

Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de citronela y su sinergia con veneno de serpiente para el control de fitopatógenos en la industria agroalimentaria

Antimicrobial activity evaluation of citronella essential oil and its synergy with snake venom for the control of phytopathogens in the agro-food industry

Leidy Johanna Gómez-Sampedro¹

Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia

Diego Segundo Deossa Vásquez²

Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia

Laura María Reyes Méndez³

Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia

Luz Marina Gómez-Álvarez⁴

Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia

Resumen

La contaminación por bacterias fitopatógenas ha sido un problema persistente tanto en Colombia como a nivel mundial, afectando la producción alimentaria y, por ende, la competitividad, la seguridad y la soberanía alimentaria. Las infecciones causadas por fitopatógenos son responsables de entre el 20 % y el 40 % de las pérdidas globales en la producción agrícola debido a enfermedades en plantas. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de citronela (AEC) y su efecto sinérgico con péptidos antimicrobianos. El AEC se extrajo mediante destilación por arrastre de vapor de agua y se evaluó su actividad

¹ Grupo de investigación Giepronal, Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería.
<https://orcid.org/0000-0001-9078-7051/> leidyj.gomez@unad.edu.co

² Grupo de investigación Giepronal, Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería, dilusadi@gmail.com

³ Laboratorio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario – LIDA. <https://orcid.org/0000-0002-3782-8747/> laura.reyes@unad.edu.co

⁴ Grupo de Investigación Fitosanidad y Control Biológico, <https://orcid.org/0009-0007-0554-2107/> lgomez@cib.org.co

antimicrobiana frente a *Pectobacterium sp.* y *Xanthomonas campestris* utilizando la prueba de microdilución en caldo. Se analizaron distintas concentraciones del AEC tanto de manera aislada como en combinación con una biopelícula formulada por el equipo de investigación. Además, se probó el potencial antibacteriano del AEC mezclado con venenos de tres especies de serpientes (*Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii* y *Bothrops asper*), previamente identificados como fuentes de compuestos antibacterianos. Los resultados mostraron que el AEC tiene una alta actividad inhibidora frente a ambas bacterias, con un mayor efecto contra *X. campestris*, obteniendo un IC₅₀ promedio de 1.08 mg/mL. Al combinar el AEC con los venenos de serpiente, la actividad antibacteriana se potenció alcanzando una inhibición cercana al 100 % frente a ambas bacterias. Estos hallazgos sugieren que el AEC podría ser una alternativa prometedora para el desarrollo de tratamientos antibacterianos en cultivos.

Palabras clave: biopelícula, bioprospección, compuestos antimicrobianos, fitoquímicos.

Abstract

Phytopathogenic bacterial contamination has been a persistent problem in Colombia and worldwide, affecting food production and, consequently, competitiveness, food security, and food sovereignty. Infections caused by phytopathogens account for between 20% and 40% of global agricultural production losses due to plant diseases. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of citronella essential oil (AEC) and its synergistic effect with antimicrobial peptides. AEC was extracted by steam distillation and its antimicrobial activity was assessed against *Pectobacterium sp.* and *Xanthomonas campestris* using the broth microdilution assay. Different concentrations of AEC were analyzed both alone and in combination with a biofilm formulated by the research team. In addition, the antibacterial potential of AEC mixed with venoms from three snake species (*Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii*, and *Bothrops asper*), previously identified as sources of antibacterial compounds, was tested. The results showed that AEC has potent inhibitory activity against both bacteria, with a greater effect against *X. campestris*, yielding an average IC₅₀ of 1.08 mg/mL. When AEC was combined with snake venoms, the antibacterial activity was enhanced, reaching nearly 100 % inhibition against both bacteria. These findings suggest that AEC could be a promising alternative for the development of antibacterial treatments in crops.

Keywords: Antibacterial activity, biofilm, citronella, phytopathogens.

1. Introducción

Las infecciones asociadas a fitopatógenos son responsables del 20 al 40 % del total de pérdidas en producción ocasionadas por enfermedades en plantas, las cuales generan pérdidas económicas cercanas a los 40 billones de dólares al año a nivel mundial (Savary *et al.*, 2012). Este tipo de contaminación se da naturalmente en los cultivos, principalmente cuando se tienen cambios de temperatura extremos o aumento de humedad por invierno, o por malas prácticas en el cuidado de los cultivos. El uso de compuestos de base biológica como extractos de plantas puede ser una alternativa a los antimicrobianos utilizados actualmente para controlar los hongos y bacterias fitopatógenas, ya que constituyen una fuente rica de compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides, quinonas, taninos, alcaloides, saponinas, entre otros (Cruz-Trujillo *et al.*, 2021). Particularmente la citronela ha sido estudiada en la última década, por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, destacando su eficacia contra una variedad de patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Magnaporthe oryzae* (Balendres & De la Cueva, 2019; Zhou *et al.*, 2022). Por otro lado, los venenos de serpientes han demostrado un potencial para el hallazgo de componentes antimicrobianos, recientemente se describió la actividad antibacteriana del veneno de víboras colombianas sobre fitopatógenos como *Xanthomonas* del cultivo de frutas de exportación (Núñez-Rangel *et al.*, 2023). Con el propósito de determinar si la combinación de dos productos naturales mejora su efecto antimicrobiano, el presente trabajo evaluó el potencial del Aceite de Citronela (AEC), y su sinergia con el veneno de: *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii* y *Bothrops asper*, en su actividad antimicrobiana sobre fitopatógenos de interés en la industria alimentaria.

2. Metodología

2.1 Materiales

Para la obtención del aceite esencial se utilizaron hojas de citronela sembrada y cosecha en la vereda Lourdes de Santuario, Antioquia, Colombia; las cuales fueron secadas a temperatura ambiente durante 12 horas previo su uso en el proceso.

Los venenos liofilizados de *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii* y *Bothrops asper* fueron suministrados por el serpentario de la Universidad de Antioquia.

2.2 Extracción del aceite esencial de citronela

Las hojas de citronela se usaron para la extracción del AEC, mediante arrastre por vapor no saturado, con una posterior condensación en un serpentín a contra reflujo de agua fría. Finalmente, el aceite fue separado del hidrolato (fase acuosa) por diferencia de densidades.

2.3 Preparación de la solución filmogénica

Las soluciones formadoras de películas fueron realizadas empleando la formulación establecida previamente por Reyes *et al.* (2021). Como macromolécula se utilizó gelatina tipo A, glicerol como plastificante y Tween 80 como emulsificante. Considerando los niveles de incorporación de los compuestos activos.

2.4 Prueba de inhibición por el método microdilución en caldo

Se empleó el método de microdilución en caldo colorimétrico siguiendo el protocolo descrito por Gómez-Sampedro (2013), con algunas modificaciones. Para la preparación del inóculo, cada cepa bacteriana (*Pectobacterium sp.* y *Xanthomonas campestris*) fue incubada durante 24 h a 37 °C en caldo Mueller-Hilton, y ajustada a una densidad final de 10⁸ UFC/mL (estándar de McFarland de 0.5). Se realizaron diluciones sucesivas del AEC entre 6 al 0.37 % (p/v) diluyéndolo tanto en dimetilsulfóxido (DMSO) como en la solución filmogénica. Se utilizaron microplatos de 96 pozos fondo plano, mezclando en cada pozo 20 µL del aceite, 80 µL de caldo Mueller-Hinton y 100 µL del inóculo. Como control se usó el medio de cultivo y la solución filmogénica, y cada muestra se evaluó por triplicado. Los microplatos fueron incubados a 37 °C durante 4 h. La lectura se realizó adicionando 20 µL de colorante vital bromuro de 3,4,4-di-methylthiazolyl-2,5 diphenyltetrazolium (MTT) a 0.8 mg/mL a cada uno de los pozos, e incubando a 37 °C durante 1 h, para permitir a las células vivas metabolizar el MTT. Finalmente se realizó la medición de la absorbancia a 660 nm, mediante un lector multipocillo Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y los resultados son reportados como porcentaje de inhibición con respecto al control.

Adicionalmente, se evaluó la actividad antibacteriana del AEC en la solución filmogénica, mezclado con veneno de *Micrurus mipartitus* (MM) y *Micrurus dumerilii* (MD) y *Bothrops asper* (BA), lo anterior con el fin de identificar posibles efectos sinérgicos. Así, se adicionó en cada pozo de la microplaca 20 µL de una mezcla que contenía AEC a una concentración de 1.5 % y cada uno de los venenos a una

concentración de 0.24 mg/mL, se ajustó a un volumen de 200 μ L con el medio de cultivo y se continuo con el procedimiento según lo descrito previamente.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente empleando el software Stagraphics® Centurion XV (Virginia, EE. UU.). Los valores se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias entre las medias se identificaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido un test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey, con un nivel de significación de 0,05 (95 % de confianza).

3. Resultados y discusión

El AEC mostró actividad antimicrobiana dosis dependiente sobre *Pectobacterium* sp y *Xanthomonas campestris* (Figura 1) siendo mayor el efecto sobre esta última. El efecto fue observado tanto diluido en DMSO (E) como incorporado a la solución filmogénica para biopelícula (PE), con IC50 similares para ambas bacterias (Tabla 1). Estos resultados sugieren que la solución filmogénica no modifica la actividad antibacteriana de la citronela frente a las dos bacterias evaluadas, lo que demuestra la viabilidad de utilizar estas biopelículas como un medio de aplicación del biocompuesto.

Estudios previos señalan que el AEC actúa mediante desestabilización de las membranas celulares (descrito principalmente en hongos), inhibición de la biosíntesis del ergosterol e inducción de las enzimas de defensa de las plantas, que en conjunto contribuyen al efecto antimicrobiano (Balendres & De la Cueva, 2019; Zhou *et al.*, 2022).

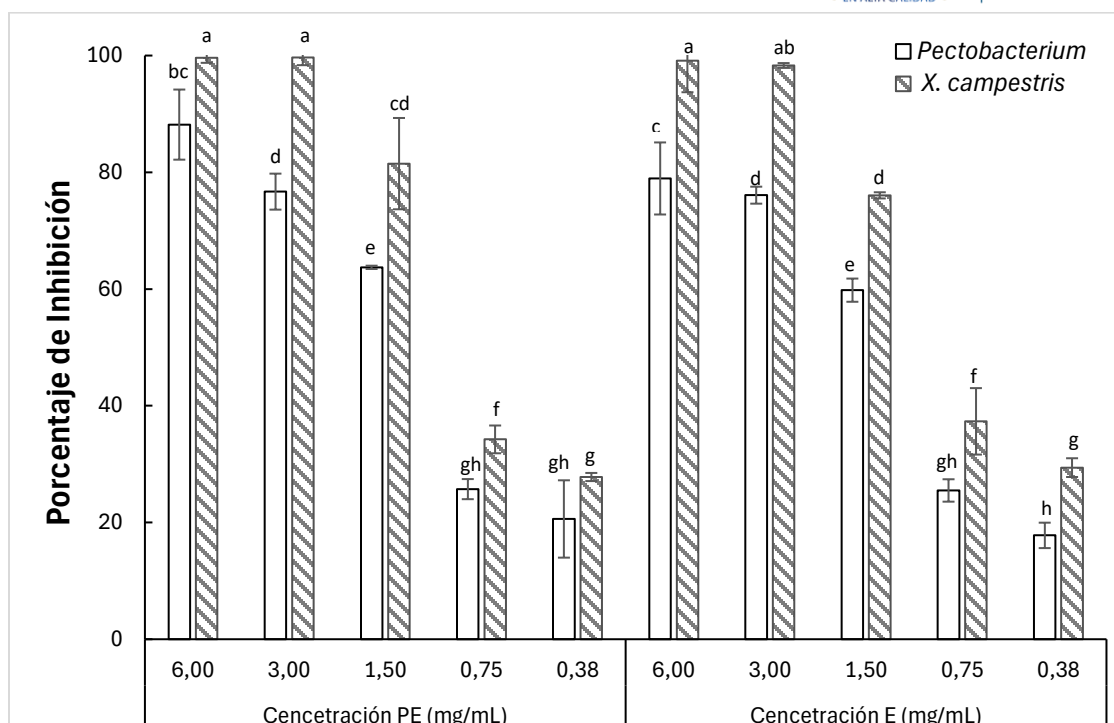


Figura 1. Actividad antibacteriana del AEC diluido en la solución filmogénica (PE) y diluido en DMSO (E).

a-h Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 1. IC_{50} de la biopelícula funcionalizada con aceite esencial de citronela y del aceite esencial diluido en DMSO

Microorganismo	IC 50 (%)	
	Aceite esencial en biopelícula (mg/mL)	Aceite esencial en DMSO (mg/mL)
<i>Pectobacterium</i>	$1,21 \pm 0,05^a$	$1,28 \pm 0,01^a$
<i>X. campestris</i>	$0,92 \pm 0,03^b$	$0,93 \pm 0,17^b$

a-b Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Al evaluar la mezcla de AEC con los venenos de serpiente, se observó una mejora en la inhibición del efecto antimicrobiano, alcanzando casi el 100 % (Figura 2). Resultados similares fueron obtenidos cuando se preparó la solución filmogénica con esta mezcla. El efecto es especialmente marcado sobre *Pectobacterium* sp., donde los componentes por separado presentan menor actividad a las concentraciones ensayadas (AEC: $63,7 \pm 0,28$ %; venenos: 6–9 %), mientras que las mezclas exhiben inhibiciones del 94–100 %. En conjunto, estos datos evidencian un efecto sinérgico entre el AEC funcionalizado en PE y las proteínas de veneno evaluadas. Estos hallazgos subrayan la importancia de explorar combinaciones de

bioactivos para maximizar la eficacia antimicrobiana, un enfoque que ha mostrado resultados prometedores en estudios previos sobre sinergismo (Vaou *et al.*, 2022).

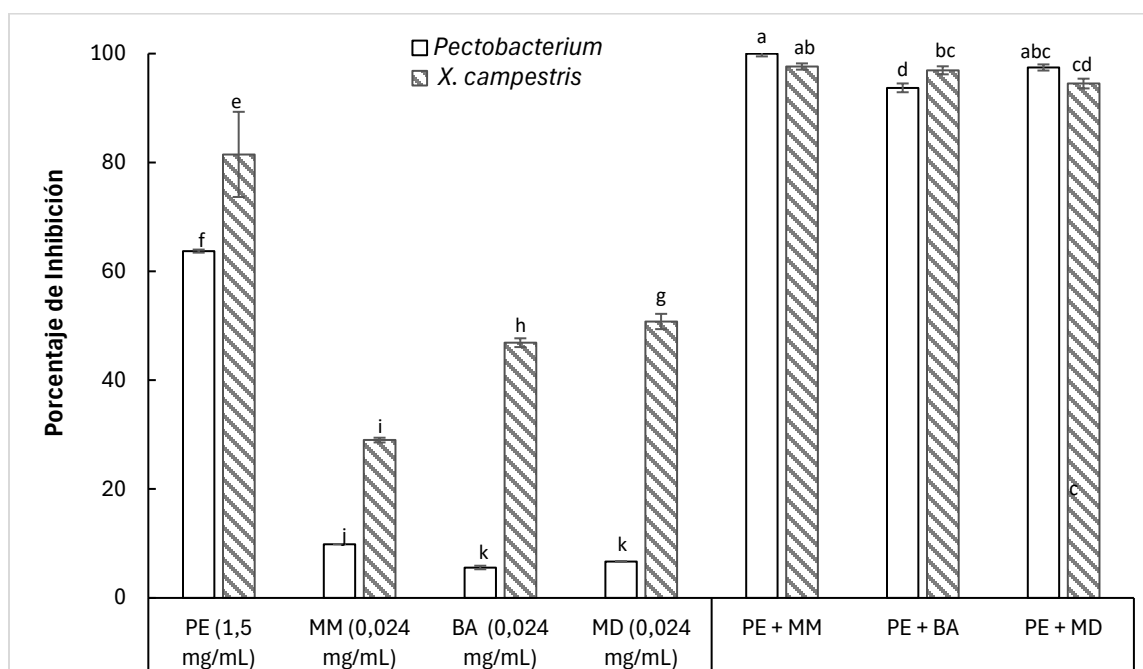


Figura 2. Actividad antibacteriana del AEC diluido en la solución filmogénica (PE) y venenos completos de *Micrurus mipartitus* (MM) y *Micrurus dumerilii* (MD) y *Bothrops asper* (BA).

a-k Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4. Conclusiones

El aceite esencial de citronela (AEC) mostró actividad antibacteriana y una respuesta dosis-dependiente frente a *Pectobacterium sp.* y *Xanthomonas campestris*. La incorporación en la matriz filmogénica (PE) no deterioró el desempeño del AEC: los IC_{50} se mantuvieron en el mismo orden de magnitud (0,9 - 1,2), lo que respalda el uso de biopelículas como vehículo de aplicación del biocompuesto. Además, la combinación del AEC con venenos de *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii* y *Bothrops asper* mostró incrementos estadísticamente significativos de la inhibición bacteriana, alcanzando valores cercanos al 100 % y superando el efecto de cada componente por separado. El beneficio fue especialmente marcado en *Pectobacterium sp.* En conjunto, los resultados evidencian un efecto sinérgico entre el AEC y los venenos, y se perfila como una alternativa viable para el control de fitopatógenos de interés agroalimentario, con potencial para reducir el uso de plaguicidas sintéticos y contribuir a prácticas agrícolas más sostenibles.

Agradecimientos

Los autores agraden al grupo de investigación en Toxinología, alternativas terapéuticas y alimentarias de la Universidad de Antioquia (UdeA), y al Ministerio de Ciencia y Tecnología Colombia (Minciencias) proyecto número 82487.

Referencias

- Balendres, M. A. O. & De la Cueva, F. M. (2019). Growth-inhibiting activity of citronella essential oil to multiple fungal plant pathogens. *bioRxiv*, 860718. <https://doi.org/10.1101/860718>
- Cruz Trujillo, J. J., Hernández Gutiérrez, V., Sánchez Leal, L. C., & Fuentes Quintero, L. S. (2021). Alternativas de control biorracionales sobre *Phytophthora infestans*, fitopatógeno causante de la gota en papa. *Revista Nova*, 19(36). <https://revistas.universidadmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1832>
- Gómez Sampedro, L. J. (2013). *Propiedades biológicas de los hidrolizados enzimáticos de plasma de bovino: actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana*. (Tesis de maestría). Universidad de Antioquia. <http://hdl.handle.net/10495/3907>
- Núñez-Rangel, V., Rey-Suárez, P., Serna, A., Gómez-Robles, J., Rey-Torres, A., & Morales, E. (2023). Antimicrobial activity of *Bothrops asper* and *Porthidium nasutum* venom on purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) phytopathogens. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 17(3).
- Reyes, L. M., Landgraf, M., & Sobral, P. J. A. (2021). Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils. *Food Packaging and Shelf Life*, 27, 100607. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100607>
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4), 519-537.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2022). Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive

Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. *Antibiotics*, 11(8), 10.3390. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>

Virrey, E. C. (2023). Antifungal activity of Citronella essential oil against stem-end rot of mango. *Journal of Applied Horticulture*, 25(2), 130-134. <https://doi.org/10.37855/jah.2023.v25i02.23>

Zhou, A., Li, R., Mo, F., Ding, Y.-B., Li, R., Guo, X., Hu, K., & Li, M. (2022). Natural Product Citronellal can Significantly Disturb Chitin Synthesis and Cell Wall Integrity in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Fungi*, 8(12), 1310. <https://doi.org/10.3390/jof8121310>