

# Efecto antimicrobiano de extractos obtenidos de residuos agroindustriales en un microorganismo aislado del tomate de árbol.

Alejandra Mesa González<sup>a</sup>, Marcela Orozco del Corral 2<sup>a</sup>

Luz Deisy Marín Palacio<sup>b</sup>, Yasmin E. Lopera Pérez<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia

<sup>b</sup> Profesora, Co-asesora del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

<sup>c</sup> Profesora, Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

---

## Resumen

El tomate de árbol es un fruto originario de América del sur, de gran producción en Colombia, especialmente en el departamento de Antioquia. Su producción, como la de la mayoría de los productos agrícolas, se ve afectada por el surgimiento de enfermedades causadas por microorganismos, generando pérdidas significativas en la producción. Los extractos naturales con actividad antimicrobiana son considerados una alternativa para controlar el surgimiento de dichas enfermedades. En este trabajo se tuvo como propósito la identificación de un microorganismo aislado del tomate de árbol enfermo y la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre este de extractos obtenidos de menta, orégano, semillas de papaya y cáscara de naranja. Los extractos se obtuvieron; usando hidrodestilación y el método de extracción Soxhlet. Por el primer método sólo se pudo extraer la fase oleosa de la cáscara de naranja; para el resto de los materiales se obtuvieron extractos acuosos. Mientras que por Soxhlet se recuperó la fase oleosa de la menta, orégano y semillas de papaya. El microorganismo que se logró aislar se identificó en la empresa AOXLAB como *Colletotrichum acutatum* y se evaluó la capacidad mínima inhibitoria de los extractos obtenidos sobre este. Esto permitió determinar que el extracto oleoso de las semillas de papaya fue el único capaz de inhibir al hongo con una concentración de 1250 mg/L. El extracto oleoso de papaya fue posteriormente nanoencapsulado en niosomas con el fin de comparar su potencial antimicrobiano encapsulado y sin encapsular. Este ensayo permitió encontrar que el proceso de encapsulación hace que la concentración de mínima inhibición requerida disminuya a 78.13 mg/L.

## 1. Introducción

El tomate de árbol (*Solanum Betaceum*) es un fruto cultivado en zonas tropicales de varios países de América del sur, siendo Ecuador y Colombia los mayores productores de este. En 2013 Colombia produjo 161.748 toneladas, siendo Antioquia el principal departamento productor con el 29, 2% del área total sembrada de tomate de árbol en el país. El cultivo de este fruto, como el de muchos productos agrícolas, se ve afectado por el surgimiento de plagas y enfermedades causadas por microorganismos, las cuales son detectadas generalmente por síntomas como pudriciones, manchas y deformaciones. La antracnosis, el moho blanco y la Botritis son ejemplos claros de las enfermedades que más afectan al tomate de árbol, esta primera se origina frecuentemente de hongos de la especie *Collectotrichum* y es una de las principales causantes de grandes pérdidas de producción en Colombia. La aplicación de productos químicos y biológicos como el caldo bordelés, el polisulfuro de calcio, el yodo, cobre, *Bacillus subtilis*, especies de *Pseudomonas*, extractos vegetales, entre otros, son las medidas de control que hoy en día se usan para mitigar los daños en los cultivos causados por la antracnosis [1]. Sin

embargo, es necesario plantear una mejor solución a la problemática dada por las grandes pérdidas de tomate de árbol a causa de las enfermedades anteriormente mencionadas.

Los aceites esenciales (AE) son conocidos por su potencial antiséptico, muchos de estos son usados como bactericidas, viricidas, fungicidas y son muy utilizados en la conservación de alimentos. Cada vez son más los estudios que se realizan sobre sus mecanismos de acción, particularmente a nivel antimicrobiano [2]. En la literatura científica se han publicado diferentes estudios que mencionan el uso de aceites esenciales como inhibidores antimicrobianos, por ejemplo, los estudios realizados por [3] revelaron efectos antifúngicos de los AE de tomillo, corteza de canela y brotes de clavo; *in vitro* sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum*, la germinación de conidios y la formación de apresorios e *in vivo* sobre la incidencia de la enfermedad del fruto de la fresa, sugiriendo que los compuestos volátiles de los AE de la corteza de tomillo y canela son eficaces contra *C. acutatum* tanto *in vitro* como *in vivo*. En otro estudio realizado por [4] se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de extractos obtenidos de la manzanilla, chamico, marco, lavanda y ortiga contra *C. acutatum*, aislado del tomate de árbol; los mejores resultados en los parámetros medidos se lograron con el extracto de lavanda obtenido por arrastre de vapor. Sin embargo, cabe mencionar que todas las especies vegetales utilizadas presentaron actividad antifúngica contra *C. acutatum*. Varias investigaciones se han enfocado en caracterizar los extractos producidos a partir de estas plantas con el fin de identificar qué compuesto activo es el responsable de su potencial antimicrobiano, muchos de los extractos que muestran tener una alta actividad antioxidante, muestran a su vez un alto potencial de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. De igual manera, se ha establecido una posible relación entre el contenido de fenoles totales con estas propiedades inhibitorias [5]. Tanto el extracto de la menta como el del orégano han mostrado tener un alto contenido de fenoles y a su vez se ha hallado actividad antimicrobiana sobre diferentes especies de hongos y bacterias [6], [7], por lo que estos extractos pueden tener resultados interesantes sobre los microorganismos que afectan al tomate de árbol. Adicional a eso hay otros materiales vegetales provenientes de desechos agroindustriales que pueden ser aprovechados para esta aplicación. La extracción ecológica de aceites esenciales, pectina y polifenoles de varios de estos residuos se ha descrito en los últimos años, prestando especial atención a los residuos de cítricos. La industria de procesamiento de jugos es un buen caso de estudio, este sector genera el 50% de los residuos de la fruta total / material de partida (por ejemplo, cáscara, bagazo y semillas). Alrededor de 20 millones de toneladas de cáscaras de naranja por año se producen en todo el mundo [8]. Últimamente, se han realizado varios estudios sobre la eficacia antifúngica del AE de cáscara de naranja, obteniendo resultados positivos para la inhibición del hongo *Aspergillus flavus* [9] y para otras especies de bacterias y levaduras [10]. Otro residuo agroindustrial que ha mostrado tener actividad antimicrobiana, son las semillas de papaya; se ha reportado que tanto su extracto acuoso como el metanólico son efectivos para inhibir patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Salmonella typhi* [11]. A pesar de los resultados prometedores de muchos aceites esenciales, su aplicación industrial no es tan viable por factores como: baja solubilidad en agua, biodisponibilidad y estabilidad. Sin embargo, se ha demostrado que técnicas como la nanoencapsulación pueden solucionar este problema, ayudando a mejorar estas características en el extracto [12]. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar un microorganismo presente en el tomate de árbol enfermo, con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano de extractos vegetales obtenidos a partir de residuos agroindustriales como lo son el orégano, la menta, las semillas de papaya y la cáscara de naranja, para adicionalmente nanoencapsular el extracto con mayor potencial antimicrobiano, buscando mejorar su efectividad.

## 2. Materiales y métodos

**Aislamiento del microorganismo.** Se colectaron hojas y tomates de árbol contaminados de una plantación ubicada en el municipio de Entrerrios, Antioquia (coordenadas 6.5936199, -75.5221247, vereda Tesorero). Los frutos recolectados fueron llevados al laboratorio de microbiología de AOXLAB y se obtuvieron los tejidos usando un bisturí estéril, cortando fragmentos de tejido infectado y sano aproximadamente de 5x5 mm. Estos fragmentos se sumergieron durante 1 minuto en hipoclorito de sodio a una concentración de 0.525% con el fin de eliminar la flora normal presente en el tejido. Los fragmentos de tejido se sembraron en medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA) con ácido láctico, colocando cinco fragmentos de tejido en posición equidistante en la placa de agar a través de maniobra con pinzas. Las placas de agar sembradas se incubaron a temperatura ambiente

(25±2°C), posteriormente cada uno de los aislamientos obtenidos fue resembrado en placas de PDA por separado con el fin de purificar el hongo. Se realizaron observaciones microscópicas en los objetivos de 10 y 40X, para tal fin los montajes se colorearon con azul de lactofenol, con el fin de verificar la naturaleza del patógeno y observar la morfología de los conidios, el micelio, entre otras estructuras propias de los microorganismos [13]. La verificación de la naturaleza del hongo se realizó con base en la clave para la identificación de hongos imperfectos de Barnett [14].

**Caracterización del aislamiento.** Se realizaron microcultivos con el fin de conocer las principales características taxonómicas de los microorganismos aislados en los diferentes tejidos, y de esta forma, determinar el género y lograr su aproximación a la especie, que incluye la observación macroscópica y microscópica de las colonias de los nuevos aislamientos obtenidos en las pruebas de patogenicidad. En la descripción macroscópica se tuvieron en cuenta aspectos como el color, forma, elevación, borde, apariencia, densidad de las colonias, y el tipo de micelio. Este se determinó mediante la observación directa, teniendo en cuenta los siguientes criterios: micelio algodonoso, esponjoso, veloso, si el crecimiento del micelio se extiende por la superficie del agar, si penetra por el medio, y la presencia de micelio aéreo [15]. Estas clasificaciones fueron útiles para describir morfológicamente el microorganismo. La descripción microscópica, se basó especialmente en la forma y tamaño de los conidios, la aparición de estados asexuales o sexuales, así como también la formación de otras estructuras taxonómicas, que permiten su ubicación dentro de un género y especie.

**Identificación molecular.** Se utilizó PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para confirmar la identificación de la especie de los aislados. Se realizó la extracción de ADN de los hongos patógenos mediante la técnica descrita por [15]. La región ITS-5.8S-ITS2 del ADNr fue amplificada mediante los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')[16]. Las amplificaciones por PCR se realizaron a través de un termociclador en tiempo real [17] con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s y una extensión del iniciador a 72 °C por 2 min. Con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA-Aldrich®), las cuales se tiñeron con bromuro de etidio (0.2 µg mL<sup>-1</sup>). Las secuencias de ADN fueron alineadas en Basic Local Alingment Search Tool (NCBI BLAST) de la base de datos en línea NCBI [18].

**Obtención de extractos.** Para esta investigación se implementaron dos métodos de obtención de extractos. Primero se realizó una extracción de menta, orégano, cáscara de naranja y semillas de papaya mediante hidrodestilación por un periodo de una hora y media. Previamente, el material vegetal fue secado en un horno a 72°C por 24 h. Cada residuo agroindustrial seco se licuó con 3L de agua y la mezcla final fue adicionada al balón de la hidrodestilación. Se utilizaron 593 g de cáscara de naranja, 29.46 g de menta, 46.53 g de orégano y 375.2 g de semillas de papaya. Este proceso, se realizó dos veces y los destilados obtenidos de cada extracto se almacenaron en frascos ámbar de vidrio a 4°C±2, en un mismo frasco se almacenaron ambos destilados por extracto. Dado que con este proceso sólo se logró recuperar la fase oleosa de la cáscara de naranja, se hizo una segunda extracción para las demás materias vegetales utilizando un aparato de extracción automático tipo Soxhlet (SOX500 Hannon). Para este procedimiento se pesaron en un dedal ~6 g de material vegetal, previamente seco y se pusieron en el equipo, utilizando benzina de petróleo como solvente. Las muestras fueron sometidas a reflujo por un tiempo de 4 horas a 148°C±2 y, una vez alcanzado este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó el solvente restante mediante secado en estufa a 105±2°C. Los aceites obtenidos se guardaron en pequeños viales de rosca y fueron mantenidos en congelación (-20°C±2) para evitar su degradación antes de la realización de los diferentes ensayos.

A los extractos oleosos obtenidos se les encontró el rendimiento como se observa en la Ecuación 1:

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{g extracto oleoso obtenido}}{\text{g material vegetal}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

**Caracterización cualitativa de los extractos obtenidos.** Con el fin de identificar en cuales de los extractos obtenidos por hidrodestilación había presencia de fenoles y/o de terpenos se aplicaron técnicas colorimétricas [19]. Para evaluar la presencia de fenoles se realizó la prueba de Cloruro férrico, primero añadiendo acetato de sodio a la muestra para neutralizarla y posteriormente agregando tres gotas de una solución de tricloruro férrico

al 5% en solución salina. La coloración que tomó la muestra permitió determinar la presencia de fenoles: los colores rojo, verde y azul indicaban resultados positivos. Para evaluar la presencia de terpenos se hizo una prueba de Liebermann Buchart. En esta se adicionó 1 mL de anhídrido acético a la muestra y tres gotas de ácido sulfúrico, en este caso, una coloración rosada, azul o verde, indica presencia de terpenos.

**Caracterización cuantitativa de los extractos obtenidos.** Esta caracterización se basó en la cuantificación de fenoles totales, de terpenos y de la actividad antioxidante de los extractos. Para la cuantificación del contenido de fenoles totales se usó el método del reactivo de Follin Ciocalteu [20]. La cuantificación de terpenos, para los extractos que en la prueba cualitativa dieron positivo y para los extractos que lograron inhibir, se hizo mediante cromatografía de gases con inyección Headspace (Shimadzu GC-2014), usando helio como gas acarreador y la velocidad como modo de control de flujo. La temperatura de operación del equipo durante la cuantificación fue de 250 °C y la presión de 143,9 kPa, el flujo total implementado fue de 16,6 mL / min y el flujo de columna de 1,24 mL / min, la velocidad lineal fue de 33,0 cm / seg y el flujo de purga de 3,0 mL / min, el modo de inyección fue dividido y la relación de división de 10, siguiendo el protocolo del laboratorio AOXLAB. A su vez, se realizó la determinación de la actividad total antioxidante aplicando el método oficial de la AOAC [21] para la medición de la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) con un espectrofluorímetro Synergy HT. La cuantificación de fenoles totales y de la actividad de antioxidante se realizó para los extractos obtenidos por Soxhlet, para los obtenidos por hidrodestilación y para el aceite nanoencapsulado.

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.** La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la concentración más baja a la que un antimicrobiano inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Para ello se realizaron 12 microdiluciones con cada extracto obtenido. La dilución inicial consistió en 9 mL del caldo de cultivo y 1 mL del extracto a trabajar y, a partir de ella, se realizaron las demás microdiluciones tomando 5mL de la dilución anterior junto con 5 mL de agua, hasta lograr el total de microdiluciones. Del mismo modo, se realizaron 12 microdiluciones con fenol al 5%, correspondiente al control. La concentración inicial para las microdiluciones fue de 5000 mg/L. Una vez determinada la concentración en la microdilución de los extractos en la cual se observa una reducción en la turbidez característica del crecimiento del microorganismo, esta se dividió por la concentración de fenol a la cual fue posible dicha inhibición para hallar el coeficiente fenólico, el cual, si tiene un valor menor a 1 corrobora que se logró una inhibición del microorganismo.

**Nanoencapsulación.** Se centrifugó el aceite de papaya para sedimentar sólidos que pudieran interferir en la preparación de los Niosomas (Centrífuga Eppendorf modelo 5430) durante 20 min a 7830 rpm. Posteriormente se realizó una filtración con un filtro de 0.45 µm. Se tomaron 5 mL del extracto previamente centrifugado y filtrado y se pusieron en un baño maría a 50°C. Simultáneamente, el frasco conteniendo los proniosomas (PRONANOSOMES Nio-N elaborados por la empresa NANOVEX Biotechnologies S.L) se llevó al baño maría a la misma temperatura. Una vez alcanzados los 50°C, se tomaron 5 mL del extracto y se adicionaron al frasco de proniosomas, dejando por 2 min más en el baño maría. A continuación, se llevó la muestra al Sonicador (ULTRASONIC CRUSHER modelo TOPT92-IIL) usando una sonda de 10 mm de diámetro. La sonicación se hizo durante 5 minutos, sonicando con intervalos de 1 segundo y una intensidad del 30% del poder total del Sonicador. La temperatura se mantuvo constante durante el procedimiento, ya que esto ayuda a que la encapsulación del compuesto deseado sea más efectiva [22].

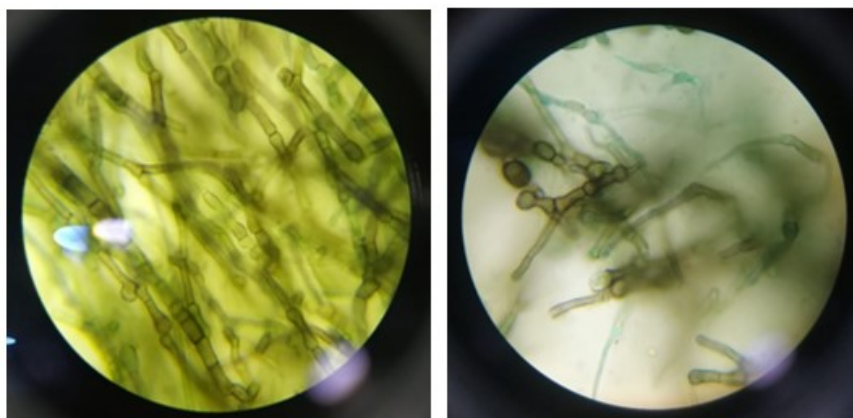
**Purificación de Niosomas.** Una vez obtenidos los Niosomas con los biocompuestos encapsulados se procedió a su purificación, transfiriéndolos a un tubo falcon de 15 mL. Se sometió la muestra a centrifugación durante 30 min a 7830 rpm. La formación de un pellet en el fondo del tubo del centrifugado es el Niosoma obtenido. Se eliminó el sobrenadante y su mismo volumen fue añadido en agua destilada para una segunda centrifugación de 30 min a 7830 rpm [23]. Los Niosomas puros fueron guardados a una temperatura entre 2-8°C para evitar degradación de compuestos.

**Caracterización de Niosomas conteniendo el extracto.** Los Niosomas preparados se caracterizaron encontrando la efectividad de encapsulación, la cual permite determinar la concentración de los biocompuestos

que son capaces de capturar las nanovesículas durante la preparación de niosomas. Para ello, se adicionó metanol a la solución en la que se encontraban los Niosomas purificados (relación 10:1) con el fin de provocar la ruptura de las nanovesículas y así liberar el compuesto encapsulado. La solución restante fue sonicada durante 2 min, con intervalos de 1 seg y una intensidad del 30%. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante 1 h a 7830 rpm. El sobrenadante corresponde a los biocompuestos liberados y el precipitado a las nanovesículas. El mismo procedimiento se le realizó a una alícuota de 1 mL de Niosomas que no fueron purificados para determinar la concentración total de biocompuestos en la solución con la cual se prepararon los Niosomas. Una vez que la concentración de biocompuestos, medida como actividad antioxidante ORAC, se determinó en ambas muestras, el cociente de estas se utilizó para calcular la eficiencia de encapsulación. Adicionalmente, se tomó una muestra de los compuestos liberados para la medición de fenoles y antioxidantes

### 3. Resultados y análisis

**Microorganismo aislado.** Todos los frutos recolectados mostraban lesiones similares, todos poseían manchas grandes de color negro que están principalmente asociadas con antracnosis. Se obtuvieron colonias radiales de borde definido y aspecto algodonoso. Inicialmente, el micelio fue de color blanco y se tornó salmón o rosado, debido a la producción de masas de esporas, característica que generalmente presentan los aislamientos de *C. acutatum* [24].



**Figura 1.** Vista microscópica del microorganismo aislado.

A nivel microscópico, se observó que la estructura de los hongos se formó por hifas dematiáceas (pigmentadas) septadas y ramificadas, como se observa en la Figura 1, lo que indica que es un hongo filamentoso, que coincide con lo reportado en la literatura respecto al hongo *C. acutatum* [25]. Además, se puede evidenciar que su forma de reproducción era asexual, ya que se observan conidios cilíndricos unicelulares.

Las secuencias de ADN alineadas en Basic Local Alignment Search Tool (NCBI BLAST) permitieron identificar que el hongo aislado fue *C. acutatum*. Este resultado era el esperado, ya que varios estudios han relacionado la antracnosis de varios frutos con este hongo, entre los frutos estudiados se encuentra el tomate de árbol [4][24]. Se ha encontrado que la población de *C. acutatum* del tomate de árbol tiene una base genética estrecha y homogénea. Esto facilita que las soluciones encontradas para su inhibición tengan un rango de aplicación muy amplio, puesto que como no existe una diversidad genética tan alta y al haber una incidencia en los hallazgos de este hongo en los cultivos enfermos de antracnosis, se podría obtener un extracto con potencial antimicrobiano que esté en la capacidad de mitigar los daños causados por *C. acutatum*.

**Obtención de extractos.** Con el método de hidrodestilación sólo se logró recuperar la fase oleosa de la cáscara de naranja, obteniendo 7 mL de aceite en el primer ensayo y 6 mL en una segunda hidrodestilación, lo cual es una buena cantidad [26] y representa un rendimiento del 0.96%. Ambos aceites se almacenaron en un mismo recipiente. Para el resto de los materiales vegetales se obtuvieron extractos acuosos, en cada ensayo se recuperaron 100 mL de extracto, por lo que al final por cada material se obtuvo un volumen de 200 mL. A pesar de que tanto para el orégano [27], y para la menta [7] investigaciones han logrado la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación, en este caso no fue posible recuperar la fase oleosa de ninguno de estos materiales. Estudios realizados respecto al aceite esencial de orégano han evaluado la influencia de factores tales como la humedad de las hierbas, su especie y su edad sobre la calidad y cantidad del aceite esencial obtenido, encontrando que la humedad es el único factor que influye significativamente en ambas variables [28][29]. Es probable que, para este proceso, hubiera sido necesario variar el tiempo del secado del orégano para lograr una humedad que permitiera obtener una fase oleosa en la hidrodestilación. En el caso del aceite esencial de menta, los autores que han logrado su obtención han aplicado variantes del método de hidrodestilación, como la adición de solventes [7]. Estas variantes han permitido alcanzar rendimientos aceptables, lo que sugiere la posibilidad de que el método de hidrodestilación aplicado en las experimentaciones descritas en este trabajo sea insuficiente para la obtención del aceite y requiera modificaciones específicamente para la menta. En el caso de las semillas de papaya, no es común usar hidrodestilación, sino que se han aplicado métodos como la extracción por solventes orgánicos [30], la extracción por Soxhlet, extracción enzimática, entre otros tipos [31], por esta razón se puede asumir que el método aplicado no es apropiado para la obtención del aceite esencial de semillas de papaya. Finalmente, a diferencia de la hidrodestilación, con la extracción por Soxhlet se logró obtener AE de los tres residuos agroindustriales investigados con este método, cuyo rendimiento se puede observar en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Rendimientos obtenidos para los extractos oleosos

Método	Extracto	Rendimiento
Hidrodestilación	Cáscara de Naranja	0,96%
Soxhlet	Menta	0,005%
Soxhlet	Orégano	0,705%
Soxhlet	Semillas de Papaya	17,770%

**Caracterización cualitativa de los extractos.** La Tabla 2, presenta los resultados de caracterización cualitativa de presencia o ausencia de fenoles y terpenos para los extractos obtenidos de orégano, menta, semillas de papaya y naranja. Para todos los casos, se encuentra presencia de fenoles. En cuanto a terpenos, los extractos de orégano, menta y semillas de papaya dieron negativo. Para el caso de aceite esencial de orégano se han reportado en la literatura numerosos tipos de terpenos con diversas actividades, como carvacrol y timol y se ha descrito el uso de estos como antioxidante en los alimentos [29]. A pesar de ello, en este trabajo no se logró detectar presencia de terpenos mediante el análisis cualitativo (Tabla 2), puesto que este análisis se le hizo a un extracto acuoso y no al aceite, como se indica en la literatura. Por ende, se concluye que la hidrodestilación realizada no resultó un método adecuado para la recuperación de terpenos contenidos en el orégano en la fase acuosa.

**Tabla 2.** Resultados de la caracterización cualitativa de los extractos obtenidos por hidrodestilación

Extracto	Fenoles	Terpenos
Orégano	+	-
Menta	+	-
Semillas de papaya	+	-
Cáscara de naranja	+	+

Lo mismo ocurrió con la menta, donde se ha encontrado que el aceite esencial es rico en terpenos como el Limoneno y el Linalool [7], pero no se pudo identificar compuestos de este tipo en el extracto acuoso. En el caso del extracto de semillas de papaya, se ha encontrado que su componente principal es el bencil isotiocianato (BITC) en un porcentaje predominante (~96%) [30] [32]. Por lo que son pocas las probabilidades de encontrar un alto contenido de compuestos diferentes a este. Lo anterior podría explicar por qué no se detectaron terpenos en el extracto obtenido, los cuales pueden no estar presentes, o, en caso de estarlo, su cantidad es tan poca que no logra ser identificada cualitativamente. Para el aceite de cáscara de naranja se ha encontrado que los terpenos son sus compuestos principales [33] y en la caracterización cualitativa fue posible identificarlos. Esto se debe a que, a diferencia de los demás extractos, sí se obtuvo una fase oleosa, por lo que se pudo recuperar los terpenos presentes en la cáscara.

**Cuantificación de fenoles totales de los extractos.** Actualmente, la extracción Soxhlet ha sido implementada como una alternativa a la hidrodestilación, produciendo mayores rendimientos de aceite [34]. Esto pudo ser comprobado al lograr una extracción de la fase oleosa de los tres residuos estudiados con este método, cosa que no se logró con la hidrodestilación. Adicional a eso, en estudios previos [35], se han comparado las composiciones químicas de los extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción, observando que los resultados varían significativamente entre los métodos. Así, se ha encontrado que usando la extracción por Soxhlet es posible obtener aceites que contengan compuestos volátiles y de mayor peso molecular, mientras que por hidrodestilación generalmente se obtienen sólo compuestos volátiles [35]. Como se puede observar en la Tabla 3, la cantidad de fenoles totales varía ampliamente en los materiales vegetales y para los extractos obtenidos por hidrodestilación osciló entre 0,89 y 22,81 mg Ácido Gálico/ 100 g de extracto, siendo los extractos de semillas de papaya y de menta, quienes presentan el contenido más bajo de fenoles. Aunque la cáscara de naranja y el orégano presentan cantidades un poco más altas siguen teniendo un contenido fenólico muy bajo puesto que está muy por debajo de los 10 mg de Ácido Gálico/g [33].

**Tabla 3.** Resultados de la caracterización cuantitativa de fenoles totales de todos los extractos obtenidos.

Extracto \ Método de extracción	Hidrodestilación	Soxhlet
	Fenoles totales (mg Ácido Gálico/100g de Extracto)	Fenoles totales (mg Ácido Gálico/100g de Extracto)
Semillas papaya	0,89	27,63
Menta	5,5	58,28
Orégano	22,81	327,16
Cáscara de Naranja	17,83	-

La extracción por Soxhlet facilitó la obtención de compuestos fenólicos, permitiendo obtener niveles elevados para todos los extractos, estos oscilaron entre 27, 63 y 327,16 mg Ácido Gálico/ 100 g de extracto. Al igual que en la hidrodestilación, tanto las semillas de papaya como la menta significaron el material vegetal con la cantidad más baja con respecto a los otros dos extractos. Sin embargo, esta segunda extracción permitió obtener cantidades de fenoles mucho mayores a las obtenidas en la hidrodestilación, logrando aumentar entre 10.59 y 31.04 veces la cantidad obtenida por el primer método de extracción.

**Determinación de la actividad antioxidante de todos los extractos.** Los resultados de actividad antioxidantes, para los extractos obtenidos por los métodos de hidrodestilación y Soxhlet, se presentan en la Tabla 4. Todos los extractos presentan actividad antioxidante medida como la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (ORAC). Sin embargo, los extractos obtenidos por hidrodestilación se pueden clasificar con bajo potencial antioxidante, ya que su actividad está por debajo de 1.000  $\mu\text{mol}$  trolox/100 g de extracto [34].

**Tabla 4.** Resultados de la caracterización cuantitativa la actividad antioxidante de todos los extractos obtenidos.

Extracto \ Método de extracción	Hidrodestilación	Soxhlet
	Actividad antioxidante (μmoles trolox/100g Extracto)	Actividad antioxidante (μmoles trolox/100g Extracto)
Semillas papaya	0,05	1523
Menta	2,63	5497
Orégano	24,02	12042
Cáscara de Naranja	51,14	-

El extracto de semillas de papaya presenta las menores actividades antioxidantes en ambos métodos de extracción. Esto podría ser atribuido a su alto porcentaje en composición de BITC, el cual, según estudios realizados anteriormente [36], ha demostrado tener pobre capacidad antioxidante. Por otro lado, el extracto de naranja y orégano presentaron los mayores valores de actividad antioxidantes para ambos métodos de extracción. Su alta capacidad antioxidante puede ser corroborada por diferentes estudios realizados al respecto [37][38].

El método de extracción por Soxhlet favorece la extracción de compuesto activos obteniendo extractos con capacidad antioxidante moderada y elevada, que han sido definidas por [34], como actividad moderada para productos que tienen una actividad de 1.000 a 5.000 μmol trolox/100 g de extracto, y productos de antioxidantes de capacidad elevada para valores mayores a 5.000 μmol trolox/100 g de extracto. Estos valores mayores de actividad antioxidante presentados en los extractos de orégano y naranja pueden estar relacionados con el alto contenido de fenoles totales encontrados en ellos (Tabla 3), en los que es probable encontrar compuestos polifenólicos, destacados en previos estudios por su alta actividad antioxidante [38]. El potencial antioxidante encontrado en estos extractos podría ser aprovechado en usos alternativos en la industria de empaques de alimentos [39], cosmética, farmacéutica, entre otras [40].

**Cuantificación de terpenos del aceite de cáscara de naranja.** Con base en los análisis cualitativos en la determinación de terpenos (Tabla 2), se realizó la cuantificación de estos por cromatografía de gases / inyección headspace para el AE de naranja (Tabla 5). El componente principal de este aceite esencial es el d-Limoneno con un 96.8%, seguido por el (-)-beta Pieno con un 1.4%. Estos resultados son coherentes con trabajos realizados anteriormente, puesto que en una caracterización previa realizada por [10] se encontró que el limoneno era el compuesto predominante de este AE, al igual que en otros estudios realizados por [9] y [41].

**Tabla 5.** Resultados de la caracterización cuantitativa de terpenos del extracto de la cáscara de naranja obtenido por hidrodestilación

Nombre	Concentración (ppm)
d-Limoneno	653428,719
(-)-beta Pieno	9501,654
(-)-Guaiol	2511,481
(-)-alpha-Bisabolol	1884,471
alpha-Pineno	1785,517
p-Isopropyltoluene (p-Cymene)	1690,008
gamma-Terpineno	1475,572
(-)-Isopulegol	1318,675
Linalool	594,735
delta-3-careno	316,022
Terpinoleno	143,072



beta-Caryophilleno	77,241
--------------------	--------

**Coefficiente mínimo de inhibición de los extractos.** Con el fin de determinar la capacidad antimicrobiana de los extractos obtenidos sobre *C.acutatum*, se hizo una prueba de coeficiente mínimo de inhibición. En esta se pudo evaluar si los extractos realmente lograban inhibir el crecimiento del hongo y, en caso de que sí lo logran, a qué concentración empezaban a inhibirlo. En la Tabla 6 se presentan los resultados de la prueba, en la cual, si el coeficiente fenólico del extracto es menor a 1 quiere decir que este sí presenta actividad antimicrobiana.

**Tabla 6.** Resultados del coeficiente mínimo de inhibición frente al hongo *C.acutatum* de todos los extractos obtenidos.

Método de extracción	Extracto	Fenol 5% CMI (mg/L)	CMI (mg/L)	Coefficiente fenólico (Relación producto fenol)
Hidrodestilación	Semillas papaya	2500	5000	2
	Menta	2500	5000	2
	Orégano	2500	5000	2
	Cáscara de Naranja	2500	5000	2
Soxhlet	Semillas papaya	2500	1250	0,5
	Menta	2500	5000	2
	Orégano	2500	5000	2

De todos los extractos evaluados, sólo el aceite de semillas de papaya extraído por Soxhlet presentó actividad antimicrobiana. Es importante notar que, en los resultados de la caracterización, los dos extractos obtenidos a partir de las semillas de papaya fueron los de menor actividad antioxidante (Tabla 4) con respecto a los demás y los de menor contenido de fenoles totales (Tabla 3). Estudios realizados por [33] evaluaron la relación entre el contenido fenólico y antioxidante de los aceites esenciales con su potencial antimicrobiano. Se encontró que no siempre hay una relación entre ellos y que a pesar de que diversos componentes de estas características han mostrado capacidad inhibitoria, sólo la tienen para ciertos microorganismos en específico [42].

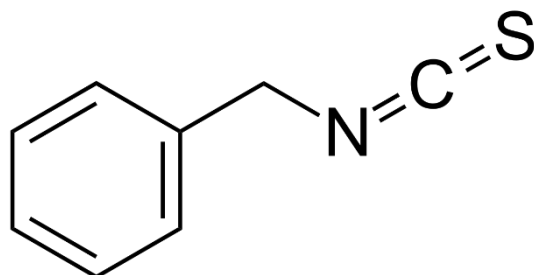
En la Tabla 7 se aprecia el contenido de terpenos presente en el AE de semillas de papaya obtenido por Soxhlet, en la que se puede observar que solo fue posible identificar dos tipos de terpenos en concentraciones bajas comparadas con las obtenidas en el perfil de terpenos del AE de la cáscara de naranja (Tabla 5). Para ambos terpenos obtenidos en el aceite de semillas de papaya se obtuvo una cantidad, aproximada, tres veces menor que la contenida en el AE de naranja.

**Tabla 7.** Resultados de la caracterización cuantitativa de terpenos del extracto de las semillas de papaya obtenido por Soxhlet

Nombre	Concentración (ppm)
(-)-Guaiol	835,408
(-)-alpha-Bisabolol	605,301

Como se mencionó anteriormente, caracterizaciones previas de extractos de las semillas de papaya han encontrado que su componente principal es el BITC, en un porcentaje de aproximadamente 96% [30]. Este componente ha mostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos, como diferentes hongos de los géneros *Fusarium* y *Candida* [32]. El mecanismo de acción de este compuesto se le ha atribuido a su estructura, que contiene un átomo de carbono altamente electrofílico (Figura 2), el cual le permite reaccionar fácilmente con tioles celulares, como lo son las cisteínas en proteínas, y tioles de bajo peso molecular,

como el glutatión. Este está presente a altas concentraciones en hongos de tipo filamentoso [43], como lo es *C. acutatum*. La interacción del carbono electrofílico con el glutatión genera una pérdida de la estructura y funcionalidad de las proteínas, causando estrés oxidativo al agotar el glutatión intracelular o, incluso, dañar las mitocondrias. Dicha inactivación de proteínas, sumado con el estrés oxidativo producen la apoptosis [44].



**Figura 2.** Estructura molecular del BITC

Teniendo en cuenta lo anterior, es probable que gracias a este compuesto, el extracto de las semillas haya mostrado actividad antimicrobiana frente a *C. acutatum* en el extracto obtenido por Soxhlet. En contraste, es posible que el extracto acuoso obtenido por medio de la hidrodestilación no haya otorgado los mismos resultados, debido a que este compuesto tiene un peso molecular de 149,21 g/mol y un punto de ebullición mucho mayor al del agua (243°C). Por lo que, se puede decir, que no se logró evaporar en el proceso de hidrodestilación.

**Nanoencapsulación del extracto de semillas de papaya.** Con el fin de mejorar los resultados obtenidos en la prueba de actividad biológica, se nanoencapsuló el extracto de semillas de papaya obtenido por Soxhlet, el cual fue el único capaz de inhibir al hongo. Mediante este proceso se pudo encapsular el 81% del extracto, este valor se considera un porcentaje alto, ya que a partir del 50% se dice que se logró encapsular una buena cantidad de componentes [45]. En la Tabla 8 se presenta el efecto de la nanoencapsulación en la CMI del extracto frente a *C. acutatum*, contenido de fenoles y actividad antioxidante.

**Tabla 8.** Comparación de actividad biológica del extracto de semilla de papaya encapsulado y sin encapsular

Extracto de semillas de papaya	Fenol 5% CMI (mg/L)	CMI (mg/L)	Coefficiente fenólico (Relación producto fenol)	Valor ORAC (µmoles trolox/100g extracto)	Fenoles (mg Ac. Gálico /100mL)
Sin encapsular	2500	1250	0,5	1523	27,63
Encapsulado	5000	78,13	0,01	1236	19,26

La nanoencapsulación de extracto de las semillas de papaya, aumentó la actividad antifúngica de *C. acutatum*, requiriendo de una CMI de 78.13 mg/L, una concentración 15 veces menor a la requerida en el extracto sin encapsular donde las CMI fue de los 1250 mg/L. La nanoencapsulación es una técnica que ha demostrado mejorar la solubilidad en agua de compuestos poco solubles, como lo son los aceites esenciales, y también mejorar su estabilidad al protegerlos de las condiciones adversas del medio. Lo anterior genera un aumento en la biodisponibilidad de los compuestos activos, lo que puede significar una disminución en la concentración del extracto requerido para lograr la inhibición de un microorganismo [46]. Adicionalmente, en estudios realizados frente a la nanoencapsulación de compuestos bioactivos, se ha encontrado que su actividad antimicrobiana puede aumentar al ser encapsulados debido a su reducción en el tamaño de partícula. Esto “puede aumentar los mecanismos de absorción celular pasiva, reduciendo así las resistencias de transferencia de masa y aumentando la actividad antimicrobiana”[47].

A pesar de lograr un aumento en la actividad antifúngica del extracto encapsulado, el resultado obtenido para la capacidad antioxidante y los fenoles totales de las nanocápsulas resultó menor al extracto sin encapsular (Tabla 8). Lo anterior puede ser atribuido a que los compuestos fenólicos y con características antioxidantes contenidos en este extracto pueden no ser tan afines al material del proniosoma. Por esto no lograron ser encapsulados en buena cantidad. Por otro lado, esto corrobora que la capacidad antimicrobiana del extracto de semillas de papaya no está relacionada con su capacidad antioxidante, su contenido de fenoles o su contenido de terpenos; como se mencionó anteriormente, sino que se le puede atribuir a la presencia del compuesto BITC, el cual, a partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que logró ser encapsulado correctamente.

#### 4. Conclusiones

En los aislamientos realizados a partir del tomate de árbol que poseía lesiones asociadas con antracnosis, se logró aislar e identificar el hongo *C. acutatum*.

La concentración mínima inhibitoria de los extractos evaluados permitió encontrar el índice de la relación Producto/Fenol, determinando que, de los extractos obtenidos, el único capaz de inhibir al hongo *C. acutatum* fue el aceite de semillas de papaya extraído por Soxhlet, con un valor de índice de 0,5 y una CMI de 1250 mg/L.

La nanoencapsulación como estrategia de mejoramiento del potencial antimicrobiano del aceite de papaya tuvo una respuesta efectiva, permitiendo obtener un porcentaje de encapsulación del 81% y una disminución en el valor de la CMI de 1250 mg/L a 78,13 mg/L, con respecto a la del aceite sin encapsular.

#### Referencias

- [1] E. Ávila, "Manual de Tomate de árbol," *Cámara de Comercio de Bogotá*, no. 1, p. 50, 2015, [En línea]. Disponible en: [https://www.ccb.org.co/content/download/13726/175108/file/Tomate de árbol.pdf](https://www.ccb.org.co/content/download/13726/175108/file/Tomate%20de%20%C3%A1rbol.pdf).
- [2] D. Kalemba and A. Kunicka, "Antibacterial and antifungal properties of essential oils," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 10, pp. 813–829, 2005, doi: 10.2174/0929867033457719.
- [3] N. Duduk, T. Markovic, M. Vasic, B. Duduk, I. Vico, and A. Obradovic, "Antifungal activity of three essential oils against *Colletotrichum Acutatum*, the causal agent of strawberry anthracnose," *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, vol. 18, no. 3, pp. 529–537, 2015, doi: 10.1080/0972060X.2015.1004120.
- [4] G. E. Carranza-Arèvalo, "Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de cinco extractos vegetales (ev) contra *Colletotrichum* spp. aislado de tomate de árbol (*Solanum Betaceum*).," no. April, p. 64, 2017, doi: 10.13140/RG.2.2.14511.84642.
- [5] S. Kaur, "Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants," *Journal of Microbiology & Experimentation*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2014, doi: 10.15406/jmen.2014.01.00005.
- [6] A. C. Seaberg, R. G. Labbe, and K. Shetty, "Inhibition of *Listeria Monocytogenes* by elite clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*)," *Food Biotechnology*, vol. 17, no. 2, pp. 129–149, 2003, doi: 10.1081/GBT-120023076.
- [7] M. N. Loolae M and R. and A. H. H, "Polyphenolic and essential oil composition of mentha and their antimicrobial effect" *Archives of Clinical Microbiology*, vol. 8, no. 4, 2017, [En línea]. Doi: 10.4172/1989-8436.100053.
- [8] V. G. Zuin and L. Z. Ramin, "Green and sustainable separation of natural products from agro-industrial waste: challenges, potentialities, and perspectives on emerging approaches," *Topics in Current Chemistry*, vol. 376, no. 1. Springer International Publishing, Feb. 01, 2018, doi: 10.1007/s41061-017-0182-z.
- [9] M. J. Velázquez-Nuñez, R. Avila-Sosa, E. Palou, and A. López-Malo, "Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact," *Food Control*, vol. 31, no. 1, pp. 1–4, May 2013, doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.029.

- [10] F. Azhdarzadeh and M. Hojjati, "Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils," *Nutrition and Food Sciences Research*, vol. 3, no. 1, pp. 43–50, 2016, doi: 10.18869/acadpub.nfsr.3.1.43.
- [11] J. K. Peter, Y. Kumar, P. Pandey, and H. Masih, "Antibacterial activity of seed and leaf extract of carica papaya var. pusa dwarf linn," *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 9, no. 2, pp. 29–37, 2014, doi: 10.9790/3008-09272937.
- [12] B. Dehghan, R. Esmaeilzadeh Kenari, and Z. Raftani Amiri, "Nano-encapsulation of orange peel essential oil in native gums (*Lepidium sativum* and *Lepidium perfoliatum*): Improving oxidative stability of soybean oil," *Journal of Food Processing and Preservation*, no. July, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1111/jfpp.14889.
- [13] J. Molina Roa, "Aislamiento Y Caracterización De Hongos Patógenos Presentes En Lulo, Tomate De Árbol Y Mora De Castilla Potencialmente Patógenos Para Los Cultivos De Gulupa (*Pasiflora Edulis* Var. *Edulis* Sims.)
- [14] O. E. Navarro Reyes, "Por un Desarrollo Agrario Integral y Sostenible".
- [15] J. Sambrook, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001
- [16] T. Kuiper-Goodman and P. M. Scott, "Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A.," *Biomedical and environmental sciences: BES*, vol. 2, no. 3. pp. 179–248, 1989, doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- [17] "Agilent Technologies Sistema de PCR en tiempo real AriaMx G8830A." [En línea]. Disponible en: [www.agilent.com/genomics](http://www.agilent.com/genomics).
- [18] S. F. Altschul *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Oxford University Press, 1997. [En línea]. Disponible en: <http://nar.oxfordjournals.org/>.
- [19] B. Prakash, C. H. Sumangala, G. Melappa, and C. Gavimath, "Evaluation of Antifungal activity of Banana peel against Scalp Fungi," in *Materials Today: Proceedings*, 2017, vol. 4, no. 11, pp. 11977–11983, doi: 10.1016/j.matpr.2017.09.119.
- [20] G. Martínez and F. López, "Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu"
- [21] "AOAC Official Method 2012.23 Total Antioxidant Activity Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe First Action 2012," 2012.
- [22] Life Technologies, "Training Document."
- [23] C. E. Falconí, R. G. F. Visser, and A. W. van Heusden, "Phenotypic, molecular, and pathological characterization of *Colletotrichum acutatum* associated with Andean lupine and tamarillo in the Ecuadorian Andes," *Plant Disease*, vol. 97, no. 6, pp. 819–827, 2013, doi: 10.1094/PDIS-02-12-0175-RE.
- [24] A. Sanabria *et al.*, "Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from Tahiti lime, tamarillo, and mango," *Agronomia Colombiana*, vol. 28, no. 3, pp. 391–399, 2010.
- [25] J. P. Zoffoli and B. A. Latorre, "Table grape (*Vitis vinifera* L.)," 2011. doi: 10.1016/B978-1-84569-735-8.50009-7.
- [26] J. Bustamante *et al.*, "Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste," *Journal of Cleaner Production*, vol. 137, pp. 598–605, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.jclepro.2016.07.108.
- [27] K. Yuri, F. Kawase, G. Luiz, V. Coelho, C. Gonçalves Mothé, and F. A. Furtado, "Changes in essential oil of *Origanum Vulgare* L. affected by different extraction methods" 2013. [En línea]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/275657487>.
- [28] J. D. Ospina, M. S. S. Orozco, and C. R. B. Correa, "Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia origanoides* Kunth," *Acta Agronomica*, vol. 65, no. 2, pp. 170–175, 2016, doi: 10.15446/acag.v65n2.47576.
- [29] G. A. Castillo-Herrera, J. A. García-Fajardo, and M. Estarrón-Espinosa, "Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia Graveolens* h.b.k.) essential oil," 2007.
- [30] R. Kermanshai, B. E. McCarry, J. Rosenfeld, P. S. Summers, E. A. Weretilnyk, and G. J. Sorger, "Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts," *Phytochemistry*, vol. 57, no. 3, pp. 427–435, 2001, doi: 10.1016/S0031-9422(01)00077-2.
- [31] S. S. Tan, "Papaya (*Carica papaya* L.) seed oil," in *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, Springer International Publishing, 2019, pp. 615–626.

- [32] X. He, Y. Ma, G. Yi, J. Wu, L. Zhou, and H. Guo, "Chemical composition and antifungal activity of *Carica papaya* Linn. seed essential oil against *Candida* spp.," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 64, no. 5, pp. 350–354, May 2017, doi: 10.1111/lam.12711.
- [33] M. P. Kähkönen *et al.*, "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962, Oct. 1999, doi: 10.1021/jf990146l.
- [34] S. Zhao and D. Zhang, "Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of Eucalyptus leaves oil and comparison with Soxhlet extraction and hydro-distillation methods," *Separation and Purification Technology*, vol. 133, pp. 443–451, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.seppur.2014.07.018.
- [35] S. Zapata, A. María Piedrahita, and B. Rojano, "Perspectivas en Nutrición Humana."
- [36] H. Yuan, S. Yao, Y. You, G. Xiao, and Q. You, "Antioxidant activity of isothiocyanate extracts from broccoli," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 18, no. 2, pp. 312–321, Apr. 2010, doi: 10.1016/S1004-9541(08)60358-4.
- [37] R. Avila-Sosa, M. G. Gastélum-Franco, A. Camacho-Dávila, J. V. Torres-Muñoz, and G. V. Nevárez-Moorillón, "Extracts of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 3, no. 3, pp. 434–440, 2010, doi: 10.1007/s11947-008-0085-7.
- [38] N. Mahato, K. Sharma, M. Sinha, and M. H. Cho, "Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives," *Journal of Functional Foods*, vol. 40. Elsevier Ltd, pp. 307–316, Jan. 01, 2018, doi: 10.1016/j.jff.2017.11.015.
- [39] A. Guarda, J. F. Rubilar, J. Miltz, and M. J. Galotto, "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 146, no. 2, pp. 144–150, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011.
- [40] R. C. Fierascu, I. Fierascu, S. M. Avramescu, and E. Sieniawska, "Recovery of natural antioxidants from agro-industrial side streams through advanced extraction techniques," *Molecules*, vol. 24, no. 23. MDPI AG, Nov. 20, 2019, doi: 10.3390/molecules24234212.
- [41] A. Geraci, V. di Stefano, E. di Martino, D. Schillaci, and R. Schicchi, "Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity," *Natural Product Research*, vol. 31, no. 6, pp. 653–659, 2017, doi: 10.1080/14786419.2016.1219860.
- [42] L. M. Aguilar-Veloz, M. Calderón-Santoyo, Y. Vázquez González, and J. A. Ragazzo-Sánchez, "Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges," *Food Science and Nutrition*, vol. 8, no. 6. Wiley-Blackwell, pp. 2555–2568, Jun. 01, 2020, doi: 10.1002/fsn3.1437.
- [43] I. Pócsi, R. A. Prade, and M. J. Penninckx, "Glutathione, altruistic metabolite in fungi," *Advances in Microbial Physiology*, vol. 49. pp. 1–76, 2004, doi: 10.1016/S0065-2911(04)49001-8.
- [44] V. Dufour, M. Stahl, E. Rosenfeld, A. Stintzi, and C. Baysse, "Insights into the mode of action of benzyl isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, no. 22, pp. 6958–6968, Nov. 2013, doi: 10.1128/AEM.01967-13.
- [45] Y. E. Lopera (comunicación privada), 2020.
- [46] C. C. Liolios, O. Gortzi, S. Lalas, J. Tsaknis, and I. Chinou, "Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity," *Food Chemistry*, vol. 112, no. 1, pp. 77–83, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.060.
- [47] F. Donsì, M. Annunziata, M. Sessa, and G. Ferrari, "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 44, no. 9, pp. 1908–1914, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2011.03.003.