

**Efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de propóleo sobre *Nigrospora osmanthi*
Antifungal effect of hydroethanolic propolis extract on *Nigrospora osmanthi***

Autores:

José Humberto Vera-Rodríguez¹, <https://orcid.org/0000-0003-3027-059X>

Axel Samuel Palacios-Mayorga², <https://orcid.org/0000-0001-5123-3953>

Haydee Azucena Macías-Rojas³, <https://orcid.org/0000-0003-1163-9881>

Edison Macgyver Barragán-Taco¹, <https://orcid.org/0009-0002-9665-8757>

Arturo Medardo Palacios-García³, <https://orcid.org/0000-0001-8883-1498>

Filiación institucional: ¹Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad de Ciencias Agrarias, Santa Elena, Ecuador, 240207. ²Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador, 120550. ³Instituto Superior Tecnológico La Troncal, Ecuador, 030302.

E-mail: jvera7569@upse.edu.ec

Fecha de recibido: 20 ene. 2025

Fecha de aprobado: 10 feb. 2025

Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroetanólico de propóleo sobre *Nigrospora osmanthi*. Utilizándose propóleo de abejas, se deshidrató, maceró y realizó el extracto hidroalcohólico 50/50, con un tamizaje fitoquímico. El estudio fue experimental evaluando el crecimiento radial del hongo sobre cajas Petri con medio PDA envenenado con extracto hidroetanólico por 72 horas a dosis: T1 (25 %); T2 (50 %); T3 (75 %); T4 (100 %); T5 (Control), se utilizaron 10 réplicas. Los datos fueron evaluados bajo un diseño completamente al azar (DCA), análisis de varianza (ANOVA), y prueba de Duncan 5 %, tabulados en el software Infostat 2020. El tamizaje fitoquímico resultó positivo para (Triterpenos, esteroides, alcaloides, flavonoides, cloruro férrico y azúcares reductores), el estudio metagenómico confirmó la especie *Nigrospora osmanthi* el mejor tratamiento se dio con la dosis de extracto hidroetanólico de propóleo al 100 %. Esto mostró eficacia antifúngica significativa contra *N. osmanthi*.

Palabras clave: Abeja; Banano; Hongo fitopatógeno; Metagenómica

Abstract

The objective was to evaluate the antifungal effect of the hydroethanolic extract of propolis on *Nigrospora osmanthi*. Bee propolis was used, dehydrated, macerated and the hydroalcoholic extract was made 50/50, a phytochemical screening was performed: The study was experimental evaluating the radial growth of the fungus on Petri dishes with PDA medium poisoned with hydroethanolic extract for 72 hours at doses: T1 (25%); T2 (50%); T3 (75%); T4 (100%); T5 (Control), 10 replicates were used. The data were evaluated under a completely randomized design (DCA), analysis of variance (ANOVA), and Duncan's 5% test, tabulated in Infostat 2020 software. The phytochemical screening was positive for (Triterpenes, steroids, alkaloids, flavonoids, ferric chloride and reducing sugars), the metagenomic study confirmed the *Nigrospora osmanthi* species and the best treatment was given with the dose of 100% hydroethanolic propolis extract. Propolis showed significant antifungal efficacy against *N. osmanthi*.

Keywords: Bee; Banana; Phytopathogenic fungus; Metagenomics

Introducción

El uso de productos naturales en la medicina y la agricultura ha cobrado gran relevancia en las últimas décadas (Vera et al., 2024). Entre estos productos, el propóleo, una resina producida por las abejas, ha sido objeto de diversos estudios debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Suárez Quinodoz et al., 2013). Este extracto se ha utilizado tradicionalmente para tratar diversas enfermedades y afecciones (Mayta-Tovalino et al., 2012), lo que ha motivado la investigación sobre su efectividad frente a hongos fitopatógenos.

Nigrospora osmanthi es un hongo que afecta a diversas plantas, causando pérdidas significativas en cultivos agrícolas (Yang et al., 2025). Su capacidad para desarrollarse en condiciones adversas y su resistencia a tratamientos convencionales han hecho que sea un foco de estudio en la búsqueda de soluciones efectivas para su control (Oskay & Karataş, 2021). La necesidad de métodos de control alternativos ha llevado a la exploración de sustancias naturales (Jeres-Caguana et al., 2025), como el propóleo, que podrían ofrecer un enfoque más sostenible (Becerra-Rojas et al., 2022).

El extracto de propóleo se ha destacado por su rica composición química, que incluye flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos bioactivos (Delgado Aceves et al., 2025). Estos componentes no solo le confieren al propóleo su potencial antifúngico, sino que también pueden actuar sinérgicamente para potenciar su efecto (Lozano-Lévano et al., 2022). El estudio de estas interacciones es fundamental para comprender cómo el propóleo puede ser utilizado como un agente de control biológico efectivo (Muñoz Rodríguez et al., 2011).

La investigación sobre el efecto antifúngico del extracto de propóleo sobre *Nigrospora osmanthi* no solo tiene implicaciones en la agricultura, sino que también puede contribuir al desarrollo de estrategias más amplias para el manejo de enfermedades en cultivos (Bucio-Villalobos & Martínez-Jaime, 2017). Dado el creciente interés en prácticas agrícolas sostenibles, es crucial explorar cómo las soluciones naturales pueden integrarse en los sistemas de cultivo modernos (Vera et al., 2025).

Además, el uso de extractos naturales como el de propóleo se alinea con la tendencia global hacia la reducción del uso de productos químicos en la agricultura (Sánchez et al., 2013). Al investigar el potencial antifúngico del propóleo, se abre la puerta a alternativas menos

perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana (Londoño-Orozco et al., 2008). Esto es especialmente relevante en un contexto donde la resistencia a fungicidas químicos es un problema cada vez más presente (García et al., 2024).

Los resultados de esta investigación podrían proporcionar una base científica sólida para la utilización de propóleo como un biocontrol en el manejo de enfermedades fúngicas en cultivos (Arboleda-Zapata et al., 2019). Asimismo, podrían incentivar la producción y comercialización de extractos de propóleo, favoreciendo a los apicultores y promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación consistió en evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroetanólico de propóleo sobre *Nigrospora osmanthi* y determinar su potencial como herramienta en el control de este hongo fitopatógeno.

Materiales y métodos

El estudio se efectuó en el laboratorio de química y microbiología de la Facultad de ciencias Agrarias de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE). Se realizó la extracción hidroetanólica 50/50 (V/V) a partir del propóleo de abeja (*Apis mellifera*). La muestra húmeda fue sometida a un proceso de secado a bajas temperaturas por largo periodos de tiempo en un desecador de alimentos marca Ronco, modelo FD6000 con la finalidad de garantizar la conservación de los compuestos bioactivos. Posteriormente se sometió a un secado de 40°C por 72 horas en un desecador de alimentos con temperatura controlada.

Se realizó el extracto hidroalcohólico al 50% por proceso de maceración del material seco obtenido durante 48 horas y finalmente filtrado para eliminar material extraño.

Para el tamizaje químico se emplearon técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios. Se determinó en el extracto los compuestos orgánicos que de acuerdo a su solubilidad podían ser extraídos en estos solventes. Se realizaron los siguientes ensayos:

Ensayo Reactivo Lieberman- Burchard (triterpenos o esteroides). Se añade una solución reciente de una gota de ácido sulfúrico en 1 mL de anhídrido acético frío, al residuo desecado del extracto (entre 1 a 10 mg) disuelto en cloroformo. La prueba es positiva si se observa cambio de coloración entre 2, 5, 20 y 60 minutos luego de mezclar.

Ensayo de Mayer (Alcaloides). A 1 mL del extracto se le añade 3 gotas de Reactivo de Mayer, la formación de un precipitado color blanco indica la presencia de alcaloides.

Reactivo Wagner (Alcaloides). A 1 mL del extracto se le añade 3 gotas de Reactivo de Wagner, la formación de un precipitado color rojo pardo/café oscuro indica la presencia de alcaloides.

Prueba Shinoda (Flavonoides). A 1 mL del extracto se añadió una limadura de magnesio y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se observa un intenso burbujeo por la reacción de la limadura y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando la coloración naranja se va intensificando, lo que indica la presencia de flavonoides.

Cloruro férrico (Taninos/Fenoles). Se añadió 2 gotas de cloruro férrico al extracto. La aparición de un color verde negruzco indica la presencia de compuestos fenólicos.

Prueba Espuma (Aminoácidos). El extracto se sometió a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de las saponinas es indicada por la formación de una espuma persistente durante 3 minutos.

Fehling (Azúcares Reductores). Se añade 1 mL de sol A y 1 mL de sol B a 0.5 mL del extracto se calienta en baño maría por 10 min, la aparición de un precipitado rojo oscuro cuproso se reporta como positivo para azúcares reductores.

La muestra de tejido vegetal fue tomada de cultivos locales de banano Cavendish, el hongo fitopatógeno fue aislado a partir de muestras de hojas necrosadas y sembradas en medio de cultivo PDA con la ayuda de una cabina de seguridad. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 horas y replicadas para su purificación.

Se tomó una muestra del hongo y se analizó mediante perfil taxonómico por secuenciación masiva paralela metagenómica (metabarcoding ITS). Para esto se tomaron aproximadamente 500mg de muestra desde donde se extrajo ADN por métodos convencionales. Se verificó la calidad y cantidad del ADN obtenido mediante lectura espectrofotométrica en nanodrop, además, se verificó su integridad a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%.

Una vez realizado el análisis de calidad se amplificaron las secuencias diana con el primers ITS: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA, TCCTCCGCTTATTGATATGC para hongos. Los productos de PCR obtenidos se purificaron, cuantificaron y homogeneizaron para la creación de librerías SMRT. Se realizó un control de calidad de las bibliotecas y las que cumplían los requisitos se procesaron para su secuenciación en la plataforma PacBio Sequel II.

Las lecturas obtenidas fueron limpiadas, ensambladas, contabilizadas utilizando software bioinformático. Las secuencias quiméricas fueron eliminadas. Las secuencias finales fueron identificadas mediante BLAST con un índice de identidad del 97% para hongos. Los resultados se visualizaron con discos de Krona y tablas de unidades taxonómicas operacionales.

Para evaluar el crecimiento radial del hongo sobre cajas Petri con medio PDA envenenado con extracto hidroetanólico por 72 horas se establecieron los siguientes tratamientos: T1 (25 %); T2 (50 %); T3 (75 %); T4 (100 %); T5 (Control), se utilizaron 10 réplicas. Los datos fueron evaluados bajo un diseño completamente al azar (DCA), análisis de varianza simple (ANOVA), y prueba de Duncan 5 %, tabulados en el software Infostat 2020 y graficados en Excel Microsoft 2023.

Resultados y discusión

Análisis químico del extracto de propóleos

El tamizaje fitoquímico resultó positivo para triterpenos, esteroides, alcaloides, flavonoides, cloruro férrico y azúcares reductores (tabla 1).

Tabla 1. Tamizaje químico del extracto de propóleo

Parámetros	Método de referencia	Resultados
Triterpenos /Esteroles	Reactivo Lieberman-Burchard	+
	Reactivo Mayer	+
Alcaloides	Reactivo Wagner	+
	Reactivo Dragendorff	+
Flavonoides/Antocianinas	Prueba Shinoda	+
Taninos/Fenoles	Cloruro férrico	+
Azúcares reductores	Fehling	+
Aminoácidos	Espuma	+

Positivo (+)

En conjunto, la presencia de estos diversos compuestos bioactivos sinérgicamente contribuye a las múltiples propiedades farmacológicas del propóleo, incluyendo su actividad antimicrobiana (antifúngica, antibacteriana, antiviral), antiinflamatoria, antioxidante y potencialmente antitumoral (Premoli et al., 2010). Esta complejidad química es la base de su uso tradicional y su creciente interés en la investigación científica para diversas aplicaciones en salud y conservación de alimentos.

Análisis de perfil taxonómico

Tanto las concentraciones como las calidades del ADN obtenido de las muestras fueron adecuadas para proceder a la preparación de librerías y la posterior secuenciación (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del proceso de extracción de ADN, secuenciación masiva y análisis

Código	Concentración muestra (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Total de lecturas	OTUs*	Número de secuencias
H637	690	2	2	37,765	120	37,565

bioinformático

Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs)

La tabla describe que la muestra tuvo una concentración de ADN alta, una pureza de ADN razonable y produjo un número considerable de lecturas de secuencia que se agruparon en 120 Unidades Taxonómicas Operacionales. Estos resultados sugieren que el proceso de extracción de ADN y secuenciación fue exitoso y proporcionó datos suficientes para el análisis de la diversidad microbiana presente en la muestra H637. Siendo así que en la muestra existe una predominancia del 97% de *Nigrospora osmanthi* perteneciente al filo *Ascomycota* como se muestra el disco de Krona en la figura 1.

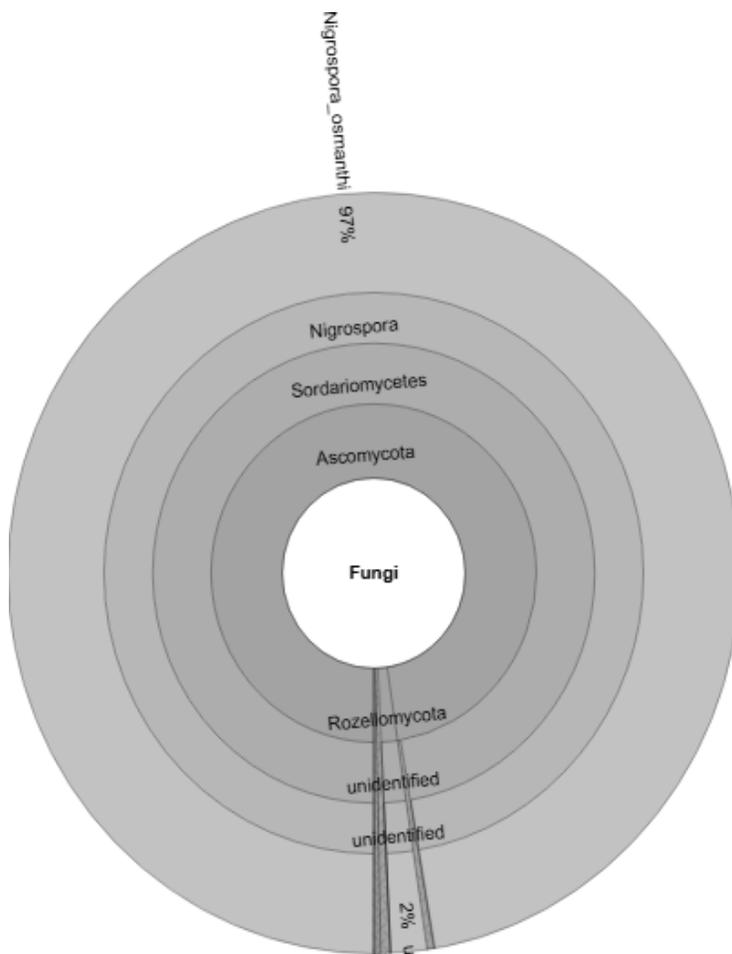
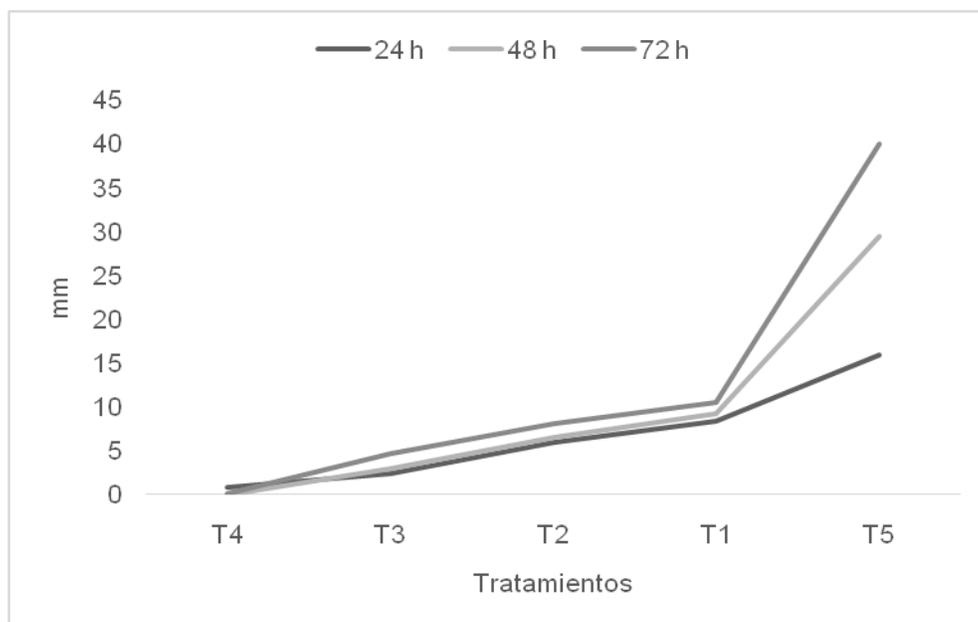


Figura 1. Resultado del perfil taxonómico ITS de la muestra H637

Esto sugiere que el análisis basado en secuenciación de ADN ha determinado con alta probabilidad que el organismo estudiado pertenece a esta especie específica dentro del género *Nigrospora*, que a su vez se clasifica dentro de la clase *Sordariomycetes*, el filo *Ascomycota* y finalmente el Reino *Fungi*. Esta especie puede ser fitopatógeno en diversos hospedantes identificado en plantas causando manchas foliares causante de enfermedades (Zambrano et al., 2025).

Cinética de crecimiento de N. osmanthi sobre el extracto de propóleo

La figura 2 muestra el crecimiento radial (en milímetros) del hongo *N. osmanthi* en placas de Petri que contienen agar PDA envenenado con extracto hidroetanólico de propóleo a diferentes concentraciones (T1: 25%, T2: 50%, T3: 75%, T4: 100%) y un control sin propóleo (T5: 0%). El crecimiento radial se midió a las 24, 48 y 72 horas.



T1 (25 %); T2 (50 %); T3 (75 %); T4 (100 %); T5 (Control)

Figura 2. Cinética de crecimiento del hongo *Nigrospora osmanthi* bajo el efecto de diferentes dosis del extracto hidroetanólico de propóleo 50/50

Se observa una tendencia significativa de inhibición del crecimiento radial de *N. osmanthi* a medida que aumenta la concentración del extracto hidroetanólico de propóleo. El tratamiento control (T5) muestra el mayor crecimiento radial en los tres tiempos de evaluación, lo que indica el crecimiento normal del hongo en ausencia del extracto. A las 24 horas, el crecimiento radial es relativamente bajo en todos los tratamientos, incluyendo el control. Con el tiempo (48 y 72 horas), el crecimiento radial aumenta significativamente en el control (T5) y en los tratamientos con concentraciones más bajas de propóleo (T1 y T2). El tratamiento con la concentración más alta de propóleo (T4: 100%) muestra la inhibición más marcada del crecimiento radial en los tres tiempos evaluados.

Los resultados de esta figura sugieren que el extracto hidroetanólico de propóleo posee actividad antifúngica contra *N. osmanthi*, y esta actividad es dependiente de la concentración. A concentraciones más altas de propóleo, se observa una inhibición más efectiva del crecimiento radial del hongo. Este hallazgo concuerda con varios estudios que han demostrado las propiedades antifúngicas del propóleo contra una amplia gama de hongos (Cibanal et al., 2019). La actividad antifúngica del propóleo se atribuye a su compleja composición química, rica en compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios (Becerra-Rojas et al., 2022). Estos compuestos pueden actuar a

través de diversos mecanismos, incluyendo la disrupción de la membrana celular fúngica, la inhibición de la síntesis de la pared celular, la interferencia con el metabolismo energético y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Bedascarrasbure et al., 2004).

La marcada inhibición observada en el tratamiento T4 (100% propóleo) podría deberse a la acción sinérgica de la alta concentración de estos compuestos bioactivos, lo que resulta en un ambiente altamente desfavorable para el crecimiento de *N. osmanthi*. Por otro lado, las concentraciones más bajas (T1 y T2) pueden no haber alcanzado la concentración umbral necesaria para ejercer una inhibición significativa, permitiendo un crecimiento progresivo del hongo con el tiempo.

La diferencia en el crecimiento radial entre los tratamientos a las 72 horas es particularmente notable, lo que subraya la importancia de la concentración del propóleo para controlar el crecimiento de este hongo. El crecimiento significativo en el control (T5) confirma que el medio de cultivo era adecuado para el desarrollo fúngico en ausencia del agente antifúngico. Es importante destacar que *Nigrospora* es un género de hongos con diversas especies, algunas de las cuales son fitopatógenos y pueden causar enfermedades en plantas (Pineda et al., 2007). El control de su crecimiento mediante agentes naturales como el propóleo podría tener implicaciones importantes en la agricultura y la fitopatología.

Conclusiones

El análisis químico del extracto de propóleo reveló la presencia de diversos compuestos bioactivos conocidos por sus propiedades antifúngicas.

El análisis taxonómico de la muestra H637 identificó con alta confianza 97% *Nigrospora osmanthi*, como el hongo predominante.

Los ensayos de cinética de crecimiento demostraron que el extracto hidroetanólico de propóleo inhibe significativamente el crecimiento radial de *N. osmanthi* de manera dosis-dependiente, siendo la concentración al 100% la más efectiva.

Estos hallazgos sugieren el potencial del extracto de propóleo como agente antifúngico natural contra *N. osmanthi*, lo cual podría ser relevante en contextos agrícolas o fitopatológicos donde este hongo pueda ser perjudicial.

Bibliografía

- Arboleda-Zapata, T., Díaz-Medina, A. R., & Ríos-Osorio, L. A. (2019). Biological control strategies used for the management of antracnosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruits: A systematic review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(3). <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.2699>
- Becerra-Rojas, S. A., Maldonado-Roa, E., & Castro-Molina, S. L. (2022). Efecto bioconservante del propóleo y su aplicación en la conservación de matrices cárnicas. *Perspectivas en nutrición humana*, 24(1), 125-135. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v24n1a08>
- Bucio-Villalobos, C. M., & Martínez-Jaime, O. A. (2017). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.24253>
- Cibanal, I., Fernández, L., Krepper, G., Pellegrini, C., & Gallez, L. (2019). Avances en el desarrollo de un biofungicida: Caracterización físico-química y actividad antifúngica de propóleos. *Agrociencia (Uruguay)*, 23(2), 99-108. <https://doi.org/10.31285/agro.23.83>
- Delgado Aceves, M. D. L., Andrade Ortega, J. Á., & Ramírez Barragán, C. A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(28), 74-87. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11322015000200006&script=sci_arttext
- García, B., Parrales, L., Villón, H., Torres, S., Vera, J., Moyano, G., & Villamar, M. (2024). Comparación de métodos de control de malezas en arroz en la época lluviosa y seca. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 41 (4). <https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/42713>
- Jeres-Caguana, G. A., Montañó-Roldan, V. L., Ordoñez-Zúñiga, N. L., Vera-Rodríguez, J. H., & Lucas-Vidal, L. R. (2025). Efecto biorremediador de la espirulina y *Trichoderma* spp. en suelo contaminado con plomo (Pb). *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 3(2), 1-12. <https://doi.org/10.70881/mcj/v3/n2/48>
- Lozano-Lévano, C., Zavaleta-Rengifo, A., & Villaseca-Robertson, A. (2022). Evaluación microbiológica de la vida útil de néctar de durazno con propóleo como conservante natural. *Biotempo*, 19(2), 177-184. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v19i2.4843>
- Oskay, F., & Karataş, A. (2021). *Pinus nigra* subsp. *pallasianave* Pinussylvestristohumlarında *Diplodiasapinea* ninyoğunluğu. *Turkish Journal of Forestry*, 22(3), 218-228. <https://doi.org/10.18182/tjf.799849>
- Premoli, G., Laguado, P., Díaz, N., Romero, C., Villarreal, J., & González, A. (2010). Uso del propóleo en odontología. *Acta odontológica venezolana*, 48(2). http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_aov/article/view/7852
- Sánchez, R. D. V., Urrutia, G. R. T., & Escalante, A. S. (2013). El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38(10), 705-711. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33929482003>

- Suárez Quinodoz, M. A., Rosende, R. O., & Finten de Tarallo, S. B. F. (2013). Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. *Revista de la Facultad de Odontología*, 6(1), 21-26.<https://doi.org/10.30972/rfo.611684>
- Vera, J., Gavin-Moyano, C., Villamar, M., Ortiz, J., Sevilla, J., Lucas, L., & García, B. (2024). Estudio químico de la lenteja de agua macrófita (*Lemnaminor* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 42 (1).
[https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v42.n1.II](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v42.n1.II)
- Vera, J., Sarango, Y., Villamar, M., Ortiz, J., Sevilla-Carrasco, J., Duarte, J., & Lucas, L. (2025). Effect of herbicides on the growth of beneficial microorganisms in rhizospheric soil. *Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia*, 42(2).[https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v42.n2.VI](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v42.n2.VI)<https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/43831>
- Yang, K., Yang, X., Li, M., Li, D., Huang, X. y Li, C. (2025). Aparición de *Nigrospora osmanthi* que causa la mancha foliar en *Artemisia argyi* en China. *Protección de cultivos*, 107142.<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2025.107142>
- Zambrano, S. M. T., Puga, A. M. V., Ramos, J. R. O., Hidalgo, G. E. L., & López, D. A. (2025). Epiphytic microorganisms associated with banana phyllosphere with potential antagonism to Black Sigatoka (*Pseudocercospora fijiensis*) in Los Ríos, Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*.<https://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCFA/article/view/8117>