismos como los principales productores de celulosa (Wang *et al.*, 2022). La identificación de las bacterias se realizó con el sistema de identificación de API web basado en las pruebas presentadas con el sistema de codificación, también se utilizó la base de datos más grande del mundo para información bacteriana estandarizada (BacDive).

Tabla 5. Identificación de los microorganismos productores de celulosa.

Cepa	Especie identificada
B9 y B84	<i>komagataeibacter</i> spp.
B15, B17, B18	<i>komagataeibacter</i> spp.
B51	<i>komagataeibacter</i> spp.
B50	<i>komagataeibacter</i> spp.
B62	<i>Gluconobacter</i> spp.
B63	<i>Gluconobacter</i> spp.

La razón por la cual los microorganismos producen celulosa ha generado un amplio debate. Una teoría sostiene que las bacterias aeróbicas producen celulosa para mantenerse en una posición cercana a la superficie de la solución, favoreciendo su acceso al oxígeno. Otra hipótesis propone que la celulosa actúa como un mecanismo de protección contra la radiación ultravioleta, mientras que una tercera sugiere que las bacterias la producen para defenderse de posibles amenazas, como enemigos naturales o iones de metales pesados, dado que los nutrientes necesarios pueden ser fácilmente difundidos en el medio (Hernandez-Ruiz, 2018). Específicamente, en *komagataeibacter xylinum*, la celulosa facilita la adhesión celular en interacciones simbióticas, además de conferir protección mecánica, química y biológica en su entorno natural. En el caso de la kombucha, las células productoras

quedan atrapadas en la red de celulosa, lo que permite que la población se mantenga en la interfase aire-líquido, favoreciendo su desarrollo (Vázquez *et al.*, 2013).

Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una comprensión detallada de los factores que influyen en la producción de celulosa bacteriana durante la fermentación de kombucha. Se demostró que la glucosa, como fuente de carbono, y una temperatura de 35 °C favorecen la producción de SCOBY, lo que puede ser aprovechado para optimizar los procesos de producción de celulosa en aplicaciones diversas. Además, el perfil de compuestos volátiles de la kombucha reveló una predominancia de ésteres, que contribuyen significativamente a sus características sensoriales. Por último, el aislamiento y caracterización microbiológica permitieron identificar diversas cepas bacterianas con capacidad para producir celulosa, abriendo nuevas oportunidades para el aprovechamiento biotecnológico de estos microorganismos. Estos hallazgos son relevantes tanto para la mejora de la producción de kombucha como para el uso sostenible de la celulosa bacteriana en diferentes campos de la ciencia.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas de las cepas productoras de celulosa.

Prueba/microorganismo	B9	B15	B17	B18	B50	B51	B62	B63	B84
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfología microscópica	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Morfología colonial									
Tamaño	0.1mm	0.5mm	0.5mm	0.5mm	0.1mm	0.1mm	0.1mm	0.1mm	0.1mm
Forma	Puntiforme	Irregular	Irregular	Irregular	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme
Elevación	Umbilicada	Plana	Plana	Plana	Umbilicada	Umbilicada	Elevada	Elevada	Elevada
Margen	Entero	Rizoide	Rizoide	Rizoide	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
Color	Crema	Blanco	Blanco	Blanco	Crema	Crema	Blanco	Blanco	Crema
Superficie	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate
Densidad	Opaca	Traslúcido	Traslúcido	Traslúcido	Opaca	Opaca	Traslúcido	Traslúcido	Traslúcido
Consistencia	Seca	Granulosa	Granulosa	Granulosa	Rugosa	Rugosa	Granulosa	Granulosa	Granulosa
Pigmento difundido	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Olor	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Pruebas bioquímicas									
Movilidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
KIA	A/K	K/A	K/A	K/A	A/K	A/K	K/A	K/A	A/K
CIT	-	+	+	+	-	-	-	-	-
O/F	O/F	F	F	F	O/F	O/F	F	O/F	O/F
TSI	A/K	K/A	K/A	K/A	A/K	A/K	K/A	K/A	A/K
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pruebas bioquímicas API									
ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	-
ADH	-	+	+	+	-	+	+	-	-
LCD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	V	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	V	V	V	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GEL	-	+	+	+	-	+	+	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	-	+	+	+
INO	+	-	-	-	-	-	+	+	+
SOR	+	+	+	+	-	-	+	+	+
RHA	+	-	-	-	-	-	+	+	+
SAC	-	+	+	+	+	+	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AMY	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ARA	+	-	-	-	+	-	+	+	+
NIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-

KIA (agar de hierro Kligler), TSI (agar triple azúcar hierro), CIT (agar citrato Simmons), O/F (prueba oxidación/fermentación). K(alcalino), A (ácido), O/F (oxida y fermenta), F (fermenta). (ONPG) β -galactosidasa, (ADH) arginina-dihidrolasa, (LDH) lisina decarboxilasa, (ODC) ornitina decarboxilasa, (CIT) utilización del citrato, (H₂S) producción de H₂S, (URE) ureasa, (TDA) triptofano desaminasa, (IND) producción de indol, (VP) producción de acetoina, (GEL) gelatinasa (GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA) fermentación-oxidación de la glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melosa, amigdalina y arabinosa; (NIT) reducción de nitratos a nitrógeno o nitritos.



Universidad Michoacana
de San Nicolas de Hidalgo

PIDCB

B1 ASM



B2 ASM



B3 ASM



B4 ASM



B5 ASM



B6 ASM



B7 ASM



B8 ADS



B9 ADS



B10 APD



B11 APD



B12 APD



B13 APD



B14 AST



B15 AST



B16 AST



B17 AST



B18 AST



B19 Y 19.1 AST



B20 AST



B21 AST



B22 AST



B23 AST



B24 AST



B25 ASM



B26 AST



B27 AST



B28 AST



B29 AST



B30 AST





Universidad Michoacana
de San Nicolas de Hidalgo

PIDCB



B31 AST



B32 AST



B33 AST



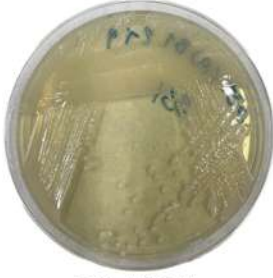
B34 AST



B35 AST



B36 AST



B37 AST



B38 AST



B39 AST



B40 AST



B41 AST



B42 AST



B43 AST



B44 AST



B45 AST



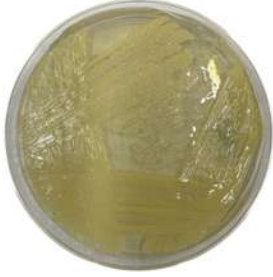
B46 AST



B47 AST



B48 AST



B49 ADS



B50 ADS



B51 ADS



B52 AST



B53 AST



B54 AST



Universidad Michoacana
de San Nicolas de Hidalgo

PIDCB



B55 AST



B56 AST



B57 AST



B58 AST



B59 AST



B60 AST



B61 APD



B62 APD



B63 APD



B64 APD



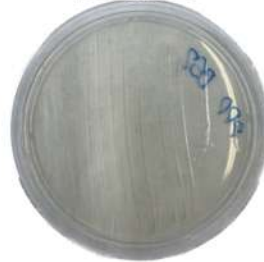
B65 APD



B66 APD



B67 APD



B68 APD



B69 APD



B70 APD



B71 APD



B72 APD



B73 APD



B74 APD



B75 APD



B76 APD



B77



B78 AST

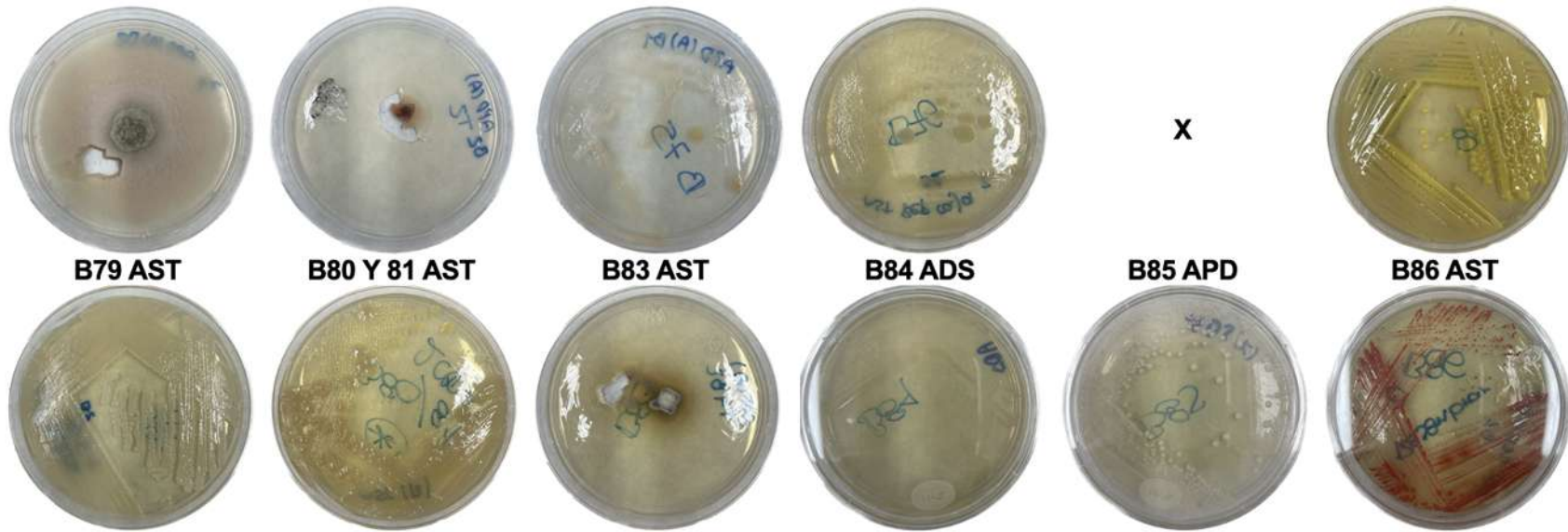


Figura 2. Morfología colonial de cada cepa encontrada en la Kombucha.

Literatura citada

- Absharina, D., M. Padri, C. Veres y C. Vágvölgyi. 2025. **Bacterial Cellulose: From Biofabrication to Applications in Sustainable Fashion and Vegan Leather**. *Fermentación* 11 (1): 23.
- Ankit, C., K. Vikas, K. Satish, M. Ishrat, A. Poonam y S. Sheenam. 2020. **5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation , occurrence and potential health concerns : recent developments** *Toxin Reviews* 40(4), 545-561.
- Antolak, H., D. Piechota y A. Kucharska. 2021. **Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY)**. *Antioxidants* 10(10): 1541.
- Archer, M. C., W. R. Bruce, C. Chow, D. E. Corpet, A. Medline, D. Stamp y X. Zhang . 1992. **Aberrant Crypt Foci and Microadenoma As Markers for Colon Cancer**. *Environmental Health* 98: 195–197.
- Aung, T, y J. B. Eun. 2021. **Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (Porphyra dentata) during fermentation**. *Food Science and Technology* 154: 112643.
- Bertsch, P., D. Etter, y P. Fischer. 2021. **Transient in situ measurement of kombucha biofilm growth and mechanical properties**. *Food & Function* 12.
- Bishop, P., E. Pitts, D. Budner, y K. Witrick. 2022. **Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile**. *Food Chemistry Advances* 1: 100025.
- Chou, Y.-C., H. W. Lin, C. Y. Wang, C. C. Hsieh, S. P. Santoso, S. P. Lin y K. C. Cheng. 2024. **Enhancing Antioxidant Benefits of Kombucha Through Optimized Glucuronic Acid by Selected Symbiotic Fermentation Culture**. *Antioxidants* 13(11): 1323.
- Diez-Ozaeta, I. y O. J. Astiazaran. 2022. **Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production**. *International Journal of Food Microbiology* 377: 109783.

- Feng, X., Z. Ge, Y. Wang, et al. 2024. **Production and characterization of bacterial cellulose from kombucha-fermented soy whey**. Food Prod Process and Nutr 6: 20.
- Gaggia, F., L. Baffoni, M. Galiano, D. S. Nielsen, R. R. Jakobsen, J. L. Castro-Mejía, S. Bosi, F. Truzzi, F. Musumeci, G. Dinelli y D. Di Gioia. 2018. **Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity**. Nutrients 11(1): 1.
- Hernandez-Ruiz L. S. 2018. **Determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de kombucha** (Universidad Rafael Landívar). Retrieved from: <http://www.tfd.org.tw/opencms/english/about/background.html%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.024%0A>
- La China, S., L. De Vero, K. Anguluri, M. Brugnoli, D. Mamlouk y M. Gullo. 2021. **Té de kombucha como reservorio de bacterias productoras de celulosa: evaluación de la diversidad entre los aislados de Komagataeibacter**. Ciencias Aplicadas 11 (4): 1595.
- Melo, C. W. B., I. H. de Costa, L. de Santos, y M de J. Bandeira. 2022. **Identification of the profile of volatile compounds in commercial kombucha added with hibiscus (Hibiscus rosa-sinensis) / Identificação do perfil de compostos voláteis em kombucha comercial adicionado de hibisco (Hibiscus rosa-sinensis)**. Brazilian Journal of Development 8(3): 16208–16225.
- Meng, Y., X. Wang, Y. Li, J. Chen y X. Chen. 2024. **Microbial interactions and dynamic changes of volatile flavor compounds during the fermentation of traditional kombucha**. Food Chemistry 430: 137060.
- Oliveira, Í. A. C. L. D., V. A. d. O. Rolim, R. P. L. Gaspar, D. Q. Rossini, R. de Souza y C. S. B. Bogsan. 2022. **The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production**. Fermentation 8(4): 185.
- Pang, L., S. Guo, L. Zhan, C. Zhu, S. Qu y S. Pan. 2024. **Comparison of water mobility and distribution in Dioscorea opposita Thunb. cv. Tiegun during hot-air and**

- microwave drying processes.** International Journal of Food Science and Technology 59(4): 2558–2569.
- Phung, LT, H. Kitwetcharoen, N. Chamnipa, et al. 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.
- Sabatini, F., E. Maresca, M. Aulitto, V. Termopoli, A. De Risi, M. Correggia, G. Fiorentino, V. Consonni, F. Gosetti, M. Orlandi, H. Lange y P. Contursi. 2025. **Exploiting agri-food residues for kombucha tea and bacterial cellulose production.** International Journal of Biological Macromolecules 302: 140293.
- Vazquez, A., M. L. Foresti, P. Cerrutti y M. Galvagno. 2013. **Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by Gluconacetobacter xylinus.** Journal of Polymers and the Environment 21(2): 545–554.
- Wang, B., K. Rutherford-Markwick, X. X. Zhang y A. N. Mutukumira. 2022. **Kombucha: Production and Microbiological Research.** Foods 11(21): 1–18.
- Wang, Q., S. Geng, L. Wang, Z. Wen, X. Sun y H. Huang. 2022. **Bacterial mandelic acid degradation pathway and its application in biotechnology.** Journal of Applied Microbiology 133(2): 273–286.
- Wang, Z., W. Ahmad, A. Zhu, W. Geng, W. Kang, Q. Ouyang y Q. Chen. 2023. **Identification of volatile compounds and metabolic pathway during ultrasound-assisted kombucha fermentation by HS-SPME-GC/MS combined with metabolomic analysis.** Ultrasonics Sonochemistry 94: 106339.
- Wrona, M., F. Silva, J. Salafranca, C. Nerín, M. J. Alfonso y M. A. Caballero. 2021. **Design of new natural antioxidant active packaging: Screening flowsheet from pure essential oils and vegetable oils to ex vivo testing in meat samples.** Food Control 120: 107536.

VI. III. Capítulo 3: Desarrollo y caracterización de apósitos basados en celulosa bacteriana funcionalizada como vehículo de liberación tópica de antibióticos

Resumen

La celulosa bacteriana (CB) producida a partir de la fermentación de kombucha ha emergido como un biomaterial versátil para aplicaciones en ingeniería de tejidos y sistemas de liberación tópica de fármacos. En este estudio se desarrollaron y caracterizaron apósitos funcionalizados con antibióticos a partir de matrices de CB combinadas con colágeno, propilenglicol, nipagin y diferentes gelificantes (carboximetilcelulosa, quitosano y alginato). Se formularon seis prototipos, cuyas propiedades fisicoquímicas, mecánicas y funcionales fueron evaluadas mediante técnicas de DRX, FTIR, SEM y ensayos de actividad antimicrobiana. Los resultados indicaron que la formulación con 1% de colágeno y 0.5% de CMC (formulación D) presentó la mejor combinación de propiedades, incluyendo alta resistencia mecánica (8.86 MPa), bajo grado de solubilidad, alto hinchamiento (3305%), y actividad antibacteriana superior frente a *E. coli* y *S. aureus*. El análisis estructural reveló que el secado promueve una transición desde una morfología amorfa hacia una fase más cristalina de tipo celulosa I, lo que se correlaciona con una mejor integridad mecánica. Asimismo, la funcionalización con antibióticos mostró una liberación efectiva, con halos de inhibición mayores a los de discos estándar. Estos hallazgos respaldan el potencial de la CB como plataforma modular para la administración localizada de agentes antimicrobianos, con aplicaciones en el tratamiento de heridas crónicas e infectadas.

Abstract

Bacterial cellulose (BC) produced from kombucha fermentation has emerged as a versatile biomaterial for tissue engineering and topical drug delivery systems. In this study, antibiotic-functionalized dressings were developed and characterized from BC matrices combined with collagen, propylene glycol, nipagin, and different gelling agents (carboxymethylcellulose, chitosan, and alginate). Six prototypes were formulated, and their physicochemical, mechanical, and functional properties were evaluated using XRD,

FTIR, SEM, and antimicrobial activity assays. The results indicated that the formulation with 1% collagen and 0.5% CMC (formulation D) presented the best combination of properties, including high mechanical strength (8.86 MPa), low solubility, high swelling (3305%), and superior antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Structural analysis revealed that drying promotes a transition from an amorphous morphology to a more crystalline cellulose I-type phase, which correlates with improved mechanical integrity. Furthermore, functionalization with antibiotics showed effective release, with inhibition zones greater than those of standard discs. These findings support the potential of CB as a modular platform for the localized delivery of antimicrobial agents, with applications in the treatment of chronic and infected wounds.

Introducción

La celulosa bacteriana (CB) ha emergido como un biomaterial de interés en aplicaciones biomédicas, especialmente en la fabricación de apósitos para el tratamiento de heridas. Producida por bacterias del género *Komagataeibacter*, la CB se caracteriza por su estructura nanofibrilar, alta biocompatibilidad, elevada capacidad de retención de agua y excelente permeabilidad al vapor de agua, propiedades que favorecen un entorno húmedo óptimo para la cicatrización de heridas (Portela *et al.*, 2019).

Sin embargo, la CB presenta limitaciones inherentes, como la ausencia de actividad antimicrobiana propia, lo que puede comprometer su eficacia en la prevención de infecciones en heridas (Sulaeva *et al.*, 2015). Para superar esta limitación, se han desarrollado estrategias de funcionalización de la CB mediante la incorporación de agentes antimicrobianos, como péptidos antimicrobianos, antibióticos y polímeros con propiedades bactericidas. Estas modificaciones buscan dotar a los apósitos de CB de actividad antimicrobiana, controlando la liberación del agente activo y mejorando la eficacia terapéutica (Deng *et al.*, 2024; Meng *et al.*, 2023).

En este contexto, el presente capítulo aborda el desarrollo y caracterización de apósitos basados en CB funcionalizados con antibióticos, evaluando sus propiedades mecánicas, actividad antimicrobiana y potencial para la liberación controlada de fármacos. Se exploran las interacciones entre la CB y los agentes funcionalizantes, así

como su impacto en las propiedades finales del apósito, con el objetivo de optimizar su rendimiento en aplicaciones clínicas.

Materiales y métodos

Producción y purificación de celulosa bacteriana

Para obtener detalles sobre la producción y purificación de celulosa bacteriana, se puede consultar el Capítulo 1.

Elaboración de apósitos

Se elaboraron seis formulaciones o prototipos de apósitos, como se muestra en la Tabla 1. Las membranas de celulosa obtenidas fueron trituradas en medio acuoso en una proporción de 1:1. La suspensión resultante se tamizó durante 10 min para eliminar el exceso de agua. A continuación, en un recipiente separado, se solubilizó un 0.2% en peso de Nipagin en un 5% en peso de propilenglicol, bajo agitación orbital a 50 °C. Esta mezcla se vertió en un vaso de precipitados que contenía un 10% en peso de pulpa de celulosa bacteriana, manteniendo agitación mecánica a temperatura ambiente. Luego, se añadió lentamente carboximetilcelulosa (CMC), quitosano o alginato, según el prototipo (ver Tabla 1), y se continuó agitando hasta obtener una consistencia de gel a temperatura ambiente. Finalmente, se incorporó al gel el colágeno (Tabla 1) y agua desionizada, ajustando el volumen de todas las formulaciones al mismo nivel, y se agitaron durante 3 min a temperatura ambiente. Para el secado, se pesaron 40 g de cada mezcla en cajas de acrílico de 10x10 cm, que luego fueron secadas en una estufa de secado a 40 °C bajo flujo de aire durante 24 h.

Tabla 1. Componentes de los prototipos de apósitos.

Fabricación de Prototipos					
FA	Formulación:	FB	Formulación:	FC	Formulación:
	5% propilenglicol		5% propilenglicol		5%propilenglicol
	0.2% Nipagin		0.2% Nipagin		0.2% Nipagin
	1% CMC		0.5% CMC		0.5% CMC
	8% colágeno		4% colágeno		2% colágeno
	10% celulosa		10% celulosa		10% celulosa
FD	Formulación:	FE	Formulación:	FF	Formulación:
	5%propilenglicol		5%propilenglicol		5% propilenglicol
	0.2% Nipagin		0.2% Nipagin		0.2% Nipagin
	0.5% CMC		0.5% Quitosano		0.5% Alginato
	1% colágeno		2% colágeno		2% colágeno
	10% celulosa		10% celulosa		10% celulosa

Caracterización de prototipos

Se realizaron evaluaciones a los apósitos utilizando las siguientes técnicas: grado de hinchamiento, solubilidad, permeabilidad al vapor de agua, resistencia a la tracción y porcentaje de elongación, así como difracción de rayos y FTIR. Para más detalles sobre los procedimientos y métodos utilizados, consulte el Capítulo 1.

Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó sobre las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, otorgadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán, México.

Método de difusión en disco

Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Taroco *et al.* (2006). Se utilizaron sensidiscos con cefatoxima (30µg) y cloranfenicol (5µg), discos estériles de papel filtro Whatman #1 (2.5 µm) de 6 mm de diámetro cargados con los mismo antibióticos y los 5 prototipos de apósitos igualmente cargados. Los discos de papel filtro y los apósitos se dejaron en contacto durante 24 h con los fármacos. Para todos los tratamientos se utilizaron controles negativos.

Antes de cada determinación, las cepas fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas a 37 °C/24 h. Una vez verificado el crecimiento adecuado, se procedió a preparar inóculos con cada una de las cepas en solución salina al 0.85%, el inóculo se ajustó entre 0.08-0.1 de absorbancia a 625 mn (0.5 en escala de McFarland) con un espectrofotómetro Uv-Vis modelo ve-5100 UV. Posteriormente, se introdujo un hisopo estéril en el inóculo bacteriano y se sembró en la placa de Agar Müeller Hinton con estría en forma paralela repitiendo dos veces más rotando la placa 60°. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C/24 h. Una vez transcurrido el tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos en milímetros.

Análisis estadístico

Los resultados se informan como los valores medios y las desviaciones estándar de al menos mediciones duplicadas. Los análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.05$) y comparación de medias de Tukey.

Resultados

Posterior a la producción de celulosa se elaboraron prototipos de apósitos. Inicialmente, se buscó un medió dispersante como con funciones de agente espesante-gelificante, se analizaron tres compuestos: alginato, carboximetilcelulosa y quitosano, estos materiales fueron seleccionados debido a sus propiedades mecánicas, capacidad para formar matrices estables y biocompatibles o por su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en humanos en aplicaciones biomédicas

(Hurtado *et al.*, 2020). Se elaboraron películas al 1% y se determinó la permeabilidad al vapor de agua (PVA), elongación y la fuerza de tensión. La Tabla 1 muestra los resultados, en cuanto a la permeabilidad al vapor de agua se observaron diferencias significativas con una disminución de valores entre materiales; la carboximetilcelulosa (CMC) presentó 0.92 g/msMPa, alginato 0.85 g/msMPa, y quitosano 1.05 g/msMPa. Con respecto a la fuerza de tensión se obtuvieron valores de 18.1 MPa para la carboximetilcelulosa (CMC), 27.2 MPa en el alginato y 30.8 MPa para el quitosano. Y finalmente los porcentajes de elongación de los materiales fueron 1.62% en carboximetilcelulosa (CMC), 2.1% en alginato y 9.52% en quitosano. Con estos resultados se puede determinar que a la concentración presentada se obtienen diferencias entre los parámetros analizados con lo cual pueden ser utilizados en la fabricación de apósitos, sin embargo, a pesar de presentar valores atractivos sobre todo en la fuerza de tensión y la elongación en la realidad los apósitos son fabricados como mezclas de varios materiales coadyuvantes y de refuerzo que modifican los valores finales de la mayoría de los parámetros.

Para el presente estudio se han desarrollado prototipos de apósitos utilizando celulosa bacteriana como material de estructura principal, además de nipagin (conservante antimicrobiano), propilenglicol (plastificante y humectante) y colágeno (biocompatibilidad). Se generaron 6 formulaciones (Tabla 1), para la formulación FA se utilizó como medio dispersante carboximetilcelulosa al 1% y colágeno tipo I al 8 %, para la formulación B, 0.5% de carboximetilcelulosa y el colágeno se disminuyó hasta el 4%, en el prototipo C se mantuvo al 0.5% la carboximetilcelulosa y el colágeno se redujo a 2%, para la formulación FD se disminuyó el colágeno hasta el 1% y para la FE se cambió la carboximetilcelulosa por quitosano y en la F por alginato.

La formulación FA, con 8% de colágeno mostró una capacidad formadora de película deficiente. La concentración de colágeno provocó que la película resultante fuera extremadamente sensible a los cambios de humedad y temperatura. Esta sensibilidad se traduce en una inestabilidad estructural, haciendo que la película se deforme fácilmente. Debido a estas características, la formulación FA (Tabla 2) no fue sometida a una caracterización. Con respecto a la fuerza de tensión (Tabla 3) de diferentes formulaciones se observaron diferencias significativas. En particular, se ha observado que, al disminuir

la concentración de colágeno (FB, FC y FD), la fuerza de tensión aumenta significativamente. La formulación FB, con un 4% de colágeno, presentó una fuerza de tensión de 4.29 MPa, mientras que la formulación C, con un 2%, mostró 3.2 MPa, y la formulación D, con solo un 1% de colágeno, alcanzó 8.86 MPa. Esto sugiere que el colágeno podría estar interfiriendo en la fuerza de tensión. En la formulación FE, se mantuvo un 2% de colágeno, pero se utilizó quitosano en lugar de carboximetilcelulosa (CMC), obteniendo una fuerza de tensión de 2.29 MPa y la formulación FF, donde se empleó alginato en lugar de CMC, se obtuvo una fuerza de tensión aún menor, de 1.16 MPa. Estas variaciones indican que tanto la cantidad de colágeno como el tipo de espesante empleado influyen notablemente en las propiedades mecánicas del apósito. Así mismo, al fabricar películas exclusivamente con los espesantes (Tabla 2) CMC, alginato y quitosano, los valores de fuerza de tensión se invierten en comparación con los prototipos de apósitos. Las películas de alginato alcanzaron una fuerza de tensión de 27.2 MPa, las de quitosano 30.8 MPa y las de CMC 18.1 MPa. Este comportamiento inverso resalta la complejidad de las interacciones entre los componentes en la formulación de apósitos y la necesidad de un análisis detallado para optimizar sus propiedades mecánicas y funcionales. Este comportamiento también se observó en la permeabilidad al vapor de agua. En cuanto a los valores del porcentaje de elongación (Tabla 2) los resultados mostraron que, al disminuir la cantidad de colágeno, también disminuye el porcentaje de elongación. La formulación FB presentó un 30.09%, la C un 11.9% y la D un 10.1%. Estos hallazgos indican que el colágeno disminuye la capacidad de elongación de los apósitos, este efecto también se observó en la solubilidad. Mientras que para el hinchamiento el efecto es contrario al disminuir el colágeno el hinchamiento aumento.

Las propiedades analizadas son críticas en el diseño de apósitos transdérmicos, ya que afecta significativamente su desempeño y eficacia. Un apósito transdérmico debe permitir la evaporación del exceso de humedad para prevenir la maceración de la piel (Martínez-Correa *et al.*, 2020). Apósitos, con PVA media alta como el FB, FE y FF; permitirán una mayor evaporación del vapor de agua, reduciendo el riesgo de maceración además de permitir una liberación más rápida y sostenida de los agentes terapéuticos contenidos en el apósito. Sin embargo, la adhesión del apósito a la piel puede verse

afectada por su PVA, ya que una permeabilidad alta (apósito FF) puede reducir la adherencia en presencia de humedad. Así mismo estos apósitos presentaron un equilibrio adecuado entre rigidez y flexibilidad, crucial para asegurar que el apósito se mantenga en su lugar. Puesto que la mayor fuerza de tensión (Apósito FD) puede limitar la conformabilidad del apósito sobre la piel, lo que podría ser una desventaja en áreas del cuerpo con movimiento constante o superficies irregulares.

Tabla 2. Caracterización de prototipos y materiales de fabricación.

Caracterización de prototipos					
Material/formulación	PVA (g/msMPa)	FT (MPa)	E (%)	Solubilidad (%)	Hinchamiento (%)
Material dispersante					
Quitosano	1.05±0.09 ^A	30.8±1.3 ^A	9.52±0.8 ^A	N.D.	N.D.
Carboximetilcelulosa	0.92±0.01 ^{AB}	18.1±1.6 ^B	1.62±0.5 ^B	N.D.	N.D.
Alginato	0.85±0.05 ^B	27.2±2 ^A	2.1±0.7 ^B	N.D.	N.D.
Prototipos					
FA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FB	4.50±0.34 ^C	4.29±0.14 ^B	30.09±1.4 ^A	81.97±0.8 ^B	789.73±11.7 ^C
FC	2.38±0.2 ^D	3.2±0.7 ^B	11.9±0.8 ^B	73.45±2.9 ^C	1551.68±141.8 ^B
FD	2.19±0.1 ^D	8.86±0.8 ^A	10.1±1.5 ^B	75.91±0.8 ^C	3305.14±25.4 ^A
FE	6.07±0.5 ^B	2.99±0.2 ^B	12±1.2 ^B	69.02±1.5 ^D	226±4.1 ^D
FF	13.12±0.2 ^A	1.16±0.1 ^C	10±1.4 ^B	90.96±1.2 ^A	710.99±40 ^C

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.

El análisis FTIR de los prototipos de apósitos evidencia cómo las variaciones en la concentración de colágeno y el uso de dispersantes alternativos como quitosano y alginato impactan significativamente en las propiedades químicas y estructurales del material. Un punto clave es la aparición del pico correspondiente a los enlaces O-H ($3330-3340\text{ cm}^{-1}$) (Nascimento *et al.*, 2016), evidente en las formulaciones FD, FE y FF, pero ausente en FC y FB (Fig. 1). Este comportamiento está estrechamente relacionado con la interacción molecular entre el colágeno y la celulosa bacteriana. En FB (4% colágeno) y FC (2% colágeno), la mayor concentración de colágeno promueve la formación de una

red más compacta mediante enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos de la celulosa y los grupos funcionales del colágeno, como las amidas y los carboxilos. Este fenómeno resulta en la ocupación de los grupos hidroxilo, lo que reduce su disponibilidad y enmascara el pico O-H en el espectro. Por el contrario, en FD (1% colágeno), la baja cantidad de colágeno disminuye estas interacciones, dejando expuestos más grupos hidroxilo, lo que se traduce en un pico O-H más evidente.

En las formulaciones FE (quitosano) y FF (alginato), el comportamiento del pico O-H refuerza la idea de que estos dispersantes interactúan de manera diferente con la celulosa bacteriana. El quitosano, con sus grupos amino, forma enlaces iónicos principalmente con los carboxilatos de la celulosa, dejando los hidroxilos relativamente libres. Por su parte, el alginato, una sustancia aniónica, tiende a formar una red menos compacta debido a su naturaleza polianiónica, lo que reduce las interacciones con los hidroxilos de la celulosa. Esta estructura más laxa permite una mayor exposición de los grupos O-H en el espectro. Además, los picos en el rango de $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H alifáticos (Liu *et al.*, 2021), están presentes en todas las formulaciones y reflejan la incorporación de componentes como propilenglicol, que mejora la flexibilidad de las membranas y estabiliza su estructura mecánica. Estos picos son consistentes entre formulaciones, lo que sugiere que el propilenglicol se incorpora homogéneamente en todas las muestras.

El pico observado en 1041 cm^{-1} en FD, correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-O-C de los enlaces glicosídicos, destaca en esta formulación, lo que indica una mayor proporción de enlaces característicos de los polisacáridos. Esto podría estar relacionado con la baja concentración de colágeno, lo que permite una mayor expresión de las señales propias de la celulosa bacteriana. Este comportamiento sugiere que la formulación FD mantiene mejor la estructura original de la celulosa bacteriana, mientras que en otras formulaciones, el colágeno o los dispersantes alteran estas señales. Por otro lado, en el espectro de FB, destacan los picos en 1528 cm^{-1} y 1662 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de los enlaces N-H y C=O de las amidas, respectivamente (Marquele-Oliveira *et al.*, 2019). Estos picos son más prominentes en FB debido a la mayor cantidad de colágeno presente, lo que refuerza la idea de que este material domina las interacciones moleculares en esta formulación. Además, el rango de

1700-1500 cm^{-1} muestra señales más definidas en las formulaciones con quitosano (FE), destacando un pico a 1650 cm^{-1} , que corresponde a las vibraciones de las amidas presentes en el quitosano. Este pico indica que el quitosano interactúa de forma significativa con la celulosa bacteriana, posiblemente formando una red tridimensional más laxa que facilita la disponibilidad de otros grupos funcionales, como los hidroxilos (Stubbe *et al.*, 2019).

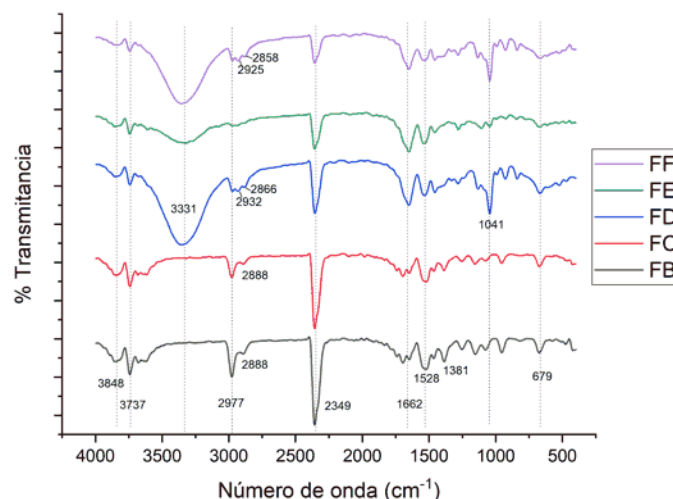


Figura 2. FTIR de los prototipos de apósitos sólidos.

El análisis comparativo de las formulaciones en estado líquido (FBL, FCL, FDL, FEL, FFL) y seco (FB, FC, FD, FE, FF) (Fig. 2 y 3) revela cambios significativos en las interacciones moleculares y las propiedades químicas. Las diferencias observadas en los espectros FTIR entre ambos estados reflejan cómo el proceso de secado impacta la reorganización estructural y la disponibilidad de grupos funcionales, aspectos cruciales para entender la funcionalidad de los materiales en aplicaciones biomédicas. En las formulaciones líquidas, como FBL, FCL y FDL, se observan picos más amplios y menos definidos en las regiones características de los enlaces O-H (3300-3400 cm^{-1}) y N-H (1500-1700 cm^{-1}). Esto puede atribuirse a la presencia de agua, que interactúa dinámicamente con los grupos funcionales del colágeno y la celulosa bacteriana, formando enlaces de hidrógeno temporales. Estas interacciones generan mayor movilidad molecular, lo que resulta en señales más amplias. Por ejemplo, el pico O-H es más prominente en las formulaciones líquidas debido a la hidratación de los grupos

hidroxilo, mientras que los picos correspondientes a las vibraciones de las amidas (1662 y 1528 cm^{-1}) también son más amplios, reflejando una menor densidad estructural en comparación con las formulaciones secas. En contraste, las formulaciones secas, como FB, FC y FD, presentan picos más definidos en las mismas regiones. El proceso de secado elimina las moléculas de agua, lo que provoca una reorganización estructural en la que los grupos funcionales interactúan entre sí a través de enlaces intramoleculares e intermoleculares. En las formulaciones con mayores concentraciones de colágeno (FB y FC), el secado favorece la formación de una red tridimensional densa, evidenciada por una disminución en la intensidad del pico O-H y un aumento de las señales en las regiones de las amidas, indicando que los grupos hidroxilo están ocupados formando enlaces más estables con el colágeno. Por otro lado, en FD, la baja concentración de colágeno deja expuestos más hidroxilos libres, lo que se traduce en un pico O-H más prominente incluso en el estado seco. En las formulaciones con dispersantes alternativos, como quitosano (FEL, FE) y alginato (FFL, FF), el comportamiento es diferente debido a las propiedades específicas de estos polímeros. En FEL y FFL, los espectros FTIR muestran un pico más prominente en 1650 cm^{-1} (vibración C=O de las amidas), lo que indica interacciones significativas entre los grupos funcionales del quitosano o el alginato con la celulosa bacteriana. En el estado líquido, estos dispersantes interactúan con el agua para formar redes más flexibles y menos densas, lo que se traduce en picos más amplios y de menor intensidad en comparación con las formulaciones secas. Sin embargo, al secarse, el quitosano y el alginato permiten la formación de una estructura más laxa en comparación con las formulaciones con colágeno, lo que se refleja en un pico O-H aún visible y en señales más definidas en las regiones correspondientes a los grupos funcionales del dispersante. Los picos en el rango de $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H alifáticos, son consistentes entre las formulaciones líquidas y secas, aunque ligeramente más intensos en las formulaciones secas. Esto se puede atribuir a la estabilización de las cadenas alifáticas en ausencia de agua. Además, en las formulaciones líquidas, como FDL, FEL y FFL, el agua puede enmascarar parcialmente estas señales debido a las interacciones con los grupos hidrófilos presentes en los materiales.

Otro aspecto interesante es el pico en 1041 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-O-C de los enlaces glicosídicos en los polisacáridos (Soares *et al.*, 2021). Este pico es más prominente en FDL y FD, lo que indica que estas formulaciones, con menor concentración de colágeno, mantienen mejor la estructura original de la celulosa bacteriana. En el estado líquido, este pico podría aparecer más amortiguado debido a la hidratación, pero se vuelve más definido tras el secado, lo que refleja la reorganización estructural de la celulosa al eliminar el agua. Finalmente, las diferencias observadas en el rango de $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ son particularmente notables en FEL y FFL, donde los picos asociados con las amidas son más prominentes tanto en el estado líquido como seco. Esto sugiere que el quitosano y el alginato no solo interactúan con la celulosa bacteriana, sino que también conservan cierta flexibilidad estructural incluso tras el secado.

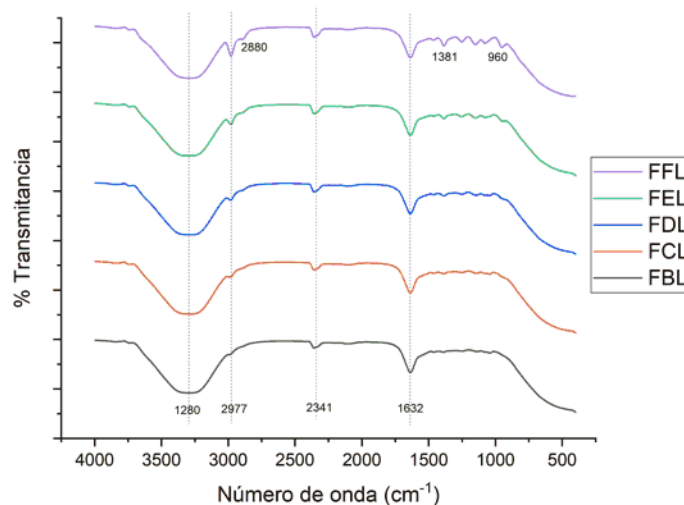


Figura 3. FTIR de los prototipos de apósitos líquido (soluciones formadoras de película).

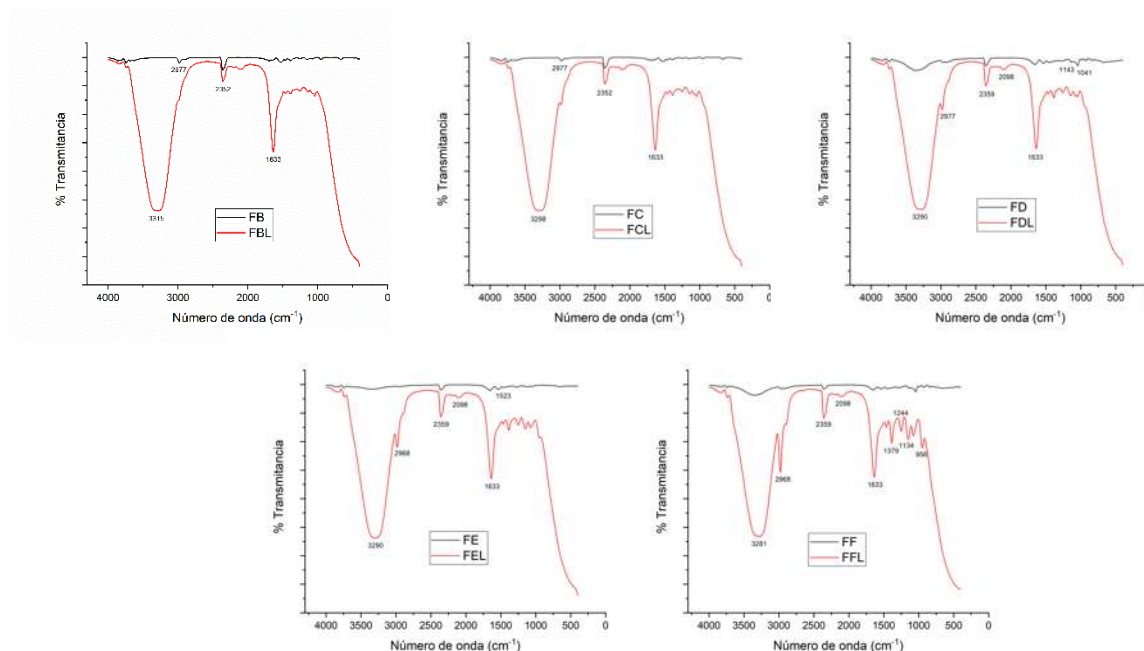


Figura 3. Comparativa de FTIR de los prototipos de apósitos líquido y sólidos.

Los difractogramas de rayos X (Figura 4) revelan diferencias estructurales sustanciales entre los apósitos formulados con carboximetilcelulosa (FB, FC, FD) y aquellos con quitosano (FE) o alginato (FF), reflejando el efecto directo del tipo de dispersante sobre el grado de cristalinidad de la matriz de celulosa bacteriana (CB). En los apósitos FB, FC y FD se identifican picos nítidos en torno a $2\theta \approx 38.5^\circ$ y 45.7° , lo que indica la presencia de regiones semi-cristalinas compatibles con una fase tipo celulosa I parcialmente organizada. La mayor intensidad y definición de estos picos en FB sugiere una estructura más compacta y ordenada, probablemente favorecida por la mayor proporción de colágeno (4%), que actúa como agente estructurante dentro de la red CB-CMC. En contraste, los difractogramas de los apósitos FE (quitosano) y FF (alginato) presentan perfiles notablemente más amorfos, con patrones de fondo más difusos y una ausencia clara de picos definidos, lo cual indica una reducción sustancial del orden estructural. Esta pérdida de cristalinidad puede estar relacionada con la incorporación de gelificantes polianiónicos (alginato) o policationicos (quitosano), los cuales interfieren en el empaquetamiento tridimensional de las nanofibrillas de CB, al introducir enlaces iónicos o interacciones débiles que alteran la agregación regular de las cadenas de celulosa (Baihaq *et al.*, 2025; Jia *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2007). La progresiva desaparición de los

picos cristalinos en las formulaciones FE y FF puede considerarse evidencia de una transición hacia un comportamiento más hidrofílico y desordenado, lo que concuerda con los altos niveles de hinchamiento observados experimentalmente en estas formulaciones. En contraste, las formulaciones FE y FF exhiben patrones de difracción considerablemente más difusos, con pérdida casi total de los picos definidos, lo que evidencia una estructura predominantemente amorfa. Este fenómeno sugiere que tanto el quitosano como el alginato interfieren en el empaquetamiento tridimensional de las nanofibrillas de celulosa, disminuyendo su capacidad de formar dominios cristalinos. Este efecto ha sido atribuido a la formación de redes polielectrolíticas débiles o enlaces secundarios entre los grupos funcionales de los gelificantes y la CB, tal como lo reportan (Ristić *et al.*, 2024; Pasaribu *et al.*, 2020) en matrices similares. La transición hacia estructuras más desordenadas concuerda con los resultados de hinchamiento: las formulaciones FE y FF muestran niveles significativamente mayores de absorción de agua (2264.1% y 710.9%, respectivamente), en comparación con FB (789.7%), lo que refuerza la idea de que una red menos cristalina presenta mayor accesibilidad para la penetración de agua. La reducción del orden estructural también está asociada a una mayor permeabilidad al vapor de agua (PVA), como se refleja en los valores elevados de FE (6.07 g/ms·MPa) y FF (13.12 g/ms·MPa), frente a FB (4.50 g/ms·MPa), lo que indica una matriz más abierta y menos densa. En términos funcionales, esto implica que las formulaciones con estructuras amorfas son más adecuadas para heridas exudativas, donde se requiere absorción y transpirabilidad, mientras que las más cristalinas pueden ofrecer mejor integridad mecánica. Por tanto, el análisis de DRX en conjunto con las propiedades fisicoquímicas permite establecer una correlación directa entre la microestructura inducida por los dispersantes y el desempeño clínico esperado de cada apósito, como lo plantean Chen *et al.* (2020) y Singh *et al.* (2022) en estudios recientes sobre apósitos de CB funcionalizada. Las variaciones estructurales influyen en hinchamiento, permeabilidad al vapor y resistencia mecánica.

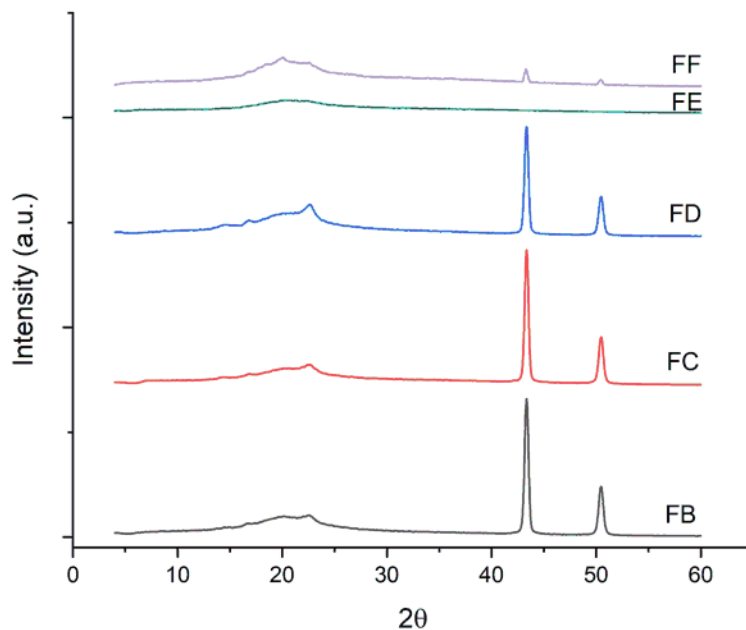


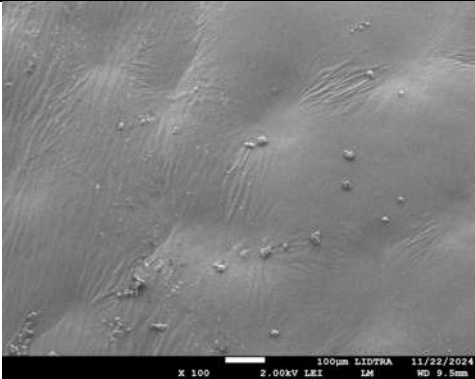
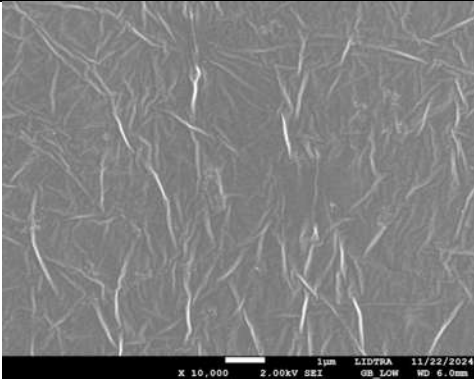
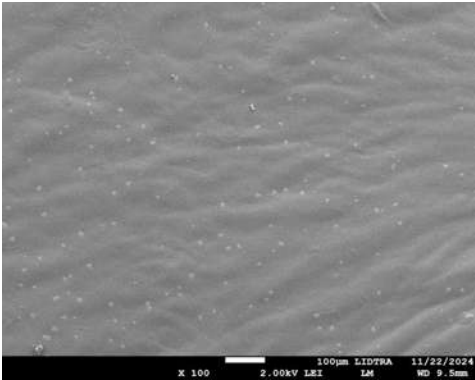
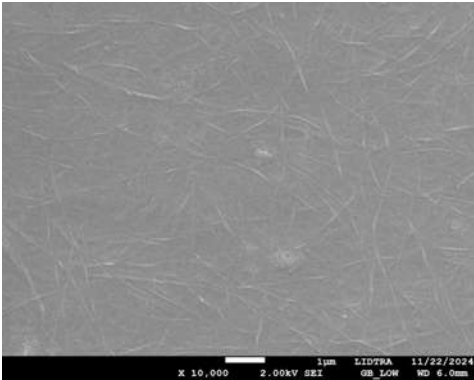
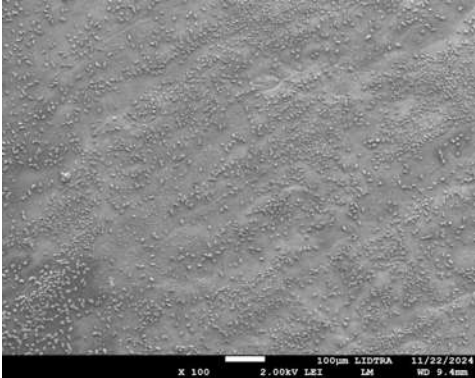
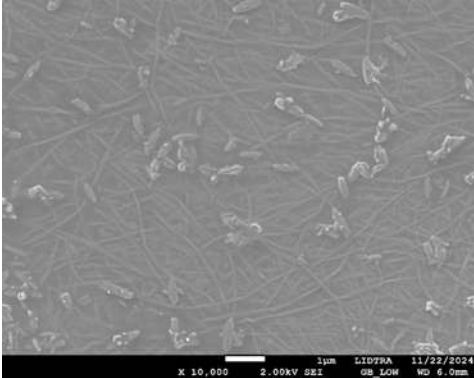
Figura 4. Comparativa de XRD de los prototipos de apósitos.

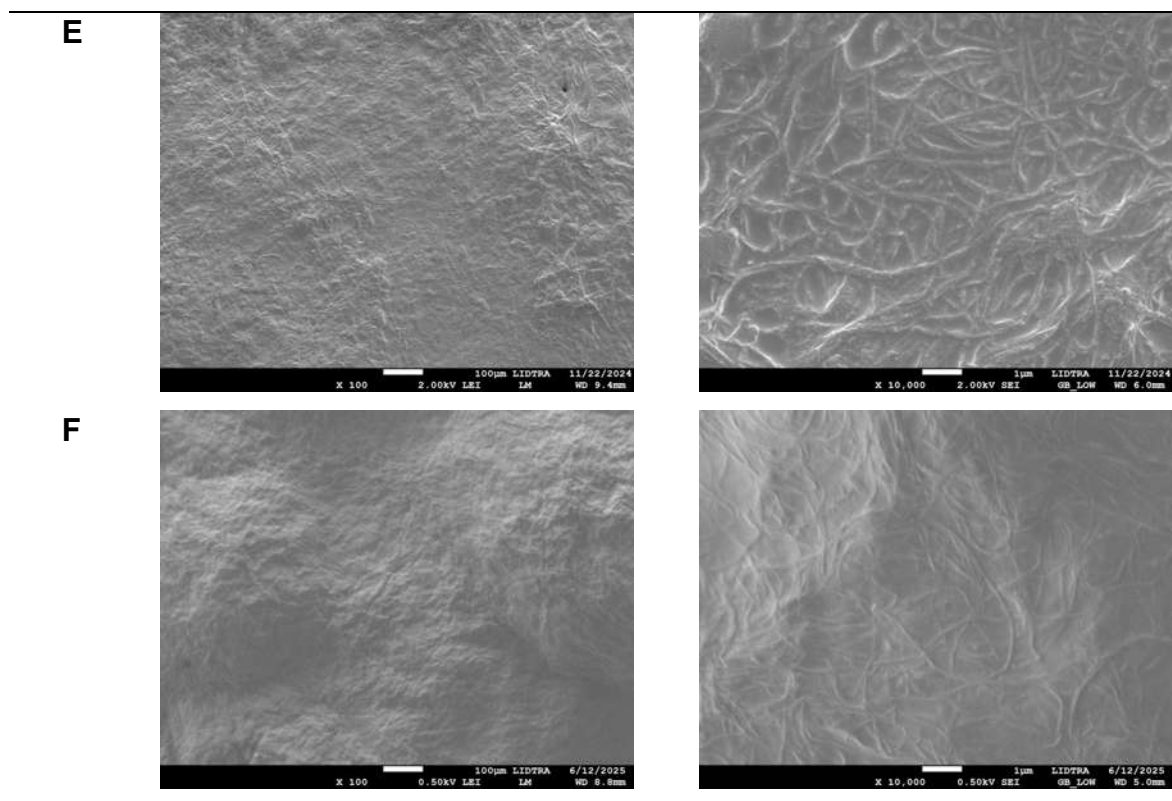
Microfotografías

El análisis SEM permitió caracterizar la ultraestructura superficial de los prototipos B, C, D, E y F (Tabla 3). El prototipo B mostró una superficie continua y ligeramente ondulada, con una red densa de nanofibras aplanadas o acintadas, parcialmente fusionadas pero aún distinguibles, sugiriendo una compactación intermedia. El prototipo C presentó una superficie extremadamente lisa y homogénea, con estructura muy densa y alta coalescencia de fibrillas, dificultando la resolución de fibras individuales, lo que indica un empaquetamiento eficiente y una película compacta. El prototipo D exhibió una superficie rugosa y granular, con una red fibrilar menos definida; las nanofibras aparecen parcialmente cubiertas o incrustadas en una matriz amorfa, y se observan características globulares o particuladas, lo que sugiere una modificación significativa de la red fibrosa. El prototipo E mostró una superficie claramente texturizada, con un patrón reticulado bien definido y una red tridimensional abierta; las nanofibras, de morfología acintada, están orientadas aleatoriamente y forman grandes espacios intersticiales, indicando baja compactación y alta porosidad. El prototipo F presentó una superficie homogénea similar

a E, pero con fibras más finas y mejor definidas, manteniendo una red porosa y organizada.

Tabla 3. Caracterización de prototipos por microscopia electrónica de barrido.

MUESTRA	
B	
	
C	
	
D	
	



Para determinar la actividad antimicrobiana se evaluó la eficacia de 12 antibióticos comunes para bacterias Gram positivas y negativas (Tabla 4). Cefotaxima y Ciprofloxacino demostraron altos niveles de actividad antimicrobiana. La Cefotaxima, un antibiótico de amplio espectro perteneciente a las cefalosporinas de tercera generación, mostró halos de inhibición significativos frente a *E. coli* (40 ± 1.73 mm), *S. aureus* (29 ± 1 mm), *E. faecalis* (26.33 ± 1.57 mm) y *P. aeruginosa* (22 ± 3.6 mm) (Tabla 3), lo que la posiciona como una opción clave para tratar infecciones bacterianas mixtas. Por otro lado, el Ciprofloxacino, una fluoroquinolona de amplio espectro, destacó por su alta eficacia contra *E. coli* (40.67 ± 1.15 mm), *P. aeruginosa* (38.0 ± 1.0 mm), *S. aureus* (27.66 ± 0.57 mm) y *E. faecalis* (21.66 ± 0.57 mm) (Tabla 3). Su capacidad para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*, un patógeno comúnmente resistente, es particularmente relevante, especialmente en infecciones nosocomiales o crónicas.

En comparación con otros antibióticos evaluados, Cefotaxima y Ciprofloxacino mostraron ventajas considerables en términos de espectro de acción y valores de inhibición. Sin embargo, otros antibióticos presentaron limitaciones importantes. Por ejemplo, Cloranfenicol mostró actividad moderada frente a *E. coli* (33.67 ± 0.57 mm) pero

fue ineficaz contra *P. aeruginosa*. Norfloxacin, aunque tuvo actividad similar al Ciprofloxacino frente a *E. coli* (35 ± 2.0 mm) y *P. aeruginosa* (35.33 ± 1.52 mm), no fue tan efectivo contra bacterias Gram-positivas, lo que restringe su utilidad en infecciones polimicrobianas. Por su parte, Gentamicina fue menos eficaz frente a *E. coli* (22.33 ± 0.57 mm) y *P. aeruginosa* (24 ± 1.0 mm) en comparación con Ciprofloxacino, y su toxicidad potencial limita su uso prolongado. Sulfametoxazol/Trimetoprim mostró actividad únicamente frente a *E. coli* (35.33 ± 0.57 mm) (Tabla 4), pero careció de acción contra los otros patógenos evaluados, lo que evidencia un espectro limitado.

El uso de Cefotaxima y Ciprofloxacino en apósitos antimicrobianos está plenamente justificado debido a su alta efectividad contra un amplio rango de patógenos y su compatibilidad con las formulaciones tópicas. Ambos antibióticos tienen la capacidad de controlar infecciones mixtas y evitar complicaciones graves en heridas infectadas, al tiempo que reducen la posibilidad de efectos adversos asociados a su administración sistémica. Estos efectos se han observado por Rancan et al. (2023) y Roy et al. (2016) quienes documentan control de infecciones con ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa* (Gram-) y *S. aureus*/MRSA (Gram+); Zakaria et al. (2016) mostraron la efectividad de la cefotaxima en hidrogeles con actividad contra *S. aureus* y *E. coli* in vivo; y Eriksson et al. (2023) explican por qué la vía tópica alcanza concentraciones locales muy altas con menor absorción sistémica.

Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de los diferentes apósitos y se compararon con papel filtro Whatmann 1 y sensidiscos típicos todos cargados con cefatoxima y ciprofloxacino como antibióticos. El apósito FD, en particular, destacó frente a *E. coli* al utilizar ciprofloxacino como agente activo, con un halo de inhibición de 45.66 ± 1.15 mm (Tabla 5). Este valor no solo es significativamente mayor que el obtenido con el papel filtro y el sensidisco utilizados como controles, sino que también supera lo reportado en estudios previos que analizan hidrogeles basados en celulosa bacteriana para la administración de antimicrobianos (Ghica et al., 2017).

Tabla 4. Antibiógramas de 12 antibióticos comunes para gram positivos (G+) y gram negativos (G-).

G-	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicilina	23.0±1.0 ^D	0±0 ^D
Amikacina	24.67±0.57 ^D	28.67±1.15 ^B
Carbenicilina	28.33±0.57 ^C	23.67±2.3 ^C
Gentamicina	22.33±0.57 ^D	24±1.0 ^C
Cefalotina	23.66±0.57 ^D	0±0 ^D
Netilmicina	29.67±0.57 ^C	0±0 ^D
Ciprofloxacino	40.67±1.15 ^A	38±1.0 ^A
Cefatoxima	40±1.73 ^A	22±3.6 ^C
Norfloxacino	35±2.0 ^B	35.33±1.52 ^A
Cloranfenicol	33.67±0.57 ^B	0±0 ^D
Sulfametoxazol/trimetoprim	35.33±0.57 ^B	0±0 ^D
Nitrofurantoína	29±1.73 ^C	0±0 ^D

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes (Tukey $p<0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.

G+	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
Ampicilina	20.33±0.57 ^{CD}	17±0.0 ^G
Cefalotina	19±1.0 ^{DE}	35.33±0.57 ^{AB}
Dicloxacilina	0±0 ^G	23.33±2.51 ^{EF}
Cefatoxima	26.33±1.57 ^B	29±0.0 ^{CD}
Ciprofloxacino	21.66±0.57 ^{CD}	27.66±0.57 ^{CDE}
Gentamicina	11.66±2.88 ^F	26.66±1.52 ^{CDE}
Clindamicina	11±1.0 ^F	36.66±0.57 ^A
Eritromicina	16.66±1.15 ^E	28.33±1.15 ^{CD}
Peniclinia	23.33±0.57 ^{BC}	24.66±3.05 ^{DEF}
Vancomicina	19.66±1.52 ^{DE}	20.33±0.57 ^{FG}
Tetraciclina	11.33±0.57 ^F	34.33±2.08 ^{AB}
Sulfametoxazol/trimetoprim	30.66±0.57 ^A	31±1.0 ^{BC}

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes (Tukey $p<0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.

Este comportamiento podría atribuirse a la menor concentración de colágeno en esta formulación que facilita la difusión del antibiótico a través de la matriz polimérica. Liu *et al.* (2021) señalaron que una menor densidad en la matriz del hidrogel mejora significativamente la liberación de compuestos terapéuticos, algo que parece corroborarse en este caso. Al evaluar la cefotaxima, el apósito FD también demostró un rendimiento superior frente a *E. coli* (43.0±1.0 mm) (Tabla 5), aunque los halos fueron

menores en comparación con ciprofloxacino. Esto es consistente con estudios previos que muestran una mayor eficacia de ciprofloxacino contra *E. coli*, debido a su mecanismo de acción sobre las topoisomerasas bacterianas, en comparación con la cefotaxima, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular (Marquele-Oliveira *et al.*, 2019). Sin embargo, es importante destacar que la interacción entre el material del apósito y los antibióticos también desempeña un papel clave. La capacidad de adsorción y posterior liberación del antibiótico puede estar influenciada por las propiedades químicas del material soporte, como su carga eléctrica y afinidad hidrofóbica (Hurtado *et al.*, 2020).

En el caso de *P. aeruginosa*, el desempeño de los apósitos fue menos efectivo, lo cual es consistente con la alta resistencia natural de esta cepa a múltiples antibióticos, incluyendo los evaluados en este estudio (Martínez-Correa *et al.*, 2020). No obstante, el apósito FF, que utilizó alginato como material dispersante, mostró un ligero aumento en el diámetro del halo de inhibición frente a esta cepa (16.33 ± 1.52 mm con cefotaxima). Esto podría estar relacionado con las propiedades intrínsecas del alginato, que han demostrado mejorar la bioadhesión y prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el sitio de acción (Sellappan *et al.*, 2021).

El análisis de las formulaciones también pone de manifiesto el equilibrio crítico entre las propiedades mecánicas y la funcionalidad antibacteriana. Formulaciones con altas concentraciones de colágeno, como la FB, mostraron una reducción en la eficacia antibacteriana, posiblemente debido a una mayor densidad de la matriz que limita la difusión del fármaco. Este hallazgo coincide con estudios previos que indican que una mayor rigidez en la matriz polimérica puede dificultar la liberación controlada de agentes terapéuticos (Stubbe *et al.*, 2019).

Además, el uso de diferentes materiales dispersantes tuvo un impacto notable en las propiedades finales de los apósitos. Mientras que la carboximetilcelulosa proporcionó un equilibrio adecuado entre fuerza de tensión y elongación, el quitosano destacó por sus propiedades antimicrobianas intrínsecas, que podrían potenciar el efecto de los antibióticos. Esto es relevante, dado que el quitosano no solo mejora la actividad antibacteriana, sino que también incrementa la biocompatibilidad, como lo han documentado Liu *et al.* (2021) en su análisis de nanofibras hidrogélicas adhesivas.

Sin embargo, es fundamental considerar el contexto completo de los resultados. Aunque el apósito FD parece ser el más prometedor debido a su balance entre propiedades mecánicas y eficacia antibacteriana, su viabilidad a largo plazo aún debe ser evaluada mediante pruebas de estabilidad acelerada. Este tipo de pruebas permitiría determinar cómo responden los componentes del apósito, incluido el antibiótico, bajo condiciones de estrés ambiental, como cambios de temperatura, humedad y exposición a luz. Estudios previos han demostrado que ciertos materiales poliméricos pueden experimentar degradación o cambios estructurales significativos bajo estas condiciones, lo que podría comprometer la eficacia del apósito (Stubbe *et al.*, 2019).

Tabla 5. Antibiógramas de los apósitos vs sensibilizadores y papel filtro.

Material	Ciprofloxacino 5 μ g (mm de inhibición)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
B	41.66 $\pm$ 1.52 ^{BC}	25 $\pm$ 1.0 ^D	24.33 $\pm$ 0.57 ^{AB}	31.33 $\pm$ 1.52 ^{BC}
C	43.66 $\pm$ 1.15 ^{ABC}	29 $\pm$ 1.0 ^{BC}	27.0 $\pm$ 1.0 ^A	31.30 $\pm$ 1.50 ^{BC}
D	45.66 $\pm$ 1.15 ^A	29.33 $\pm$ 1.0 ^{BC}	26.33 $\pm$ 1.52 ^A	33.33 $\pm$ 1.52 ^B
E	35.33 $\pm$ 0.57 ^D	26.66 $\pm$ 0.57 ^{CD}	24.66 $\pm$ 2.30 ^{AB}	29.66 $\pm$ 1.52 ^{CD}
F	44 $\pm$ 1.0 ^{AB}	34.66 $\pm$ 1.52 ^A	25.0 $\pm$ 1.0 ^{AB}	30.66 $\pm$ 1.15 ^C
Papel filtro	43.66 $\pm$ 1.15 ^{ABC}	31.0 $\pm$ 1.0 ^B	25.6 $\pm$ 0.57 ^A	28.0 $\pm$ 2.0 ^D
Sensidisco	40.66 $\pm$ 1.15 ^C	27.66 $\pm$ 0.57 ^{CD}	21.6 $\pm$ 0.57 ^B	38.0 $\pm$ 1.0 ^A

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.

Material	Cefatoxima 30 μ g (mm de inhibición)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
B	37.66 $\pm$ 0.57 ^B	28.33 $\pm$ 0.57 ^A	26.33 $\pm$ 0.57 ^{BC}	15.0 $\pm$ 1.0 ^{BC}
C	40.0 $\pm$ 1.0 ^{AB}	30.0 $\pm$ 1.0 ^A	31.66 $\pm$ 1.52 ^A	15.33 $\pm$ 0.57 ^{BC}
D	43.0 $\pm$ 1.0 ^A	31.66 $\pm$ 1.52 ^A	29.0 $\pm$ 1.0 ^{AB}	13.0 $\pm$ 2.0 ^C
E	38.66 $\pm$ 1.52 ^B	28.33 $\pm$ 2.08 ^A	24.0 $\pm$ 1.0 ^C	14.33 $\pm$ 2.51 ^{BC}
F	42.0 $\pm$ 1.0 ^A	29.66 $\pm$ 1.50 ^A	30.33 $\pm$ 2.51 ^{AB}	16.33 $\pm$ 1.52 ^{BC}
Papel filtro	40.66 $\pm$ 0.57 ^{AB}	29.66 $\pm$ 1.52 ^A	28.66 $\pm$ 1.52 ^{AB}	19.66 $\pm$ 0.57 ^{AB}
Sensidisco	40.0 $\pm$ 1.73 ^{AB}	29.0 $\pm$ 0.2 ^A	26.33 $\pm$ 1.50 ^{BC}	22.0 $\pm$ 3.6 ^A

Las medias no conectadas por la misma letra, en la misma columna, son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). Resultados obtenidos de 3 repeticiones.

Conclusión

Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de celulosa bacteriana con agentes dispersantes como CMC, quitosano y alginato puede influir de manera significativa en las propiedades mecánicas y funcionales de los apósitos. En particular, la formulación D, que contiene 1% de colágeno y CMC, mostró un equilibrio óptimo entre la fuerza de tensión, la elongación y la actividad antimicrobiana, especialmente frente a *E. coli* y *S. aureus*. Estos hallazgos respaldan la viabilidad de utilizar apósitos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas, destacando la importancia de ajustar las concentraciones de los componentes para maximizar su rendimiento y eficacia. La investigación futura podría centrarse en la evaluación de la estabilidad a largo plazo de estos apósitos bajo condiciones ambientales variables para asegurar su efectividad en el tratamiento clínico.

Literatura citada

- Baihaqi, M. F., H. Suryanto, A. Aminnudin, P. Puspitasari, J. Maulana, F. Nusantara, M. P. Renandito, A. F. Osman y U. Yanuhar. 2025. **Analysis of crystallinity and morphology of bacterial cellulose/chitosan based composite film**. BIO Web of Conferences 183, 01029. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202518301029>
- Deng, L., C. Wang, Z. Han, M. Jin, Z. Zhou, S. Chen y S. Gu. 2024. **A biological antimicrobial agent functionalized bacterial cellulose-based wound dressing**. Cellulose 31: 1–13.
- Eriksson, E., G. L. Griffith y K. Nuutila. 2023. **Topical drug delivery in the treatment of skin wounds and ocular trauma using the Platform Wound Device**. Pharmaceutics 15(4): 1060.

- Ghica, M. V., M. G. A. Kaya, C. E. Dinu-Pîrvu, D. Lupuleasa y D. I. Udeanu. 2017. **Development, optimization and in vitro/in vivo characterization of collagen-dextran spongiuous wound dressings loaded with flufenamic acid.** *Molecules* 22(9): 7–9.
- Hurtado, A., R. Selgas, R. y Á. Serrano Aroca. 2020. **El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales.** *Nereis Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation* (12): 137–149.
- Jia Y, X. Wang, M. Huo, X. Zhai, F. Li y C. Zhong. 2017. **Preparation and characterization of a novel bacterial cellulose/chitosan bio-hydrogel.** *Nanomateriales y Nanotecnología.*
- Liu, X., Y. Liu, J. Du, X. Li, J. Yu y B. Ding. 2021. **Breathable, stretchable and adhesive nanofibrous hydrogels as wound dressing materials.** *Engineered Regeneration* 2: 63–69.
- Marquele-Oliveira, F., H. da Silva Barud, E. C. Torres, R. T. A. Machado, G. F. Caetano, M. N Leite, y A. A. Berretta. 2019. **Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes.** *International Journal of Biological Macromolecules* 136: 570–578.
- Martínez-Correa, E., M. A. Osorio-Delgado, L. J. Henao-Tamayo y C. I. Castro-Herazo. 2020. **Clasificación Sistemática de Apósitos: Una Revisión Bibliográfica.** *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 41(1): 5-28.
- Meng, S., H. Wu, D. Xiao, S. Lan y A. Dong. 2023. **Recent advances in bacterial cellulose-based antibacterial composites for infected wound therapy.** *Carbohydrate Polymers* 316: 121082.
- Nascimento, D. M. do, A. F. Dias, C. P. de Araújo Junior, M. de F. Rosa, J. P. S. Morais y M. C. B. de Figueirêdo. 2016. **A comprehensive approach for obtaining cellulose nanocrystal from coconut fiber. Part II: Environmental assessment of technological pathways.** *Industrial Crops and Products* 93: 58–65.
- Pasaribu, K. M., S. Gea, S. Ilyas, T. Tamrin y I. Radecka. 2020. **Characterization of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing in Different Order Impregnation of Chitosan and Collagen.** *Biomolecules* 10(11): 1511.

- Portela, R., C. R. Leal, P. L. Almeida y R. G. Sobral. 2019. **Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications**. *Microbial Biotechnology* 12(4): 586–610.
- Rancan, F., J. Jurisch, S. Hadam, A. Vogt, U. Blume-Peytavi, I. S. Bayer, M. Contardi y C. Schaudinn. 2023. **Ciprofloxacin-loaded polyvinylpyrrolidone foils for the topical treatment of wound infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. *Pharmaceutics* 15(7): 1876.
- Ristić, I., L. Nikolić, S. Cakić, V. Nikolić, J. Tanasić, J. Zvezdanović y M. Krstić. 2024. **Eco-Friendly Microwave Synthesis of Sodium Alginate-Chitosan Hydrogels for Effective Curcumin Delivery and Controlled Release**. *Gels* 10(10): 637.
- Roy, D., S. Tomblyn, D. Burmeister, N. Wrice, S. Becerra, L. Burnett y R. Christy. 2014. **Ciprofloxacin-Loaded Keratin Hydrogels Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Support Healing in a Porcine Full-Thickness Excisional Wound**. *Advances in Wound Care* 4: 150127064149004.
- Sellappan, L. K., A. Sanmugam y S. Manoharan. 2021. **Fabrication of dual layered biocompatible herbal biopatch from biological waste for skin - tissue regenerative applications**. *International Journal of Biological Macromolecules* 183: 1106–1118.
- Soares, M. G., M. de Lima y V. C. Reolon Schmidt. 2021. **Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review**. *Trends in Food Science and Technology* 110: 539–550.
- Stubbe, B., A. Mignon, H. Declercq, S. Van Vlierberghe y P. Dubruel. 2019. **Development of Gelatin-Alginate Hydrogels for Burn Wound Treatment**. *Macromolecular Bioscience* 19(8): 1–12.
- Sulaeva, I., U. Henniges, T. Rosenau y A. Potthast. 2015. **Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review**. *Biotechnology Advances* 33(8): 1547–1571.
- Taroco, R., V. Seija y R. Vignoli. 2006. **Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de bacteriología y Virología Médica**. Oficina del Libro FEFMUR: Montevideo, Uruguay, 2008; págs. 663–671.

- Zakaria, A. S., S. A. Afifi y K. A. Elkhodairy. 2016. **Newly developed topical cefotaxime sodium hydrogels: Antibacterial activity and in vivo evaluation.** BioMed Research International 2016: 6525163.
- Zhou, L. L., D. P. Sun, L. Y. Hu, Y. W. Li y J. Z. Yang. 2007. **Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: 34(7), 483–489.

VI. IV. Capítulo 4: preferencia del consumidor y análisis de estabilidad acelerada de apósitos elaborados a partir de celulosa bacteriana

Resumen

El presente estudio aborda la preferencia del consumidor y el análisis de estabilidad acelerada de apósitos, con el objetivo de evaluar las características más valoradas por los consumidores y la durabilidad de los materiales. Para ello, se realizó una prueba discriminativa de preferencia con 50 participantes familiarizados con el uso de apósitos. Los resultados mostraron que el prototipo FB, un apósito delgado y transparente, fue el más preferido, destacándose por su estética, adherencia, flexibilidad y durabilidad. En términos de estabilidad acelerada, los apósitos fueron sometidos a condiciones de temperatura y humedad para evaluar su vida útil. Los resultados indicaron que la temperatura influye significativamente en la estabilidad de los materiales, con el prototipo E mostrando la mayor vida útil en términos de permeabilidad al vapor de agua, con una vida útil extrapolada a 25°C de 260.7 días, superando a los demás prototipos. Sin embargo, en cuanto a la resistencia a la tensión, el prototipo D presentó la mayor estabilidad, con una vida útil de 189.3 días. En el análisis antimicrobiano, los apósitos con ciprofloxacino presentaron vidas útiles significativamente superiores a los de cefatoxima, siendo el prototipo B el que mostró la mayor vida útil para ciprofloxacino (2502.23 días a 25°C), mientras que el prototipo D alcanzó los 1340.62 días. Estos resultados demuestran que las condiciones de almacenamiento y los componentes de los apósitos afectan de manera significativa su rendimiento y estabilidad, lo que es esencial para su optimización en el mercado.

Abstract

This study addresses consumer preference and accelerated stability analysis of dressings, with the aim of evaluating the characteristics most valued by consumers and the durability of the materials. To this end, a discriminatory preference test was conducted with 50 participants familiar with the use of dressings. The results showed that prototype

FB, a thin and transparent dressing, was the most preferred, standing out for its aesthetics, adherence, flexibility, and durability. In terms of accelerated stability, the dressings were subjected to temperature and humidity conditions to evaluate their shelf life. The results indicated that temperature significantly influences the stability of the materials, with prototype E showing the longest shelf life in terms of water vapor permeability, with an extrapolated shelf life at 25°C of 260.7 days, surpassing the other prototypes. However, in terms of tensile strength, prototype D presented the greatest stability, with a shelf life of 189.3 days. In the antimicrobial analysis, dressings containing ciprofloxacin had significantly longer shelf lives than those containing cefatoxime, with prototype B showing the longest shelf life for ciprofloxacin (2502.23 days at 25°C), while prototype D reached 1340.62 days. These results demonstrate that storage conditions and dressing components significantly affect their performance and stability, which is essential for their optimization in the market.

Introducción

La investigación en el cuidado avanzado de heridas se ha enfocado en el desarrollo de apósitos que no solo protejan la herida, sino que también promuevan activamente la cicatrización. En este contexto, la celulosa bacteriana (CB) ha surgido como un biomaterial de vanguardia debido a su estructura nanofibrilar tridimensional, alta pureza, excelente capacidad de retención de agua y notable biocompatibilidad (Portela *et al.*, 2019). Estas propiedades intrínsecas la convierten en una matriz ideal para apósitos, ya que mantiene un ambiente húmedo en la herida, esencial para el proceso de curación, al tiempo que absorbe el exceso de exudado (Huang *et al.*, 2014). Además, su versatilidad permite la incorporación de agentes terapéuticos, como antibióticos, para prevenir infecciones y acelerar la recuperación (Liu *et al.*, 2018).

El éxito de un apósito en el mercado no depende únicamente de su eficacia clínica, sino también de su aceptación por parte del consumidor. La adherencia del paciente al tratamiento está fuertemente influenciada por características como la comodidad, la flexibilidad y la facilidad de uso del producto (Hargis *et al.*, 2024; Ousey *et al.*, 2023; Morris *et al.*, 2009). Investigaciones sobre las preferencias de los usuarios han demostrado que los apósitos delgados, discretos y transparentes son a menudo preferidos, ya que

permiten la monitorización de la herida sin necesidad de retirar el apósito, reduciendo así el trauma en el sitio de la lesión y mejorando la experiencia del paciente (Rosadi *et al.*, 2023; Wounds International 2016). Por lo tanto, el diseño y la evaluación de las propiedades estéticas y ergonómicas son pasos cruciales en el desarrollo de nuevos biomateriales para su aplicación clínica.

Para garantizar la viabilidad comercial y el cumplimiento normativo de un apósito, es imperativo realizar un análisis de estabilidad riguroso. Los estudios de estabilidad acelerada son una herramienta fundamental para predecir la vida útil de un producto en un período de tiempo reducido, sometiéndolo a condiciones controladas de alta temperatura y humedad (ASTM 2021; FDA 1991). Durante estos estudios, se monitorean propiedades críticas como la integridad mecánica (resistencia a la tensión y elongación), las propiedades de barrera (permeabilidad al vapor de agua) y la potencia del principio activo incorporado (Zavala Arredondo *et al.*, 2018).

La degradación de estas propiedades a menudo sigue modelos cinéticos predecibles. La ecuación de Arrhenius es el método más extendido para analizar los datos de estabilidad acelerada, ya que permite cuantificar la dependencia de la tasa de degradación con la temperatura (Kim *et al.*, 2022). Mediante la extrapolación de los datos obtenidos a temperaturas elevadas, es posible estimar con fiabilidad la vida útil del apósito en condiciones de almacenamiento normales (por ejemplo, a 25 °C), asegurando que mantendrá sus especificaciones de calidad y funcionalidad durante todo su ciclo de vida (Bajaj *et al.*, 2012). Este análisis es esencial para garantizar que el apósito siga siendo seguro y eficaz desde su fabricación hasta su uso final por el consumidor.

Materiales y métodos

Prueba de preferencia del consumidor.

Se elaboró una prueba de preferencia del consumidor de tipo discriminativo (ISO 6658:2017; ISO 5495:2005) con el objetivo de demostrar la existencia de una similitudes o diferencias entre los apósitos. La metodología se describe a continuación:

- Selección de los Consumidores: se seleccionó un grupo (50 personas) representativo de consumidores familiarizados con el uso de apósitos.

- Preparación del Producto: Los apósitos a evaluar fueron ser preparados un día antes de la aplicación.
- Procedimiento de Evaluación: Presentación del Producto: Los productos se presentan de manera aleatoria y en condiciones uniformes para todos los participantes. A cada participante se le otorgo un formulario de recaudación de datos y una pieza de piel sintética para colocar el apósito en la misma. Cada consumidor usó los apósitos sobre la piel sintética según las indicaciones y evaluó diversos aspectos como la comodidad, la adherencia y la facilidad de aplicación, entre otros, según los criterios predefinidos. Finalmente se recopilaron datos cuantitativos y cualitativos sobre la preferencia de los consumidores
- Consideraciones Éticas y de Seguridad: Se siguieron las normativas éticas y de seguridad pertinentes para garantizar la integridad y el bienestar de los participantes durante todo el proceso de prueba.

Estudio de Estabilidad Acelerada

Las muestras fueron sometidas a condiciones controladas de humedad relativa fija del 75 % y temperaturas de 20, 40 y 60 °C durante un periodo de 28 días, con evaluaciones realizadas en los días 0, 7, 14, 21 y 28. Los apósitos se cortaron en secciones de 100 mm × 100 mm y fueron empacados en bolsas de aluminio selladas herméticamente para evitar pérdida de humedad o contaminación. Cada bolsa fue etiquetada con la información correspondiente al tipo de antibiótico incorporado y la condición de almacenamiento asignada.

Para evaluar la estabilidad de los antibióticos, se realizó un análisis antimicrobiano por el método de difusión en disco. En cuanto a la estabilidad física, se determinaron las propiedades mecánicas mediante ensayos de tracción, registrando la fuerza máxima soportada (N) y el porcentaje de elongación al punto de ruptura. Asimismo, se evaluó la permeabilidad al vapor de agua. A partir de los datos obtenidos se calcularon las tasas de degradación (k) aplicando un modelo cinético de primer orden y de orden cero. Las tasas de degradación obtenidas para cada temperatura fueron posteriormente correlacionadas usando la ecuación de Arrhenius $K = A * e^{-Ea/(RT)}$, lo que permitió

construir una gráfica lineal de $\ln(k)$ contra $1/T$, donde la pendiente de la recta obtenida se usó para calcular la energía de activación (E_a) de la degradación de la variable de respuesta. Este análisis permitió además extrapolar la tasa de degradación para estimar la vida útil del sistema.

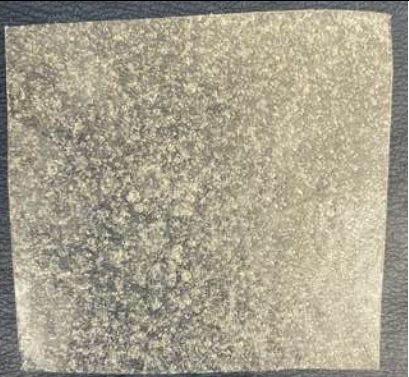
Resultados

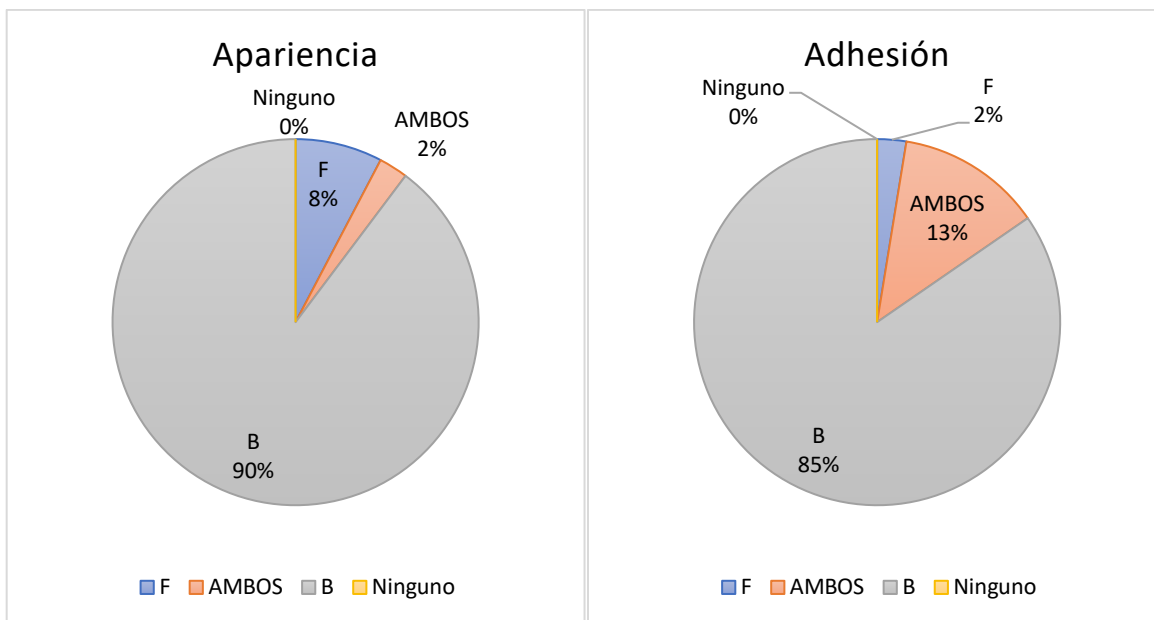
Posterior a la caracterización de los apósitos se elaboró una prueba de preferencia del consumidor para determinar la presentación adecuada de un bioparche en los potenciales consumidores, esto debido a que se lograron obtener dos presentaciones de apósito (Tabla 1): I) tipo espuma (representado con el prototipo FF) y II) apósito totalmente liso y transparente (representado por el prototipo FB). El rango de edades del estudio fue de 20 años hasta los 43 años, con un 46% de hombres y 54% de mujeres. 92% de los encuestados son estudiantes y pertenecen a las carreras de ciencias de la salud, el 5% fueron profesor y el 3% restante corresponde a otras profesiones. Dentro de la encuesta los participantes se les realizó preguntas generales sobre el uso de apósitos y se determinó que el 73% de los encuestados conocían algún parche que se coloque sobre la piel con efectos farmacológicos; Sin embargo, el 82 % nunca ha utilizado uno, y el restante los ha utilizado con una frecuencia de una vez al mes. Así mismo, se les cuestionó sobre su conocimiento sobre los materiales con los cuales están fabricados los parches y el 90% aseguró no tener conocimiento alguno. En cuanto a la apariencia (Fig. 3) solo observando el prototipo (sin hacer contacto físico con él) el 90% de los encuestados consideraron que la formulación FB presenta una estética más acorde con sus gustos personales. Respecto a la adhesión los participantes activaron los parches con un poco de agua estéril y los colocaron sobre la piel sintética, luego de 2 minutos evaluaron la facilidad con la que el parche se mantenía adherido sobre la superficie, el 85% de los encuestados mencionaron que el prototipo FB presenta mayor adherencia. La facilidad de uso (Fig. 1) fue evaluada por los encuestados tomando en cuenta el grosor del prototipo y lo complicado de uso al momento de colocarlo sobre la piel, 44% de los encuestados determinaron que la formulación B presentó mayor facilidad de uso. Para medir la sensación aparente en piel (Fig. 1) los encuestados tuvieron la libertad de tocar

el parche con las manos antes, durante y después de uso, determinando que la formulación FB presentó mayor porcentaje de agrado a los encuestados. De igual modo las encuestas proporcionaron datos sobre la preferencia del prototipo FB en términos de flexibilidad (77%) y durabilidad (85). No se percibió un olor desagradable (Fig. 1) en ninguno de los prototipos y hay una preferencia general prácticamente total hacia el prototipo FB (Fig. 2) demostrada en un análisis general de todas las propiedades analizadas.

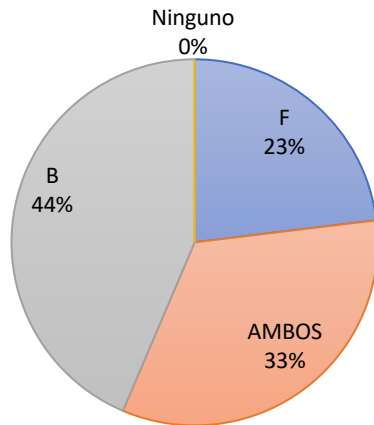
Al analizar los resultados y determinar que la preferencia de los consumidores es hacia un apósito transparente, delgado y discreto se procedió a comparar este prototipo con dos tipos de productos existentes en el mercado: I) TEGADERM, un tipo de apósito transparente y semipermeable fabricado por la compañía 3M. Que según su información oficial está compuesto principalmente por una película de poliuretano transparente y adhesivo acrílico hipoalergénico. Y II) VOLTAREN 24 H, que contiene diclofenaco sódico al 1% y componentes inactivos: Levomentol, N-metil-2-pirrolidona, ésteres de propilenglicol de ácidos grasos, ácido cítrico anhidro, copolímero en bloque del estireno-isopreno-estireno, poliisobutileno, goma éster, 2-mercaptobencimidazol, dibutilhidroxitolueno, parafina líquida. Se observaron diferencias significativas entre las variables analizadas ($p < 0.05$), donde obtuvieron mejores resultados (Tabla 2) en los prototipos presentados en este estudio en los parámetros de permeabilidad al vapor de agua, similitudes en la fuerza de tensión, pero menores porcentajes de elongación, en cuanto al hinchamiento y solubilidad son las necesarias según lo descrito en la literatura (Liu *et al.*, 2021).

Tabla 1. Prototipos evaluados en la prueba de preferencia del consumidor.

	
Prototipo F-Espuma	Prototipo B
Formulacion: • 5% propilenglicol • 0.2% Nipagin • 0.5% Alginato • 2% colágeno • 10% celulosa	Formulacion: • 5% propilenglicol • 0.2% Nipagin • 0.5% CMC • 4% colágeno • 10% celulosa

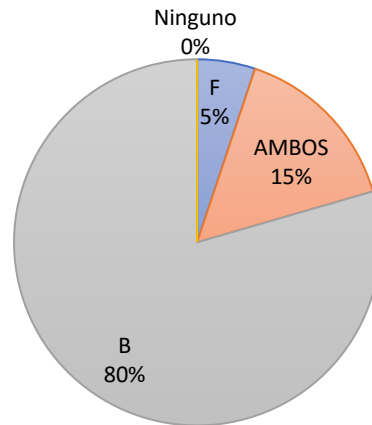


Facilidad de uso



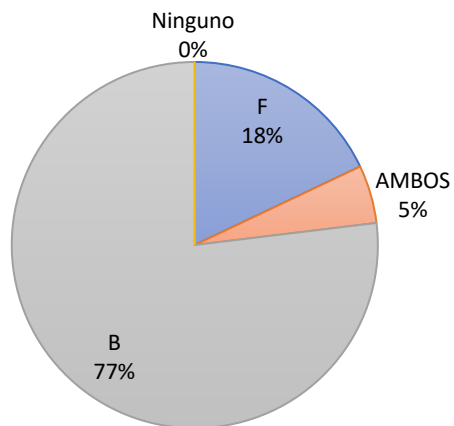
■ F ■ AMBOS ■ B ■ Ninguno

Sensación en piel



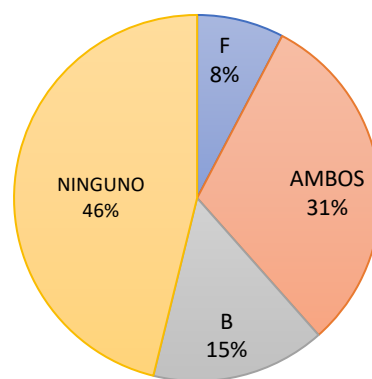
■ F ■ AMBOS ■ B ■ Ninguno

Flexibilidad



■ F ■ AMBOS ■ B ■ Ninguno

Olor



■ F ■ AMBOS ■ B ■ NINGUNO

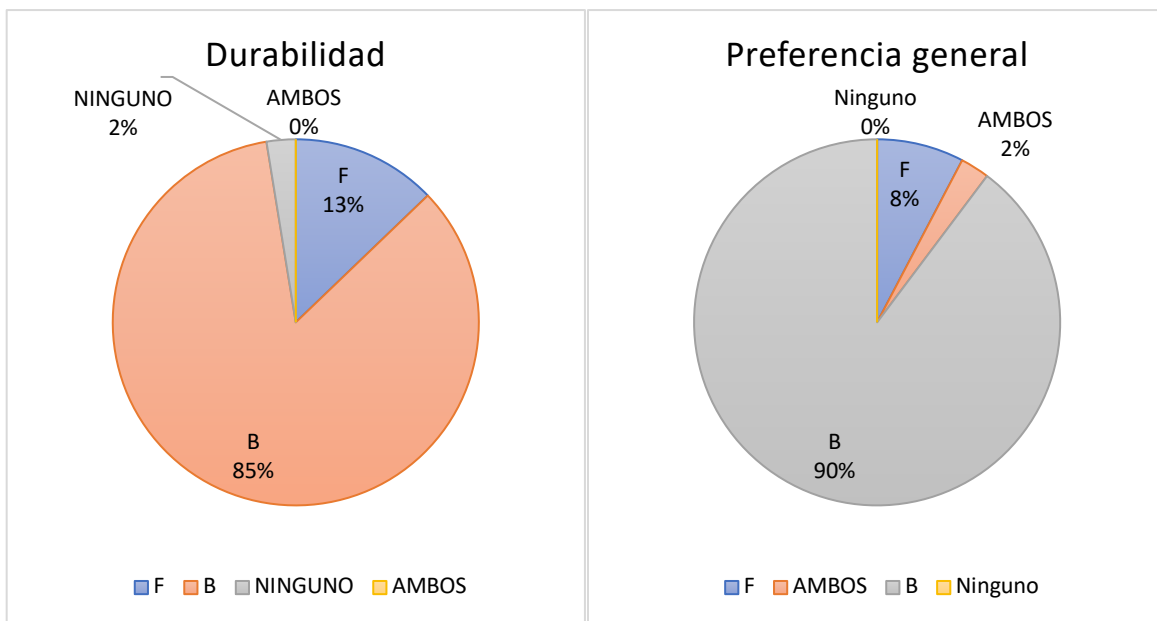


Figura 1. Resultados de la evaluación de preferencia al consumidor.

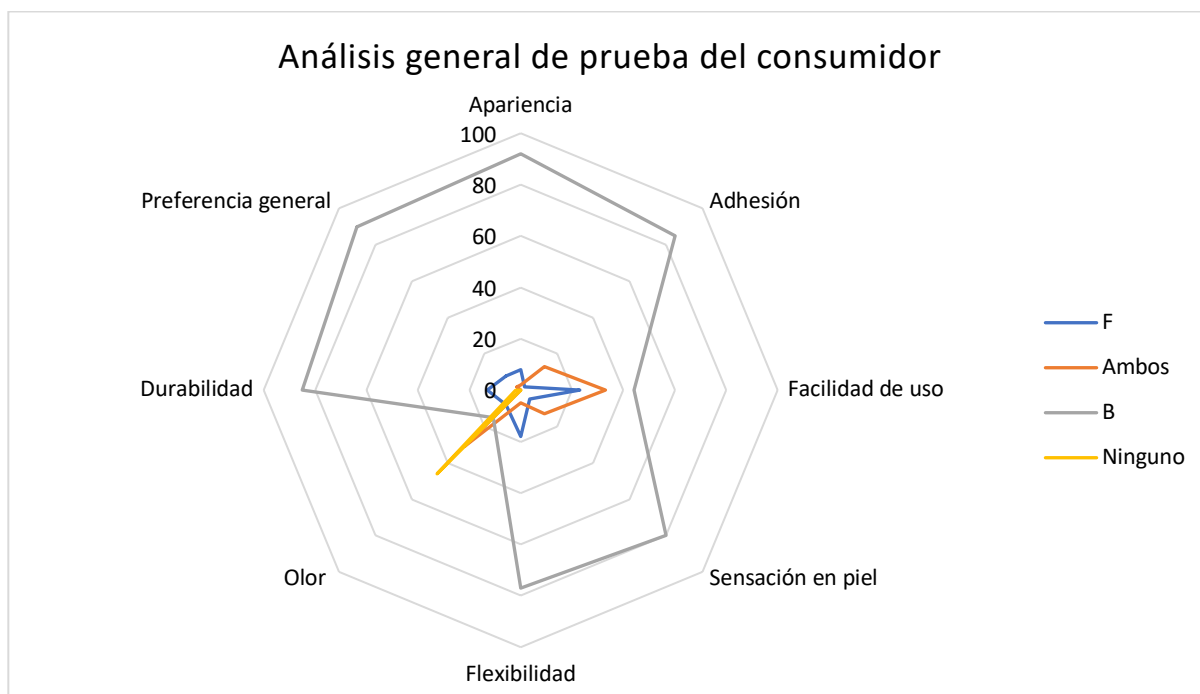


Figura 2. Análisis general de prueba de consumidor con preferencia al apósito FB.

Tabla 2. Comparativa entre prototipos y apósitos del mercado.

Comparativa entre prototipo B, TEGADERM Y VOLATEREN					
Material/formulación	PVA (g/msMPa)	FT (MPa)	E (%)	Solubilidad	Hinchamiento
Apósito F	13.12±0.2 ^A	1.16±0.1 ^C	10±1.4 ^C	90.96±0.9 ^A	722.7±48 ^B
Apósito B	4.50±0.34 ^C	4.29±0.14 ^B	30.7±0.6 ^C	81.87±0.8 ^B	789.73±11.7 ^A
TEGADERM	0.07±0.01 ^D	16.57±0.5 ^A	920±30 ^A	1.11±0.07 ^C	26.86±0.2 ^C
VOLTAREN	9.51±1.22 ^B	4.62±0.3 ^B	168.7±6.2 ^B	0.9±0.07 ^C	23.8±0.9 ^C

Los estudios de estabilidad acelerada (Tabla 3 y 4) revelaron una reducción significativa de la vida útil de los apósitos al incrementar la temperatura, en concordancia con el comportamiento descrito para sistemas poliméricos sensibles a la humedad y temperatura (Mendes *et al.*, 2021). El prototipo FE mostró la mayor vida útil extrapolada a 25 °C en permeabilidad al vapor de agua (PVA) (260.7 días), superando ampliamente a los demás prototipos, lo cual puede atribuirse a su alta reticulación y menor susceptibilidad a la hidrólisis, similar a lo reportado en películas de celulosa bacteriana con agentes entrecruzantes (Almeida *et al.*, 2020).

En resistencia a la tensión (TS), el prototipo FD presentó la mayor vida útil (189.3 días), indicando una matriz más estable mecánicamente, comparable a lo observado en apósitos de quitosano reforzados con nanopartículas, donde se reporta vida útil superior a 150 días bajo condiciones simuladas (Fang *et al.*, 2022). Sin embargo, el prototipo FE mostró menor estabilidad en TS (17.0 días), posiblemente debido a su mayor permeabilidad inicial que compromete la integridad estructural a largo plazo. Respecto a la elongación, el prototipo FE presentó la mayor vida útil (82.5 días), reflejando su alta flexibilidad y resistencia a deformaciones, similar a lo descrito en sistemas compuestos con colágeno y elastina. El prototipo FB mostró la menor estabilidad en elongación (28.2 días), lo que podría limitar su aplicación en zonas corporales sometidas a movimientos frecuentes.

En el análisis antimicrobiano, los apósitos cargados con ciprofloxacino presentaron vidas útiles significativamente superiores a los de cefatoxima, lo cual coincide con estudios que destacan la mayor estabilidad térmica y actividad prolongada de

fluoroquinolonas frente a cefalosporinas (Li *et al.*, 2021). Destacó el prototipo B, con una vida útil extrapolada de 2502 días para ciprofloxacino, frente a 150.9 días para cefatoxima, mientras que el prototipo FD también mostró resultados destacados (1340.6 días con ciprofloxacino). Estas diferencias pueden atribuirse a la interacción entre el antibiótico y la matriz polimérica, así como a la posible formación de enlaces secundarios que retardan la degradación del principio activo, tal como se ha descrito en apósitos de celulosa bacteriana funcionalizados.

Las diferencias observadas en la estabilidad de los antibióticos se explican por las fuertes interacciones fármaco–matriz. Por ejemplo, Sczesny *et al.* (2024) muestran que las fluoroquinolonas (como ciprofloxacino) cargadas positivamente pueden establecer interacciones iónicas y puentes de hidrógeno con la matriz (p.ej. galoilatos de taninos), las cuales son más fuertes que simples puentes de hidrógeno y resultan en cinéticas de liberación mucho más lentas del antibiótico. De forma análoga, Zorilă *et al.* (2025) encontraron que la incorporación de celulosa bacteriana en hidrogeles aumenta el área de superficie y los grupos –OH disponibles, reforzando los enlaces de hidrógeno con el ciprofloxacino. Esto se tradujo en una mayor carga de antibiótico en la matriz y una liberación retardada del fármaco.

Los valores de R^2 (≥ 0.70) confirman la validez del modelo cinético aplicado, alineándose con otros trabajos que han usado la ecuación de Arrhenius para estimar la vida útil de biomateriales (García *et al.*, 2022).

Tabla 3. Análisis de estabilidad acelerada de las propiedades mecánicas de los prototipos.

Prototipo	°C	PVA			TS			Elongación		
		Vida útil*	R ²	^a Vida útil a 25°	Vida útil*	R ²	^a Vida útil a 25°	Vida útil*	R ²	^a Vida útil a 25°
B	20	45.51	0.93	46.291	39.98	0.89	45.00	56.16	0.91	28.24
	40	42.02	0.93		44.11	0.77		4.16	0.97	
	60	10.71	0.9		2.00	0.9		0.48	0.9	
C	20	37.93	0.83	37.462	51.17	0.87	49.87	54.95	0.88	51.76
	40	29.07	0.86		36.49	0.94		34.52	0.98	
	60	3.20	0.81		3.11	0.87		2.76	0.77	
D	20	39.29	0.78	41.967	179.89	0.85	189.34	38.57	0.88	39.44
	40	38.38	0.78		146.66	0.74		32.48	0.94	
	60	3.20	0.81		3.34	0.78		2.80	0.8	
E	20	291.47	0.76	260.689	16.84	0.89	17.04	92.47	0.78	82.46
	40	184.21	0.77		16.24	0.95		59.19	0.91	
	60	90.65	0.82		7.68	0.793		36.84	0.86	
F	20	61.24	0.77	50.570	56.57	0.92	55.59	71.51	0.78	69.75
	40	45.87	0.9		45.06	0.86		62.91	0.7	
	60	41.87	0.7		8.82	0.81		41.62	0.9	

*Datos que expresan la vida útil en días de los apósitos según la temperatura considerando llegar a un 10% de la funcionalidad de la propiedad estudiada. R² expresa el ajuste del modelo. ^a Datos que expresan la vida útil en días de los apósitos considerando un modelo de ajuste con la ecuación de Arrhenius con todas las temperaturas y tomando en cuenta llegar a un 10% de la funcionalidad de la propiedad estudiada.

Tabla 4. Análisis de estabilidad acelerada de las propiedades antimicrobianas de los prototipos.

Prototipo	Cefatoxima			Ciprofloxacino			
	°C	Vida útil*	R ²	^a Vida útil a 25°	Vida útil*	R ²	^a Vida útil a 25°
B	20	270.89	0.76	150.93	2878.23	0.82	2502.23
	40	28.11	0.85		1771.22	0.95	
	60	2.57	0.82		1771.22	0.95	
C	20	170.56	0.88	110.33	548.23	0.8	525.34
	40	29.33	0.67		469.92	0.7	
	60	2.56	0.82		442.80	0.75	
D	20	104.19	0.82	74.44	1644.70	0.75	1340.62
	40	27.98	0.83		793.99	0.85	
	60	6.51	0.9		657.88	0.7	
E	20	92.85	0.96	83.68	639.61	0.82	599.07
	40	62.91	0.9		500.56	0.98	
	60	47.38	0.76		418.65	0.78	
F	20	173.13	0.87	111.45	959.41	0.98	817.95
	40	29.33	0.77		535.48	0.8	
	60	2.56	0.84		397.00	0.86	

*Datos que expresan la vida útil en días de los apósitos según la temperatura considerando llegar a un 10% de la funcionalidad de la propiedad estudiada. R² expresa el ajuste del modelo. ^a Datos que expresan la vida útil en días de los apósitos considerando un modelo de ajuste con la ecuación de Arrhenius con todas las temperaturas y tomando en cuenta llegar a un 10% de la funcionalidad de la propiedad estudiada

Conclusión

En resumen, este estudio ha mostrado que las preferencias del consumidor por apósitos funcionales están fuertemente influenciadas por la comodidad, facilidad de uso y estética del producto. Los resultados indican que los consumidores prefieren apósitos delgados y transparentes, ya que proporcionan una mayor discreción y confort durante su uso diario. Además, los análisis de estabilidad acelerada han demostrado que las condiciones de temperatura y humedad tienen un impacto directo en la vida útil de los apósitos, y que la celulosa bacteriana presenta propiedades favorables en términos de biocompatibilidad y durabilidad. Estos hallazgos son esenciales para el diseño y la optimización de productos que no solo sean funcionales, sino que también satisfagan las expectativas de los consumidores y mantengan su efectividad a lo largo del tiempo.

Literatura citada

- Almeida, I. F., E. Pereira, P. Silva y P. Costa. 2020. **Development of bacterial cellulose membranes as active wound dressings: stability and mechanical behavior.** International Journal of Biological Macromolecules 165: 1695–1705.
- ASTM. (2021). **Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems for Medical Devices** (ASTM F1980-21). <https://www.astm.org/f1980-21.html>
- Bajaj, S., D. Singla y N. Sakhuja. 2012. **Stability Testing of Pharmaceutical Products.** Journal of Applied Pharmaceutical Science 2: 129–138.
- Fang, Y., X. Wang, Y. Zhu y Y. Zhao. 2022. **Chitosan-based composite hydrogel dressings with enhanced mechanical properties and antibacterial activity.** Carbohydrate Polymers 275: 118696.
- FDA. (1991). **Shelf life of medical devices.** U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/media/72487/download>
- Hargis, A., M. Yaghi, N. Maskan y B. Amit. 2024. **Foam Dressings for Wound Healing Introduction : Wound Healing and the Role.** Current Dermatology Reports 28–35.
- Huang, Y., C. Zhu, J. Yang, Y. Nie, C. Chen y D. Sun. 2014. **Recent advances in bacterial cellulose.** Cellulose 21.
- International Organization for Standardization. (2005). **Sensory analysis — Methodology — Paired comparison test** (ISO 5495:2005). ISO. <https://www.iso.org/standard/31621.html>
- International Organization for Standardization. (2017). **Sensory analysis — Methodology — General guidance** (ISO 6658:2017). ISO. <https://www.iso.org/standard/65519.html>
- Kim, A.-N., O. W. Kim y H. Kim. 2022. **Degradation kinetics of physicochemical and sensory properties of rice during storage at different temperatures.** Food Science and Technology 164: 113688.
- Li, H., Y. Luo y J. Xiao. 2021. **Stability and antibacterial performance of antibiotic-loaded nanofiber dressings under different storage conditions.** Materials Science and Engineering 124: 112065.

- Liu, X., L. N. Nielsen, S. N. Kłodzińska, H. M. Nielsen, H. Qu, L. P. Christensen, J. Rantanen y M. Yang. 2018. **Ciprofloxacin-loaded sodium alginate/poly (lactic-co-glycolic acid) electrospun fibrous mats for wound healing**. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik 123: 42–49.
- Liu, X., Y. Liu, J. Du, X. Li, J. Yu y B. Ding. 2021. **Breathable, stretchable and adhesive nanofibrous hydrogels as wound dressing materials**. Engineered Regeneration 2: 63–69.
- Mendes, M. A., R. M. Guedes y A. M. Pinto. 2021. **Accelerated aging and long-term prediction of polymeric biomaterials for medical devices**. Polymer Degradation and Stability 186: 109514.
- Morris, C., P. Emsley, E. Marland, F. Meuleneire y R. White. 2009. **Use of wound dressings with soft silicone adhesive technology**. Paediatric nursing 21(3): 38–43.
- Ousey, K., M. G. Rippon, A. A. Rogers y J. P. Totty. 2023. **Considerations for an ideal post-surgical wound dressing aligned with antimicrobial stewardship objectives: a scoping review**. Journal of Wound Care 32(6): 334–347.
- Portela, R., C. R. Leal, P. L. Almeida y R. G. Sobral. 2019. **Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications**. Microbial Biotechnology 12(4): 586–610.
- Rosadi, B., T. Lawanto, A. Paula y Jupri. 2023. **Satisfactory level of Hiperskin TR® transparent film dressings in post-operative patient: a primary hospital Indonesia experience at Tebet District general hospital**. International Surgery Journal 10(10): 1577–1580.
- Sczesny N.F., H. J. Wiggers, C. Z. Bueno, P. Chevallier, F. Copes, D. Mantovani . 2024. **From Burst to Sustained Release: The Effect of Antibiotic Structure Incorporated into Chitosan-Based Films**. Antibiotics 6;13(11):1055.
- Wounds International. (2016). **Suitability of a transparent absorbent dressing to support surgical site infection surveillance**. Wounds International. <https://woundsinternational.com/journal-articles/suitability-of-a-transparent-absorbent-dressing-to-support-surgical-site-infection-surveillance/>

- Zavala Arredondo, M., J. C. Castañeda Ramírez, M. Rivera Arredondo y N. M. De la Fuente Salcido. 2018. **Evaluación de propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosano**. Jóvenes en la Ciencia 4: 27–31.
- Zorila, F. L., G. Toader, M. Alexandru, E. Rusen, A. Mocanu, G. Isopencu y A. Diacon. 2025. **Bio-inspired bacterial cellulose-based hydrogel films for controlled ciprofloxacin release**. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications 10: 100796.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Se ha explorado la viabilidad de la celulosa bacteriana obtenida de Kombucha como una alternativa sostenible a los apósitos sintéticos, evaluando sus propiedades físico-químicas, mecánicas y su capacidad para actuar como vehículo de liberación tópica de antibióticos. Los resultados obtenidos a lo largo de los diferentes capítulos proporcionan evidencia clara de su potencial en aplicaciones biomédicas, al mismo tiempo que destacan algunas áreas de mejora y consideraciones para su implementación práctica.

El proceso de optimización de la fermentación de Kombucha, utilizando la metodología de superficie de respuesta, permitió obtener un rendimiento sobresaliente de celulosa bacteriana (CB), alcanzando 2,94 g/L. Este rendimiento supera los reportados en estudios previos, lo que confirma la viabilidad del proceso de fermentación de Kombucha como una alternativa eficiente y económica. El control de parámetros como el volumen de té inicial, la concentración de glucosa y la temperatura mostró una correlación directa con las propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana, destacándose la resistencia a la tracción de 4 MPa y una capacidad de hinchamiento de 400%. Estos resultados son prometedores, pero es necesario señalar que la optimización del proceso a gran escala podría requerir ajustes adicionales en términos de consistencia y control de la calidad, especialmente cuando se pretende transferir el proceso a una producción industrial.

El análisis microbiológico y cromatográfico del proceso fermentativo reveló que el consorcio microbiano del SCOBY es preferencial para la producción de celulosa bacteriana. Esta sinergia microbiana garantiza un producto de alta calidad, sin la necesidad de sistemas de biorreactores costosos y controlados, lo que resalta la ventaja económica y ambiental de utilizar Kombucha como fuente de celulosa. Además, el uso de subproductos agroindustriales, como el té y el azúcar, refuerza el carácter sostenible de este proceso.

En cuanto al desarrollo y la funcionalización de los apósitos, los resultados de liberación de antibióticos (ciprofloxacino y cefatoxima) y la reducción significativa de la carga bacteriana en los modelos de prueba biomédica resaltan el potencial de la celulosa bacteriana como vehículo efectivo para la administración tópica de fármacos. Las pruebas de estabilidad acelerada confirmaron que los apósitos mantenían sus

propiedades estructurales y funcionales en condiciones altas de temperatura y humedad, lo que valida su viabilidad para aplicaciones clínicas. Sin embargo, se sugiere que se realicen pruebas más extensivas en condiciones clínicas reales para evaluar la efectividad a largo plazo del material.

Un hallazgo relevante de la investigación fue el análisis de la preferencia del consumidor, que reveló que los apósitos de celulosa bacteriana transparentes fueron preferidos por los usuarios en comparación con otros prototipos, debido a su mayor confort, flexibilidad y adaptabilidad a la piel. Este resultado no solo sugiere una alta aceptabilidad del producto, sino que también abre posibilidades para la adopción comercial de los apósitos en el mercado.

Finalmente, el proceso de producción de celulosa bacteriana a partir de Kombucha, que no requiere equipos costosos ni condiciones especiales de fermentación, se presenta como una solución económica y escalable frente a los métodos tradicionales de producción de biopolímeros. El uso de ingredientes sencillos y el aprovechamiento de subproductos agroindustriales brindan una ventaja considerable en términos de sostenibilidad y costos de producción, lo que favorece la viabilidad económica del proceso.

VIII. PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

A pesar de los resultados positivos, esta investigación presenta algunas limitaciones, aunque las pruebas de estabilidad acelerada fueron satisfactorias, se necesita evaluar la estabilidad de los apósitos en condiciones clínicas reales, como la exposición a fluidos biológicos y al uso prolongado. La muestra utilizada para evaluar la preferencia del consumidor también fue limitada, por lo que sería necesario ampliar esta evaluación para obtener resultados más representativos.

En cuanto a las perspectivas, se podrían explorar nuevas modificaciones de los apósitos para incluir otros agentes antimicrobianos, mejorando aún más su efectividad. Además, la optimización del proceso de fermentación a nivel industrial, mediante el uso de bioreactores o la integración de tecnologías avanzadas, podría mejorar la eficiencia de la producción y reducir costos. Con la mejora de estos aspectos, la celulosa bacteriana derivada de Kombucha tiene el potencial de convertirse en un material biomédico ampliamente utilizado, con aplicaciones no solo en el ámbito médico, sino también en otras industrias.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Cacicedo, M. L., M. C. Castro, I. Servetas, L. Bosnea, K. Boura, E. Tsouko y A. Koutinas. 2020. **Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: Preparation and characterization studies**. International Journal of Biological Macromolecules 147: 1136-1145.

Carayon, I., P. Szarlej, P. Gnatowski, E. Piłat, M. Sienkiewicz, M. Glinka y J. Kucińska-Lipka. 2022. **Polyurethane based hybrid ciprofloxacin-releasing wound dressings designed for skin engineering purpose**. Advances in Medical Sciences 67(2): 269–282.

Carreño, L. D. y L. A. Caicedo. 2022. **Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión**. Ingeniería y Ciencia 18(35): 1-24.

Contardi, M., J. A. Heredia-Guerrero, G. Perotto, P. Valentini, P. P. Pompa, R. Spanò, L. Goldoni, R. Bertorelli, A. Athanassiou y I. S. Bayer. 2017. **Transparent ciprofloxacin-povidone antibiotic films and nanofiber mats as potential skin and wound care dressings**. European Journal of Pharmaceutical 104: 133–144.

Ding, Y., Z. Song y J. Li. 2021. **Recent progress in bacterial cellulose as a biocompatible material for biomedical applications**. Biotechnology Advances 50; 107789.

Gagliardi, T. R., A. D. F. Nascimento y G. A. Valencia. 2025. **Kombucha bacterial cellulose: A promising biopolymer for advanced food and nonfood applications**. Foods 14(5): 738.

García, P. et al. 2021. **Coste-efectividad de la terapia avanzada con productos de cura en ambiente húmedo comparada con terapia tradicional en el tratamiento de úlceras por presión**. Helcos 26(3):12345.

Health Care Without Harm Europe. (2019). *Hacia un cuidado de la salud sin sustancias tóxicas*. Recuperado de https://noharm.org/sites/default/files/documents-files/6733/2021-04-08_HCWH_Non_Toxic_Healthcare_ES_WEB.pdf

Jang, H. C., S. M. Choi, H. K. Kim, S. E. Kim, S. J. Kang, K. H. Park, P. Y. Ryu, T. H. Lee, Y. R. Kim, J. H. Rhee, S. I. Jung y H. E. Choy. 2014. **In vivo efficacy of the**

combination of ciprofloxacin and cefotaxime against *Vibrio vulnificus* sepsis. *Plos one* 9(6): 101118.

Jiang, L. y S. C. J. Loo. 2021. **Intelligent Nanoparticle-Based Dressings for Bacterial Wound Infections.** *ACS Applied Bio materials* 4(5): 3849–3862.

Ju, T., S. Gaisford y G. R. Williams. 2024. **Ciprofloxacin-loaded electrospun nanofibres for antibacterial wound dressings.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 91: 105264.

Ju, T., S. Gaisford y G. R. Williams. 2024. **Ciprofloxacin-loaded electrospun nanofibres for antibacterial wound dressings.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 91: 105264.

Landis, A. E. y B. E. Wolfe. 2022. **Microbial diversity and interaction specificity in kombucha tea fermentations.** *mSystems* 7(3): 00157-22.

Liu, B. y K. Chen. 2024. **Advances in Hydrogel-Based Drug Delivery Systems.** *Gels* 10(4): 262.

Martínez-Correa, E., M. A. Osorio-Delgado, L. J. Henao-Tamayo y C. I. Castro-Herazo. 2020. **Clasificación Sistemática de Apósitos: Una Revisión Bibliográfica.** *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 41(1): 5-28.

Martirani-VonAbercron, S. M. y D. Pacheco-Sánchez. 2023. **Bacterial cellulose: A highly versatile nanomaterial.** *Microbial Biotechnology* 16(6): 1174–1178.

May, A., S. Narayanan, J. Alcock, A. Varsani, C. Maley y C. Aktipis. 2019. **Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem.** *PeerJ* 7: 7565.

Moradifar, F., N. Sepahdoost, P. Tavakoli y A. Mirzapoor. 2025. **Multi-functional dressings for recovery and screenable treatment of wounds: A review.** *Heliyon* 11(1): 41465.

Moreno-Díaz, C., S. González-Arranz y C. Martínez-Cerezo. 2024. **Bacterial cellulose production within a circular economy framework: Utilizing organic waste.** *Polymers* 16(19): 2735.

Nashwan, A. J., H. H. Shah, T. Hussain, S. A. Rauf y S. K. Ahmed. 2024. **Environmental Drivers of Antimicrobial Resistance in Low and Middle-Income**

Countries: The Impacts of a Changing World. Environmental Health Insights 18: 11786302241246420.

Okoye, E. I. y T. A. Okolie. 2025. **Development and in vitro characterization of ciprofloxacin loaded polymeric films for wound dressing.** International Journal of Health & Allied Sciences 14(1): 45-53.

Orlando, I., P. Basnett, R. Nigmatullin, W. Wang, J. C. Knowles y I Roy. 2020. **Chemical Modification of Bacterial Cellulose for the Development of an Antibacterial Wound Dressing.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8: 1–19.

Pasaribu, K. M., S. Gea, S. Ilyas, T. Tamrin y I. Radecka. 2020. **Characterization of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing in Different Order Impregnation of Chitosan and Collagen.** Biomolecules 10(11): 1511.

Portela, R., C. R. Leal, P. L. Almeida y R. G. Sobral. 2019. **Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications.** Microbial Biotechnology 12(4): 586–610.

Revin, V. V., E. V. Liyaskina, M. V. Parchaykina, T. P. Kuzmenko, I. Kurgaeva, V. D. Revin y M. W. Ullah. 2022. **Bacterial Cellulose-Based Polymer Nanocomposites: A Review.** Polymers 14(21): 4670.

Roy, D. C., S. Tomblyn, D. M. Burmeister, N. L. Wrice, S. C. Becerra, L. R. Burnett, J. M. Saul y R. J. Christy. 2015. **Ciprofloxacin-Loaded Keratin Hydrogels Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Support Healing in a Porcine Full-Thickness Excisional Wound.** Advances in Wound Care 4(8): 457–468.

Sabatini, F., E. Maresca, M. Aulitto, V. Termopoli, A. De Risi, M. Correggia y P. Contursi. 2025. **Exploiting agri-food residues for kombucha tea and bacterial cellulose production.** International Journal of Biological Macromolecules 302: 140293.

Selvaraj, A. y P. Gurumurthy. 2024. **Optimizing bacterial cellulose production from kombucha tea.** Fermentation Science & Technology 5(1), 1-10.

Shah, J., D. Patel, D. Rananavare, D. Hudson, M. Tran, R. Schloss, N. Langrana, F. Berthiaume, y S. Kumar. 2025. **Recent Advancements in Chitosan-Based Biomaterials for Wound Healing.** Journal of Functional Biomaterials 16(2): 45.
<https://doi.org/10.3390/jfb16020045>

Solanki, G. y R. Solanki. 2012. **Alginate dressings: An overview**. International Journal of Biomedical Research 3.

Vowden, K. y P. Vowden. 2017. **Wound dressings: Principles and practice**. Surgery 35.

Winter G. D. 1962. **Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig**. Nature 193: 293–294.

Yarahmadi, A., B. Dousti, M. Karami-Khorramabadi y H. Afkhami. 2024. **Materials based on biodegradable polymers chitosan/gelatin: a review of potential applications**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 12: 1–22.

Wang, B., K. Rutherford-Markwick, X. X. Zhang y A. N. Mutukumira. 2022. **Kombucha: Production and Microbiological Research**. Foods 11(21): 3456.

Zakaria, A. S., S. A. Afifi y K. A. Elkhodairy. 2016. **Newly Developed Topical Cefotaxime Sodium Hydrogels: Antibacterial Activity and In Vivo Evaluation**. BioMed research international 2016: 6525163.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponde,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Elaboración y caracterización de un opósito de celubosa bacteriana como sistema de administración tópica de antibióticos	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Rafael Contreras Chavez	Rafael.contreras@umich.mx
Director	Ma. Guadalupe Garnica Romo	Guadalupe.garnica@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	Rodolfo Pérez Rodríguez	doc.ciencias.biologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (si/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	Si	Mejora en la redacción

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	Sí	Verificación del Inglés en Abstract
Revisión y corrección de estilo	Sí	Corrección estilo científico
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	Ninguno	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán a 7/Enero/2026

Rafael Contreras Chávez

Elaboración y caracterización de un apósito de celulosa bacteriana como sistema de administración tópica de antibiót...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:544759460

Fecha de entrega

8 ene 2026, 7:37 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

8 ene 2026, 7:50 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

Elaboración y caracterización de un apósito de celulosa bacteriana como sistema de administraci....pdf

Tamaño del archivo

26.9 MB

127 páginas

34.185 palabras

192.639 caracteres

15% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 14%  Fuentes de Internet
- 11%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión



Caracteres reemplazados

61 caracteres sospechosos en N.º de páginas

Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.