

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

**Evaluación del efecto antifúngico y antibacteriano del propóleo
de Zamorano contra los hongos *Fusarium spp.*, *Colletotrichum spp.*, y
las bacterias *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.***

Elena Victoria Máximo Salgado

Eduardo Antonio Serrano Orantes

Asesores

Carolina Avellaneda Barbosa, Ph.D.

Rogelio Trabanino, M.Sc.

Honduras, agosto 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidente y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora del Departamento Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Anexos	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Materiales y Métodos	12
Obtención de Propóleo	12
Evaluación de Contaminantes	12
Organismo Fitopatógenos Empleados	13
Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP)	13
Preparación de Medio para Establecimiento de los Hongos Fitopatógenos	14
Control para Hongos	14
Preparación de Medio para Establecimiento de Bacterias Fitopatógenas	15
Control para Bacterias	15
Diseño Experimental	16
Resultados y Discusión	17
Efecto de propóleo en crecimiento de hongo	17
Evaluación del Crecimiento de Fusarium spp. en Medio de Cultivo PDA + EEP.	17
Evaluación del Crecimiento de Colletotrichum spp. en Medio de Cultivo PDA + EEP.	18
Efecto del Propóleo en Crecimiento de Bacterias	19
Evaluación del Crecimiento de Pseudomonas spp. en Medio de Cultivo AN + EEP.	19
Evaluación del Crecimiento de Xanthomonas Spp. en Medio de Cultivo AN + EEP.	21
Conclusiones	23

Recomendaciones..... 24

Referencias..... 25

Anexos..... 28

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Concentraciones establecidas para elaboración de extractos etanólicos de propóleo.....	14
Cuadro 2 Crecimiento de micelio de <i>Fusarium</i> spp. en milímetros (mm) en medios de cultivo con extractos etanólicos de propóleo a distintas concentraciones.	17
Cuadro 3 Crecimiento de micelio de <i>Colletotrichum</i> spp. en milímetros (mm) en medios de cultivo con extractos etanólicos de propóleo a distintas concentraciones.	18
Cuadro 4 Halo de inhibición de extractos etanólicos de propóleo en distintas concentraciones ante <i>Pseudomonas</i> spp. en milímetros (mm) a las 24 horas.	20
Cuadro 5 Halo de inhibición de extractos etanólicos de propóleo en distintas concentraciones ante <i>Xanthomonas</i> spp. en milímetros (mm) a las 24 horas.	21

Índice de Anexos

Anexo A Protocolo para la elaboración de agar papa dextrosa (PDA)	28
Anexo B Protocolo para la elaboración de Agar Nutriente (AN)	29
Anexo C Protocolo para la elaboración de Luria Broth (LB).....	30
Anexo D Control Bacillus subtilis y EEP al 33% con 15 días de reposo ante Fusarium spp. durante 18 días.	31
Anexo E Control Bacillus subtilis y EEP al 100 % con 15 días de reposo ante Fusarium spp. durante 18 días.	32
Anexo F Control Bacillus subtilis y EEP al 33% con 7 días de reposo ante Colletotrichum spp. durante 18 días.	33
Anexo G Control Bacillus subtilis y EEP al 100% con 15 días de reposo ante Colletotrichum spp. durante 18 días.	34
Anexo H Control Tetraciclina y EEP al 33% con 15 días de reposo ante Pseudomonas spp. a las 24 horas.	35
Anexo I Control Tetraciclina y EEP al 50% con 15 días de reposo ante Pseudomonas spp. a las 24 horas.	36
Anexo J Control tetraciclina y EEP al 100% con 7 días de reposo ante Xanthomonas spp. a las 24 horas.	37

Resumen

El propóleo es uno de los subproductos de la miel conocido por sus atributos antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, antioxidantes y otros que lo permiten ser considerado como una alternativa para el control de fitopatógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las propiedades biológicas de extractos etanólicos de propóleo de Zamorano (EEP) *in vitro* contra los hongos *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., y las bacterias *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., comparándolos con productos comerciales como *Bacillus subtilis* cepa QST713 SC y el antibiótico tetraciclina. Se realizaron concentraciones volumétricas de gramos de propóleo sobre mililitros de etanol a partir de 33%, 50%, 75% y 100%. Se evaluó el diámetro de crecimiento micelial y halos de inhibición en diferentes medidas de tiempo con un diseño completamente al azar, en dónde se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en los fitopatógenos evaluados. Basado en los resultados del estudio, *Colletotrichum* spp. mostró ser el fitopatógeno evaluado más susceptible al efecto de propóleo y todos los tratamientos ante *Fusarium* spp. destacaron en el control del crecimiento micelial del hongo. Para *Pseudomonas* spp., el tratamiento con 7 días de reposo al 100% y en *Xanthomonas* spp. los tratamientos al 33.3% y 50% destacaron en la inhibición bacteriana. Los extractos etanólicos de propóleo presentaron actividad antifúngica y antibacteriana sobre los patógenos evaluados y demuestran su capacidad de utilizarse como alternativa a productos químicos.

Palabras clave: actividad biológica, crecimiento micelial, EEP, inhibición, propóleo.

Abstract

Propolis is one of the honey by-products known for its antimicrobial, antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, and other attributes that allow it to be considered as an alternative for the control of phytopathogens. The objective of this study was to evaluate the effect of the biological properties of ethanolic extracts of Zamorano propolis (EEP) *in vitro* against the fungi *Fusarium* spp, *Colletotrichum* spp., the bacteria *Pseudomonas* spp., and *Xanthomonas* spp. by comparing them with commercial products such as *Bacillus subtilis* strain QST713 SC and the antibiotic tetracycline. The volumetric concentrations of grams of propolis on milliliters of ethanol were made from 33%, 50%, 75% and 100%. The mycelial growth diameter and inhibition halos were evaluated at different time measures, with a completely randomized design, where significant differences were found between treatments in the phytopathogens evaluated. Based on the results of the study, *Colletotrichum* spp. proved to be the phytopathogen most susceptible to the effect of propolis and all treatments against *Fusarium* spp. stood out in the control of mycelial growth of the fungus. For *Pseudomonas* spp. the treatment with 7 days of rest at 100% and for *Xanthomonas* spp. the treatments at 33.3% and 50% were outstanding in bacterial inhibition.

Keywords: biological activity, EEP, inhibition, mycelial growth, propolis.

Introducción

La importancia de las enfermedades en las plantas se debe al daño que generan en el material vegetal, viéndose reflejado en un bajo rendimiento productivo y económico, destacándose las enfermedades producidas por hongos, bacterias, virus y nemátodos, afectando el rendimiento y potencial del cultivo. En la actualidad, se han descrito aproximadamente 8,000 especies de hongos patógenos en plantas y son de particular importancia aquellos relacionados con la calidad de los cultivos y sus productos, lo cual depende entre otros factores, de la protección que tengan éstos contra el ataque de dichos patógenos. En el caso de las pérdidas por bacterias en cultivos pueden ser severas en zonas tropicales o subtropicales y existen aproximadamente 60 especies de bacterias reconocidas que incluyen alrededor de 300 subespecies o patovares (Orozco 2000).

El uso de plaguicidas ha tenido impactos negativos tanto en la salud humana como en el medio ambiente, contaminando suelos, agua, aire y todo el cuerpo de organismos presentes. Para enfrentar esa problemática se ha implementado la agricultura sostenible, que se orienta a la búsqueda de sistemas agrícolas equilibrados, los cuales buscan no agotar los recursos naturales, preservando agua, nutrientes y fomentando la biodiversidad. Según (Duncan et al. 2020), la escala y complejidad de garantizar la alimentación a una población mundial en crecimiento, es un desafío que requiere un enfoque sistémico, holístico y disruptivo, con un pensamiento sistémico que hasta ahora ha hecho falta, por lo que es necesario repensar y rediseñar los procedimientos de gestión de los sistemas alimentarios.

Entre estas alternativas se encuentra el uso del propóleo, lo que se define como el producto elaborado por diferentes especies de abejas a partir de resinas, gomas y exudados de diversas especies vegetales (Ghisalberti 1979; Bankova et al. 2000). El uso de propóleo se remonta al menos 300 años A.C. como remedio en la medicina natural y ha captado la atención a investigadores por su cantidad de atributos. Según Gómez-Caracava et al. (2006), una vez recolectado, el material es enriquecido con secreciones salivares y enzimáticas y es utilizado para construir y reparar la colmena.

Además de ser material de construcción, es el “arma química” de las abejas contra microorganismos patógenos; la presencia de esta sustancia al interior de la colmena proporciona un ambiente inadecuado para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos (Kartal et al. 2003).

El propóleo tiene funciones tan diversas como preparar las celdas reales en condiciones asépticas, barnizar las paredes de las cavidades o embalsamar enemigos introducidos a la colmena. Éste puede ser recolectado por raspado con espátula o con trampas colocadas debajo del entretecho (Vit 2004).

La composición química del propóleo depende en gran medida de su origen botánico, la variedad de la abeja, la época y técnicas de recolección. La especificidad de la flora local en diferentes zonas geográficas es la que determina la calidad, composición y actividad biológica del propóleo. Por ejemplo, en las zonas templadas, una de las fuentes más comunes de propóleo para las abejas es el álamo, principalmente *Populus nigra*. Por lo tanto, el propóleo europeo contiene compuestos fenólicos típicos de las yemas del álamo. Propóleo de zonas sub tropicales o tropicales tal como Brasil, presentan compuestos fenólicos derivados principalmente de *Baccharis dracunculifolia*, variando así en diferentes regiones (Bankova 2009).

El propóleo es un conjunto de sustancias gomosas y resinosas que varía de acuerdo con su origen, el cual se compone de resinas y bálsamos (50-55%), cera de abeja (30 a 40%), aceites esenciales o volátiles (5 a 10%), polen (5%) y otros materiales orgánicos (5%). En este producto natural se han identificado más de 240 sustancias, de las cuales 50% son compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas y triglicéridos fenólicos) con acción farmacológica (Huang et al. 2014).

La mayor proporción de constituyentes de los propóleo son del tipo fenólico; entre los que se encuentran los flavonoides como principales representantes (Bankova et al. 1982). No obstante, la máxima capacidad fungicida se asocia siempre con el grupo de isoflavonoides; se ha considerado la posibilidad de utilizar estos compuestos como sustitutos de fungicidas convencionales. Por ello, se

han analizado las relaciones estructura/actividad, así como los mecanismos de acción de los isoflavononas (Weidenborner et al. 1990). (Pineda et al. 2010) evaluaron el efecto antifúngico del propóleo en diferentes concentraciones sobre aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* y demostraron el efecto inhibitorio del propóleo sobre el crecimiento micelial, correlacionado a la presencia de compuestos flavonoides en el extracto.

En el caso de las propiedades antimicrobianas de los extractos etanólicos de propóleo obtenidos de abejas *Apis mellifera*, se atribuyen a los flavonoides galangina y pinocembrina y derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y cafeico. El ácido cinámico y algunos flavonoides desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndolas más vulnerables al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos (Farre et al. 2004). La actividad enzimática de las bacterias para reducir sus efectos sobre los sistemas biológicos es susceptible a propóleo, tanto bacterias Gram-positivas (+) como Gram-negativas (-) (Zeighampour et al. 2014). (Choi et al. 2006), estudiaron la actividad antimicrobiana de extractos de propóleo de algunas regiones de Corea y encontraron actividad inhibitoria sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* y *C. albicans*.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de inhibición de los extractos etanólicos de propóleo de Zamorano sobre organismos fitopatógenos: evaluar su efecto antifúngico en *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. y antibacteriano, sobre *Pseudomonas* spp. y *Xanthomonas* spp.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en los meses de febrero a mayo del 2023 en el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el Km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Honduras; con una precipitación de 1,100 mm, temperatura promedio de 27 °C y una altura de 800 msnm.

Obtención de Propóleo

El propóleo fue proporcionado por la Planta Apícola de Zamorano, siendo recolectado entre las fechas de octubre a diciembre del 2022 en el apiario ubicado en Monte Redondo. Las abejas pertenecientes a la zona obtienen propóleo a partir de todas las especies botánicas presentes en la zona, con una capacidad de vuelo de 5km. Planta Apícola suministró 500 gramos de propóleo para realizar el experimento. Éste se llevó al laboratorio de Fitopatología dónde se mantuvo en refrigeración hasta que se llevara a cabo la limpieza y remoción de impurezas y todo aquel contaminante físico, como residuos de madera, restos de abejas y hojas que este mismo pueda incluir.

Evaluación de Contaminantes

Antes de realizar las concentraciones de los extractos etanólicos de propóleo para los tratamientos, se tomó una muestra de 5 gramos que se pulverizó para facilitar su dilución en 45 mL de etanol. La muestra se agitó manualmente para homogeneizarla y durante el proceso, se preparó medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para hongos y el medio de cultivo Agar Nutriente (AN) específico para bacterias. En estos medios se inoculó la muestra del propóleo y fueron llevadas a incubación por tres días para hongos y por 48 horas para bacterias en sus debidas condiciones para que se pudiera desarrollar algun patógeno presente. Al momento de observación luego de su tiempo de inoculación, nos permitió conocer la condición sanitaria del propóleo, comprobando que no habían patógenos presentes que interrumpieran el desarrollo del experimento.

Organismo Fitopatógenos Empleados

Los fitopatógenos utilizados en el experimento provienen del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Los hongos utilizados fueron *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. El hongo *Fusarium* que fue utilizado en nuestra investigación fue aislado del cultivo de sandía y el hongo *Colletotrichum* fue aislado del cultivo de café en Zamorano. Éstos fueron puestos en medio de cultivo PDA para obtener trozos de 5mm e inocularlos en los tratamientos. Asimismo, las bacterias utilizadas fueron *Xanthomonas* spp., aisladas del cultivo de cebolla y *Pseudomonas* spp., aisladas del cultivo de tomate. Éstas pertenecientes al cepario, fueron puestos en medio de cultivo Agar Nutriente y se inocularon en medio Luria Broth únicamente 48 horas antes de ser expuestas a los EEP.

Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP)

Para llevar a cabo la elaboración de los extractos etanólicos de propóleo, 500 gramos de propóleo fueron llevados al congelador para facilitar su manipulación al momento de pulverizarlo en una licuadora, ya que, el propóleo a temperatura ambiente tiene una consistencia cerosa y pegajosa. El pulverizado del propóleo fue con el objetivo de diluirlo con el etanol al 70% y llevarlo al agitador orbital a 180rpm, obteniendo un extracto más homogéneo, facilitando la manipulación y distribución del propóleo en los tratamientos a evaluar. Los extractos de etanólicos de propóleo (EEP) fueron divididos en cuatro concentraciones (%P/V), partiendo de las dosis establecidas a evaluar (Cuadro 1). (Zenteno 2017), evaluó la acción fungicida del propóleo en el control *in vitro* de *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium* utilizando dosis de propóleo en concentraciones de 0% (testigo), 0.5%, 1.0% y 3%. A manera de evaluar otras dosis, para nuestra investigación, se utilizaron concentraciones al 33%, 50%, 75% y 100% de propóleo, expuestas en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Concentraciones establecidas para elaboración de extractos etanólicos de propóleo.

Extractos de Propóleo	Concentración (% P/V)	Soluto (g)	Solvente (mL)
T1	33	25	75
T2	50	33	66.6
T3	75	43	57
T4	100	50	50

Nota. Volumen Final 100mL. Soluto: propóleo. Solvente: Etanol al 70%

Al obtener las concentraciones, se dividieron en dos períodos de reposo de 7 y 15 días. Para realizar este proceso, cada una de las concentraciones se almacenó en beakers de 150 mL, estos fueron cubiertos con papel aluminio para evitar la exposición a luz, ya que un ambiente de oscuridad permite que el etanol absorba de mejor manera los compuestos fenólicos. Luego de su tiempo de reposo, se filtraron para eliminar la borra, obteniendo así, 8 extractos etanólicos de propóleo.

Preparación de Medio para Establecimiento de los Hongos Fitopatógenos

Se empleó Agar Papa Dextrosa (PDA), por su alta disponibilidad de almidones y dextrosa que son la base para el crecimiento de los hongos y levaduras, el bajo pH (3.5) presente evita el crecimiento de las bacterias. En la elaboración del medio de cultivo se siguieron en orden cronológico las actividades establecidas en el protocolo del laboratorio (Anexo A). El medio fue esterilizado a una temperatura de 121 °C durante 30 minutos con una presión de 1.05 Kg/ cm² en el autoclave del laboratorio. Al momento de agregar el EEP al medio de cultivo, se usaron beakers con una medida de 200mL, en donde se agregó 185mL PDA y 15mL del extracto de propóleo a evaluar, esta solución era llevada a un agitador magnético para lograr una uniformidad, para así poder distribuirlos en los platos Petri.

Control para Hongos

En el presente estudio, se utilizó *Bacillus subtilis* cepa QST713 SC como testigo para los tratamientos con hongos. Éste es un fungicida biológico que actúa a través de una combinación de esporas viables y lipopéptidos activos que perforan la membrana celular de los hongos fitopatógenos presentes en el suelo, colonizando las raíces de las plantas y formando una cubierta protectora,

induciendo una resistencia sistémica adquirida que le ayuda al cultivo a defenderse mejor de enfermedades y condiciones ambientales adversas. Partiendo de la dosis comercial que estipula que la dosis para este fungicida es de 1.5mL para 150mL, se utilizaron 2mL de *Bacillus subtilis* cepa QST713 SC por cada 200mL de PDA. Se inocularon trozos de 5mm de cada hongo y fueron puestos en la cámara de incubación para hongos a una temperatura de 28° C, de esta manera fueron observados y evaluados cada 3 días, por 18 días en total, comparándolo con el crecimiento micelial de los 4 tratamientos EEP.

Preparación de Medio para Establecimiento de Bacterias Fitopatógenas

Con el propósito de evaluar el efecto antibacteriano del propóleo, se preparó el medio de establecimiento para las bacterias con base al protocolo de agar nutriente del Laboratorio de Fitopatología (Anexo B). Este medio de cultivo no conllevó ninguna adición de extractos etanólicos en su composición ya que el método de evaluación para bacterias es diferente al de hongos. Se prepararon 50mL de Luria Broth (Anexo C) y fueron puestos en agitación continua por 48 horas antes de ser inoculadas para ser activadas en medio líquido. En la cámara de flujo laminar, se agregaron 100µL de cada bacteria y por medio del método de extensión con hisopos esterilizados, se esparcieron las bacterias por todo el plato Petri y para evaluar la efectividad de los EEP, se utilizaron discos remojados en cada EEP para evaluar la sensibilidad *in vitro* de las bacterias fitopatógenas midiendo su halo de inhibición, utilizando la técnica de antibiograma disco-placa. Éstos fueron colocados en una cámara de incubación de bacterias donde permanecieron a una temperatura de 37°C durante 24 horas para su evaluación.

Control para Bacterias

Para nuestro estudio, se utilizó Tetraciclina como testigo para los tratamientos con *Pseudomonas* spp., y *Xanthomonas* spp. Las tetraciclinas, naturales o semisintéticas, actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas. Son bacteriostáticas, con amplio espectro de

actividad contra una gran gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, aerobios y anaerobios (Vicente y Pérez-Trallero 2003). Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas impidiendo la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma bacteriano, uniéndose directamente a la proteína S7 de la subunidad de 30S (Goldman et al. 1983). La dosis utilizada de Tetraciclina fue de 0.1g en 10mL de agua destilada estéril y fue formulada en el Laboratorio de Fitopatología. En la cámara de flujo laminar, se agregaron 100 µmL de cada bacteria y por medio del método de extensión con hisopos esterilizados, se esparcieron las bacterias por todo el plato Petri. Se utilizaron discos remojados en Tetraciclina y por medio de la técnica de antibiograma disco-placa, se midió el halo de inhibición para compararlo con el efecto de los EEP en cada tratamiento.

Diseño Experimental

Para el análisis e interpretación de datos de dicha investigación, se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con medidas repetidas de tiempo, siendo evaluados 9 tratamientos. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento en cada patógeno evaluado.

Las variables por evaluar fueron crecimiento de micelio en milímetros (mm) en el caso de los hongos y el halo de inhibición en milímetros (mm) para las bacterias. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS® versión 9.4. Para el análisis de variables, se elaboró un análisis de varianza (ANDEVA) y para los resultados obtenidos se realizó una separación de medias utilizando una prueba de comparación múltiples Duncan. El análisis de varianza y separación de medias se realizó con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Efecto de propóleo en crecimiento de hongo

Evaluación del Crecimiento de Fusarium spp. en Medio de Cultivo PDA + EEP.

Los resultados muestran las diferencias estadísticas a lo largo de la investigación en dónde los tratamientos conteniendo extractos de propóleo retardaron el crecimiento de micelio, especialmente en los días 3, 9 y 12 dónde se observa que los tratamientos presentan mejores resultados que el control y no difieren significativamente entre sí. Todos los tratamientos fueron capaces de reducir el desarrollo del hongo inhibiendo significativamente el crecimiento de micelio de *Fusarium* spp. (Cuadro 2).

Cuadro 2

Crecimiento de micelio de Fusarium spp. en milímetros (mm) en medios de cultivo con extractos etanólicos de propóleo a distintas concentraciones durante 18 días.

Tratamiento (% P/V)	Tiempo Reposo (días)	Crecimiento de micelio (mm)					
		Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18
Control		13 b	27	42	52	57	57
T1 (33%)	7	0 a	9.3	11	21	27	42
T2 (50%)	7	3.3 a	16	19	30	36	49
T3 (75%)	7	0 a	12	16	23	30	46
T4 (100%)	7	4 a	13	15	21	23	44
T5 (33%)	15	0 a	8	16	18	26	35
T6 (50%)	15	0 a	9	17	20	26	39
T7 (75%)	15	0 a	11	17	24	35	46
T8 (100%)	15	0 a	13	18	24	31	42
CV		211.14	54.74	45.37	42.49	36.08	25.09
R ²		0.66	0.55	0.59	0.53	0.54	0.47
P		0.04	0.16	0.10	0.2	0.19	0.34

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas entre días ($P < 0.05$) según la prueba de separación de medias Duncan. EEP: Extracto

Etanólicos de Propóleo, CV: Coeficiente de Variación, R²: Coeficiente de determinación, P: Probabilidad.

Éstos resultados pueden ser explicados por (Aceves et al. 2008) cuando realizaron una investigación para evaluar la actividad fungicida del propóleo sobre *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*. En los resultados obtenidos, los extractos de propóleo tuvieron actividad fungicida con una inhibición en el crecimiento del micelio, a una concentración de 5mg/mL y 100mg/mL

respectivamente. En dónde mediante observaciones a través del microscopio, observaron qué hifas del micelio modificaron las paredes transversales, ocasionando alteración en el sistema de crecimiento y desarrollo del fitopatógeno. Los resultados de nuestra investigación muestran qué entre tratamientos etanólicos de propóleo no existen diferencias significativas, éstos difieren con los obtenidos por (Cupull-Santana et al. 2014), en dónde determinaron qué los menores crecimientos fúngicos corresponden al tratamiento de mayor concentración de propóleos. Las diferencias en la actividad antifúngica por efecto de concentración pueden estar asociadas a un mayor contenido de metabolitos bioactivos de tipo fenólico presente en el extracto (Markham et al. 1996).

Evaluación del Crecimiento de Colletotrichum spp. en Medio de Cultivo PDA + EEP.

El tratamiento control difirió significativamente de todos los tratamientos conteniendo propóleo a lo largo de la investigación, resultados que destacan la actividad antifúngica de los EEP presentando valores en crecimiento aproximados a 0 mm. Se infiere que los extractos de propóleo en sus cuatro concentraciones y ambos períodos de reposo inhibieron el crecimiento total del *Colletotrichum spp.* (Cuadro 3).

Cuadro 3

Crecimiento de micelio de Colletotrichum spp. en milímetros (mm) en medios de cultivo con extractos etanólicos de propóleo a distintas concentraciones durante 18 días.

Tratamiento (%P/V)	Tiempo de Reposo	Crecimiento de micelio (mm)					
		Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18
Control		9 b	14 b	19 b	19 b	27 b	27 c
T1 (33%)	7	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T2 (50%)	7	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T3 (75%)	7	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T4 (100%)	7	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T5 (33%)	15	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T6 (50%)	15	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T7 (75%)	15	0 a	0 a	0 a	5 a	5 a	6 ab
T8 (100%)	15	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	11 b
CV		0	0	0	225.13	197.16	159
R ²		1	1	1	0.75	0.82	0.74
P		0.0001	0.0001	0.0001	0.006	0.001	0.009

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas entre días ($P < 0.05$) según la prueba de separación de medias Duncan. EEP: Extracto

Etanólicos de Propóleo, CV: Coeficiente de Variación, R²: Coeficiente de determinación, P: Probabilidad.

(Martínez Galán 2009) realizó una caracterización fisicoquímica y evaluó la actividad antifúngica de propóleo recolectados en el Suroeste Antioqueño. Presentó que, los hongos más susceptibles al efecto del propóleo fueron los pertenecientes al género *Colletotrichum acutatum* y *gloeosporioides*. (Sosa Lopez et al. 2014) mostraron resultados de tratamientos utilizando propóleo procedente de Misiones sobre el desarrollo de la cepa de *Colletotrichum gloeosporioides*. En su investigación, los tratamientos difirieron significativamente del testigo, resultando en una inhibición total del hongo. En los Anexos F y G se pueden observar el efecto de los extractos.

Por otro lado, (Obasa et al. 2007) evaluaron la eficacia del extracto etanólico de doce concentraciones de propóleo sobre el crecimiento del hongo *C. lindemuthianum* obtenido de hojas de judías infectadas con antracnosis. Estos investigadores reportaron una inhibición del crecimiento del micelio del hongo hasta por 21 días en los medios de crecimiento contentivos de extractos de propóleo en concentraciones entre 6% y 10%. De igual manera, los autores observaron que los medios de cultivo que contenían concentraciones de extractos de propóleo entre 20-33%, presentaron un efecto fungicida sobre el hongo *C. lindemuthianum*.

Las diferencias en la actividad antifúngica por efecto de concentración posiblemente estén asociadas a un mayor contenido de los metabolitos bioactivos del tipo diterpénico, flavonoide y fenólico presentes en el extracto (Markham et al. 1996).

Efecto del Propóleo en Crecimiento de Bacterias

Evaluación del Crecimiento de Pseudomonas spp. en Medio de Cultivo AN + EEP.

El tratamiento control fue el que más inhibió el crecimiento bacteriano y que de todos los tratamientos, los tratamientos al 33% y 50% con 15 días de reposo, no difirieron estadísticamente del tratamiento control, demostrando su actividad antibacteriana (Cuadro 4). Todos los tratamientos, a excepción del tratamiento de 33% con 7 días de reposo, no tuvieron diferencias entre ellos, sin embargo, demostraron que los extractos tienen atributos antibacterianos. Asimismo, cabe resaltar que el tratamiento al 33% de 7 días no tuvo acción inhibitoria en las bacterias.

Cuadro 4

Halo de inhibición de extractos etanólicos de propóleo en distintas concentraciones ante

Pseudomonas spp. a las 24 horas.

Tratamiento(%P/V)	Tiempo de Reposo (días)	Halo de inhibición (mm)
Control		28 a
T1 (33%)	7	0 c
T2 (50%)	7	19 b
T3 (75%)	7	15 b
T4 (100%)	7	18 b
T5 (33%)	15	20 ab
T6 (50%)	15	20 ab
T7 (75%)	15	16 b
T8 (100%)	15	16 b
CV		1.63
R ²		0.99
P		<.0001

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) según la prueba de separación de medias Duncan. EEP: Extracto Etanólicos de Propóleo, CV: Coeficiente de Variación, R²: Coeficiente de determinación, P: Probabilidad.

En otros trabajos de investigación, se han estudiado algunas propiedades antibacterianas, fungicidas y antivirales que los flavonoides confieren al propóleo (Sosa López et al., 2000; Machado et al., 2004), observándose que estos compuestos en sinergia con el ácido nicotínico, caféico, ferúlico y ascórbico actúan como barrera química contra los microorganismos. Por su parte (Lu et al. 2005) determinaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo colectado en diferentes períodos y varias regiones en Taiwan, contra *Staphylococcus aureus*, reportando varios grados de actividad antibacteriana dependientes de la concentración, área y época de recolección del propóleo; estos autores reportan la mínima concentración inhibitoria (MIC) del extracto entre 3.75 a 60 ug/mL mientras que la mínima concentración bactericida (MCB) osciló entre 7.5 y 120 µg/mL contra *S. aureus*.

La actividad enzimática de las bacterias para reducir sus efectos sobre los sistemas biológicos es susceptible a propóleo, tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Zeighampour et al., 2013).

El propóleo puede retardar el desarrollo de formación de 21 biopelículas en diferentes grupos microbianos incluyendo *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli* y especies de *Pseudomonas* (Stan et al., 2013).

Evaluación del Crecimiento de *Xanthomonas* Spp. en Medio de Cultivo AN + EEP.

El Cuadro 5 contiene los resultados de las medias del halo de inhibición de *Xanthomonas* spp., evaluados por 24 por medio de pruebas de sensibilidad, los 8 tratamientos con EEP. Se observa que todos los extractos presentan inhibición de bacterias, siendo el tratamiento al 100% de 7 días fue el que presentó mejor respuesta.

Cuadro 5

Halo de inhibición de extractos etanólicos de propóleo en distintas concentraciones ante

Xanthomonas spp. a las 24 horas.

Tratamiento(%P/V)	Tiempo de Reposo (días)	Halo de inhibición (mm)
Control		15 bc
T1 (33%)	7	16 b
T2 (50%)	7	15 bc
T3 (75%)	7	13 de
T4 (100%)	7	18 a
T5 (33%)	15	16 bc
T6 (50%)	15	13 e
T7 (75%)	15	16 bc
T8 (100%)	15	14 cd
CV		6.55
R ²		0.97
P		<.0001

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba de separación de medias Duncan. EEP: Extracto Etanólicos

de Propóleo, CV: Coeficiente de Variación, R²: Coeficiente de determinación, P: Probabilidad.

Estos resultados difieren con los obtenidos por (Zignago 2011) donde realizó un estudio *in vitro* de la actividad antimicrobiana de dos propóleos frente a bacterias fitopatógenas. Demostraron que el EEP de Canelones inhibió con diferencias significativas a cuatro de las bacterias probadas: *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *Cucurbitae* y *Ralstonia solanacearum*.

Los resultados obtenidos se pueden atribuir al ácido cinámico y algunos flavonoides que desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndolas más vulnerables al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos (Farre et al. 2004).

Conclusiones

Los extractos etanólicos de propóleo presentaron actividad biológica al inhibir el crecimiento sobre *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Pseudomonas* spp. y *Xanthomonas* spp.

Los extractos etanólicos de propóleo en las cuatro concentraciones en ambos períodos de reposo tuvieron efecto antifúngico ante los hongos fitopatógenos *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp.

El hongo *Colletotrichum* spp. demostró ser el hongo fitopatógeno más susceptible a los extractos etanólicos al presentar inhibición en crecimiento de micelio del hongo en todos los tratamientos.

Los extractos de propóleo en las concentraciones de 33% y 50% con 15 días de reposo inhibieron el crecimiento de *Pseudomonas* spp. y al 100% con 7 días de reposo para *Xanthomonas* spp. mostrando diferencias significativas con respecto al control.

Recomendaciones

Evaluar diferentes concentraciones de extractos etanólicos de propóleo empleando concentraciones mayores o menores de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio.

Evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano de los extractos en otros géneros de hongos y bacterias fitopatógenas de interés.

Evaluar los extractos etanólicos de propóleo de manera *in vitro* para validar los resultados su efectividad antimicrobiana y posteriormente realizar pruebas *in vivo* a nivel de invernadero.

Mediante HPLC cromatografía Líquida de Alta Eficiencia u otras técnicas de cromatografía realizar el análisis de los componentes del propóleo de Zamorano para actualizar los resultados de su composición química.

Referencias

- Aceves TdJ, Virgen G, Posos P, Contreras MdL. 2008. Actividad fungicida sobre los propóleos *Fusarium oxysporum*. México: Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/agronomia/produccionagricola\(pp%201-86\)/acevesesquiviasteresa/1-10.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/agronomia/produccionagricola(pp%201-86)/acevesesquiviasteresa/1-10.pdf).
- Bankova V. 2009. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *J. ApiProd ApiMed Sci.* 1(2):23–28. <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.4.01.2.01>. doi:10.3896/ibra.4.01.2.01.
- Bankova VS, Castro SL de, Marcucci MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31(1):3–15. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000102>. doi:10.1051/apido:2000102.
- Bankova VS, Popov SS, Marekov NL. 1982. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography A.* 242(1):135–143. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300872556>. doi:10.1016/S0021-9673(00)87255-6.
- Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology.* 39(7):756–761. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643805001192>. doi:10.1016/j.lwt.2005.05.015.
- Cupull-Santana RD, Cortés-Rodríguez R, Olazábal-Manso EE, Hernández Medina CA. 2014. Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongos contaminantes en cultivo de tejidos vegetales. *Acta Universitaria.* 23(6):3–9. <http://dx.doi.org/10.15174/au.2013.463>. doi:10.15174/au.2013.463.
- Duncan J, Carolan M, Wiskerke JS, editores. 2020. *Routledge Handbook of Sustainable and Regenerative Food Systems.* 1ª ed. New York: Routledge. ISBN: 9780429466823. <http://dx.doi.org/10.4324/9780429466823>.
- Farre R, Frasquet I, Sánchez A. 2004. Propolis and human health. *Ars Pharma*; [consultado el 18 de ago. de 2023]. 45(1):21–43.
- Ghisalberti EL. 1979. Propolis: A Review. *Bee World*; [consultado el 18 de ago. de 2023]. 60(2). en. <http://www.tandfonline.com/loi/tbee20>. doi:10.1080/0005772X.1979.11097738.
- Goldman R, Hasan T, Hall C, Strycharz W, Cooperman B. 1983. ... of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. United States: American Chemical Society. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00271a020>.
- Gómez-Caracava AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41(4):1220–1234. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506002536>. doi:10.1016/j.jpba.2006.03.002.
- Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ, Hu F-L. 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules.* 19(12):19610–19632. en. <https://www.mdpi.com/85554>. doi:10.3390/molecules191219610.

- Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*. 86(1):69–73. doi:10.1016/S0378-8741(03)00042-4.
- Lu L-C, Chen Y-W, Chou C-C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 102(2):213–220. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505000589>. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.017.
- Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. 1996. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*. 42(1):205–211. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942296832869>. doi:10.1016/0031-9422(96)83286-9.
- Martínez Galán JP. 2009. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño: Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño [Tesis de pregrado]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. spa. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3416>.
- Obasa K, Adeoti A, Enikuomehin A. O, Bodunde G. J. 2007. Efficacy of Bee-Propolis in the Control of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Briosi and Cav. In vitro. *Research J. of Microbiology*. 2(2):175–179. <http://dx.doi.org/10.3923/jm.2007.175.179>. doi:10.3923/jm.2007.175.179.
- Orozco EF. 2000. Recopilación Bacterias Fitopatógenas. Mexico: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Pineda J, Barrios C, Milla D, Solano Y, Gil E. 2010. Propiedad fungistática in vitro de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Universidad Centroccidental. Venezuela: [sin editorial]. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0798-72692010000100011.
- Sosa Lopez AA, Rennis L, Cabrera MG, Castillo AE. 2014. Determinación de hongos patógenos en cultivos ornamentales y su control con soluciones de propóleos. *Agrotecnia*. (22):13. doi:10.30972/agr.022285.
- Vicente D, Pérez-Trallero E. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21(9):520–529. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X03729991>. doi:10.1016/S0213-005X(03)72999-1.
- Vit P. 2004. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 35(2). http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=s0798-04772004000200006&script=sci_arttext.
- Weidenborner M, Hindorf H, Chandra Jha H, Tsotsanos P, Egg H. 1990. Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochemistry*. 29(3):801–803. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942290800229>. doi:10.1016/0031-9422(90)80022-9.
- Zeighampour F, Mohammadi-Sichani M, Shams E, Sadat Naghavi N. 2014. Antibacterial activity of propolis ethanol extract against antibiotic resistance bacteria isolated from burn wound infections. [sin lugar]: [sin editorial]. https://www.sid.ir/en/viewssid/j_pdf/88720140306.pdf.

- Zenteno V. 2017. Evaluación de la acción fungicida del propóleo en el control in vitro de *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium*. *Agrociencias*. 2(4):25–30. es. <http://dicyt.uajms.edu.bo/revistas/index.php/agrociencias/article/view/659>.
- Zignago A. 2011. Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de dos propóleos frente a bacterias fitopatógenas. Uruguay: Universidad de la Republica. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/9698/1/3705zig0.pdf>.

Anexos

Anexo A

Protocolo para la elaboración de agar papa dextrosa (PDA)

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 39 g de agar PDA
2. Añadir ~961 mL de agua destilada
3. Hervir para disolver
4. Autoclavar

Anexo B

Protocolo para la elaboración de Agar Nutriente (AN)

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 23 g de agar nutriente
2. Añadir ~980 mL de agua destilada
3. Hervir para disolver
4. Autoclavar

Anexo C

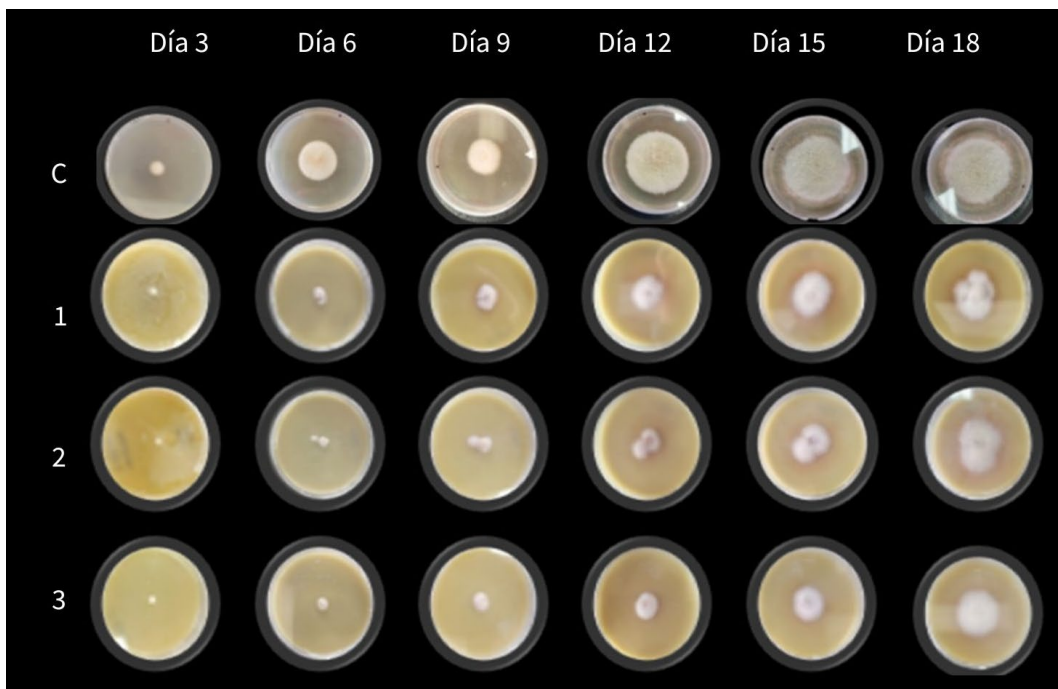
Protocolo para la elaboración de Luria Broth (LB)

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 15 g de LB (Luria Broth)
2. Añadir ~975mL de agua destilada
3. Remover
4. Añadir 15 g de bacto-agar
5. Autoclavar

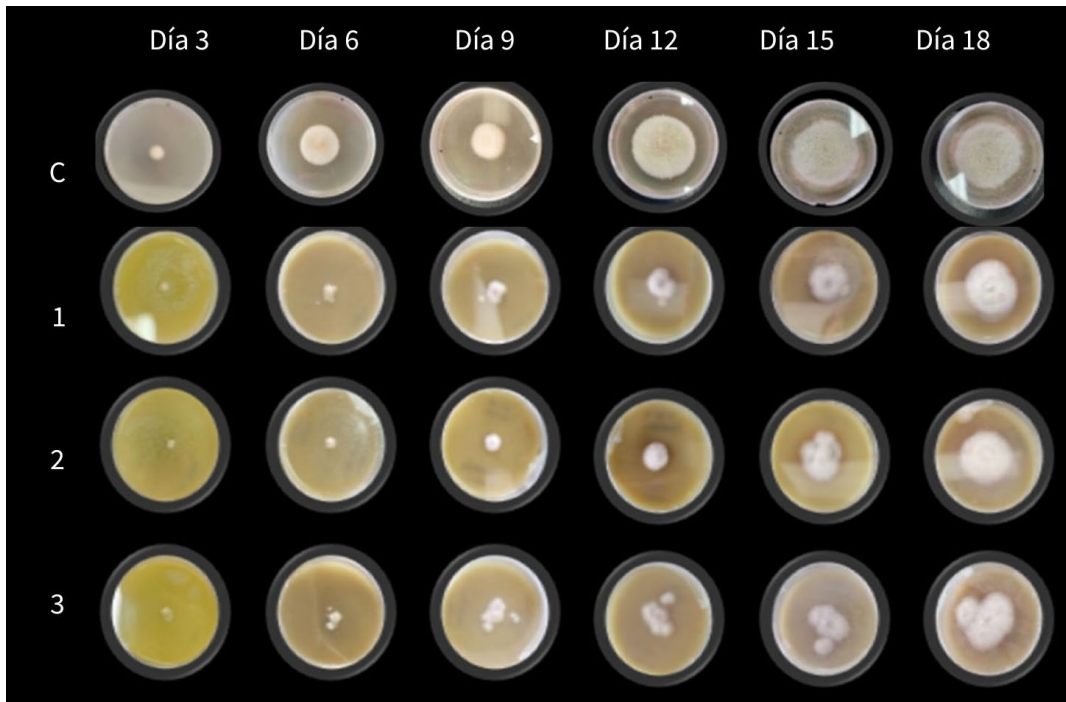
Anexo D

Control *Bacillus subtilis* y EEP al 33% con 15 días de reposo ante *Fusarium* spp. durante 18 días.



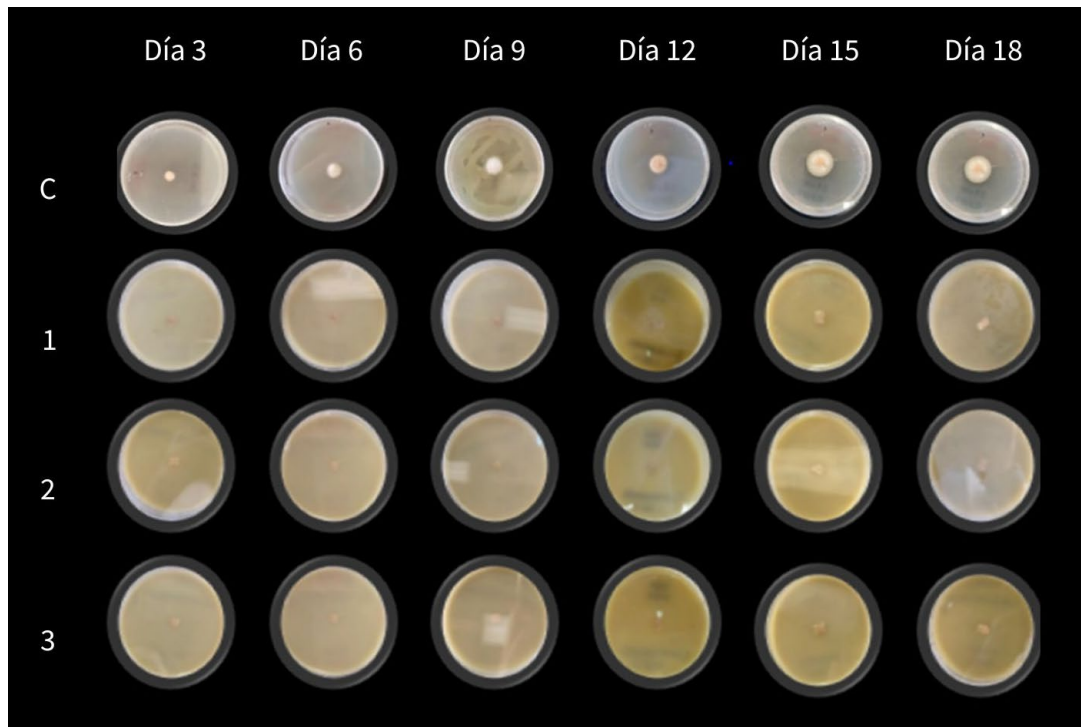
Anexo E

Control *Bacillus subtilis* y EEP al 100 % con 15 días de reposo ante *Fusarium* spp. durante 18 días.



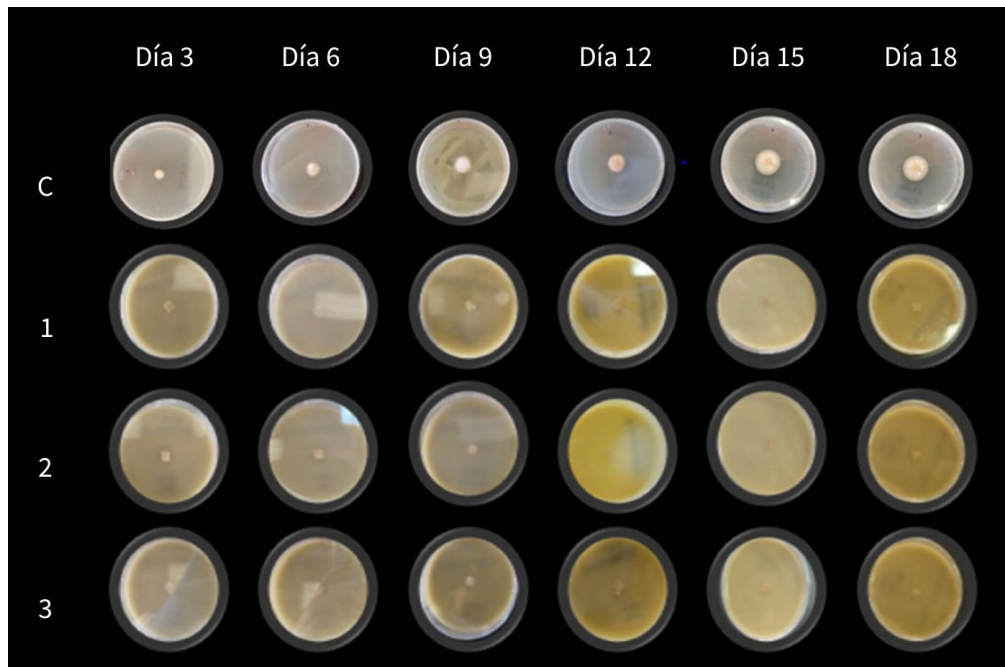
Anexo F

Control *Bacillus subtilis* y EEP al 33% con 7 días de reposo ante *Colletotrichum* spp. durante 18 días.



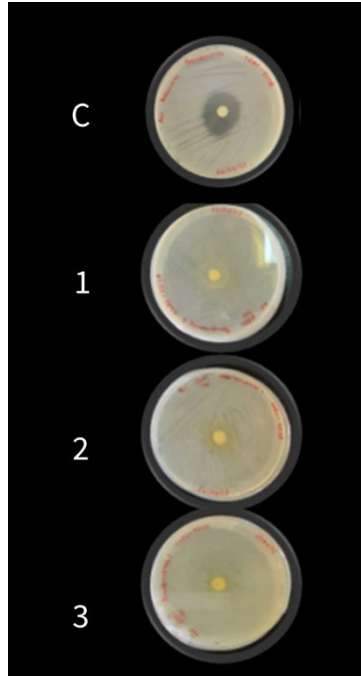
Anexo G

Control *Bacillus subtilis* y EEP al 100% con 15 días de reposo ante *Colletotrichum* spp. durante 18 días.



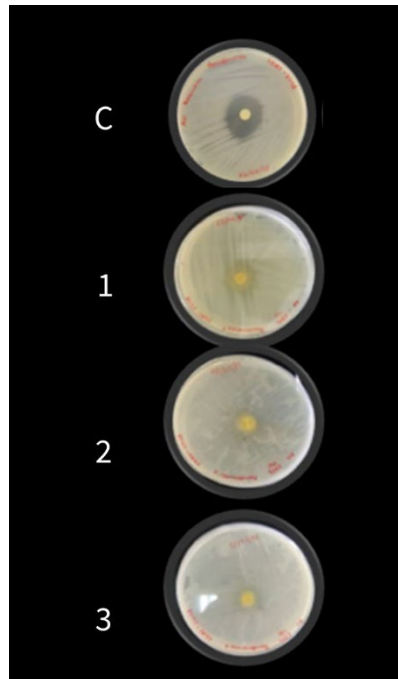
Anexo H

Control Tetraciclina y EEP al 33% con 15 días de reposo ante *Pseudomonas* spp. a las 24 horas.



Anexo I

Control Tetraciclina y EEP al 50% con 15 días de reposo ante *Pseudomonas* spp. a las 24 horas.



Anexo J

Control tetraciclina y EEP al 100% con 7 días de reposo ante *Xanthomonas* spp. a las 24 horas.

