

ACTIVIDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIFÚNGICAS DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *Passiflora edulis* Y *Citrus x sinensis*

ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF ALCOHOLIC EXTRACTS FROM *Passiflora edulis* AND *Citrus x sinensis*

Marcia Eduarda Aveiga Zambrano, Liz Yanaina Sánchez López, Stalin Gustavo Santacruz Terán

Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Circunvalación – Vía San Mateo, Manta – Manabí – Ecuador.

Email: stalin.santacruz@uleam.edu.ec

Información del artículo

Tipo de artículo:
Nota técnica

Recibido:
30/06/2022

Aceptado:
21/12/2022

Licencia:
CC BY-NC-SA 4.0

Revista
ESPAMCIENCIA
13(2):55-61

DOI:
https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v13i2.349

Resumen

En el presente trabajo se estudió el poder inhibitorio de los extractos alcohólicos de los subproductos agroindustriales de naranja y maracuyá frente a cuatro bacterias: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y dos hongos: *Penicillium* sp. y *Rhizopus* spp. Para ello, los extractos alcohólicos del epicarpio-albedo de maracuyá y del exocarpo-mesocarpo de la naranja en concentraciones de 0,05 y 0,1% se aplicaron a cepas de los seis microorganismos y se determinó la zona de inhibición y la curva de crecimiento durante 24 h. Los resultados mostraron que la mayor concentración de los extractos (0,1%) de ambas frutas formó zonas de inhibición de mayor diámetro. Las bacterias fueron más resistentes a los extractos de la naranja en comparación con los de maracuyá, con inhibiciones completas a las 24 y 6 h, respectivamente. Por otro lado, se observó que la inhibición completa de los hongos fue a partir de las 4 horas por acción de extractos de las dos frutas en estudio.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, inhibición, *Passiflora edulis*, *Citrus sinensis*, bacterias, hongos.

Abstract

In the present work, the inhibitory power of the alcoholic extracts of the agro-industrial by-products of orange and passion fruit was studied against four bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and two fungi: *Penicillium* sp. and *Rhizopus* spp. The alcoholic extracts of orange and passion fruit peels in concentrations of 0,05 and 0,1% were applied to strains of the six microorganisms and the zone of inhibition and the growth curve along 24 h were determined. The results showed that the highest concentration of the extracts (0,1%) of both fruits formed inhibition zones of larger diameter. The bacteria were more resistant to orange extracts compared to passion fruit extracts, with complete inhibition at 24 and 6 h, respectively. On the other hand, the complete inhibition of the fungi was after 4 hours of action of extracts of the two fruits.

Keywords: Phenolic compounds, inhibition, *Passiflora edulis*, *Citrus sinensis*, bacteria, fungi.

INTRODUCCIÓN

Los desechos o subproductos agrícolas a nivel mundial son generados en grandes volúmenes, siendo sólo una mínima parte de ellos reutilizada (Ojeda y Cáceres, 2002), por lo que representan un problema ambiental (Londoño-Londoño *et al.*, 2012).

A partir de los años 60, el mercado de los jugos y conservas de frutas empezó a desarrollarse en el Ecuador. Gracias al clima favorable del país, es posible el cultivo de varias frutas para la elaboración de bebidas y néctares; entre las que se encuentran maracuyá y naranja (Plaza, 2018).

El procesamiento del maracuyá genera alrededor del 75% de subproductos, respecto al peso de la fruta, mientras que

el de la naranja produce entre 45 y 60% de subproductos. Los subproductos del maracuyá son utilizados como material coadyuvante a la fermentación de yogurt (Do Espírito Santo *et al.*, 2012) o potenciador de aromas (Leão *et al.*, 2014), mientras que los de naranja son utilizados para la alimentación de rumiantes, obtención de aceites esenciales (Gonzales, 2007) y pectina (Rentería, 2014).

Los compuestos fenólicos, que se presentan de forma natural en las frutas y vegetales, poseen actividad antioxidante (Pérez-Nájera *et al.*, 2013), actividad bacteriostática, fungicida y viricida, siendo más efectivos sobre las bacterias gram-positivas que sobre las gram-negativas (Abud-Blanco *et al.*, 2015).

El consumo frecuente de frutas y vegetales está asociado a la mayor ingesta de compuestos fenólicos de carácter antioxidante, que conducen al menor desarrollo de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares (Tenea y Lara, 2019).

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos es de gran interés para aplicaciones en la industria de alimentos, debido a la mayor aceptación que tiene el consumidor hacia los productos naturales y al uso más restringido de los compuestos sintéticos, dada la toxicidad de estos últimos (Amensour *et al.*, 2010). Las técnicas de extracción de compuestos fenólicos empleadas son las convencionales con solventes (Alara *et al.*, 2018) y no convencionales como las asistidas con microondas (Alara and Abdurahman, 2019), asistidas con ultrasonido (Shirzad *et al.*, 2017) y con fluidos supercríticos (De Zordi *et al.*, 2014).

Con base en lo expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo investigar si los extractos alcohólicos del epicarpio-albedo de maracuyá (*Passiflora edulis*) y del exocarpo-mesocarpo de la naranja (*Citrus sinensis*), poseen propiedades inhibitorias *in vitro* frente a dos bacterias gram-positivas *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus mutans*, dos bacterias gram-negativas *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y dos hongos *Penicillium* sp. y *Rhizopus* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de exocarpo-mesocarpo de naranja (EM naranja) se las obtuvo de un local de expendio de jugos de fruta, mientras que las de epicarpio-albedo de maracuyá (EA maracuyá) de frutas adquiridas en un mercado local, ambos de la ciudad de Manta, Ecuador.

Las muestras de EA maracuyá y de EM naranja se secaron en una estufa a una temperatura de 50°C. Una vez secos, los materiales se trituraron con ayuda de un molino casero (molino Corona, Colombia) y posteriormente se

tamizaron, desechándose las partículas con tamaño superior a 1 mm.

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* (ATCC CECT-4076), *Salmonella* spp. (ATCC CECT-708), *Listeria monocytogenes* (ATCC CECT-5672) que fueron aisladas de queso perteneciente a una Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, mientras que las cepas de *Penicillium* y *Rhizopus* fueron aisladas de mandarina y papaya respectivamente.

Extracción alcohólica

La extracción alcohólica se realizó de acuerdo con el método propuesto por Slinkard y Singleton (1977), 15 g del material molido se mezclaron con 150 mL de etanol (95% v/v) con agitación constante durante 24 h a 20°C. La mezcla obtenida se filtró y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio hasta que se obtuvo un residuo seco (Espínosa y Santacruz, 2017).

Curva de crecimiento

Para la realización de la curva de crecimiento se empleó el método propuesto por Puupponen *et al.* (2001). Se inoculó 10 mL de agua de peptona con 1 o 5% del cultivo (dependiendo del microorganismo) y posteriormente el extracto alcohólico, previamente extraído, se agregó en concentraciones de 0,05 y 0,1%. La solución preparada se inoculó en medios de cultivo específicos, agar *Salmonella-Shigella* (Tm media, India) para las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, mientras que para *Streptococcus mutans* se usó el medio de cultivo agar sangre de cordero (Bioxon, México). Las muestras se diluyeron con agua de peptona para luego ser sembradas por triplicado en cajas Petri de 6 cm de diámetro, e incubadas a 37°C por 24 h. Se tomaron muestras del crecimiento bacteriano para los tiempos de 2, 4, 6, 8 y 24 h de incubación, para realizar un recuento de microorganismos haciendo uso de un contador de colonias (Suntex, Taiwan).

Inhibición *in vitro* de microorganismos

La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó según CLSI (2009). Se inoculó el microorganismo a analizar en medio de cultivo agar y se incubó a 37°C durante 24 h. Se sumergieron discos de papel de filtro (Fisher Scientific Q2) de diámetro de 5 mm en una solución de los extractos con concentraciones de 0,05 y 0,1 %. Los discos se colocaron en el centro de una placa de Petri en donde se había sembrado previamente el microorganismo, para luego incubarla a 37°C durante 2 días. El diámetro de la zona de inhibición se midió después de 24 h por triplicado y se clasificó de la siguiente manera: no inhibición (6 mm), ligera inhibición (6 a 8 mm),

inhibición moderada (8 a 10 mm), +++: inhibición fuerte (>10 mm).

Diseño experimental

Se utilizó un arreglo factorial 2x2 en un diseño completamente al azar correspondiente al uso de dos factores: residuo de la fruta, con dos niveles (epicarpio-albedo del maracuyá y exocarpo-mesocarpio de la naranja) y concentración del extracto alcohólico, con dos niveles (0,05 y 0,1 %).

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Infostat (Infostat versión 2014, Argentina) para el análisis de varianza y la prueba de medias con el test de Tukey ($p \leq 0,05$ %). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición *in vitro* de bacterias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*) frente a extractos alcohólicos

Los resultados (Cuadro 1) mostraron una relación directa entre la concentración del extracto alcohólico y el diámetro de la zona de inhibición, sin que existan diferencias ($p \leq 0,05$). La concentración al 0,1% del extracto de EM naranja tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes* y *S. mutans*, y fue diferente al producido por el extracto de EA maracuyá al 0,05% (Cuadro 1). La inhibición de EM naranja al 0,1% sobre *L. monocytogenes* fue fuerte, mientras que para EA maracuyá al 0,05% sobre *S. mutans* fue ligera. Las diferencias en inhibición podrían ser el resultado de diferentes compuestos fenólicos presentes en las frutas analizadas. En ambos casos, el poder inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre las bacterias gram-positivas puede deberse a su capacidad de afectar la pared celular de las bacterias (Puupponen *et al.*, 2001). Corzo (2012) mostró la acción inhibitoria de los compuestos fenólicos de frutas sobre bacterias gram-positivas, con zonas de inhibición de 10 mm de diámetro a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Resultados de inhibición similares, 10,67 mm, fueron obtenidos en la presente investigación a concentraciones menores de extracto (0,1%). Kim y Shin (2012) mostraron que los extractos de semilla de *Citrus trifoliata* tuvieron actividad inhibitoria contra *Listeria* pero no contra *S. mutans*. En este último caso, la falta de acción inhibitoria contra *S. mutans* podría deberse a la variedad de naranja utilizada.

Cuadro 1. Resultados del diámetro de la zona de inhibición de soluciones de extractos de EA maracuyá y EM naranja sobre *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus mutans*

Tratamiento (concentración del extracto alcohólico, %)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
M (0,05) ¹	8,22++ ^A	7,67+ ^A
M (0,1) ¹	9,22++ ^{A,B}	9,00++ ^{A,B}
N (0,05) ²	9,11++ ^{A,B}	8,44++ ^{A,B}
N (0,1) ²	10,67+++ ^B	9,33++ ^B

Valores promedios seguidos de letras superíndices diferentes indican diferencia estadística por la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$ %).

-: no inhibición (6 mm), +: ligera inhibición (6 a 8 mm), ++: inhibición moderada (8 a 10 mm), +++: inhibición fuerte (>10 mm).

¹M: extracto alcohólico del EA maracuyá

²N: extracto alcohólico del EM naranja

Inhibición *in vitro* de extractos alcohólicos frente a bacterias gram-negativas (*Salmonella* spp, *Escherichia coli*)

Los resultados (Cuadro 2) mostraron una relación directa entre la concentración del extracto alcohólico y el diámetro de la zona de inhibición solo para EM naranja, siendo mayor la inhibición para la más alta concentración ($p \leq 0,05$). La concentración al 0,1% de extracto alcohólico de EM naranja y EA maracuyá tuvieron el mayor efecto inhibitorio sobre *Salmonella* spp. (Cuadro 2), mientras que los extractos de EA maracuyá al 0,05% tuvieron la menor inhibición ($p \leq 0,05$). La concentración del extracto alcohólico de EA maracuyá al 0,1% tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre la bacteria *Escherichia coli*, mientras que el menor efecto inhibitorio fue el obtenido por el extracto de EM naranja al 0,1%, $p \leq 0,05$ (Cuadro 2). La inhibición de EM naranja al 0,1% sobre *Salmonella* spp fue fuerte, mientras que contra *E. coli* fue ligera. Así mismo los extractos de EA maracuyá al 0,05% tuvieron una ligera acción antimicrobiana sobre *E. coli*.

Según Tahera *et al.* (2014) los extractos alcohólicos (mentanol y etanol) tuvieron efecto inhibitorio contra *Salmonella* spp, mientras que los extractos acuosos no tuvieron ningún efecto contra el microorganismo. Esto sugiere la existencia de actividad antimicrobiana de los compuestos extraídos con alcoholes. Extractos etanólicos de tallos de maracuyá mostraron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, con una zona de inhibición de diámetro entre 7 y 9 mm, pero no contra *Salmonella* spp (Aernan *et al.*, 2013). Al parecer la eficiencia del extracto depende no solo del solvente utilizado, sino de la concentración utilizada (Mohanasundari *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Resultados de la zona de inhibición de extracto alcohólico de EA maracuyá y EM naranja sobre *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*

Tratamiento	<i>Salmonella spp</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
M (0,05) ¹	7,89 ^A	8,33 ^{++A,B}
M (0,1) ¹	9,22 ^{++A,B}	9,78 ^{++B}
N (0,05) ²	8,44 ^{++A}	8,78 ^{++A,B}
N (0,1) ²	10,22 ^{+++B}	7,67 ^{++A}

Valores promedios seguidos de letras superíndices diferentes indican diferencia estadística por la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$ %).

-: no inhibición (6 mm), +: ligera inhibición (6 a 8 mm), ++: inhibición moderada (8 a 10 mm), +++: inhibición fuerte (>10 mm).

¹M: extracto alcohólico del EA maracuyá

²N: extracto alcohólico del EM naranja

Inhibición *in vitro* de extracto alcohólico de EM naranja y EA maracuyá frente a hongos (*Penicillium sp* y *Rhizopus spp*)

Los resultados mostraron una relación directa entre concentración del extracto alcohólico y el diámetro de la zona de inhibición ($p \leq 0,05$), con excepción del EM naranja sobre *Penicillium sp*. La concentración al 0,05% de extracto alcohólico de EA maracuyá tuvo el menor efecto inhibitorio sobre *Penicillium*, en relación a los otros tres tratamientos, los cuales fueron similares entre sí ($p \leq 0,05$) (Cuadro 3). Los extractos alcohólicos de EM naranja y EA maracuyá a 0,05% tuvieron iguales efectos de inhibición sobre *Rhizopus*, que los extractos de EM naranja a la misma concentración, siendo menores al efecto inhibitorio de EM naranja y EA maracuyá al 0,01%, $p \leq 0,05$ (Cuadro 3). La acción inhibitoria de extractos de EA maracuyá al 0,05% fue ligera sobre ambos hongos, así como los de EM naranja al 0,05% sobre *Rhizopus spp*. No hubo acción inhibitoria fuerte de ninguno de los extractos sobre los hongos estudiados.

Christ-Ribeiro et al. (2019) emplearon extractos del pericarpio de arroz y spirulina e inhibieron el crecimiento de *Penicillium verrucosum* y *Rhizopus oryzae* en el 39,8 y 20,2%, respectivamente. A pesar de no poder comparar directamente los resultados con los del presente estudio, es evidente la presencia de compuestos fenólicos con efecto antifúngico en ambos casos.

Cuadro 3. Resultados del diámetro de la zona de inhibición de extracto alcohólico de EA maracuyá y EM naranja sobre *Penicillium* y *Rhizopus*

Tratamiento	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
M (0,05) ¹	7,67 ^{++A}	7,44 ^{++A}
M (0,1) ¹	9,22 ^{+++B}	9,11 ^{+++B}
N (0,05) ²	9,11 ^{+++B}	7,67 ^{++A}
N (0,1) ²	9,56 ^{+++B}	9,0 ^{+++B}

Valores promedios seguidos de letras superíndices diferentes indican diferencia estadística por la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$ %)

-: no inhibición (6 mm), +: ligera inhibición (6 a 8 mm), ++: inhibición moderada (8 a 10 mm), +++: inhibición fuerte (>10 mm).

¹M: extracto alcohólico del EA maracuyá

²N: extracto alcohólico del EM naranja

Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Penicillium sp*, y *Rhizopus spp* frente a extractos alcohólicos de EM naranja y EA maracuyá

En la figura 1 se puede observar que las UFC (normalizadas) de *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus mutans* en presencia de extractos alcohólicos de EA maracuyá y EM naranja a la concentración de 0,1% disminuyó en un período de 6 h, luego de lo cual se redujo la velocidad de disminución. Los extractos de EA maracuyá produjeron una mayor reducción de las UFC frente a estas dos bacterias gram-positivas en relación a los de EM naranja en el transcurso de las 24 h de estudio. Según Pupponen et al. (2001) las variaciones de poder inhibitorio encontradas pueden deberse a las diferencias estructurales de las superficies celular de las bacterias.

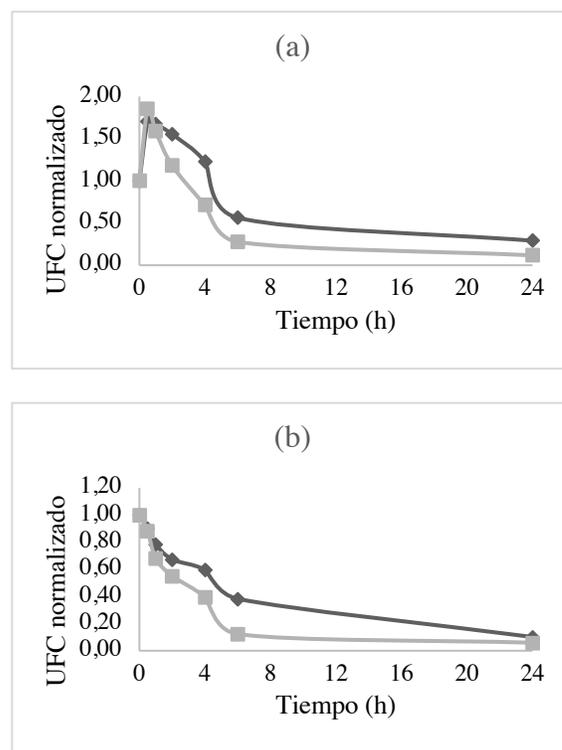


Figura 1. Curva de crecimiento de (a) *Listeria monocytogenes* y (b) *Streptococcus mutans* frente a extractos alcohólicos de EM naranja (rombos sombreados) y EA maracuyá (cuadrados sombreados) al 0,1%

En la figura 2a, se observa que la inhibición de *Salmonella spp.* a partir de las 6 h de análisis fue completa bajo la acción de extractos de EA maracuyá a la concentración de 0,1%, siendo esta inhibición mayor que la de EM naranja. En el Figura 2b, se puede observar que la bacteria *Escherichia coli* se inhibió completamente a las 6 h de estudio en presencia de extractos de las dos frutas.

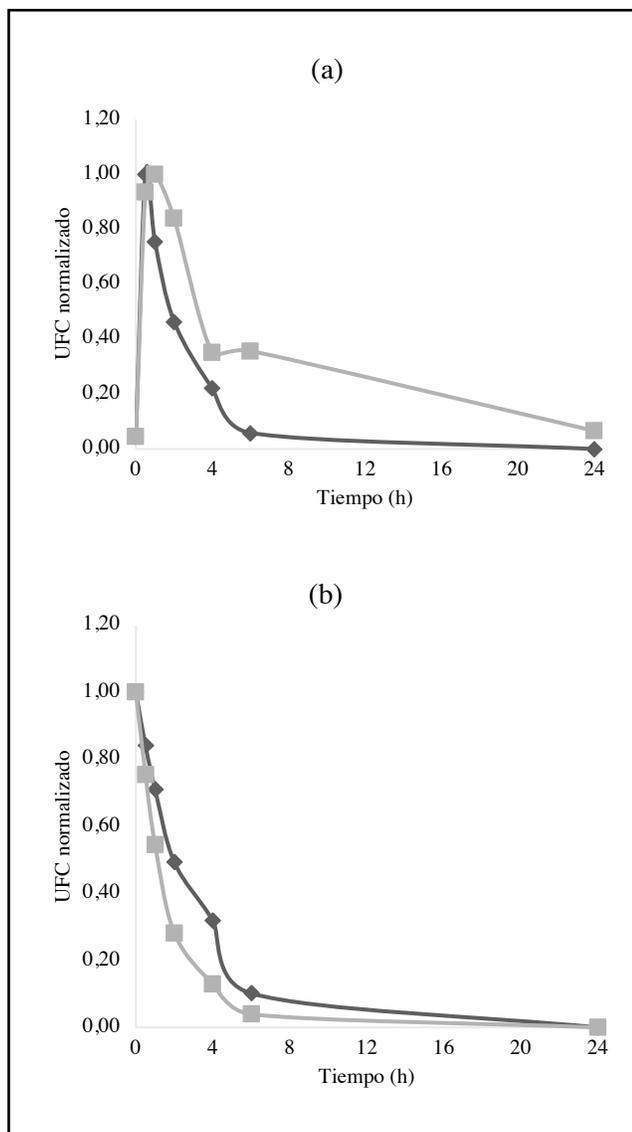


Figura 2. Curva de crecimiento de (a) *Salmonella* spp y (b) *Escherichia coli* frente a extractos alcohólicos de EM naranja (rombos sombreados) y EA maracuyá (cuadrados sombreados) al 0,1%

La inhibición total de *Rhizopus* spp y *Penicillium* sp se da a partir de las 4 y 6 horas respectivamente (Figura 3) mediante el empleo de extractos alcohólicos tanto de EM naranja como de EA maracuyá a una concentración del 0,1%.

Carrillo-Inungaray et al. (2006) mostraron que la inhibición de *Penicillium digitatum* y *Rhizopus oryzae* en presencia de soluciones con solutos de carácter orgánico e inorgánico se debe a la disminución de la actividad de agua. Posiblemente, la presencia de compuestos fenólicos podría producir cambios de actividad de agua que también contribuyan a la inhibición de los microorganismos.

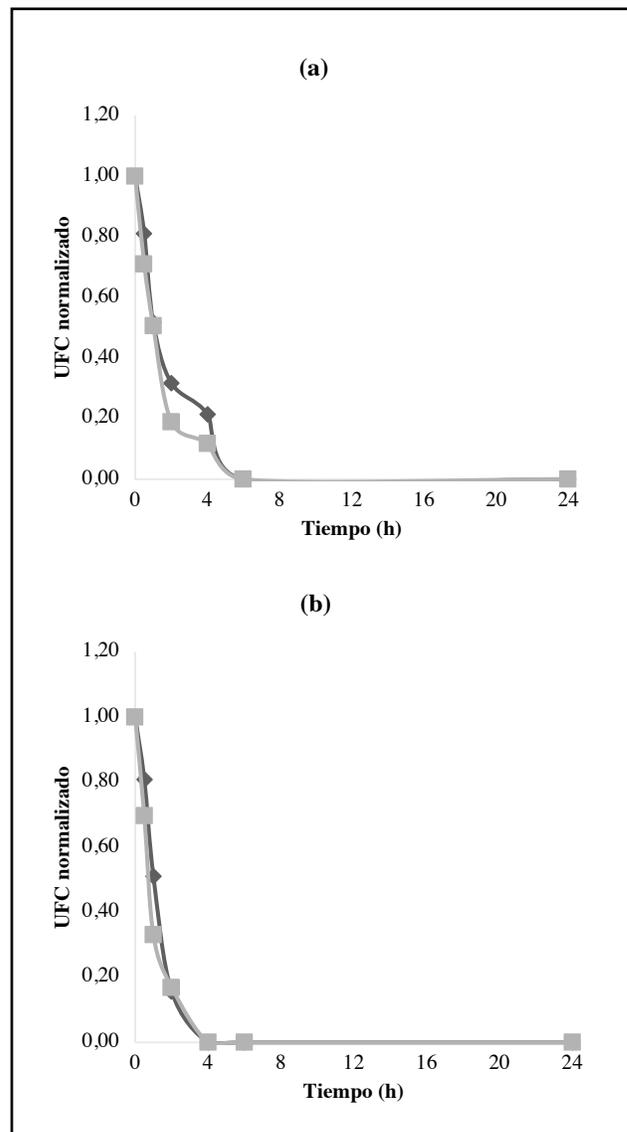


Figura 3. Curva de crecimiento de (a) *Penicillium* sp y (b) *Rhizopus* spp frente a extractos alcohólicos de EM naranja (rombos sombreados) y EA maracuyá (cuadrados sombreados) al 0,1%

CONCLUSIONES

Soluciones de extractos alcohólicos en concentraciones del 0,1%, de exocarpo-mesocarpio de naranja y epicarpio-albedo de maracuyá, tuvieron el mayor poder inhibitorio frente a *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Penicillium* sp, y *Rhizopus* spp. El método de difusión de discos mostró que las bacterias fueron más inhibidas por los extractos del exocarpo-mesocarpio de la naranja y los del epicarpio-albedo del maracuyá en relación a los hongos, con inhibiciones completas entre las 6 y 24 h. Por otro lado, se observó que la inhibición completa de los hongos se dio entre las 4 y 6 h, por acción de ambos extractos.

LITERATURA CITADA

- Abud-Blanco, K., Bustos-Blanco, L., Covo-Morales, E., Fang-Mercado, L. 2015. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos sulfonados en el sistema de conductos radiculares. Revisión sistemática. Revista CSV. 7(2): 53-60.
- Aernan, P., Aondofa, T., Angbian, T. 2013. In-Vitro Antibacterial Activity of Leaf and Stem Extract of *Passiflora edulis* (Passion Fruit) Planted in Federal University of Agriculture Makurdi, Central Nigeria. International Journal of Science and Research. 5: 499-503
- Alara, O., Abdurahman, N., Ukaegbu, C. 2018. Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 11: 1-6
- Alara, O., Abdurahman, N. 2019. Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa* calyces: kinetic modelling and process intensification Ind. Crop. Prod. 137: 528-535
- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Perez- Álvarez, J., Fernandez-Lopez, J. 2010. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos de extracto de mirto. CyTA- Journal of Food. 8(2): 95-101.
- Carrillo-Inungaray, M., Ramírez-Zapata, M., Martínez-Castilleja, J. 2006. Efecto de solutos sobre el crecimiento de hongos deteriorativos de alimentos. Efecto de solutos sobre los parámetros de crecimiento de moldes de alimentos de alimentos. CyTA- Journal of Food. 5(2):142-146.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44-A2
- Corzo, D. 2012. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 43(3): 66-70
- Christ-Ribeiro, A., Graça, C., Kupski, L., Badiale-Furlong, E., de Souza-Soares, L. 2019. Cytotoxicity, antifungal and antimycotoxins effects of phenolic compounds from fermented rice bran and *Spirulina* sp. Process Biochemistry. 80: 190-196
- De Zordi, N., Cortesi, A., Kikic, I., Moneghini, M., Solinas, D., Innocenti, G., Portolan, A., Baratto, G., Dall'Acqua, S. 2014. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis: a central composite design approach. J. Supercrit. Fluids. 95: 491-498. DOI:https://10.1016/j.supflu.2014.10.006
- Do Espírito Santo, A., Perego, P., Convertí, A., Oliveira, M. 2012. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. LWT - Food Science and Technology. 47(2): 393-399.
- Espinosa, A., Santacruz, S. 2017. Phenolic compounds from the peel of *Musa Cavendish*, *Musa acuminata* and *Musa cavandanaish*, Ecuador. Revista Politécnica 38(2): 69-74
- Gonzales, N. 2007. Elaboración de galletas con harina de bagazo de naranja. Tesis Licenciatura. UAEH. Hidalgo, Mexico. p 82
- Kim, S., Shin, K. 2012. Antimicrobial Activity of Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliolate*) Seed Extracts on Gram-Positive Foodborne Pathogens. Korean J. Food & Nutr. 25: 284-290
- Leão, M., Sampaio, L., Pagani, C., Da Silva, M. 2014. Odor potency, aroma profile and volatiles composition of cold pressed oil from industrial passion fruit residues. Industrial Crops and Products. 58: 280
- Londoño-Londoño, J., Sierra, J., Álvarez, R., Restrepo, A., Pássaro, C. 2012. Aprovechamiento de los subproductos cítricos. Medellín, Colombia, Corporación Universitaria Lasallista. P 367.
- Mohanasundari, C., Natarajan, D., Srinivasan, K., Umamaheswari, Ramachandran, A. 2007. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. – a common exotic medicinal plant. African Journal of Biotechnology. 6: 2650 – 2653.
- Ojeda, F., Cáceres, O. 2002. Principales avances en la utilización de los subproductos agroindustriales. Pastos y Forrajes. 25(1): 21
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M., Del-Toro-Sánchez, C. 2013. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* risso) y determinación de su actividad antioxidante. Biotecnia. 15(3): 18-22.
- Plaza, M. 2018. Análisis del comportamiento de consumo de pulpa congelada de frutas exóticas ecuatorianas en la ciudad de Guayaquil. Tesis. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Guayaquil. EC.
- Puupponen, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman, K. 2001.

- Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 494-507
- Rentería, J. 2014. Procesamiento de frutas de maracuyá (*Pasiflora edulis*) para obtención de pectina. Tesis Ingeniería. UTMACH. Machala. EC. p 55.
- Shirzad, H., Niknam, V., Taheri, M., Ebrahimzadeh, H. 2017. Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC-ESI-DAD-MS. *J. Food Sci. Technol.* 54: 2361-2371. DOI: <https://10.1007/s13197-017-2676-7>
- Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49-55
- Tahera, J., Feroz, F., Das Senjuti, J., Kanta Das, K., Noor. R. 2014. Demonstration of Anti-Bacterial Activity of commonly available Fruit Extracts in Dhaka, Bangladesh. *American Journal of Microbiological Research*. 2: 68-73
- Tenea, G., Lara, M. 2019. Compuestos Antimicrobianos Producidos por *Weissella confusa* Cys2-2 inhiben el crecimiento de bacterias gram-negativas. *CyTA - Journal of Food*. 17(1): 105-111