

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS:

**Efecto anti fúngico *in vitro* de Extractos Etanólicos de
Propóleos de *Apis mellifera* sobre *Colletotrichum
gloeosporioides* de palto. Ayacucho, 2024**

Para optar el título profesional de:

INGENIERA AGRÓNOMA

PRESENTADO POR:

Bach. Yenny Miluzca BAYGORREA CUBA

ASESOR:

M.Sc. Angela Juana REQUIS QUINTANILLA

COASESORAS:

M.Sc. Eugenia Rocío QUISPE MEDINA

M.Sc. Kirianova GODOY BAUTISTA

AYACUCHO - PERÚ

2025

Dedicatoria

*A Dios, por el regalo invaluable de la vida,
por su compañía diaria y por la posibilidad
de seguir creciendo.*

*A mis padres, Armando y Esperanza: mi madre quien
sacrificó todo por mí, por ser madre y padre. Y a mi
papá, cuya memoria y guía siguen iluminando cada
uno de mis pasos.*

*A mi hermano(a) Anghelo y Cinthia,
quienes nunca me han dejado sola y han
sido la inspiración y el pilar para alcanzar
mis objetivos.*

*A la memoria de mis abuelos, Saturnino, Juan, Estela
y Victoria, quienes me enseñaron a apreciar y valorar
el campo.*

*A mis familiares, por su apoyo
incondicional y por motivarme a seguir
adelante con mis metas, sin dejar que me
rinda.*

Agradecimiento

A Dios por la gran oportunidad que me brinda de seguir adelante.

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi alma mater de mi formación profesional. A la Escuela Profesional de Agronomía, por acogerme en el espacio académico y la formación integral que me han proporcionado, las cuales han sido claves para mi desarrollo.

A la M. Sc. Angela Juana Requis Quintanilla, asesora de este trabajo de investigación, por su apoyo incondicional, paciencia, dedicación y motivación para su realización.

A la M. Sc. E. Rocío Quispe Medina, responsable del laboratorio de Biotecnología vegetal y a la M. Sc. Kirianova Godoy Bautista, responsable del laboratorio de control de calidad y co – asesoras de esta investigación, por brindarme su conocimiento, motivación y tiempo.

A Enedina y Mardonio por haberme permitido trabajar con los propóleos de su apiario

A CHIRAPAQ, por brindarme todo su apoyo en el desarrollo de la investigación, sin ellos no hubiese sido posible completar a cabalidad los objetivos trazados.

Índice general

Dedicatoria	II
Agradecimiento	III
Índice general	IV
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de anexos	IX
Resumen.....	1
Introducción	2
Capítulo II	
Marco teórico	5
1.1. Antecedentes de la investigación.....	5
1.2. Cultivo de palto (<i>Persea americana</i> Mill).....	6
1.2.1. <i>Origen y distribución</i>	6
1.2.2. <i>Clasificación taxonómica</i>	7
1.2.3. <i>Exportación e importancia de palto variedad Hass</i>	8
1.2.4. <i>Cultivo Hass</i>	11
1.2.5. <i>Morfología del fruto</i>	12
1.2.6. <i>Madurez del fruto</i>	13
1.2.7. <i>Manejo del cultivo durante la cosecha y poscosecha</i>	14
Condiciones para la cosecha palto.....	14
Manejo poscosecha.....	14
Cosecha y transporte.....	15
Recepción en planta o área de acopio.....	15
Selección y empaclado	16
Almacenamiento y transporte.....	16
1.3. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
1.3.1. <i>Importancia económica</i>	16
1.3.2. <i>Generalidades del hongo</i>	17
1.3.3. <i>Clasificación taxonómica</i>	18
1.3.4. <i>Características morfológicas</i>	18

1.3.5.	<i>Ciclo biológico</i>	19
1.3.6.	<i>Fuente de inóculo y conservación del hongo</i>	21
1.3.7.	<i>Factores ambientales que favorecen el desarrollo del patógeno.</i>	22
1.3.8.	<i>Sintomatología</i>	22
1.3.9.	<i>Estrategias de alternativas de control</i>	23
1.4.	Propóleo	24
1.4.1.	<i>Origen y definición</i>	24
1.4.2.	<i>Propiedad y composición química del propóleo</i>	25
1.4.3.	<i>Acción antifúngica, bactericida, bacteriostática y fungistática del propóleo de <i>Apis mellifera</i></i>	26
1.5.	Cromatografía	28
1.5.1.	<i>Reseña histórica</i>	28
1.5.2.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	28
1.5.3.	<i>Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas</i>	29
1.5.4.	<i>Modelos celulares de investigación</i>	30
Capítulo III		
Metodología		32
3.1.	Lugar del experimento.....	32
3.2.	Tipo de investigación.....	33
3.3.	Variables.....	33
3.4.	Población y muestra.....	34
3.4.1.	<i>Población</i>	34
3.4.2.	<i>Colección de muestras</i>	34
3.5.	Técnicas e instrumentos.....	35
3.5.1.	<i>Materiales</i>	35
3.5.2.	<i>Reactivos</i>	36
3.5.3.	<i>Equipos</i>	36
3.6.	Conducción del ensayo.....	37
3.6.1.	<i>Colección de frutos de palto Hass</i>	37
3.6.2.	<i>Aislamiento y purificación</i>	37
3.6.3.	<i>Caracterización morfológica</i>	37
3.6.4.	<i>Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleos</i>	38
3.6.5.	<i>Análisis de cromatografía en capa fina de los propóleos</i>	39

3.6.6.	<i>Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los propóleos</i>	40
3.6.7.	<i>Cuantificación de fenoles y flavonoides</i>	40
3.6.8.	<i>Prueba de medio contaminado</i>	41
3.7.	Análisis de datos	41
Capítulo IV		
Resultados y discusión		43
4.1.	Obtención de extractos etanólicos	43
4.2.	Caracterización morfológica de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	43
4.2.2.	<i>Características macroscópicas</i>	43
4.2.3.	<i>Características microscópicas</i>	45
4.3.	Análisis químico de los EEP.....	47
4.3.2.	<i>Factor de retención de cromatografía de capa fina</i>	47
4.3.3.	<i>Cromatografía de gases</i>	49
4.3.4.	<i>Cuantificación de fenoles y flavonoides</i>	53
4.4.	<i>Porcentaje de inhibición de EEP de Apis mellifera sobre Colletotrichum gloeosporioides</i>	55
Capítulo V		
Conclusiones y recomendaciones		59
5.1.	Conclusiones	59
5.2.	Recomendaciones	60
Referencias bibliográficas		61
Anexo...		68

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 2.1. <i>Contenido nutricional del palto 'Hass' (Persea americana Mill.)</i>	10
Tabla 3.1. <i>Lugar y ubicación de la recolección de muestras de propóleos de Apis mellifera.</i>	34
Tabla 3.2. <i>Descripción de los tratamientos en estudio</i>	42
Tabla 4.1. <i>Resumen de características morfológicas de Colletotrichum gloeosporioides</i>	46
Tabla 4.2. <i>Procedencia y RF de propóleos de Apis mellifera</i>	48
Tabla 4.3. <i>Cuantificación de flavonoides en muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg de quercetina/g muestra</i>	53
Tabla 4.4. <i>Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico de muestras de propóleos de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg EAG/g muestra</i>	54
Tabla 4. 5. <i>Análisis de varianza del Porcentaje de inhibición de Colletotrichum gloeosporioides</i>	57

Índice de figuras

	Pág.
<i>Figura 2.1. Principales mercados de destino de palto peruano en el exterior</i>	8
<i>Figura 2.2. Exportaciones peruanas de palto</i>	9
<i>Figura 2.3. Ciclo de vida de Colletotrichum</i>	20
<i>Figura 3.1. Mapa de ubicación de lugar de instalación de Colletotrichum gloeosporioides aislados de frutos de palto Hass.</i>	32
<i>Figura 3.2. Esquema del proceso de obtención del extracto de propóleo de Apis mellifera ..</i>	38
<i>Figura 4.1. Caracteres morfológicos macroscópicos de C. gloeosporioides en medio PDA .</i>	43
<i>Figura 4.2. Ratio de crecimiento diario de C. gloeosporioides</i>	44
<i>Figura 4.3. Forma y tamaño de las conidias de C. gloeosporioides.....</i>	45
<i>Figura 4.2. Tipo de flavonoides y factor de retención.....</i>	47
<i>Figura 4.3. Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de Cangallo.</i>	49
<i>Figura 4.4. Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de Luis Carranza.....</i>	51
<i>Figura 4.5. Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de San Miguel.....</i>	52
<i>Figura 4.6.53. Cuantificación de flavonoides en muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg de quercetina/ g muestra.....</i>	53
<i>Figura 4.7. Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico de muestras de propóleos de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg EAG/g muestra.</i>	54
<i>Figura 4.10. Comportamiento del patógeno en medio con PDA y con extracto etanólico de propóleo</i>	56

Índice de anexos

	Pág.
<i>Anexo 1. Mapa de ubicación de muestras de propóleo de Cangallo</i>	69
<i>Anexo 2. Catálogo de fotos de ejecución de tesis</i>	71
<i>Anexo 2.1. Colección de muestras de propóleo.....</i>	71
<i>Anexo 2.2. Identificación de Colletotrichum gloeosporioides en frutos de palto Hass.....</i>	71
<i>Anexo 2.3. Preparación de medio PDA, identificación y purificación de C. gloeosporioides</i>	71
<i>Anexo 2.4. Proceso de obtención de Extractos Etanólicos de Propóleo de Apis mellifera.....</i>	73
<i>Anexo 2.5. Estandarización de protocolo y preparación del solvente para cromatografía de capa fina.....</i>	76
<i>Anexo 2.6. Corrida de cromatografía en capa fina de las muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, San Miguel y Luis Carranza</i>	78
<i>Anexo 2.7. Preparación de muestras de propóleos para Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas</i>	79
<i>Anexo 2.8. Preparación de muestras de propóleos para Cuantificación de Flavonoides y Fenoles.....</i>	81
<i>Anexo 3. Resultados de análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas</i>	82
<i>Anexo 3.1. Resultados de muestras de propóleo de Cangallo.....</i>	82
<i>Anexo 3.2. Resultados de muestras de propóleo de Luis Carranza</i>	84
<i>Anexo 3.3. Resultados de muestras de propóleo de San Miguel</i>	85
<i>Anexo 3.4. Parámetros de la relación señal/ruido de las bandas cromatográficas de propóleos de Cangallo.....</i>	87
<i>Anexo 3.5 Parámetros de la relación señal/ruido de las bandas cromatográficas de propóleos de Luis Carranza</i>	89
<i>Anexo 3.6. Parámetros de la relación señal/ruido de las bandas cromatográficas de propóleos de San Miguel</i>	91
<i>Anexo 3.7. Tabla de curva de calibración de flavonoides.....</i>	93
<i>Anexo 3.8. Figura de curva de calibración de flavonoides</i>	93
<i>Anexo 3.9. Tabla de curva de calibración de fenoles</i>	93
<i>Anexo 3.10. Figura de curva de calibración de fenoles</i>	94
<i>Anexo 3.11. Medida de las conidias de Colletotrichum gloeosporioides.....</i>	94

Resumen

La antracnosis en frutos de palto es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno que provoca la descomposición de los frutos durante la poscosecha. El propóleo producido por las abejas (*Apis mellifera* L.) es una resina que posee efectos antifúngicos y antibacterianos atribuidas a su contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos. El objetivo fue evaluar el efecto antifúngico de Extractos Etanólico de Propóleos (EEP) frente a *C. gloeosporioides*, para lo cual se utilizaron muestras de propóleos procedentes de las localidades de Cangallo, Luis Carranza y San Miguel preparadas a tres concentraciones 25%, 50% y 75%. Se trabajó con un Diseño Completo al Azar (DCA), con 10 tratamientos y 5 repeticiones, empleando la metodología de medio contaminado. El hongo fue inoculado en medio PDA mediante discos de micelio con mediciones diarias. Para el análisis químico de los EEP, se utilizó la metodología de cromatografía en capa fina para la identificación de flavonoides y cromatografía gases acoplado a espectrometría de masas para la detección de compuestos volátiles. Los resultados obtenidos con la fórmula de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM) evidenciaron que todos los EEP inhiben el crecimiento del *C. gloeosporioides*. Las mayores inhibiciones se registraron a la concentración del 75 %, con valores de 69.85 % para Luis Carranza, 68.91 % para Cangallo y 59.37 % para San Miguel. Asimismo, los análisis cromatográficos revelaron que los propóleos de Luis Carranza y Cangallo presentaron mayor diversidad de flavonoides, mientras que los de Luis Carranza mostraron la mayor cantidad de compuestos volátiles según los resultados obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Palabras claves: Propóleo, *Colletotrichum gloeosporioides*, cromatografía de capa fina y de gases, Extractos Etanólico de Propóleos (EEP) y efecto antifúngico.

Introducción

El cultivo de palto (*Persea americana* Mill) forma parte de la vida del hombre desde hace miles de años. En los últimos años, se ha convertido en uno de los cultivos más valorados a nivel mundial. Esto puede deberse a sus destacadas propiedades nutricionales y a los beneficios que brinda para la salud. La palta ha adquirido importancia económica por los avances en temas agronómicos del cultivo, como la mejora genética para obtener variedades más resistentes a distintas enfermedades, técnicas de riego eficientes, fertilización y manejo de plagas, lo que ha permitido aumentar los rendimientos y la calidad del fruto. En nuestro país, la producción de palta también ha mostrado una tendencia creciente, siendo la variedad Hass la más apreciada. Esta variedad se destaca no solo por su excelente composición nutricional, sino también por su cáscara gruesa, que facilita su transporte y almacenamiento, lo que ha sido clave para su éxito comercial (Zapata et al., 2020).

El fruto de palto es uno de los frutales de mayor importancia comercial en Perú; sin embargo, las pérdidas poscosecha de este cultivo están asociadas principalmente con factores como la manipulación inadecuada en la cosecha, daños mecánicos, almacenamiento deficiente y transporte inapropiado. Estos aspectos no solo afectan la calidad del fruto, sino que también favorecen el desarrollo y ataque de enfermedades que reducen el valor comercial (Benítez et al., 2021; Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI, 2008)).

La palta enfrenta problemas en su almacenamiento, siendo uno de los problemas más críticos la presencia de patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis. Este hongo forma apresorios que le permiten penetrar la cutícula del fruto, lo que facilita el desarrollo de una hifa subcuticular que permanece inactiva hasta que el fruto madure o surjan las condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Con los cambios fisiológicos que ocurren cuando el fruto madura, el hongo se reactiva y comienza a causar síntomas de la enfermedad, ocasionando pérdidas económicas de hasta el 20% de la producción (Tapia et al., 2020). Según Mayek - Pérez et al. (2009), *Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo que tiene la capacidad de permanecer en un estado de infección latente en el fruto, lo que complica su control y manejo en condiciones poscosecha.

Beno y Prusky (2000, Mayek - Pérez et al. 2009) señalan que la antracnosis provoca pérdidas importantes durante el almacenamiento y la comercialización, debido al deterioro de los frutos. La sintomatología inicial se manifiesta con la aparición de manchas blandas,

húmedas, ligeramente decoloradas y de forma circular. Con el tiempo, estas manchas se tornan de color café oscuro y presentan masas de conidias de color rosa o salmón en el pericarpio. Este proceso de deterioro lleva al ablandamiento y pudrición de la pulpa o mesocarpio, lo que a menudo resulta en la pérdida total del fruto.

El propóleo es un material resinoso colectada por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de diversas exudaciones de brotes, néctar de flores y otras secreciones de las plantas. Este material es transportado a la colmena, donde las abejas lo utilizan para sellar grietas y agujeros, embalsamar invasores que logran ingresar a la colmena y ofrecen protección química contra microorganismos patógenos. Las abejas recolectan con sus mandíbulas, resinas de las yemas, peciolos, brotes y grietas de diferentes árboles, y estando en las colmenas son combinadas con secreciones salivales, ceras, enzimas (Luna y Polo, 2024). Se ha identificado que el propóleo contiene al menos 300 compuestos diferentes, cuya concentración varía dependiendo del origen geográfico, botánico y de la época de recolección. La interacción de estos compuestos es esencial para sus actividades biológicas, como las propiedades antibacteriana y antifúngica (Rodríguez, 2020).

La tendencia global está experimentando un cambio hacia la reducción del uso de fungicidas en la producción de alimentos, debido a la creciente preocupación por los efectos negativos de estos productos en la salud humana y el medio ambiente. En este contexto, se viene generando interés en los productores y científicos, sobre la búsqueda de alternativas más seguras y ecológicas para reducir las pérdidas poscosecha de frutas, así como la prevención del ataque de enfermedades en las plantas.

Una alternativa es la aplicación de extractos etanólicos de propóleos, que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, entre ellos el *Colletotrichum gloeosporioides*, que es el agente causal de la antracnosis en el palto. El uso de propóleo, debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, se presenta como una opción para reducir la incidencia de esta enfermedad durante la etapa de almacenamiento y transporte de los frutos. Esta estrategia no solo contribuye a mantener la calidad de las frutas, sino que también representa un enfoque sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

Teniendo en cuenta los antecedentes relacionados a la producción y el manejo poscosecha, el trabajo de investigación se llevó a cabo con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera* en *Colletotrichum gloeosporioides* de palto.

Objetivos específicos

1. Obtener extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera*.
2. Reconocer las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* de palto.
3. Realizar el análisis químico de los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera*.
4. Comparar *in vitro* el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera* en *Colletotrichum gloeosporioides* de palto.

Capítulo II

Marco teórico

1.1. Antecedentes de la investigación

Martínez (2009), al investigar el efecto antifúngico de los propóleos sobre tres hongos fitopatógenos, llegó a la conclusión que *Colletotrichum* spp, era más sensible a los propóleos mostrando una inhibición en el crecimiento radical de hasta el 39% en concentraciones que oscilaban entre 1000 y 5000 ppm. De manera similar, las especies *Aspergillus* y *Penicillium* presentaron inhibiciones del 25% y 19%, respectivamente. En el mismo estudio, también se evaluaron cepas de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella tiphy*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, para demostrar la capacidad antibacteriana de los propóleos. Los resultados mostraron halos de inhibición de 9 mm a una concentración de 10mg/ml, evidenciando el potencial de los propóleos como agente antimicrobiano.

En una investigación realizada en el laboratorio de micología de la Universidad Centroccidental, evaluaron la acción fungistática de propóleo de *Apis mellifera* sobre cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*, el hongo que infecta frutos de palta (*Persea americana* Mill), papaya (*Carica papaya*) y maracuyá (*Passiflora edulis*). Para ello, se utilizaron diluciones de propóleo en etanol al 0%, 15%, 20% y 30%, con un diseño experimental en laboratorio de 5 tratamientos y 5 repeticiones para cada uno de las cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*. El medio de cultivo empleado fue agar – papa – dextrosa (APD). Llegando a la conclusión de que hay diferencia significativa entre los tratamientos en comparación con el testigo, evidenciando el efecto supresor del propóleo sobre el crecimiento micelial del patógeno (Pineda et al., 2010).

En la tesis realizada por Agosto y Cuya (2021), evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos liofilizados de propóleos provenientes de Ayacucho y Huaral, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Además, realizaron análisis químico para determinar los componentes cualitativos y cuantitativos presentes en los propóleos. Los resultados de la investigación concluyeron que las muestras de propóleos de *Apis mellifera* L. procedentes de Ayacucho presentaron mayor actividad antimicrobiana en comparación con las muestras de propóleos de Huaral.

Areff et al. (2022), examinaron el recubrimiento de propóleo en etanol y probaron su actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en plátanos (*Musa acuminata*). En la investigación, se midió el índice de gravedad de la enfermedad (DSI) en plátanos inoculados artificialmente con *C. gloeosporioides*. Los resultados mostraron que el plátano control (sin tratar) fue más propenso a desarrollar necrosis, alcanzando un 60% de necrosis, mientras que el plátano recubierto con propóleo inhibió con éxito la actividad del hongo. Además, se observó que a mayor concentración y recubrimiento de extractos etanólicos de propóleo, más efectiva fue la protección contra el hongo. En cuanto al almacenamiento, el testigo perdió más peso (6,92%) y presentaron una disminución en los sólidos solubles totales, mientras que los plátanos tratados con una capa de propóleo al 11% mejoraron en parámetros como: el color, el contenido de sólidos solubles totales y la acidez titulable, lo que sugiere que el propóleo no solo tiene propiedades antifúngicas, sino que también ayuda a mantener la calidad en la postcosecha de la fruta.

1.2. Cultivo de palto (*Persea americana* Mill)

1.2.1. Origen y distribución

Sánchez – Pérez (1999, como se citó en Barrientos, 2024) menciona que los hallazgos más antiguos de palto primitivo se localizaron en la región Central de México y Guatemala, abarcando gran parte de Centroamérica, que abarca desde la Sierra Madre Oriental en Nuevo León, México, hasta Costa Rica. Esto representa una evidencia de que esta área podría ser el centro de origen del palto y del género *Persea*. Esta teoría fue respaldada por Schaffer et al. (2013), quienes afirmaron que el cultivo de palto (*Persea americana* Mill) tiene su origen en una zona geográfica de México, que se extiende desde las montañas centrales y orientales de México y Guatemala hasta la costa Pacífico de Centroamérica. Según el Instituto Líder en Capacitación Agrícola (INTAGRI, 2018) basándose en las evidencias taxonómicas, se

considera que los ancestros silvestres del palto cultivados en la actualidad se originaron en el centro-sur de México y Centroamérica.

El palto o aguacate, es originario de América, y se considera que esta especie tiene su origen en las zonas montañosas situadas al occidente de México y Guatemala. Esta teoría fue respaldada por evidencias arqueológicas encontradas en Tehuacán, Puebla, que sugieren que el palto apareció hace unos 8.000 a 12.000 años (Flores-Izquierdo y Espinoza-Villanueva, 2023). Según Bernal y Díaz (2020), la distribución del cultivo de palto se extiende desde México hasta Perú, abarcando Centro América, Colombia, Venezuela y Ecuador. Pérez et al. (2015) señalan que el cultivo de palto creció inicialmente de forma silvestre, posteriormente fue domesticado y, con la conquista por parte de los españoles, se distribuyó a Europa y otras regiones del mundo.

Actualmente, el cultivo de palto se extiende por numerosas regiones tropicales y subtropicales del mundo, con una producción anual que alcanza los dos millones de toneladas. Este cultivo no solo es de gran importancia económica debido al crecimiento de la demanda nacional como internacional, sino también porque representa una de las mejores alternativas en la agricultura debido a sus beneficios alimentarios (Ataucusi, 2015). Su expansión y éxito se deben, en parte, a la creciente valoración de sus propiedades nutricionales y versatilidad en diversas industrias.

1.2.2. Clasificación taxonómica

Bernal y Díaz (2008) y Pérez et al. (2015), mencionan que el palto se clasifica como se detalla a continuación:

División	: Spermatophyta
Subdivisión	: Angiospermae
Clase	: Dicotyledoneae
Sub clase	: Dipétala
Orden	: Ranales
Suborden	: Magnolineas
Familia	: Lauraceae
Género	: Persea

Especie : *Persea americana* Mill

Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura (INTAGRI, 2018) menciona que la amplia variabilidad genética de la especie *Persea americana* ha favorecido la diversidad de subespecies, principalmente debido al aislamiento de cada subespecie bajo diferentes condiciones agroclimáticas. Esto ha dado lugar a la formación de distintas formas botánicas, conocidas también como razas, cultivares, subespecies o grupos hortícolas o ecológicas. Esta diversidad genética no solo contribuye a la adaptación del cultivo a diversas condiciones ambientales, sino que también ha sido clave en el desarrollo de variedades con características específicas que responden a las demandas del mercado y las necesidades de los productores.

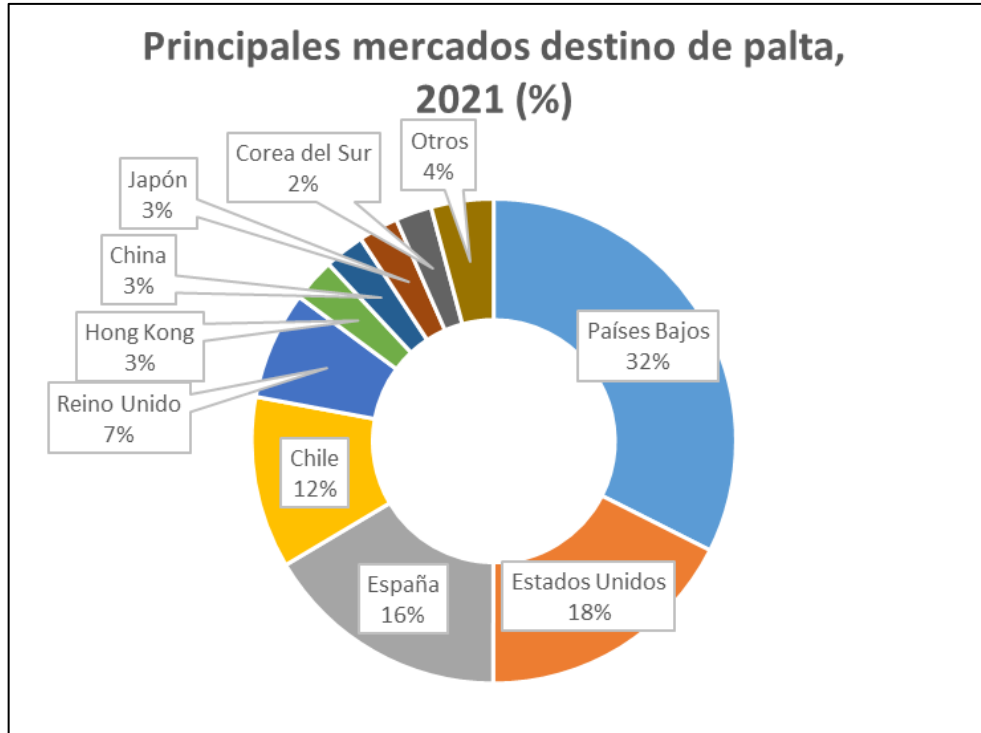
1.2.3. Exportación e importancia de palto variedad Hass

Según Suárez (2023), la palta es considerada a nivel mundial como una fruta de alto valor nutricional, lo que explica el porqué de su crecimiento significativo y la expansión de su comercialización en los últimos años. La palta variedad ‘Hass’ ha experimentado una creciente demanda durante la última década, en gran parte gracias a su reconocimiento global como un súper alimento. Esto lo sitúa como uno de los frutos que posee propiedades nutricionales, superando a otros productos horto-frutícolas con su popularidad y beneficios para la salud.

Según la Superintendencia Nacional de Aduanas y de Administración Tributaria (SUNAT, 2022), “los principales países demandantes de la palta peruana son Países Bajos, Estados Unidos, España, Chile, Reino Unido, Hong Kong, China, Japón y Corea del Sur. La figura 2.1 muestra la distribución de los mercados, donde las exportaciones peruanas en el 2021 representaron un 32%, 18%, 16%, 11%, 7%, 3%, 3%, 3% y 2% respectivamente” (p.01).

Figura 2.1.

Principales mercados de destino de palto peruano en el exterior



Nota: Se observa la distribución (%) de mercados de exportación de palta peruana 2021(SUNAT, 2022)

Según datos del Sistema de Información para el Desarrollo Empresarial Rural (SIDER, 2024), en la figura 1.2 ilustra que las exportaciones de palta superan los US\$ 217 millones en el primer trimestre de 2024, producto de la venta de 95 591 toneladas de palto que se cultiva en diversas regiones del país. SIDER, (2024) también menciona que el 87 % de la palta consumida en los mercados de América, Europa y Asia corresponden a la variedad Hass, mientras que el 13 % incluye otras variedades como Fuerte, Zutano y Ettinger. Este incremento en las exportaciones resalta la importancia del palto en la economía peruana y su consolidación como uno de los principales productos de exportación a nivel mundial.

Figura 2.2.

Exportaciones peruanas de palto



Nota: Se muestra el crecimiento de las exportaciones peruanas de palta durante los últimos años hasta el primer trimestre del año 2024 (SIDER, 2024).

Según Romero (2019), diversos estudios científicos realizados en las universidades de Europa y Estados Unidos respaldan la consideración del palto como una fruta de alto valor nutricional. Esto se debe a su contenido de nutrientes, que la diferencian de otras frutas; el contenido de aceite en el palto oscila entre 8% y 30%, dependiendo de la variedad, lo que la convierte en una fuente alta en contenido de luteína; un carotenoide que desempeña un papel crucial en la protección de la enfermedad ocular, especialmente en la prevención de enfermedades relacionadas con la edad, como la degeneración macular.

El Comité de palta Hass (2012, como se citó en Villar, 2016) señala que la variedad Hass tiene menor cantidad de agua en comparación con otras variedades. Esta característica no solo influye en su textura y sabor, sino que también puede tener implicaciones en su conservación y transporte, destacando la variedad Hass como opción preferente para el comercio internacional.

Según Dreher y Davenport (2013), la variedad Hass, al igual que otras variedades comercialmente relevantes, se caracteriza por su excelente composición en nutrientes esenciales entre los que destaca: fibra dietética, potasio, magnesio, vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina K. 1. Además, esta variedad es rica en folato, vitamina B-6, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, colina, luteína/zeaxantina, fitoesteroles y aceite rico en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) a 1,7 kcal/g lo que la convierte en una fuente calórica densa y saludable para la dieta.

Tabla 2.1.

Contenido nutricional del palto 'Hass' (Persea americana Mill.)

Nutrientes/fitoquímicos	Valor por 100 g	1 fruta, 136 g	1/2 fruta, 68g (ocasión para comer NHANES)	1 ración, 30 g (ración NLEA)
Próximos				
Agua (g)	72.3	98,4	49.2	2.7
Energía (kcal)	167	227	114	50
Energía (kcal) (fibra insoluble ajustada)	148	201	101	44
Proteína (g)	1,96	2.67	1.34	0,59
Lípidos totales (grasas) (g)	15.4	21	10.5	0.62
ceniza, g	1,66	2.26	1.13	0,50
Carbohidratos, por diferencia (g)	8.64	11.8	5.9	2.59
Fibra dietética total (g)	6.8	9.2	4.6	2
Azúcares, totales (g)	0,30	0,41	0,21	0,09
Almidón (g)	0,11	0,15	0,08	0,03
Minerales				
Calcio (mg)	13	18	9	0
Hierro (mg)	0,61	0,83	0,42	0,18
Magnesio (mg)	29	39	19.5	0
Fósforo (mg)	54	73	36,5	1
Potasio (mg)	507	690	345	152
Sodio (mg)	8	11	5.5	0
Zinc (mg)	0,68	0,92	0,46	0,20
Cobre (mg)	0,17	0,23	0,12	0,05
Manganeso (mg)	0,15	0,20	0,10	0,05
Selenio (ug)	0,40	0,50	0,25	0,10
Vitaminas y fitoquímicos				
Vitamina C (mg)	8.8	12	6	0.6
Tiamina (mg)	0,08	0,10	0,05	0,02
Riboflavina (mg)	0,14	0,19	0,09	0,04
Niacina (mg)	1.91	2.6	1.3	0,57
Ácido pantoténico (mg)	1.46	2	1	0,44
Vitamina B-6 (mg)	0,29	0,39	0,19	0,09
Folato, alimentos (µ g)	89	121	60,5	2
Colina, total (mg)	14.2	19.3	9.65	4.3
Betaina (mg)	0,7	1	0,5	0.2
Vitamina B-12 (µ g)	0	0	0	0
Vitamina A (µ g RAE)	7	10	5	0
Caroteno, beta (µ g)	63	86	43	1
Caroteno, alfa (µ g)	24	33	16.5	0
Criptoxantina, beta (µ g)	27	37	18.5	0
Luteína + zeaxantina (µ g)	271	369	185	81
Vitamina E (alfa-tocoferol), mg	1,97	2,68	1.34	0,59
Tocoferol, beta (mg)	0,04	0,05	0,03	0,01
Tocoferol, gamma (mg)	0,32	0,44	0,22	0,10
Tocoferol, delta (mg)	0,02	0,03	0,02	0,01
Vitamina K 1 (filoquinona) (µ g)	21	28.6	14.3	0.3
Lípidos				
Ácidos grasos, saturados totales (g)	2.13	2.9	1.45	0,64
16:0 (g)	2.08	2,82	1.41	0,62
Ácidos grasos, monoinsaturados totales (g)	9.8	13.3	6.65	2.94
18:1 (g)	9.07	12.3	6.15	2.71
Ácidos grasos poliinsaturados totales (g)	1,82	2.47	1.24	0,55
18:2 (g)	1,67	2.28	1.14	0,50
18:3 (g)	0,13	0,17	0,09	0,04
Colesterol (mg)	0	0	0	0
Estigmasterol (mg)	2	3	1.5	0
Campesterol (mg)	5	7	3.5	0
Beta-sitosterol (mg)	76	103	51,5	2

Nota. Contenido nutricional de palto 'Hass' (*Persea americana Mill.*) (USDA, (2011).

1.2.4. Cultivo Hass

Téliz (2000, citado por Bernal y Díaz, 2020) menciona que la palta Hass es la más consumida en todo el mundo la cual fue patentada en 1935 y se cree que descende del antiguo cultivar Lyon. Este cultivar moderno ha sido objeto de diversos estudios genéticos, los cuales han revelado que se origina a partir de una combinación de dos progenitores, con

aproximadamente un 10 – 15% de material genético proveniente de la raza mexicana y el resto de la raza guatemalteca, esta mezcla genética que contribuye a las características organolépticas distintivas de la variedad Hass, así como su adaptabilidad a diversas condiciones climáticas.

El cultivo de palto, particularmente Hass, Fuerte, Reed y Colinred, se consideran adecuados para condiciones de clima frío y moderado (Téliz, 2000, citado por Bernal y Díaz, 2020). Sin embargo, Condeña y Palomino (2007) señalan que la variedad Hass muestra sensibilidad a las bajas temperaturas y a la humedad ambiental, especialmente durante la floración. Por esta razón, se recomienda evitar su cultivo en regiones expuestas a vientos fuertes, ya que estas condiciones pueden causar la deshidratación de flores y brotes tiernos, lo que afecta negativamente el desarrollo del fruto y, por ende, su productividad del cultivo.

Maldonado (2015) señala que el cultivar Hass es considerada la variedad más cultivada en el mundo, por su elevado rendimiento y calidad superior de su pulpa, donde el fruto de esta variedad tiene la capacidad de permanecer en la planta por un largo periodo sin perder la calidad, además menciona que debido a la cáscara gruesa que posee la variedad Hass permite prolongar su transporte a larga distancia.

Romero (2019) menciona que aproximadamente el 95% del comercio mundial es de palta Hass, por las características de fácil transporte y el procesamiento poscosecha. Esta variedad domina el mercado y participa en el comercio mundial.

1.2.5. Morfología del fruto

La Dirección General de Información Agraria (DGIA, 2008) describe que los frutos de palto Hass tienen una forma ovalada y algo periforme, siendo ligeramente más pequeños que los de la variedad Fuerte, con un peso que oscila entre 180 a 360 gramos. Su pulpa es de buena calidad, con semillas pequeñas que permanecen adheridas al mesocarpio. La piel es gruesa y áspera, de color verde que se torna ligeramente negra cuando está en el árbol, y al cosecharse cambia a un tono morado o negro a medida que el fruto madura. Una característica destacada es que, una vez alcanzado la madurez, puede permanecer en el árbol durante periodos prolongados sin deteriorarse, manteniendo sus propiedades organolépticas y nutricionales. Esta particularidad es ventajosa para los productores, ya que permite realizar cosechas escalonadas. Además, esta variedad tiene mayor importancia en los mercados internacionales, debido a su capacidad de resistencia durante el transporte y almacenamiento prolongando su vida útil,

maximizando la eficiencia en la cadena de suministro asegurando que el producto llegue al consumidor en óptimas condiciones.

Según Gallegos (2002), el peso del fruto de la variedad Hass oscila entre 170 gr a 350 gr, presentando una forma ovalada y una pulpa cremosa de excelente sabor. Esta variedad se distingue por su textura libre de fibra y un contenido de aceite que puede alcanzar hasta el 23,7%, la cáscara es algo coriácea y rugosa, adoptando un color púrpura oscuro al madurar, y presenta una semilla pequeña que permanece adherida a la cavidad del fruto, lo que puede influir en la facilidad de su extracción.

Según Téliz (2000, citado por Bernal y Díaz, 2020), el fruto presenta un peso que varía entre 170 y 350 gramos. Sin embargo, para Beta Complejo Agroindustrial (2024), el peso del fruto es relativo en varios países, incluso llegando a ser más livianos que el rango mencionado por Téliz. Independientemente del tamaño del fruto, la pulpa se caracteriza por su textura cremosa, siendo completamente libre de fibra. La cáscara presenta una consistencia coriácea y rugosa, mostrando un color verde a negro mientras el fruto permanece en el árbol por algunos meses después de la madurez fisiológica, sin que ello afecte la calidad del producto (Beta Complejo Agroindustrial, 2024).

1.2.6. Madurez del fruto

Según Ramsay (2021), la selección del momento óptimo de madurez para la cosecha de frutas y hortalizas es un factor importante que influye significativamente en la vida útil poscosecha y su comercialización. En este proceso, es fundamental establecer claramente una distinción entre la madurez fisiológica y la madurez comercial, ya que cada una de ellas tiene implicaciones distintas para la calidad del producto y su aceptación en el mercado.

Zapata et al. (2020) indican que en los frutos de palta Hass se identifican dos estados de madurez: la madurez fisiológica y la madurez organoléptica. La calidad de fruta se establece desde el momento de cosecha, siendo la madurez fisiológica un factor determinante que impacta tanto en la calidad del almacenamiento como en la aptitud comestible. La palta se considera fisiológicamente maduro cuando alcanza un estado específico de desarrollo en el cual, si es cosechado, madura a una condición comestible, presentando un sabor aceptable y una textura característica en contraste, a una fruta que no ha alcanzado la madurez fisiológica, aquella que

no ha llegado a su desarrollo la cual puede ablandarse, pero no ofrece la calidad necesaria para el consumo.

1.2.7. Manejo del cultivo durante la cosecha y poscosecha

Condiciones para la cosecha palto

Téliz (2000, como se citó en Bernal y Díaz, 2020) y Sandoval et al., (2020) destacan que durante la cosecha es importante monitorear el proceso de corte, ya que una técnica inadecuada puede reducir la aptitud del fruto. La cosecha debe de llevarse a cabo utilizando materiales adecuados, asegurando que una parte del pedúnculo permanezca adherida al fruto (se recomienda dejar de 8 – 10 mm) para evitar una maduración acelerada y la posible penetración de patógenos. Es fundamental evitar el contacto directo del fruto con el suelo, ya que esto puede ocasionar daños mecánicos y contaminación del producto. Además, es recomendable almacenar las cajas de fruta en áreas sombreadas para minimizar la exposición a la luz solar y mantener la calidad del fruto durante el almacenamiento.

Cerdas et al. (2014) señalan que, si la palta se cosecha antes de alcanzar la madurez óptima, el consumidor enfrentará dificultades al cortarla, como la adherencia del hueso a la pulpa y del tegumento, lo que dificulta la separación de la pulpa de la cáscara. Además, el fruto puede presentar zonas de pulpa endurecida, lo que afecta negativamente la textura. Como resultado, el sabor puede volverse aceitoso o a mantequilla, lo que no satisface las expectativas del consumidor.

Manejo poscosecha

La Norma Técnica Peruana NTP 011.018 establece los requisitos mínimos que deben cumplir las paltas de diversos cultivares de *Persea americana* Mill., perteneciente a la familia Lauraceae. Estas paltas deben de suministrarse frescas al consumidor, tras un adecuado proceso de acondicionamiento y envasado. Es fundamental que las paltas hayan alcanzado una fase de desarrollo fisiológico que garantice la culminación del proceso de maduración, conocido como la madurez de consumo, conforme a los criterios específicos de cada variedad y las condiciones de la zona de producción. La palta madura no debe presentar sabor amargo, el contenido mínimo de materia seca en la pulpa debe ser de 21.5%. Además, los frutos deben estar enteros, visiblemente sanos, libres de insectos, sin daños por plagas y carecer de olores y sabores extraños que puedan comprometer su calidad organoléptica (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI, 2014).

Cosecha y transporte

Según MIDAGRI (2024) y Herrera-González et al. (2020), la cosecha de palto en campo se lleva a cabo utilizando tijeras o ganchos equipados con navajas montadas sobre una vara, en bolsas recolectoras, las cuales son descargadas en jabas plásticas una vez llenas. Las jabas se colocan una sobre otra y están diseñadas para apilarse sin mucho riesgo de que caigan o se rompan. Los frutos deben de tener una intensidad y uniformidad en tamaño, forma, ausencia de pudriciones y ausencia de defectos; estas características mencionadas dependen mucho de la variedad. Por ejemplo, el color varía de acuerdo a la variedad; en variedad Hass, el punto sazón se manifiesta cuando en la superficie del fruto el color verde empieza a oscurecerse y a tornarse opaco o mate. Posteriormente, el traslado de las cajas hacia la empacadora se efectúa utilizando remolques o camiones debidamente sellados, lo que garantiza la protección del producto durante el transporte y minimiza el riesgo de contaminaciones externas, asegurando así que los frutos de palto lleguen en óptimas condiciones para el proceso de embalaje.

Recepción en planta o área de acopio

Las jabas se deben de ubicar inmediatamente en el área de acopio, donde el sitio debe ser seco y fresco, donde se deja enfriar durante 12 horas para que la temperatura del fruto pueda disminuir. La temperatura óptima para el almacenamiento de la palta variedad 'Hass' es 6 °C, con una humedad relativa entre el 90 y 95%; sin embargo, cuando el fruto presenta un alto contenido de materia seca (superior 30%) y aceite, la temperatura puede disminuir hasta 2 °C. Para los destinos más lejanos, como Europa y Asia, el proceso de refrigeración se complementa con el uso de atmósferas controladas, en la cual se reduce la concentración de oxígeno (O₂) a niveles de 2-5% y se incrementa el dióxido de carbono (CO₂) a un rango de 3-10%. Es fundamental que estas concentraciones se mantengan durante el transporte, ya que las atmósferas controladas disminuyen la velocidad de respiración del fruto, la producción de etileno autocatalítico, la actividad enzimática y contribuyen así mantener la firmeza del producto (Herrera-González et al., 2020).

Bernardo (2024) afirma que, una vez finalizada la cosecha, la fruta debe transportarse de forma inmediata al lugar de empaque para ser enfriada. El enfriamiento es un proceso crucial, ya que reduce la respiración de la fruta y previene el crecimiento de hongos oportunistas, además cuando la fruta es enfriada lo más antes posible, conserva mejor su frescura, lo que contribuye a mantener su calidad durante el almacenamiento y transporte.

Selección y empaçado

La selección y el empaçado de las paltas comienzan con el pesado en las jabas, seguido del volcado en las bandas o la línea de procesamiento. Este proceso continuo con el lavado y la desinfección de frutos, garantizando la eliminación de contaminantes, posteriormente se realiza el secado, seguido de una prueba exhaustiva en la que seleccionan los frutos, descartando aquellos que presentan daños visibles. A continuación, se realiza el calibrado y finalmente los frutos son empaçados en cajas de cartón o plástico, asegurando su protección y presentación adecuada para su comercialización (etiquetado de las cajas que contiene información comercial la que solicita la institución fitosanitaria del país, el SENASA). Cabe mencionar que todo este proceso solo es realizado por el personal capacitado, los cuales deben de estar equipados con delantal que protejan al producto de estar en contacto con el vestido o directamente con la piel para evitar posibles contaminaciones por microorganismos (Ruiz, 2024).

Almacenamiento y transporte

Según Herrera-González et al. (2020), una vez empaçada, la fruta debe ser almacenada en cámaras de frío para mantener su frescura y controlar el nivel de etileno, lo cual previene la maduración prematura. Antes de cargar los contenedores para su transporte, se verifican las condiciones de temperatura y se asegura que los frutos estén libres de plagas.

Por otro lado, Ruiz (2024) indica que, después de realizar el paletizado en parihuelas de madera y el proceso de enzunchado, la fruta debe ser sometida a frío forzado y almacenarla a una temperatura de 4°C para garantizar su conservación, antes de proceder finalmente con el despachado de los frutos hacia su destino final.

Bernardo (2024) afirma que en la actualidad se utilizan tecnologías como la atmósfera modificada y controlada para prolongar la vida útil de la fruta durante el transporte. Estas técnicas controlan la concentración de gases en el entorno de almacenamiento, lo que previene la maduración acelerada. Con todos estos cuidados y precauciones, se garantiza que los frutos de palto lleguen a su destino final en óptimas condiciones, lista para ser disfrutada por los consumidores de todo el mundo.

1.3. *Colletotrichum gloeosporioides*

1.3.1. *Importancia económica*

De acuerdo con Alvarado (2015), este patógeno se distribuye a nivel mundial y ocasiona pérdidas económicas tanto en las etapas de pre como de postcosecha, especialmente en regiones

tropicales, subtropicales y de clima templado. Se considera una de los principales patógenos de las plantas, aunque también puede actuar como saprofito o invasor secundario de tejidos en decadencia. Las pérdidas asociadas al patógeno causante de la antracnosis se manifiestan principalmente a través de una disminución en la cantidad y calidad del producto cosechado.

Según Alvarón (2024), el agente causal de la antracnosis es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, un patógeno fúngico cuyo ciclo de vida le permite sobrevivir en una estrecha asociación con el árbol, predominando en las ramas. Desde esta ubicación, el hongo tiene la capacidad de contaminar los frutos en desarrollo a través del escurrimiento de agua libre o las condiciones ambientales como lluvias, neblinas o rocíos.

Para Trinidad-Ángel et al. (2017), la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum* spp., se posiciona como una de las principales enfermedades que afecta el palto, impactando negativamente la calidad del fruto y mermando su producción. En los últimos años, se han reportado dificultades para la prevención y erradicación de esta patología.

1.3.2. Generalidades del hongo

Van et al. (2021, como se citó en Alonso, 2023) señala que el micólogo alemán Heinrich Rehm fue el primero en describir el género de *Colletotrichum* en 1881. Este género abarca numerosas especies fitopatógenas que son responsables de diversas enfermedades en las plantas, en particular la especie *Colletotrichum gloeosporioides* fue reportada por Penzig y Saccardo, quienes se basaron en el estudio de *Vermicularia gloeosporioides*, un ejemplar que fue recolectada de especies de género Citrus en Italia.

Sutton (1992, como se citó en Trinidad-Ángel et al., 2017) considera que la morfología, el rango y la especialización se han descrito en 38 especies dentro del género *Colletotrichum*, de las cuales ocho presentan un estado sexual. Este patógeno tiene la capacidad de infectar una amplia gama de especies, ya sea de manera individual o en asociación provocando infecciones mixtas con diferentes especies de *Colletotrichum*. Entre las plantas afectadas se incluyen la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), el olivo (*Olea europaea* L.), diversas plantas forrajeras (*Stylosanthes* spp.) y el camote (*Dioscorea* spp.); sin embargo, en el caso de palto (*Persea americana* Mill) y el almendro (*Prunus dulces* Mill.) no se ha documentado la ocurrencia de infección mixta por especies de este género.

1.3.3. Clasificación taxonómica

La clasificación proporcionada por la Base de Datos Mundial de (European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO,2019)), *Colletotrichum gloeosporioides* se clasifica de la siguiente manera:

Dominio	: Eucariota
Reino	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Clase	: Sordariomycetes
Orden	: Glomerellales
Familia	: Glomerellaceae
Género	: <i>Colletotrichum</i>
Especie	: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

1.3.4. Características morfológicas

Alonso (2023) menciona que morfológicamente el hongo germina debajo de la epidermis en forma de cojines o discos en el tejido vegetal, a menudo aparece como cerdas o espinas oscuras en los bordes, los conidióforos son simples y alargados, mientras que los conidios, que son estructuras de reproducción del hongo, son transparentes y presentan células individualmente con formas cilíndricas u ovaladas; además, los grupos de masas conidiales son de color salmón característico, lo que contribuye a su identificación morfológica.

De acuerdo con Rojo-Báez et al. (2017), las colonias de *Colletotrichum gloeosporioides* tienen formas circulares o irregulares, con márgenes enteros u ondulados, que generalmente son de color blanco a salmón o gris a negro con masas conidiales de color anaranjado.

Para Favaro et. al. (2022), *Colletotrichum* morfológicamente presenta conidias cilíndricas con bordes obtusos y alargadas, son hialinas y tienen dimensiones que varían entre 7 a 20 μm de longitud y 2.5 μm a 5 de ancho y 9 a 24 μm de longitud x 3 a 6 μm de ancho

facilitando su identificación bajo condiciones microscópicas. Forman acérvulos en zonas necróticas o en las partes que presentan lesiones la planta, redondeados, alargados o de forma irregular pudiendo llegar 500 μm de diámetro.

1.3.5. Ciclo biológico

Según Alvarón (2024), una vez que el fruto es infectado, el inóculo se establece en un estado latente, permaneciendo inactiva hasta que se presenten las condiciones de mayor susceptibilidad, las cuales se desencadenan principalmente durante las etapas de almacenamiento y maduración postcosecha, donde el fruto se encuentra más vulnerable a la proliferación del hongo. Como consecuencia de esta infección, se produce una reducción en la calidad comercial del fruto, lo que repercute negativamente en su valor en el mercado y la satisfacción del consumidor.

El inóculo, en la mayoría de los casos, alcanza a su hospedero a través de la acción del agua o mediante la dispersión de las conidias, los cuales se adhieren a la cutícula de la planta y germinan en un periodo de un día. Durante este proceso se desarrolla un tubo germinal que varía entre 10 y 20 μm , la cual culmina antes de formar un apresorio terminal, que penetra directamente la cutícula de las plantas. Las principales fuentes de inóculo son las conidias y los acérvulos que se generan en estructuras conocidas como acérvulos y peritecios, respectivamente (Agrios, 2005).

Según Contreras (2006), este patógeno ingresa al fruto a través de aberturas naturales como poros y estomas, así como por lesiones o heridas, penetrando de forma directa a través de las barreras celulares. Posteriormente, el patógeno limita su crecimiento a la capa epidérmica, donde permanece en un periodo de latencia y a medida que el fruto madura, los cambios fisiológicos inducen la formación de tejido que favorece la reactivación del patógeno causando el desarrollo de la enfermedad y la aparición de los síntomas característicos.

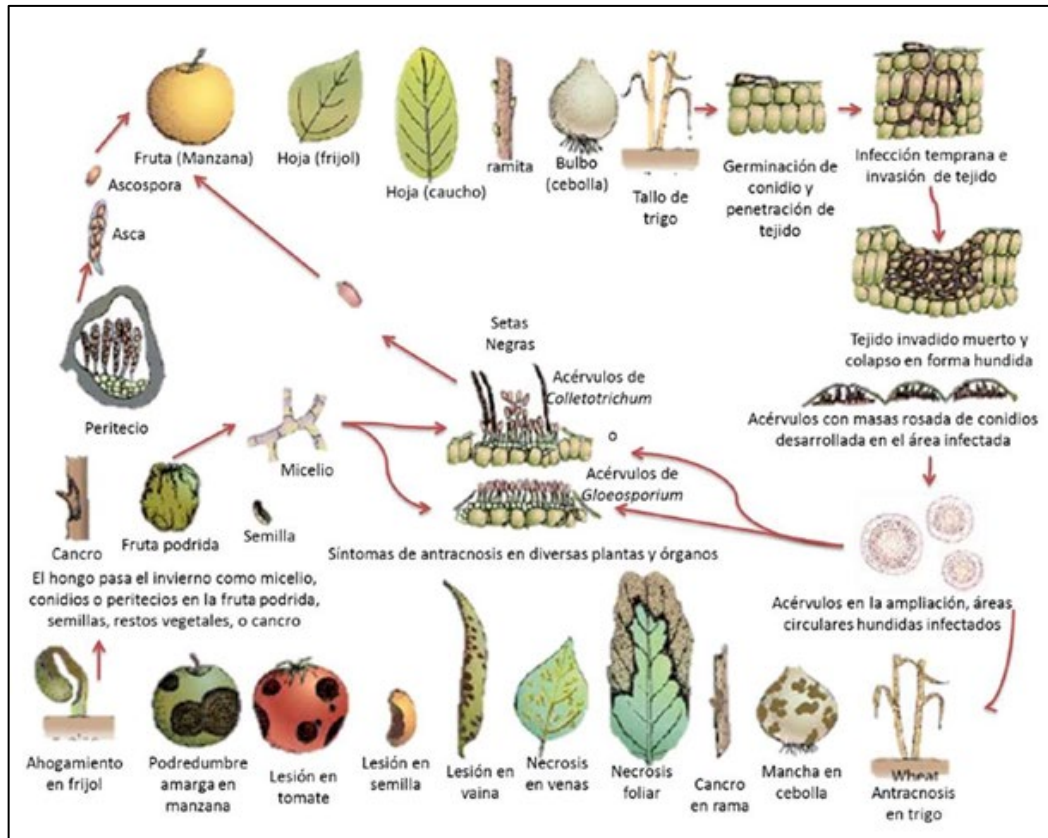
Cuando *Colletotrichum* coloniza con éxito el tejido vegetal mediante una infección hemibiótrofa, el patógeno desencadena un cambio hacia un comportamiento necrotrófico. Esta invasión inicial permite al hongo establecer un entorno adecuado para su desarrollo, ya que obtiene nutrientes y recursos necesarios de los tejidos vegetales para su posterior manifestación de los síntomas patológicos (Contreras, 2006).

Mendgen y Hahn (2002) destacan un aspecto importante, aunque poco conocido, de la fase de crecimiento necrotrófico, que se manifiesta cuando el fruto afectado permanece aparentemente intacto, a pesar de la dispersión y destrucción del tejido circundante. Este fenómeno sugiere que las cutinasas, enzimas implicadas en la degradación de las cutículas, están involucradas en la penetración inicial y su posterior síntesis y/o actividad. A medida que el micelio se desarrolla, forma estructuras reproductivas como acérvulo y peritecios en la superficie del fruto. Estos producen conidias que se encuentran inmediatamente por debajo de la cutícula intacta, la cual eventualmente se rompe, liberando los conidias al ambiente, esta liberación inicia un nuevo ciclo de infecciones, facilitando así la propagación del patógeno y estableciendo nuevas colonias en otros tejidos vegetales.

Rodríguez et al. (2009, como se citó en Villa 2019) afirma que la antracnosis es una enfermedad fúngica causada por diversas especies del género *Colletotrichum*. Esta enfermedad puede afectar los tejidos de las plantas en todas sus etapas fenológicas, especialmente los frutos, tanto durante su desarrollo y madurez como en su almacenamiento. Las etapas del ciclo de vida de este patógeno se describen a continuación: 1) Deposición en las superficies del hospedante, donde los conidios se adhieren a las superficies de los tejidos vegetales, 2) Fijación de la conidia en la superficie preparándose para germinar, 3) Germinación de la conidia, una vez fijados forman un tubo germinal, 4) Producción del apresorio, desarrolla el apresorio para que facilite la penetración en las células, 5) Penetración de la epidermis de la planta, atraviesa la epidermis de la planta, iniciando la colonización, 6) Crecimiento y colonización del tejido del hospedante, el patógeno se expande dentro del tejido y 7) Producción de acérvulos y esporulación, forman acérvulos que contienen conidias, las cuales son liberados para iniciar nuevas infecciones.

Figura 2.3.

Ciclo de vida de Colletotrichum



Nota: Se muestra el ciclo de vida de *Colletotrichum* y el rango de infección en las plantas (Agrios, 2005).

1.3.6. Fuente de inóculo y conservación del hongo

Según Alvarado (2015, citando los trabajos realizados de Bailey y Jeger, 2004), las fuentes de inóculo para *Colletotrichum* incluyen tanto acérvulos como peritecios jóvenes. Estas estructuras reproductivas contienen conidias y ascosporas que se encuentran encerrados en un material húmedo y mucilaginoso, el cual constituye un complejo mixto. Este material está predominantemente compuesto por polisacáridos y glicoproteínas, además de contener enzimas en pequeñas cantidades que ayudan a la patogénesis.

Agrios (2005), describe que el hongo sobrevive durante el invierno en tejidos vegetales infectados, como tallos, hojas y frutos, en forma de micelio o esporas. La formación de ascosporas en frutos momificados da inicio a infecciones primarias, las cuales son facilitadas por la presencia de estos tejidos infectados. El micelio sobreviviente se activa rápidamente y produce conidias, los cuales son responsables de generar infecciones tanto primarias como infecciones secundarias que se lleva a efecto mediante la penetración directa a los tejidos sanos. Una vez que los tejidos son invadidos por las conidias, el micelio se desarrolla intercelularmente, permitiendo que el hongo se propague dentro del hospedero. Este proceso de

infección puede incluir un periodo de latencia durante el cual el micelio puede permanecer inactivo antes de que las células vegetales muestren signos de descomposición.

Según Alvarón (2024), esta enfermedad fúngica está asociada principalmente con los árboles y afecta principalmente las ramas, donde el agua libre (lluvia, niebla, rocío) facilita el ingreso del hongo al árbol, contaminando los frutos en desarrollo. Una vez infectado el fruto, el inóculo permanece latente, a la espera de condiciones susceptibles para la infección del fruto, la cual se activa principalmente después de la cosecha y durante el almacenamiento conduciendo a una disminución de la calidad comercial de la fruta.

1.3.7. Factores ambientales que favorecen el desarrollo del patógeno.

Franz (1982 como se citó en Alvarado, 2015) señala que el proceso de infección del patógeno es responsable de la antracnosis favorecido por condiciones climáticas específicas, como altas precipitaciones, elevada humedad ambiental y temperaturas elevadas. Sin embargo, es importante destacar que la presencia de cada uno de esos factores debe ser de forma simultánea y en niveles óptimos, ya que la insuficiencia de uno de ellos puede impactar negativamente el proceso de infección, esto implica que cada factor es importante y su interacción conjunta determina la efectividad de infección del patógeno.

De acuerdo con Agrios (2005), la humedad, la lluvia en forma de salpicaduras y el agua corriente desempeña un papel fundamental en la distribución y diseminación de las conidias sobre la planta. Esto se debe a que, a que el mucilago hidrofílico que los rodea, las conidias son transportados desde las partes vegetativas hacia los órganos florales y frutos. Además, Agrios (2005) destaca que las malas prácticas culturales, como la escasa profundidad del suelo al momento de realizar los hoyos para la siembra pueden debilitar las plantas.

1.3.8. Sintomatología

Según Trinidad-Ángel et al. (2017), el hongo se manifiesta en diversas partes de la planta. En las hojas, aparecen pequeñas manchas de color café claro que pueden parecer más extensas cuando se agrupan. En brotes tiernos, se observa abultamientos alrededor del estos, con exudaciones de savia de color blanco, a este síntoma se le conoce ordinariamente como sarampión; y puede llegar a secar las partes infectadas. Las flores infectadas por el hongo presentan un tizón, lo que puede provocar su caída o el aborto de los frutos, inicialmente se desarrollan pequeñas prominencias de color verde brillante en cualquier etapa de desarrollo del

fruto, aunque el ataque es más severo cuando el fruto es pequeño. Las lesiones son circulares y, con el tiempo, cambian de color pasando de café a negro claro, y adquieren una consistencia corchosa; la penetración del hongo en el tejido del fruto puede ocurrir antes o después de su madurez, ya que la muerte celular no es un requisito indispensable para que se produzca la patogénesis. Los daños en los frutos se manifiestan a través de síntomas como manchas oscuras, hundidas, circulares o angulares acompañadas de masas de conidias de color rosa o salmón.

Por otro lado, Gautam (2014), describe los síntomas iniciales de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* como manchas redondas a ovaladas, hundidas, que se desarrollan a medida que progresa la enfermedad y finalmente conduciendo a la necrosis del tejido o la muerte. Sin embargo, debido a las variables condiciones agroclimáticas, los síntomas de la enfermedad también pueden variar según la región, el huésped y el medio ambiente. Los síntomas incluyen manchas de color marrón oscuro, redondas a circulares rodeadas de un halo amarillo en las hojas y el pecíolo, manchas ovaladas que se extienden irregularmente a toda la hoja y como lesiones pequeñas o grandes en los frutos.

Coria (2009, como se citó en Trinidad-Ángel et al., 2017) afirma que la antracnosis se distingue por la aparición de lesiones oscuras y hundidas, con formas elipsoidales circulares, que presentan abundantes esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas. La entrada del hongo en el fruto puede ocurrir antes de la maduración, pero los daños no se manifiestan hasta que el fruto alcanza su estado maduro. Este fenómeno es posible debido a que la muerte celular no es una condición indispensable para la patogénesis asociada a *Colletotrichum* spp.

1.3.9. Estrategias de alternativas de control

A lo largo de los años, los fungicidas de síntesis han sido una de las estrategias más empleadas por los agricultores para controlar las enfermedades fúngicas, los más comunes contienen en su composición compuestos químicos como los fosforados, clorados, carbamatos, nitroderivados y derivados aromáticos (Martínez-Romero et al., 2008 y Cantrell et al., 2012 citado por Mesa et al., 2019). Sin embargo, la preocupación por la toxicidad de estos productos y los residuos en frutos y vegetales destinados al consumo ha generado una creciente preocupación en los últimos años. El uso de agroquímicos se está restringiendo cada vez más debido a sus efectos adversos, que incluyen potenciales riesgos cancerigénicos para la salud humana. Además, la aplicación de fungicidas contribuye a la contaminación ambiental,

manifestándose en la disminución de la biodiversidad, la degradación del suelo y la contaminación del agua. Estos efectos nocivos no solo impactan el en ecosistema, sino que también plantea serios desafíos para la agricultura sostenible. Otra consecuencia alarmante del uso excesivo de fungicidas es la aparición de resistencia microbiana, lo que puede hace que los patógenos se vuelvan más difíciles de controlar y puede empeorar aún más la situación a largo plazo (Cantrell et al., 2012 citado por Mesa et al., 2019).

Los fungicidas sintéticos no garantizan la erradicación efectiva del agente etiológico responsable de las enfermedades. Pequeñas poblaciones del patógeno pueden sobrevivir por diversas razones, tales como las aplicaciones deficientes o inadecuadas del producto, la presencia de cepas resistentes, individuos dentro de la población que son menos sensibles y, por lo tanto, no son controlados, así como la introducción de inóculos provenientes de cultivos vecinos. Esta situación, ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de manejo que sean amigables con el ambiente para controlar los microorganismos fitopatógenos. En la actualidad, se vienen desarrollando diversas estrategias para el control de esta enfermedad como el uso de bioinsumos, bioinsecticidas, bioherbicidas, bioacaricidas, bionematicidas y biofungicidas, estas alternativas abarcan enfoques como el uso de estimulantes de las defensas obtenido de plantas y microorganismos. Entre estas innovaciones se encuentra uso de extracto etanólico de propóleo, que han demostrado potencial en el control de enfermedades agrícolas (Mesa et al., 2019; Moposita Echanique, 2023). Estas estrategias no solo buscan reducir la dependencia de productos químicos sintéticos, sino también promover una agricultura más sostenible.

1.4. Propóleo

1.4.1. Origen y definición

Según lo mencionado por López (2011) y Moposita (2023), el propóleo tiene dos orígenes principales. El primero es interno, generado durante la primera fase de la digestión del polen, y el segundo proviene de las gomorresinas colectadas de los árboles, que las abejas mezclan con cera, enzimas salivares y otras sustancias. Estas mezclas son transportadas en las corbículas hasta el interior de la colmena, donde tiene diversos usos, como sellar los agujeros para evitar el ingreso del viento, frío, luz o enemigos naturales, y reducir la incidencia de infecciones.

Según Farré et al. (2004), el propóleo de *Apis mellifera* es un producto de la colmena formado por resinas recolectada de ciertas plantas, néctar de flores específicas y brotes, que se mezclan con saliva, enzima y otras secreciones. El propóleo es una combinación de resinas naturales que las abejas desarrollan utilizando materiales derivados de componentes vegetales, flores y exudados. Generalmente, el propóleo es una sustancia dura, quebradizo y lipófila; sin embargo, cuando se calienta entre 25 y 45 °C, se transforma en una sustancia suave, flexible, gomosa y extremadamente pegajosa (Chavda et al., 2014). Este producto es el resultado de la colección de las abejas de una gran variedad de plantas, especialmente de los brotes que contienen cierta especie de goma o sustancia pegajosa (Moposita, 2023).

El propóleo es una sustancia natural producida por *Apis mellifera*, compuesta por resinas vegetales como los exudados resinosos. Las abejas recolectan y mastican, enriqueciendo su composición con secreciones salivares. Este material se almacena y transporta a la colmena, donde se mezcla con cera y polen. Se cree que el propóleo cumple funciones importantes dentro de la colmena, como sellar aberturas para excluir corrientes de aire y proteger contra invasores externos como parásitos y microorganismos patógenos manteniendo la colmena libre de enfermedades que puedan afectar a las abejas. Sin embargo, la función principal del propóleo es prevenir la descomposición de materia orgánica (es decir, organismos que han sido asesinados por las abejas después de la invasión) esto se logra inhibiendo el crecimiento microbiano dentro de la colmena. Por lo tanto, la presencia de propóleo crea un ambiente desfavorable para el desarrollo de hongos y otros microorganismos, lo que contribuye a mantener la colmena en condiciones asépticas y establece una barrera protectora (Curifuta et al., 2012).

1.4.2. Propiedad y composición química del propóleo

De acuerdo con Peña (2008, citado por Moposita 2023), una de las propiedades más relevantes del propóleo es su actividad antimicrobiana y antifúngica, la cual se le atribuye principalmente a la presencia de los flavonoides en su composición. Curifuta et al. (2012) señala que se han realizado numerosos estudios que han demostrado las diversas actividades farmacológicas del propóleo, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antioxidantes y antitumorales.

La composición del propóleo presenta variaciones significativas, siendo aproximadamente 50% resina, 30% cera, 10% aceites esenciales, 5% polen y 5% otros compuestos orgánicos. Se han identificado más de 300 compuestos en el propóleo, de las cuales

160. De estos el 50% son compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (flavonas, isoflavonas y flavonoles), ácidos aromáticos y ésteres (como ácido cafeico, cinámico y otros), aldehídos aromáticos (vainillina e isovainillina), cumarinas y triglicéridos fenólicos (Curifuta et al., 2012).

Según Curifuta et al. (2012), la composición del propóleo está relacionada con las resinas y bálsamos que provienen de distintas especies vegetales y otras sustancias recolectadas durante el traslado a la colmena, la cual tiene ventaja adicional como agente antimicrobiano y resistencia a la aparición de bacterias, se encuentran un promedio de 300 compuestos químicos teniendo como principales grupos a los polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides) y terpenoides considerados como los más activos en una extracción etanólica al 70%.

El amplio uso del extracto etanólico de propóleo (EEP) se debe a su efectividad terapéutica y su actividad medicinal. Este extracto se obtiene mediante la extracción etanólica al 70%, y se usan con fines médicos, dietéticos, cosméticos y para el control de enfermedades de plantas y animales. Dentro del grupo flavonoides presentes en el propóleo, se encuentran compuestos como la crisina, pinocembrina, apigenina, galangina, tecycrisina, pinostrobina y otros. Los terpenos son los responsables del olor característico del propóleo. Además, se puede encontrar micro y macroelementos como Mn, Fe, Si, Mg, Zn, Se, Ca, K, Na y Cu, así como vitaminas B1, B2, B6, C y E (Agurto y Cuya, 2021).

1.4.3. Acción antifúngica, bactericida, bacteriostática y fungistática del propóleo de *Apis mellifera*.

Los efectos bacteriostáticos y fungistáticos se refieren a la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias y hongos, respectivamente, sin causar la muerte. En contraste, los agentes bactericidas y antifúngicos son compuestos que inducen la muerte celular de estos microorganismos, esto ocurre debido a la secreción de sustancias por parte de los organismos que actúan como defensas naturales o agentes antibacterianos, provocando la lisis celular y reduciendo así la población de patógenos en el hospedero. El principal problema en la actualidad es la fragilidad de los antibióticos y antifúngicos, lo que ha llevado a un aumento en la resistencia microbiana, esta variación se debe a las variaciones genotípicas de estos microorganismos que pueden surgir como resultado de un uso inadecuado, dosis incorrectas y duración del tratamiento ineficaz (Jiménez y Rodríguez, 2018).

El propóleo, contiene una gran variedad de compuestos con actividad biológica frente a diversas especies de bacterias y hongos, se han posicionado como una alternativa viable para el desarrollo y formulación de nuevos fungicidas orgánicos. Estos productos ofrecen beneficios con menores efectos secundarios, con espectro de acción más amplia y costo inferior en comparación con los tratamientos convencionales disponibles para el manejo de enfermedades infecciosas (Jiménez y Rodríguez, 2018). Para determinar la concentración mínima inhibidora (CMI), es necesario tener en cuenta que los propóleos inhibirán el crecimiento de diversos microorganismos a la concentración más baja permitida, conocida como concentración mínima fúngica (CMF). Una de las propiedades más estudiadas del propóleo es la estimulación de la epitelización, lo que se logra al inhibir el desarrollo de patógenos y reducir la proliferación celular, un proceso que se basa en la inhibición de ARN polimerasa (Jiménez y Rodríguez, 2018).

El uso del propóleo como antifúngico tiene una larga historia que se remonta a las civilizaciones antiguas como Grecia y Roma, donde se empleaba para tratar principalmente infecciones fúngicas de la piel y las mucosas. Durante la Edad Media, su aplicación se extendió para tratar afecciones como el pie de atleta, recientemente estudios han demostrado que el propóleo es eficaz contra diversos hongos patógenos (Villa Gañay et al., 2025). La investigación ha mostrado que los compuestos fenólicos del propóleo, como los flavonoides y los ácidos fenoles, interactúan con las membranas celulares de los hongos, provocando alteraciones en su estructura y permeabilidad. Esta alteración provoca la fuga de componentes esenciales para la célula fúngica, como proteínas e iones, lo que finalmente conduce a la muerte celular (Mayta-Tovalino et al., 2014)

La actividad antimicrobiana es una de las propiedades fundamentales de los propóleos, su acción antifúngica se basada en la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática, y principalmente se le atribuye a flavonoides como pinocembrina, quercetina naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol y pinobanskina, así como alteración en los canales iónicos a consecuencia de reacciones de fosforilación y desfosforilación, disminuyendo la inhibición de la motilidad del patógeno provocando cambios en la morfología, factor importante en la virulencia (Rodríguez et al., 2020).

1.5. Cromatografía

1.5.1. *Reseña histórica*

Desde sus inicios, el análisis de objetos de interés o muestras ha requerido de técnicas de separación para su cualificación y cuantificación lo que ha llevado al desarrollo de diversas metodologías en el campo de la química analítica. Entre estas, la cromatografía se destaca como una técnica fundamental que engloba múltiples métodos de separación. Su origen se remonta a la separación de tinturas y extractos de plantas, utilizando tiras de papel como soporte; a lo largo del tiempo la cromatografía ha evolucionado y diversificado, dando lugar a diferentes variantes como la cromatografía líquida, la cromatografía de gases y la cromatografía de columna, cada una adaptada para trabajar distintas necesidades analíticas y de separación (Montoya y Páez, 2012).

Según Montoya y Páez (2012), la cromatografía es una técnica analítica para separar, cualificar y cuantificar los componentes de una muestra. Según Matthew et al. (2023), la cromatografía es un método de separación muy sofisticada con distintas variantes, en la que intervienen dos fases: una móvil y otra estacionaria, que interactúan entre sí mientras se desplazan. La muestra ingresa en la fase móvil y sus componentes se distribuyen entre los componentes fijos y móviles, y la cantidad de tiempo para la separación en cada fase es distinto. Si el componente pasa la mayor parte del tiempo en la fase móvil, la muestra se moverá rápidamente, por el contrario, si la mayor parte del componente se encuentra en la fase estacionaria, el producto quedará retenido y el movimiento será más lento.

Según Araceli et al. (2010), la cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes se distribuyen en dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil, que se desplaza a través de la fase estacionaria. La separación se basa en principios como la absorción, adsorción, reparto y arrastre mecánico, lo que genera una competencia entre ambas fases por los componentes que se desean separar.

1.5.2. *Cromatografía en capa fina*

Para Vallejo-Rosero et al. (2021), la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography), es una técnica analítica sencilla que consiste en la separación de los componentes de la muestra mediante migración diferencial a través de una fina capa de adsorbente, generalmente sostenido por una superficie plana inerte que permite determinar el grado de pureza de un compuesto, identifica y compara analitos, determina la efectividad de una etapa de purificación (pág. 20). La cromatografía en capa fina es una técnica que se utiliza

para separar mezclas de moléculas orgánicas, comparar muestras según su estructura química, solubilidad en grasas, agua y determinar la pureza de los compuestos. Para determinar se fija un soporte con un espesor de aproximadamente de 0.1 mm que contiene gel de sílice (SiO₂), alúmina (Al₂O₃), silicato de magnesio, celulosa que sirve como la fase estacionaria las cuales interactúan con la muestra (soluto) a través de enlaces de hidrogeno. Por otro lado, la fase móvil aporta el eluyente (disolvente), cuya función es extraer el compuesto de la mezcla, los disolventes más utilizados son: el hexano, tetraclorometano, cloroformo, diclorometano acetato de etilo y acetona (Ruiz, 2020).

Para Jiménez y Rodríguez (2018), la cromatografía en capa fina es un método físico que facilita la separación de sustancias utilizando una capa delgada o estacionaria de sílica gel G y fase móvil. La visualización de las manchas se realiza mediante luz ultravioleta o utilizando reactivos reveladores.

Según Apaza (2015), el R_f o Factor de Retardo, se define como la relación de distancias recorridas por una especie química y el disolvente desde el punto de origen en el cromatograma. Este valor es constante para cada compuesto bajo condiciones específicas, como el tipo de disolvente, temperatura y otros factores experimentales. El R_f es una medida fundamental en cromatografía, ya que permite identificar y comparar sustancias, proporcionando información valiosa sobre su comportamiento en el proceso de separación.

El factor de Retardo se denotado por la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el Analito}}{\text{Distancia recorrido por el Disolvente}}$$

1.5.3. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Es una técnica para la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles, se encarga de la separación de los componentes de una mezcla química mediante la distribución entre una fase gaseosa que fluye (móvil) y una fase líquida estacionaria que está sujeta a un soporte sólido. Debido a su simplicidad, sensibilidad y eficacia en la separación de mezclas, la cromatografía de gases se ha convertido es una de las herramientas más relevantes en el campo de la química (Montoya y Páez, 2012).

Por otro lado, Gutiérrez et al. (2002) indica que la cromatografía de gases es una técnica separativa que permite la separación de mezclas muy complejas. Una vez que los componentes individuales de nuestra mezcla han sido separados, detectados e incluso cuantificados, el único

dato disponible para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención asociado a los picos cromatográficos correspondientes.

Según Montoya y Páez (2012) y Gutiérrez et al. (2002), la cromatografía de gases se utiliza para llevar a cabo análisis tanto cuantitativos, así como cualitativos, así como la purificación de compuestos, además permite la determinación de constantes termoquímicas, incluyendo el calor de vaporización de soluciones, la presión de vapor y los coeficientes de actividad. Mediante este método de cromatografía de gases, los componentes de la muestra vaporizada se separan al interactuar con dos fases: una fase gaseosa que influye a través de una columna y una estacionaria que esta adherida a las paredes de la columna. Durante la separación por cromatografía, la muestra se inyecta en la fase móvil, que es un gas inerte como el helio (He), nitrógeno (N₂) o hidrogeno (H₂). En esta fase, los distintos componentes de la muestra atraviesan la fase estacionaria, la cual está fijada en el interior de la columna. Durante este proceso, cada componente interactúa de manera diferente con la fase estacionaria, lo que permite su separación en función de sus propiedades específicas.

Gutiérrez et al. (2002), señalan que la cromatografía de gases se utiliza para cuantificar los componentes individuales presentes en una muestra mediante curvas de calibración. Para este propósito, se emplean diversos detectores que se basan generalmente en la medición de propiedad físicas específicas de los componentes a analizar. Algunos detectores son universales, mientras que otros son más selectivos y responden únicamente a ciertos componentes de la muestra. En este contexto, la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases puede funcionar como un detector universal para la cuantificación de sustancias orgánicas, registrando todos los iones generados (modo TIC) o bien un detector más específico al seleccionar iones de masa determinadas (modo SIR).

1.5.4. Modelos celulares de investigación

Para Jiménez y Rodríguez (2018) los modelos celulares son procesos que permiten controlar las células en condiciones óptimas de investigación, pueden usarse *in vivo* o *in vitro* y conducen a nuevos descubrimientos al aislar y/o inhibir células que son perjudiciales para diferentes organismos. Se aíslan, purifican y propagan para determinar resultados específicos y desarrollar tratamientos basados en propiedades metabólicas dirigidas a tipo de células específicas. Asimismo Jiménez y Rodríguez (2018), mencionan que una de las principales ventajas del uso de cultivos celulares en investigación es el control de todos los factores del medio de cultivo, incluidos los factores fisicoquímicos (CO₂,

O₂, tensión superficial, pH, temperatura, presión osmótica) y factores fisiológicos (factores de crecimiento, densidad celular, hormonas) y vienen a ser una alternativa eficaz para el descubrimiento de productos para contrarrestar de manera más íntegra e eficaz las distintas enfermedades en los distintos campos.

Capítulo III

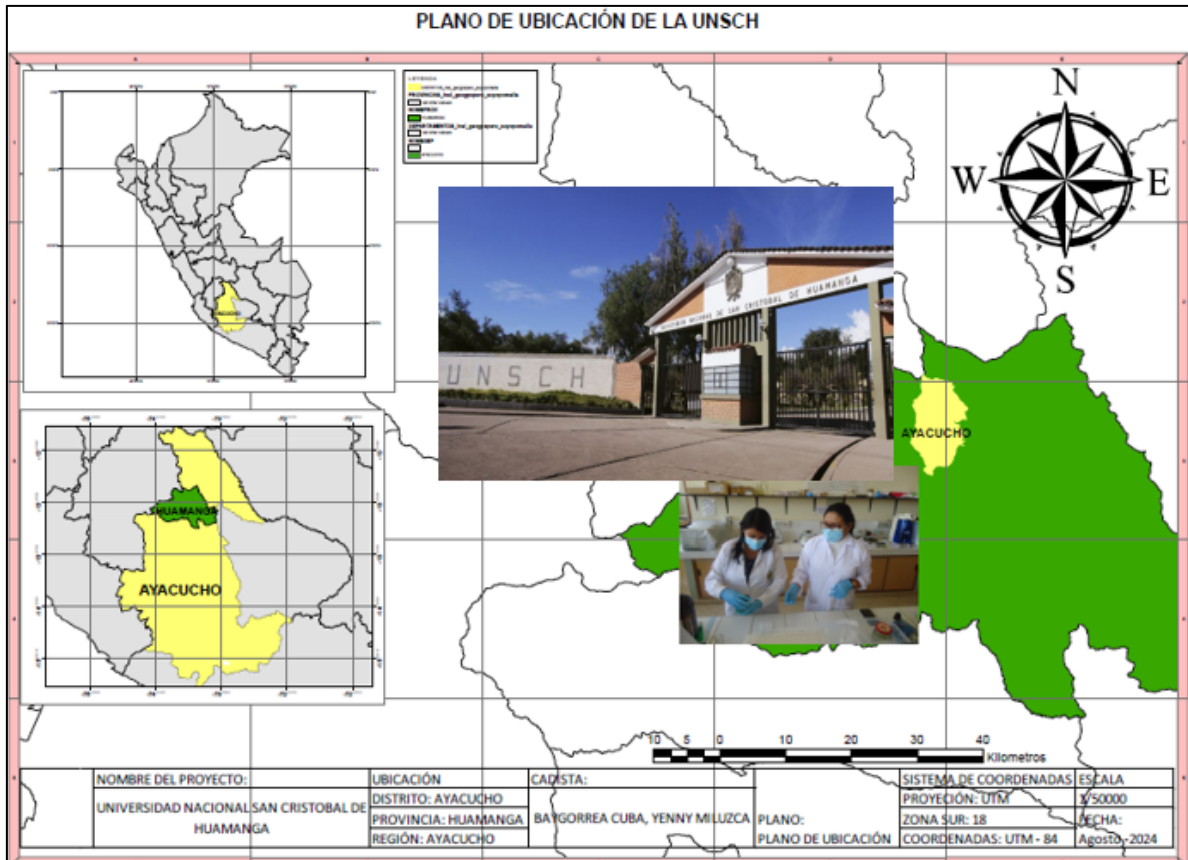
Metodología

3.1. Lugar del experimento

El trabajo de investigación se realizó en tres laboratorios. La obtención, purificación y prueba de medio contaminado se realizó en el Laboratorio de Fitopatología. La estandarización de la metodología de cromatografía en capa fina para el análisis de los EEPs en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, ambos laboratorios son de la Escuela Profesional de Agronomía. El análisis final de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, capa fina, la cuantificación de fenoles y flavonoides en el Laboratorio de Control de Calidad de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Los tres laboratorios pertenecen a la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, a una altitud de 2792 msnm. Ubicándose en las coordenadas geográficas de 13°08'38" latitud Sur y 74°13'17" longitud Oeste, provincia de Huamanga y región Ayacucho.

Figura 3. 1.

Mapa de ubicación de lugar de instalación de Colletotrichum gloeosporioides aislados de frutos de palto Hass.



3.2. Tipo de investigación

Descriptivo – Aplicada

3.3. Variables

3.3.1. Variables independientes

Frutos de palto variedad Hass

Propóleos de tres localidades de Ayacucho

Indicador:

Genero de hongo *Colletotrichum gloeosporioides*

3.3.2. Variables dependientes

Caracterizaciones morfológicas, concentración de EEP y porcentaje de inhibición de crecimiento micelial

Indicadores.

Características microscópicas

- Largo de conidias
- Ancho de conidias

- Forma de conidias
- Color de conidias

Características microscópicas

- Color de colonias
- Tipo de micelio
- Ratio de crecimiento

Indicadores:

Concentración de propóleos

- 25%
- 50%
- 75%

Características químicas de los EEPs

- Contenido de compuestos volátiles y semivolátiles
- Cuantificación flavonoides y fenoles.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

- Frutos de palto variedad Hass
- Placa Petri con aislados puros de *Colletotrichum gloeosporioides*

3.4.2. Colección de muestras

El material biológico que se utilizó estuvo constituido por muestras de propóleo de *Apis mellifera*, colectado mediante el método del raspado de los apiarios de los distritos de Cangallo, Luis Carranza y San Miguel. Las muestras de palto variedad Hass se colectaron del distrito de San Miguel.

Tabla 3.1.

Lugar y ubicación de la recolección de muestras de propóleos de Apis mellifera.

Código de muestra	Lugar de colección	Ubicación geográfica
A	Incaraccay- Cangallo	13°33'39.3"S 74°9'55.8"W
B	Luis Carranza – La Mar	13°13'29"S 73°53'48"W

3.5. Técnicas e instrumentos

- Colección de muestras
- Aislamiento y purificación
- Identificación morfológica
- Efecto inhibitorio
- Concentración de EEP
- Cuantificación de flavonoides y fenoles.

3.5.1. Materiales

- Frutos de palto Hass
- Tubos de ensayo sin rosca y con rosca
- Porta y cubre objetos
- Placas Petri de vidrio y plástico (9 cm).
- Micropipetas (100 – 100 ul, 0 – 100 ul, 1 ml) y tips
- Mechero Bunsen
- Probetas graduadas de vidrio (100 ml, 1000 ml)
- Punzón
- Capilares de vidrio
- Papel aluminio
- Frascos color ámbar
- Bandejas de polietileno
- Papel toalla
- Guantes
- Mascarillas
- Atomizador de vidrio para cromatografía en capa fina de capacidad de 30 ml
- Plumón indeleble
- Franela
- Etiquetas
- Frascos de vidrio transparentes
- Vidrios de 1" x 3"

3.5.2. *Reactivos*

- Extracto etanólico de propóleo
- Medio de cultivo “Papa Dextrosa Agar” (PDA)
- Agua destilada estéril
- Hipoclorito de sodio al 1%
- Alcohol medicinal al 80°, 70° y 96°
- Metanol
- Etanol absoluto
- N – hexano
- Acetato de etilo
- Cloroformo
- Tetraciclina
- Quercetina
- Acido gálico
- Difetil borato
- 2 – aminoetildifetil borato
- Sílica g

3.5.3. *Equipos*

- Balanza de precisión
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Refrigeradora
- Cámara de germinación
- Microscopio óptico
- Cámara fotográfica
- Estufa
- Cromatoplasmas con sílica gel
- Microscopio con regla milimetrada
- Microondas
- Cámara UV – VIS
- Cubra cromatográfica

- Equipo de cromatografía de gases
- Vortex
- Sonicador

3.6. Conducción del ensayo

3.6.1. Colección de frutos de palto Hass

Los frutos palto Hass enviados del distrito de San Miguel al laboratorio de Patología Vegetal de la Escuela Profesional de Agronomía fueron seleccionados en la etapa de madurez adecuada (verde opaco) para el análisis. Este proceso fue crucial para evaluar presencia de patógenos y otros factores que puedan afectar su calidad durante la postcosecha. Las cuales fueron acondicionadas en cámaras húmedas para identificar posibles patógenos, en especial *Colletotrichum gloeosporioides*, hongo responsable de la antracnosis.

3.6.2. Aislamiento y purificación

Para la obtención del patógeno, una vez que llegaron los frutos al laboratorio, se lavaron con agua de caño para eliminar residuos de la superficie, se secó con papel toalla estéril y la desinfección se realizó sumergiendo los frutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, se colocó el material vegetal en papel toalla estéril y se dejó secar. Los frutos se colocaron en cámara húmeda para favorecer la esporulación, y las observaciones fueron diarias hasta visualizar los signos de la enfermedad. El aislamiento se realizó tomando una masa de micelio con ayuda de un estilete, la masa se sembró en cuatro puntos de la placa con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), se incubaron a una temperatura de 27 °C durante 5 días. se realizaron siembras continuas hasta obtener un cultivo puro.

3.6.3. Caracterización morfológica

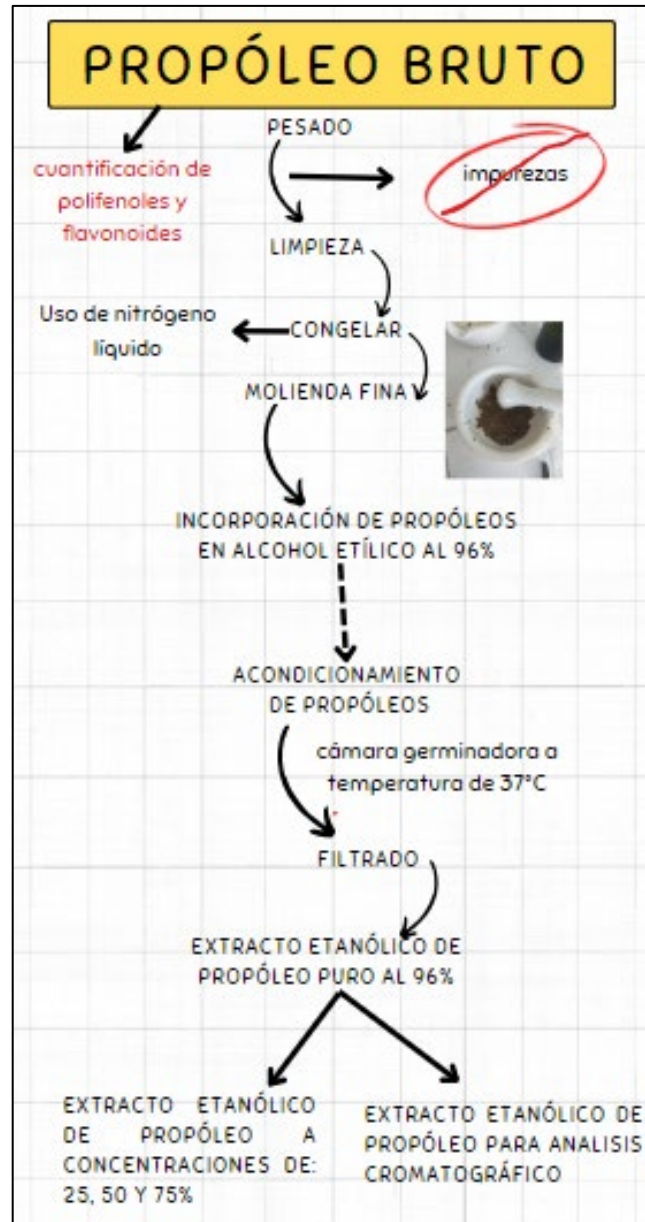
Los aislamientos puros fueron caracterizados morfológicamente teniendo las siguientes consideraciones: color de las colonias, formación de halos concéntricos, forma (cilíndricas, piriforme, ovaladas) y tamaño (largo y ancho) de las conidias. Se tomó las medidas de 200 conidias, esto se realizó con un microscopio óptico de la marca Acu-scope a un aumento de 400X en el microscopio permitió realizar mediciones directas.

3.6.4. Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleos

Se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Checalla y Sánchez- Tito, (2021). Se pesó 50 gr de propóleo de las muestras extraídas de las tres localidades: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, luego se cortaron en trozos formando láminas delgadas y pequeñas, las láminas cortadas se introdujeron en recipientes con nitrógeno líquido, una vez endurecidas las láminas se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino, este se colocó en frascos de vidrio de color ámbar y se adicionó 250 ml de alcohol etílico al 96%, los frascos se colocaron en la estufa a una temperatura de 37°C por 15 días. Diariamente los frascos se agitaron durante 15 minutos para asegurar la correcta mezcla de los componentes. transcurrido los 15 días el sobrenadante se filtró con papel Wathman número 42 con ayuda de embudo, luego el EEP se colocó en la estufa a 50°C por 4 días para eliminar el solvente, el sedimento fue reactivado con 25 ml de alcohol etílico al 96%, obteniendo así los EEP puros al 96%. Finalmente, se colocó 7.5 ml, 5 ml y 2.5 ml de agua destilada en distintos frascos ámbar donde se agregó 2.5 ml, 5 ml y 7.5 ml del EEP puro, para obtener las concentraciones de 25%, 50% y 75%. (p. 05)

Figura 3. 2.

Esquema del proceso de obtención del extracto de propóleo de Apis mellifera



3.6.5. *Análisis de cromatografía en capa fina de los propóleos*

Para la cromatografía en capa fina se siguió las pautas propuestas por Campo-Fernández et al. (2008) y Quispe (2020). Se tomó 1 ml de cada muestra, se agregó 1 ml de metanol, empleando agitación constante para una mejor disolución de las muestras de EEP. Se empleó una placa cromatográfica de vidrio con una altura de 21,5 cm y dimensiones de 23 cm x 6 cm en la base y 28 cm x 13 cm en la parte superior. Se trabajó a temperatura ambiente de 16 °C, empleando placas de Sílica gel (SIGMA ALDRICH). Las placas (50x200mm) fueron activadas previamente en una estufa a 100°C por una hora. La aplicación de muestra se realizó con una micropipeta a 1.5 cm del borde de las placas añadiendo 10 µL y luego se dejó secar al ambiente. Una vez secas las placas se realizó una corrida ascendente utilizando como fase móvil la mezcla

de cloroformo, metanol, agua (7.5:4:0.5). La corrida fue aproximadamente de 17.4 cm durante 59 min 50 s, 1 h 24 min y 1 h 41 min para las muestras de San Miguel, Cangallo y Luis Carranza respetivamente. Después de la corrida, el secado de la placa se llevó a cabo a temperatura ambiente de 16 °C, expuesta a la corriente de aire de la campana. Para el revelado de tipos de flavonoides se roseo el Difenil borato al 1% etanol, utilizando la luz ultravioleta (336 nm).

3.6.6. Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los propóleos

Para la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se siguió el protocolo propuesto por Rodríguez et al. (2020).

El análisis cromatográfico de gases acoplada a espectrometría de masas de los propóleos de *Apis mellifera* de Ayacucho fueron realizados en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Trace GC- Ultra- ITQ 900 de la marca Thermo Scientific (analizador de masas de trampa de iones). Se utilizó el Helio como acumulador de gas y se empleó el modo de inyección Splitless con un volumen de 2 µl. Las condiciones de separación comenzaron a 60°C durante 3 minutos, seguido de tres incrementos de rampa o temperatura: el primero de 20 °C/min hasta alcanzar los 200 °C; el segundo fue de 10 °C/min hasta llegar a los 220 °C; y el tercero, también a 10 °C/min, alcanzado los 240 °C, manteniendo esta temperatura durante 2 min. El tiempo total de análisis fue de 25 minutos 85 segundos. La identificación cualitativa de los compuestos se realiza mediante la comparación de espectros de masas utilizadas como la biblioteca de la base de datos NIS LIBRARY y GCMS DB-PUBLIC-KOVATSRI-VS3.MSP.Library.

3.6.7. Cuantificación de fenoles y flavonoides

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides se utilizó el protocolo propuesto por Hernández et al. (2018). La obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP) se realizó empleando 1 g de propóleo que se disolvió en 25 ml de etanol al 80% y sometido a calentamiento a 40 grados por 2 h; el extracto obtenido fue filtrado y centrifugado para eliminar las ceras, el sobrenadante se concentró a sequedad a temperatura de 40 grados y reconstituido en 25 ml de solvente.

Cuantificación de fenoles se realizó por el método de Folin Ciocalteu, se realizó una dilución 1:20 del EEP, se tomó 1 ml de esta solución, se adicionó 1 ml del reactivo de folin (1:10), y 4 ml de Na₂CO₃ al 1%. Se traslado a la oscuridad por 2 h y se leyó la absorbancia a

725 nm. Se elaboró una curva de calibración con ácido gálico. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de ácido gálico/g muestra.

Cuantificación de flavonoides, se realizó una dilución 1:20 del EEP, se tomó 500 µl de esta solución y se adicionó 100 µl de cloruro de aluminio al 1%, 100 µl de acetato de potasio 1M y 4 ml de etanol al 80%. Se traslado a la oscuridad por 40 min y se leyó la absorbancia a 415 nm. Se elaboró una curva de calibración con quercetina. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de quercetina/g muestra.

3.6.8. Prueba de medio contaminado

Se trabajo con medio PDA estéril, una vez que el medio se encontraba a temperatura de plaqueo (37° - 38°C), se le adicionó las diferentes concentraciones de EEP, utilizando una dosis de 3 L de EEP/cilindro (200 L). Se utilizó el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, cuya siembra fue 8 días antes de la prueba, se tomaron discos del micelio con medio de cultivo con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro, los discos se colocaron en el centro de la placa Petri con medio contaminado. Las placas se incubaron a 27 °C durante 7 días (hasta que el testigo lleno la placa). Se tomaron datos del crecimiento micelial, para lo cual se dibujó cuatro cuadrantes y todos los días a la misma hora se registró el crecimiento por cuadrante, para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM).

El porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo (PICM) se estimó según la fórmula señalada por Salazar et al. (2012).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro en PDA sinEEP} - \text{diámetro en PDA con EEP}}{\text{diámetro en PDA sinEEP}} \times 100$$

3.7. Análisis de datos

Los datos recopilados fueron procesados mediante el software estadístico InfoStat. Se realizó el Análisis de varianza (ANVA) y la prueba de Tukey con un nivel de confianza 95 %.

Debido a las condiciones en las que se realizó el trabajo de investigación, el diseño más apropiado fue el Diseño Completo al Azar (DCA), cuyo diseño incluye 10 tratamientos que se describen en la tabla 3.2.

Tabla 3. 2.

Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamientos	Descripción
T0	PDA solo (testigo)
T1	PDA+ EEP de Cangallo – Incaraccay al 25%
T2	PDA+ EEP de Cangallo – Incaraccay al 50%
T3	PDA+ EEP de Cangallo – Incaraccay al 75%
T4	PDA+ EEP de San Miguel al 25%
T5	PDA+ EEP de San Miguel al 50%
T6	PDA+ EEP de San Miguel al 75%
T7	PDA+ EEP de Luis Carranza al 25%
T8	PDA+ EEP de Luis Carranza al 50%
T9	PDA+ EEP de Luis Carranza al 75%

Capítulo IV

Resultados y discusión

4.1. Obtención de extractos etanólicos

Se obtuvo Extractos Etanólicos de Propóleos de los distritos de Cangallo, Luis Carranza y San Miguel. De los extractos puros (96% de alcohol etílico), mediante dilución se elaboró tres concentraciones; 25%, 50% y 75%, con las cuales se prepararon el medio contaminado para las pruebas posteriores.

4.2. Caracterización morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides*

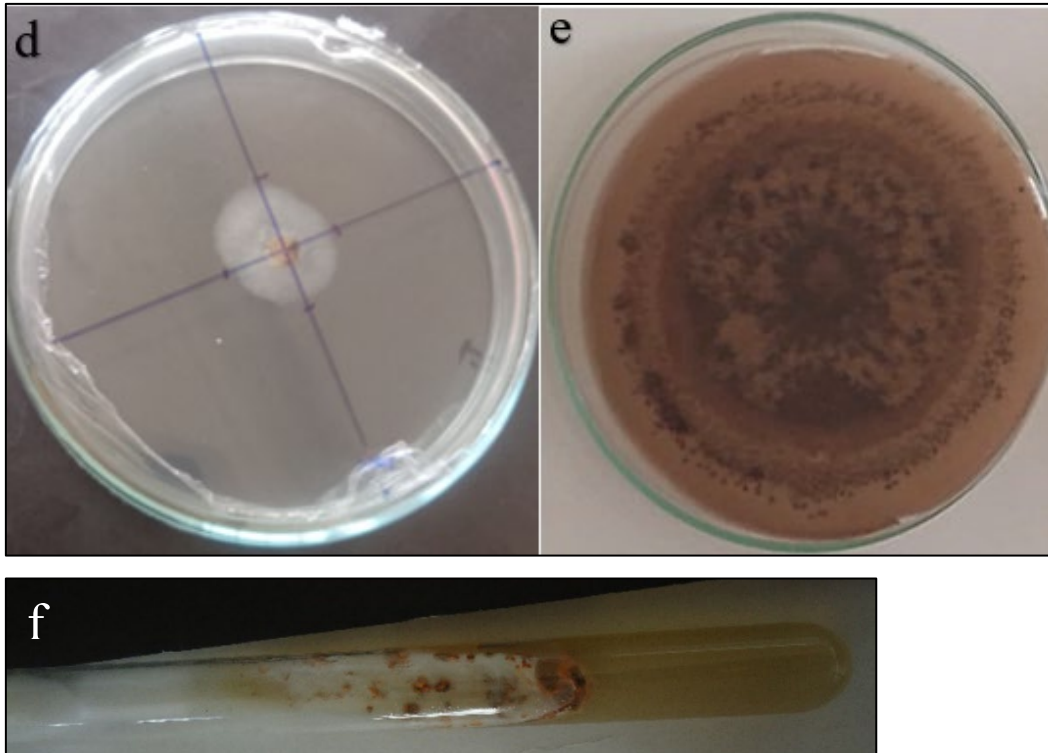
4.2.2. Características macroscópicas

Los aislamientos obtenidos mostraron inicialmente micelio con crecimiento superficial de color gris claro - blanco. Conforme fueron pasando los días, el micelio central se tornó algodonoso de color blanco cremoso y se observó la presencia de masas de color salmón- negro, donde se desarrollaron las conidias. En el reverso de las placas Petri el hongo presentó una tonalidad salmón – naranja. Los aislamientos presentaron un crecimiento rápido formando anillos concéntricos, coincidiendo con lo descrito por Villanueva-Arce et al. (2008, citado por Morales-Chávez et al. 2024).

Figura 4. 1.

Caracteres morfológicos macroscópicos de C. gloeosporioides en medio PDA



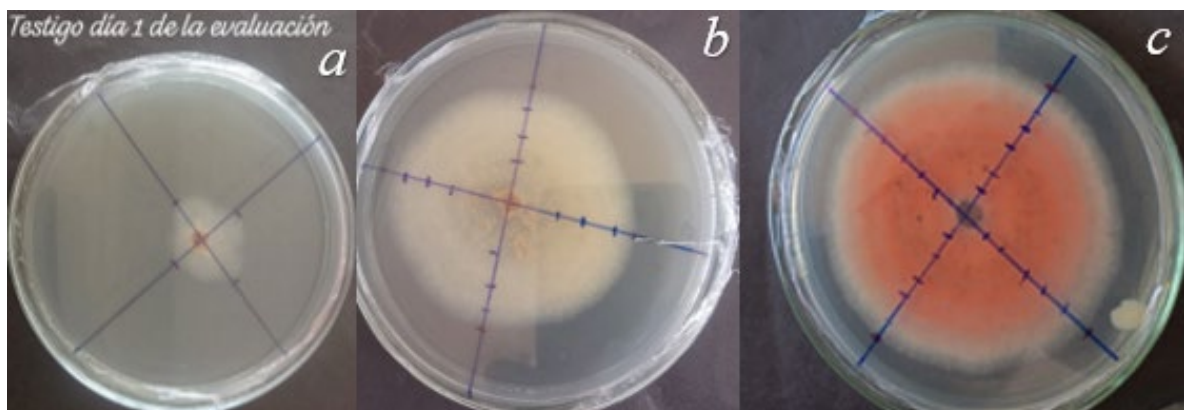


Nota: a y b) anverso de la colonia, d y e) reverso de la colonia, c y f) coloración de conidios en tubo.

En medio de cultivo de PDA, la tasa de crecimiento micelial fue de 0.7 – 8.9 cm (media= 2.60 cm). El crecimiento de la colonia cultivada en medio PDA es similar a lo reportado por Silva – Rojas y Ávila – Quezada (2011), quienes obtuvieron rangos de crecimiento de 0.8 -8 cm y Granados y Guevara, (2010) obtuvieron tasas de crecimiento promedio de 8 mm/día.

Figura 4. 2.

Ratio de crecimiento diario de C. gloeosporioides



Nota: a) ratio de crecimiento el primer día de evaluación, b) ratio de crecimiento al cuarto día de crecimiento c) ratio de crecimiento al sexto día de crecimiento.

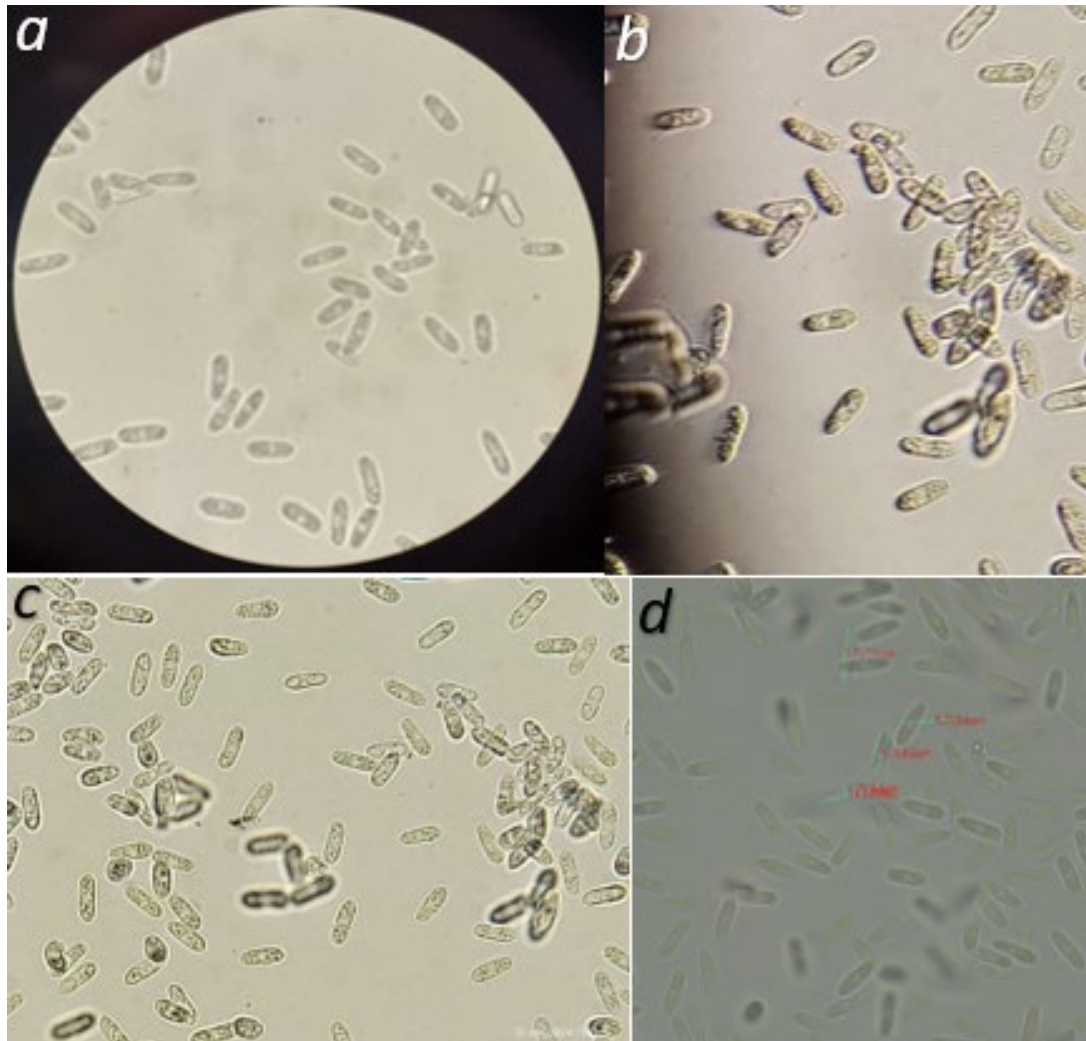
4.2.3. Características microscópicas

En cuanto a las características microscópicas, presentaron conidias hialinas, cilíndricas, no septadas y en ambos extremos redondeadas, lo que contrasta con lo mencionado por Saccardo (1991, como se citó en Morales et al., 2009), quienes observaron conidias cilíndricas redondeadas en su parte terminal después de haber aislado el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de palto.

Las conidias mostraron un tamaño promedio de 8.7 a 17.8 μm de longitud y de 3.7 a 6.9 μm de ancho. Estas características morfológicas son similares a las descritas por Villanueva-Arce et al. (2008, como se citó en Morales-Chávez et al., 2024), quienes reportaron un tamaño de 11.4-17.2 \times 4.1-4.6 μm y con Rojo-Báez et al. (2017) 13.56 - 14.24 \times 4 - 4.02 μm y por Silva – Rojas & Ávila – Quezada (2011) 13.5 - 23.8 \times 4.3 – 6.8 μm para *Colletotrichum gloeosporioides*.

Figura 4. 3.

Forma y tamaño de las conidias de C. gloeosporioides



Nota: a) Conidias vista en microscopio, c -b) conidias asexuales de *C. gloeosporioides* y d) medición de largo y ancho de conidias.

Tabla 4. 1.

Resumen de características morfológicas de Colletotrichum gloeosporioides

Aislado	Colonia		Conidias (n=200)		
	color	RC (cm/día ⁻¹)	Largo (µm)	Ancho (µm)	Forma
<i>C. gloeosporioides</i>	Blanco cremoso	0.64	8.7 – 17.8	3.7 – 6.9	Cilíndrica

Nota. Esta tabla muestra el resumen de las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de frutos de palto, donde: RC = Ratio de crecimiento (incubación 27 °C por 7 días) en medio de cultivo PDA (papa- dextrosa - agar).

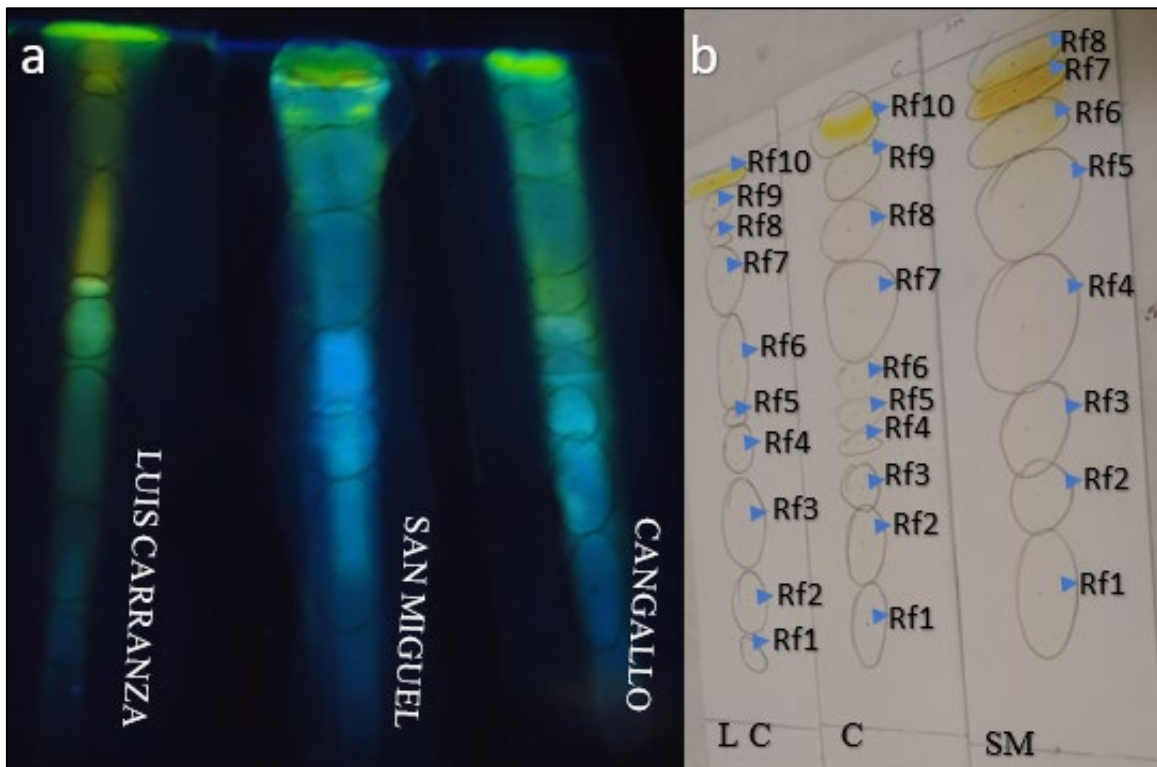
4.3. Análisis químico de los EEP

4.3.2. Factor de retención de cromatografía de capa fina

En la figura 3.4 se puede apreciar que cada Extracto Etanólico de Propóleo presenta un perfil cromatográfico distinto, lo que sugiere la presencia de distintos tipos de flavonoides en cada muestra. Estos resultados indican que cada extracto tiene una composición química única, reflejando la diversidad de los compuestos presentes en los diferentes tipos de propóleo analizados, esta variabilidad puede influir en las propiedades biológicas.

Figura 4. 2.

Tipo de flavonoides y factor de retención



Nota: Cromatografía de capa fina de muestras de propóleo a) Cromatoplasmas de propóleo derivatizadas con difenil borato y reveladas con luz UV A a 336 nm b) Cromatoplasmas de sílica gel sectorizadas con el factor de retención.

En la cromatografía se observa que los extractos etanólico de propóleo de Luis Carranza y Cangallo poseen una composición más amplia y variada en flavonoides que el extracto etanólico de propóleo de San Miguel, cuando se emplea difenil borato como agente derivatizante y revelado bajo radiación ultravioleta. Como se puede observar, el análisis de las cromatoplasmas permite visualizar que los perfiles de flavonoides de las tres muestras analizadas varían en función de la procedencia de las muestras. Así, a través de la cromatografía de capa fina, se evidencia que el extracto etanólico de propóleo contiene 10 tipos diferentes de

flavonoides, algunos de estos flavonoides se repiten entre las distintas muestras, mientras que otros son apreciables en uno o dos muestras de propóleos analizados.

Tabla 4. 2.

Procedencia y RF de propóleos de Apis mellifera

cromatografía en capa fina (TLC)	PROPORCIÓN: CLOROFORMO - METANOL - AGUA (ml)	Rf	
San Miguel	7.5:4:0.5	Fr1	0.22
		Fr2	0.36
		Fr3	0.45
		Fr4	0.60
		Fr5	0.76
		Fr6	0.87
		Fr7	0.92
		Fr8	0.96
Cangallo	7.5:4:0.5	Fr1	0.17
		Fr2	0.30
		Fr3	0.39
		Fr4	0.46
		Fr5	0.56
		Fr6	0.65
		Fr7	0.80
		Fr8	0.89
		Fr9	0.97
		Fr10	0.98
Luis carranza	7.5:4:0.5	Fr1	0.12
		Fr2	0.22
		Fr3	0.39
		Fr4	0.49
		Fr5	0.55
		Fr6	0.65
		Fr7	0.76
		Fr8	0.88
		Fr9	0.93
		Fr10	0.97

Nota. Este cuadro muestra la proporción de eluyente utilizado para el análisis cromatográfico en capa fina, el factor de retención y la polaridad de los propóleos de las tres zonas analizadas.

Se observó que el factor de retención de algunas localidades se parece entre si como: Rf1 de San Miguel, Rf2 de Luis Carranza y Rf5 de San Miguel, Rf7 de Luis Carranza y Rf9 de Cangallo, Rf10 de Luis Carranza poseen la misma distancia de recorrido dándonos a entender

que se trata tipos de flavonoides iguales. Tras realizar el revelado y marcar los tipos de flavonoides se observó que varía entre las tres muestras de propóleo, así obteniendo mayor número de tipos de flavonoides de las muestras extraídas de Luis Carranza y Cangallo, con un número menor las muestras de propóleo extraída de San Miguel.

Este hecho refleja que la amplia diversidad florística presente en la Región de Ayacucho, la cual impacta directamente en el perfil de flavonoides de las muestras analizadas, lo que contrasta lo mencionado por Forero et al., (2020) quien menciona que si la vegetación circundante en los apiarios es similar los componentes químicos también son similares o con pequeñas diferencias.

4.3.3. Cromatografía de gases

Los perfiles de CG- MS obtenidos de las muestras de propóleo de las localidades de San Miguel, Cangallo y Luis Carranza facilitan un análisis comparativo exhaustivo entre los diferentes orígenes geográficos de los propóleos, lo que nos permite discernir variaciones significativas en su composición.

Como se puede apreciar en las figuras 4.5 (Cangallo), 4.6 (Luis Carranza) y 4.7 (San Miguel) se detectaron 22, 24 y 20 picos cromatográficos, respectivamente. Las señales identificadas resultaron ser las de mayor intensidad.

Figura 4. 3.

Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de Cangallo.

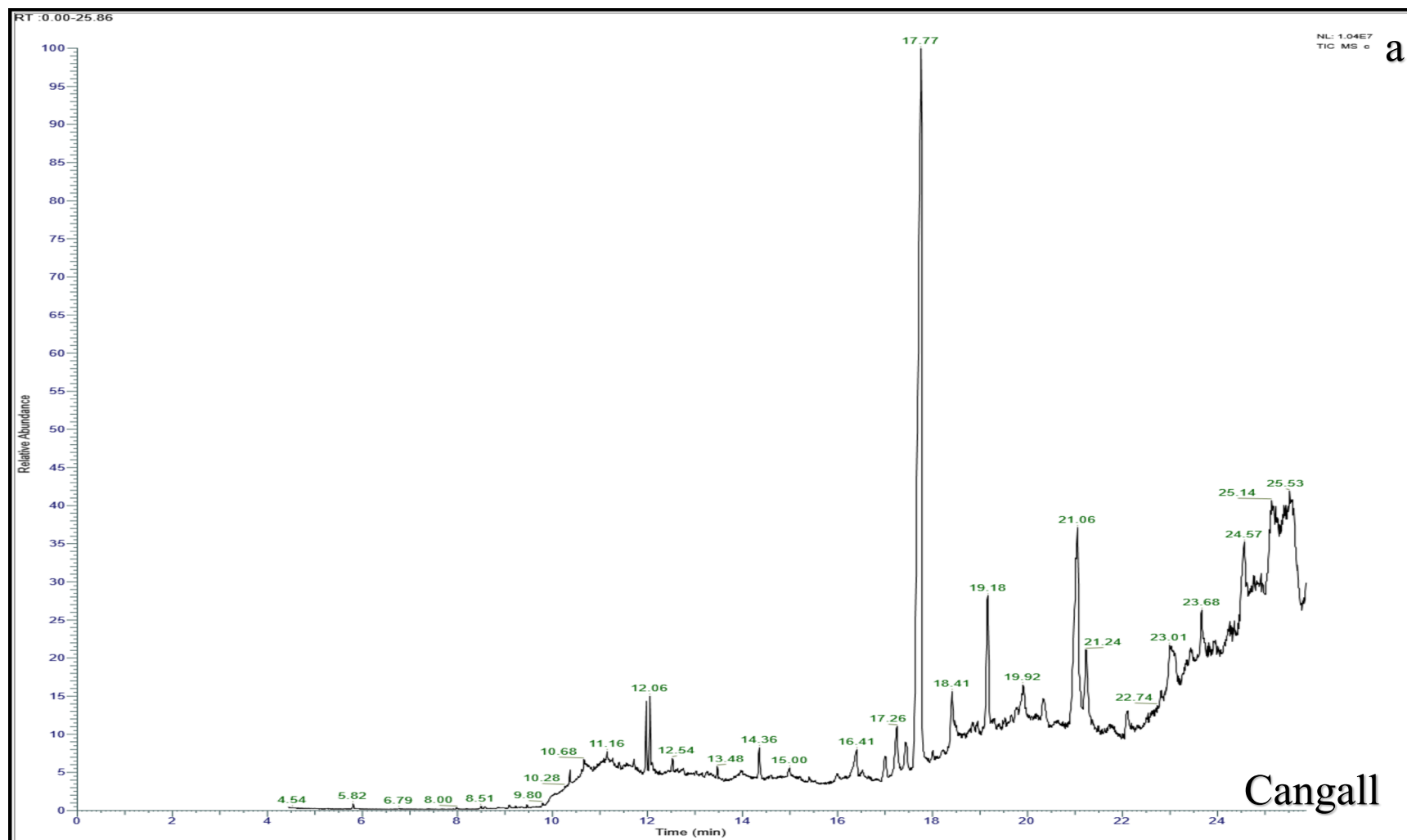


Figura 4. 4.

Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de Luis Carranza

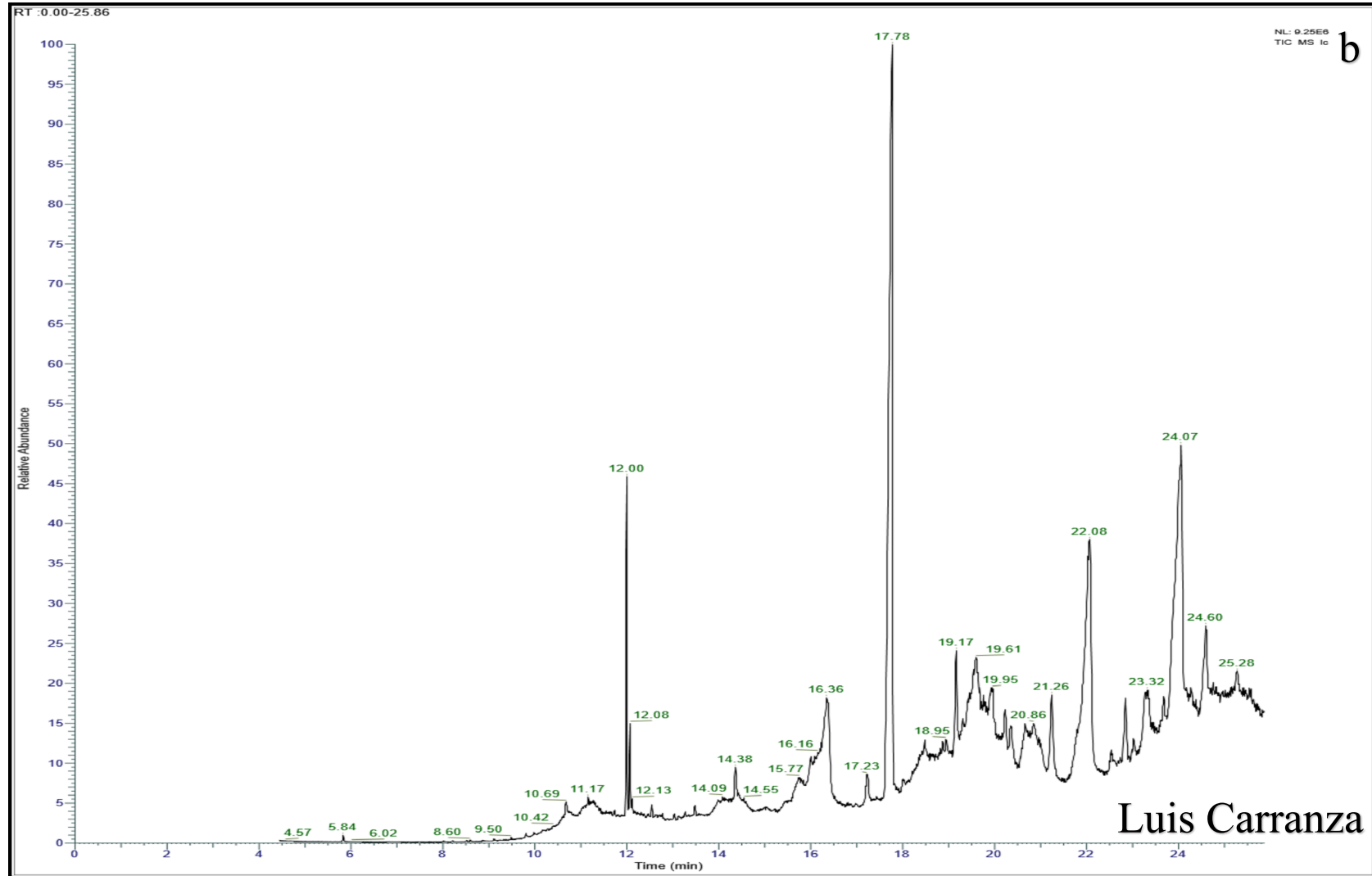
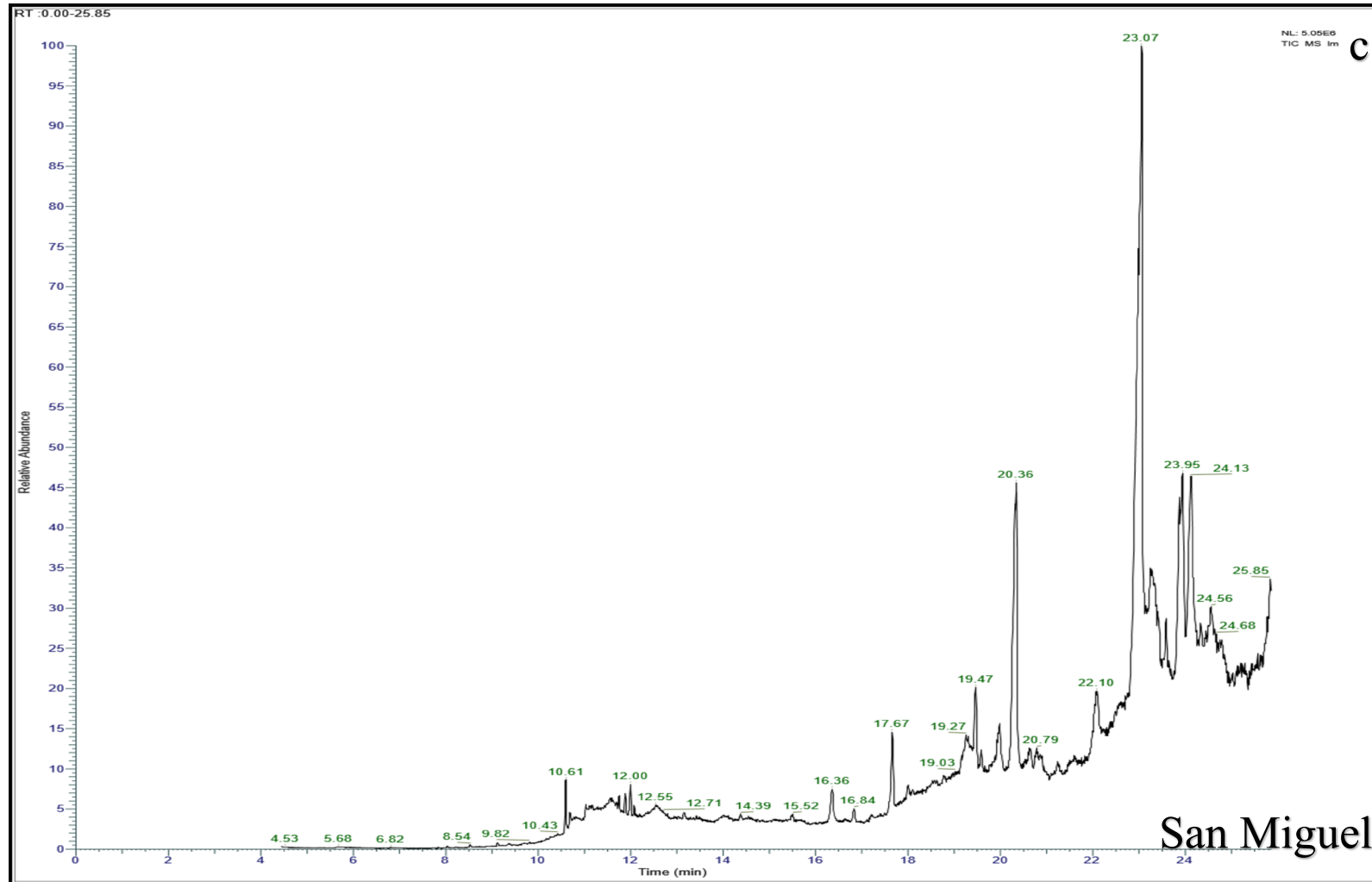


Figura 4. 5.

Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de San Miguel.



Como puede observarse, los perfiles son diferentes para las 3 muestras analizadas, lo cual nos indica que existe una importante variación en su composición, en función de la procedencia de las mismas, lo cual indica la influencia de las características climáticas, geográficas y composición floral de las distintas especies vegetales que se encuentran en cada localidad de donde se obtuvo las muestras de propóleo. Los nombres de los compuestos de los picos principales (numerados) se indican en el anexo 3.1, 3.2. y 3.3.

4.3.4. *Cuantificación de fenoles y flavonoides*

En relación con la cuantificación de flavonoides totales, (tabla 4.3. y figura 4.8), los valores varían entre 12,39 y 21.73 mg QE/g EEP, siendo el propóleo de San Miguel el que presenta el mayor contenido con 21.73 mg QE/g EEP, seguido del propóleo de Cangallo con 19.18 mg QE/g EEP y Luis Carranza con 12,39 mg QE/g EEP con diferencia estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4. 3.

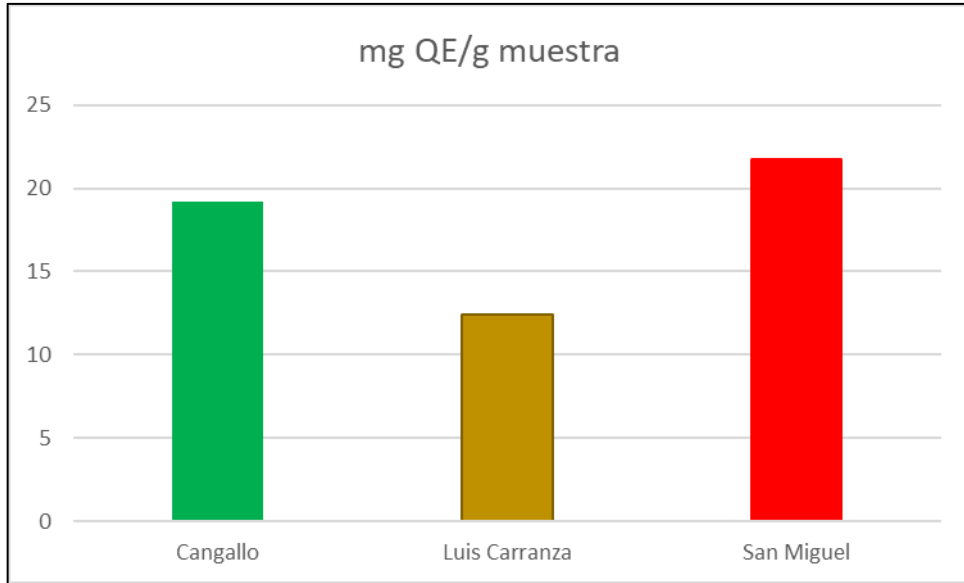
Cuantificación de flavonoides en muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg de quercetina/ g muestra

MUESTRA	PROMEDIO	DESV
C	19.1833333	1.5121039
LC	12.3916667	1.1614467
SM	21.725	2.1 028255

El espectro de absorbancia ultravioleta nos permite identificar la presencia de flavonoides en las muestras analizadas, observando picos de absorción 415 nm

Figura 4. 6.

Cuantificación de flavonoides en muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg de quercetina/ g muestra



Nota: EQ/g expresados como quercetina

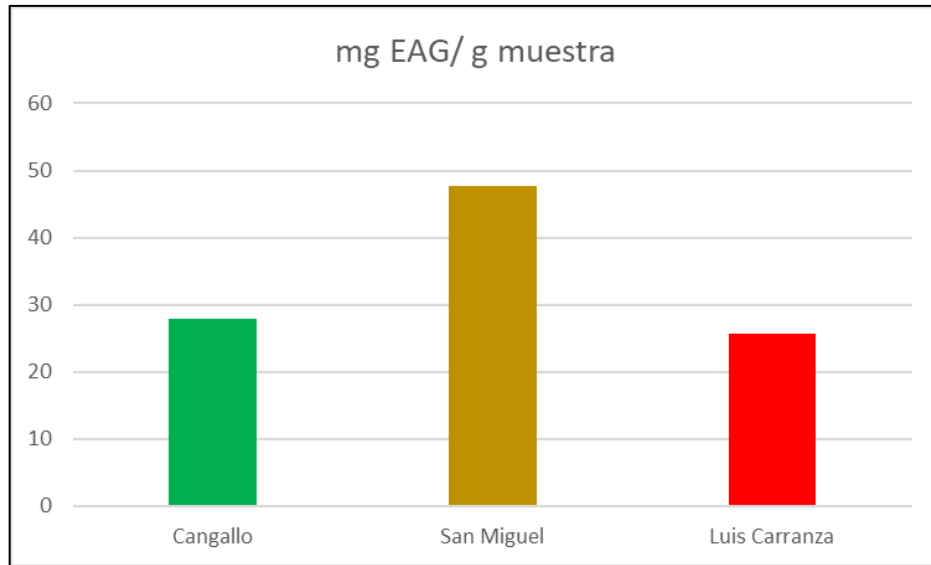
Tabla 4. 4.

Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico de muestras de propóleos de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg EAG/g muestra

MUESTRAS	mg EAG/ g muestra	DESV ESTANDAR
C	27.882716	0.669836131
SM	47.6203704	1.16018186
LC	25.691358	0.92746785

Figura 4. 7.

Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico de muestras de propóleos de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg EAG/g muestra.



Nota: EAG/g expresados como ácido gálico

Se afirma que a partir de las gráficas observadas hay diferencia significativa en contenido de fenoles de las tres localidades de Ayacucho.

Se ha observado que la cantidad de fenoles y flavonoides en las muestras de propóleo están determinadas de acuerdo a las localidades de donde se obtuvieron, la presencia de plantas que proveen de resinas, los factores climáticos en el entorno, lo que coincide con lo señalado por Soto-Vásquez (2015), al indicar que las variaciones en las concentraciones de fenoles y flavonoides en el propóleo están principalmente influenciados por la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas que proporcionan resinas, la presencia de microorganismos presentes en el entorno geográfico y los factores climáticos, condiciones que determinan la composición química del propóleo.

4.4. Porcentaje de inhibición de EEP de *Apis mellifera* sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Los extractos etanólicos de propóleo tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro*, esto fue evidente desde la primera evaluación, 24 horas después de la siembra. A concentraciones de 50% y 75% de EEP, el hongo mostró un crecimiento ascendente (aéreo), cubriendo completamente el área donde se colocó el disco de siembra, como se muestra en la figura 4.10. Este comportamiento sugirió que el propóleo pudo haber formado una barrera física que impidió el contacto directo con el medio contaminado con los EEPs, lo que limitó el crecimiento inmediato. Este efecto puede atribuirse

a las propiedades antifúngicas del propóleo, los cuales se deben en parte a la presencia de flavonoides y fenoles en su composición, estos compuestos bioactivos son conocidos por sus efectos inhibidores sobre el crecimiento celular, interfiriendo en los procesos metabólicos del hongo. Rodríguez (2020) menciona que la actividad antifúngica de los EEP está relacionada a la presencia de flavonoides y fenoles. Adicionalmente, el efecto antifúngico podría estar relacionada con la presencia de otros compuestos identificados en las muestras de propóleos analizados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, como se detalla en los anexos 3.1, 3.2 y 3.3 entre los que destacan el apiol, alpha cedrene, terpenos la cuales también poseen propiedades antifúngicas, alterando la membrana celular del hongo afectando su permeabilidad, inhibiendo la acción enzimática y destruyendo los sistemas de defensa de los hongos.

Los EEP al 25% de concentración, lograron inhibir el crecimiento del hongo en un 50% en promedio, esto coincide con lo obtenido por Barrera et al., (2012) mencionan que la aplicación de propóleo a concentraciones de $5000 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ e inhibió un 57% el crecimiento de *C. gloeosporioides* a las 24 horas.

Figura 4.10.

Comportamiento del patógeno en medio con PDA y con extracto etanólico de propóleo

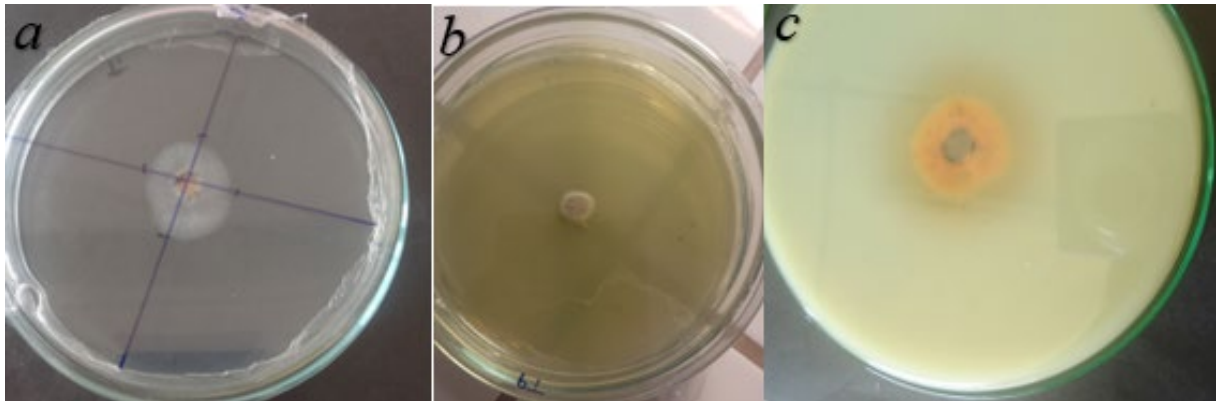


Tabla 4. 5.

Análisis de varianza del Porcentaje de inhibición de Colletotrichum gloeosporioides

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Crec.	50	0.98	0.97	8.88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20771.07	9	2307.90	177.83	<0.0001
Trat.	20771.07	9	2307.90	177.83	<0.0001
Error	519.13	40	12.98		
Total	21290.20	49			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7.62779

Error: 12.9783 gl: 40

Trat.	Medias	n	E.E.		
T9	67.11	5	1.61	A	
T3	66.05	5	1.61	A	
T6	57.37	5	1.61		B
T8	51.03	5	1.61		B C
T2	45.16	5	1.61		C
T5	43.63	5	1.61		C
T1	27.54	5	1.61		D
T4	24.32	5	1.61		D
T7	23.29	5	1.61		D
T0	0.00	5	1.61		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

El análisis de varianza nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos lo que representa que existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Esto quiere decir que los EEP tuvieron un efecto inhibitorio en diferentes porcentajes de acuerdo a las concentraciones en las que se usaron y también teniendo en consideración la procedencia de estos.

Con las concentraciones EEP al 25%, 50% y 75% inhibieron el crecimiento del patógeno. La prueba de Tukey con un nivel de confianza al 95% nos indica que los mejores tratamientos fueron el T9 (EEP Luis Carranza al 75%) y T3 (EEP Cangallo al 75%), que inhibieron 67.11% y 66.05%, respectivamente, seguido por los tratamientos T6 (EEP San Miguel al 75%) y T8 (EEP Luis Carranza al 50%), que inhibieron 57.37 % y 51.03% respectivamente, así como los tratamientos T2 (EEP Cangallo al 50%) y T5 (EEP San Miguel al 50%), que inhibieron 45.16% y 43.63% respectivamente. los tratamientos T1 (EEP Cangallo al 25%), T7 (EEP San Miguel al 25%) y T4 (EEP Luis Carranza al 25%), que inhibieron

27.54%, 24.32% y 23.29 %, respectivamente, lo cual contrasta lo reportado por Pineda et al., (2010) sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp., donde tuvo un 30% de inhibición con diluciones de 15%, 20% y 30% y Cupull et al. (2013), quienes reportaron valores de hasta 32 mm de inhibición con extractos etanólicos de propóleo obtenidos de tres provincias en Cuba a una dosis de 400 mg/L⁻¹, lo cual respalda el planteamiento de que los EEP tienen un efecto supresor en el crecimiento de *C. gloeosporioides* a nivel *in vitro*.

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

1. Se obtuvieron extractos etanólico de propóleos de *Apis mellifera* recolectados tres localidades de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, utilizando concentraciones de etanol al 25%, 50% y 75%. Las distintas concentraciones permitieron evaluar la eficiencia del mejor extracto en el control del patógeno.
2. Las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* fueron reconocidos mediante cultivo e inspección microscópica. El micelio presentó aspecto algodonoso y masas conidiales naranja – salmón con formación de halos concéntricos. Las conidias fueron cilíndricas, hialinas de bordes redondeados con dimensiones promedio de 8.7 a 17.8 μm de longitud y 3.7 a 6.9 μm de ancho.
3. Se identificó variabilidad en la composición y cantidad de flavonoides, así como en los perfiles de compuestos volátiles y semivolátiles presentes en los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera*, recolectados en las tres localidades evaluadas.
4. Los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera* mostraron actividad antifúngica in vitro frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, con porcentajes de inhibición variables según la concentración y origen geográfico del propóleo. Los tratamientos más efectivos fueron T9 (EEP Luis Carranza al 75%) y T3 (EEP Cangallo al 75%), con niveles de inhibición del 67.11% y 66.05%, respectivamente.

5.2. Recomendaciones

1. Continuar con estudios comparativos para evaluar la efectividad de cada concentración en diferentes aplicaciones a nivel *in vivo* y ampliar el análisis de los propóleos a otras localidades para evaluar la variabilidad en la composición química y la actividad biológica.
2. Con los aislamientos obtenidos de *Colletotrichum gloeosporioides*, se pueden realizar pruebas moleculares para corroborar la especie.
3. Realizar estudios adicionales para explorar la relación entre la variabilidad química del propóleo y su actividad antifúngica de las distintas localidades lo que permitirá seleccionar fuentes de propóleo con propiedades bioactivas específicas.
4. Dado que los Extractos Etanólicos de Propóleo demuestran una capacidad significativa para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, potenciar su uso especialmente en concentraciones del 75%, para el desarrollo de estrategias naturales de control biológico de la antracnosis en campo. Además, se sugiere realizar trabajos similares para el control de otros fitopatógenos.

Referencias bibliográficas

- Agostini, J. P., & Timmer, L. W. (1992). *Selective isolation procedures for differentiation of two strains of Colletotrichum gloeosporioides from citrus*. Plant Disease, 76, 1176–1178.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (Academic Press, Ed.; 5th ed.).
- Agurto, J. C., & Cuya, E. (2021). *Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/backend/api/core/bitstreams/7d6bc93a-9300-4508-a832-63f08b9ca23a/content>
- Alonso, O. (2023). *Identificación de Hongos Fitopatógenos Asociados al Cultivo del Aguacate Persea americana Mill.* en Michoacán, México.
- Alvarado, C. (2015). *Caracterización morfológica y molecular de Colletotrichum spp. asociado al complejo de la antracnosis de los cítricos en Mexico*.
- Alvarón, I. J. (2024). *Las principales enfermedades del cultivo del palto*.
- Apaza, J. P. (2015). *Validación del método para la determinación de clorhidrato de ecgonina metil ester benzoato mediante cromatografía en capa fina, punto de fusión y espectroscopia ultravioleta/visible*. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/11541/PG-1626-Apaza%20Beltran%2c%20Juan%20Pablo.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Araceli, M., Roldolfo, J., Sampietro, D., & Vattuone, M. (2010). *Cromatografía: conceptos y aplicaciones*. Revista Arakuku, 1(2), 1–6. www.csnat.unt.edu.ar/academica/publicaciones/revista-arakuku
- Areff, A. A. M., Sidique, S. N. M., Lani, M. N., & Ahmad, F. T. (2022). *Effect of different concentrations of propolis extract coating on postharvest quality of banana artificially inoculated with Colletotrichum gloeosporioides*. Malaysian Applied Biology, 51(1), 149–156. <https://doi.org/10.55230/MABJOURNAL.V51I1.1996>
- Ataucusi, S. (2015). *Manejo Técnico Del palto*. Pra Buenaventura, 11–38. <https://es.slideshare.net/slideshow/manual-palta-74682172/74682172#38>
- Barrientos, R. E. (2024). “*Manejo agronómico del cultivo de palto (persea americana mill.) cv. hass en el proyecto olmos.*”
- Base de datos mundial de la EPPO. (2019). *Colletotrichum gloeosporioides*. EPPO. Recuperado en: <https://gd.eppo.int/taxon/COLLGL>
- Benítez, J., Sánchez, A., Bolaños, C., Bernal, L., Ochoa- Martínez, C., Vélez, C., & Sandoval, Á. (2021). *Physicochemical changes of avocado hass during cold storage and accelerated ripening*. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial, 19(2), 18–26. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1363>

- Bernal E, J., & Díaz, D, C. (2008). *Tecnología para el Cultivo del Aguacate* (Diagramaci).
- Bernal, J. A., & Díaz, C. (2020). *Colección Transformación del Agro*.
- Bernardo, A., (2024). *Los Secretos de una Poscosecha Exitosa Para La Palta Hass*.
- Beta complejo agroindustrial. (2024). *Aumento en la producción de palta Hass peruana en los próximos cuatro años*.
- Cerdas, M. del M., Montero, M., & Somarribas, o. (2014). *verificación del contenido de materia seca como indicador de cosecha para aguacate (persea americana) cultivar hass en zona intermedia de producción de los santos, costa rica*. 38(1), 1–8. www.mag.go.cr/revagr/index.htmlwww.cia.ucr.ac.cr
- Chavda, P., Vuupu, S., Balar, P., Mishra, T., Bezbaruah, R., Teli, D., Sharma, N., & Alom, S. (2014). *Propolis in the management of cardiovascular disease*. International Journal of Biological Macromolecules, 266(2).
- Checalla, J., & Sñchez-Tito, M. (2021). *Caracterización Química y Actividad Antibacteriana in vitro de un Extracto Etanólico de Propóleo Peruano Frente a Streptococcus mutans* *Chemical Characterization and in vitro Antibacterial Activity of a Peruvian Propolis Ethanolic Extract Against Streptococcus mutans*. *Int. J. Odontostomat*, 15(1), 145–151.
- Condeña, F., & Palomino, R. (2007). *Hidroenfriamiento y refrigeración en la conservación y maduración postcosecha de palta Hass en Ayacucho*. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho.
- Contreras, C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum spp. obtenidos de frutos de Lulo (Solanum quitoense), tomate de árbol (Solanum betacea), granadilla (Passiflora ligularis), Mango (Mangifera indica) y tallo de mora (Rubus glaucus) con síntomas de Antracnosis*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Curifuta, M., Vidal, J., Sánchez-Venegas, J., Contreras, A., Salazar, L., & Alvear, M. (2012). *The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(2), 347–359.
- Dirección General de Información Agraria (DGIA). (2008). *Estudio de palta en el perù y el mundo*. 1–23.
- Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). *Hass Avocado Composition and Potential Health Effects*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 738–750. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.556759>
- Farré R, Frasset I, & Sánchez A. (2004). *Propolis and human health*. *Revista de La Facultad de Farmacia de La Universidad de Granada*, 45(1), 1–21. <https://doi.org/10.30827/ars>
- Favaro, M. A., Fernández, L. N., & Maumary, R. L. (2022). *El género Colletotrichum: avances y perspectivas para cultivos*. *Boletín de La Asociación Argentina de Fitopatólogos*, 11, 1–4.

- Flores-Izquierdo, M. A., & Espinoza-Villanueva, L. E. (2023). *Current situation and prospects of peruvian avocado (persea americana) production in the context of international trade* (vol. 45).
- Forero, L., Henao, A., Sánchez, S., & Meneses, E. (2020). *Búsqueda de compuestos anticancerígenos en propóleos antioqueños por medio de fluidos supercríticos*. Universidad CES.
- Gallegos, P. A. (2002). *Situación actual de la palta en el mercado nacional y en el mercado de estados unidos*.
- Gautam, A. K. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides: Biology, Pathogenicity and Management in india*. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 02(02), 1–11. <https://doi.org/10.4172/2329-955x.1000125>
- Granados, G., & Guevara, Y. (2010). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos de Colletotrichum spp. obtenidos de frutales de clima frio moderado con síntomas de antracnosis*.
- Gutiérrez, M. C., Droguet, M., Carmen, M., Bouzán, G., & En Química, D. (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*. n° (vol. 122).
- Herrera-González, J. A., Bautista-Baños, S., Salazar-García, S., & Gutiérrez-Martínez, P. (2020). *Current situation of postharvest handling and fungal diseases of avocado "Hass" for export in Michoacán, Mexico*. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1–14. <https://avocadosfrommexico.com/>
- Instituto de Defensa Nacional de la Competencia y de la Protección (INDECOPI). (2014). *Proyecto de Norma Técnica Peruana PNTN 011.018. PALTAS. Requisitos*. <https://es.slideshare.net/slideshow/ntp-011018-de-2014-aguacate-hass-2/241568067>
- Instituto líder en capacitación Agrícola (INTAGRI). (2018). *Razas del Cultivo de Aguacate*. Artículos Tecnicos de Intagri, Serie Frutales, 32(4). <https://www.intagri.com/articulos/frutales/razas-del-cultivo-de-aguacate>
- Jiménez, L. M., & Rodríguez, Y. (2018). *Determinacion de una técnica selectiva por cromatografía en capa fina para identificación de benzodiazepinas*. diciembre 2017 [Universidad Norbert Wiener]. <https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/2760/TESIS%20Jimenez%20Laura%20-%20Rodriguez%20Yessica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Maldonado, Y. (2015). *Perfil de competitividad exportadora peruana de la palta (Persea americana M.) y estrategia de marketing para incrementar su ingreso en mercados internacionales*. Universidad de Chile.
- Manzo-Sánchez, G., Pérez-Ocón, R., Chan-Cupul, W., Silva-Jiménez, E., Carlos Sánchez-Rangel, J., Ángel Ayala-Zermeño, M., & Galindo-Velasco, E. (2018). *Antifungal activity of ethanolic extracts of propolis against Mycosphaerella fijiensis: an in vitro study*. *Scientia Fungorum*, 47, 13.

- Martínez Galán, J. P. (2009). *Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño tesis de maestría Julián Paúl Martínez Galán Universidad Nacional de Colombia sede Medellín Facultad de Ciencias Agropecuarias de Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos* [universidad nacional de colombia sede medellín]. chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/3416/74185664.2009.pdf?sequence=1
- Matthew, A., Penieres, J. G., & Ortega, F. (2023). *Cromatografía en capa fina y columna* Universidad Nacional Autónoma de México. <https://ru.cuautitlan.unam.mx/retrieve/16449c20-525d-4885-8526-9b526f0e937b>
- Mayek - Pérez, N., Rodríguez - López, E. S., & Gonzáles- Prieto, J. M. (2009). *La Infección de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (Persea americana Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos*. Revista Mexicana de Fitopatología, 27.
- Mayta-Tovalino, F., Sacsquispe Contreras, S., Ceccarelli Calle, J., & Alania Mallqui, J. (2014). *Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología*. Revista Estomatológica Herediana, 22(1), 50. <https://doi.org/https://doi.org/10.20453/reh.v22i1.159>
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). *Plant infection and the establishment of fungal biotrophy*. In Trends in Plant Science (Vol. 7, Issue 8, pp. 352–356). [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02297-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02297-5)
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). *Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos*. RIA (Revista de Investigaciones Agropecuarias), 45(1), 23–30.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2008). *Estudio de palta en el Perú y el Mundo*.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2024). *PALTO (Persea americana, Miller)*.
- Montoya, S. A., & Páez, C. A. (2012). *Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Moposita Echanique, N. A. (2023). *Efecto del recubrimiento con propóleo en el control de Penicillium digitatum., en limón Meyer (Citrus meyerii Y.)* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/30449>
- Morales, J. L., Azpiróz, H. S., & Pedraza, M. E. (2009). *Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de Colletotrichum gloeosporioides Penz., causante de la antracnosis del aguacate (Persea americana Mill.) en Michoacán, México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 9(4).
- Morales-Chávez, F. M., Rodríguez-Núñez, J. R., Morales-Vargas, A. T., Mariscal-Amaro, L. A., & Núñez-Colín, C. A. (2024). *In vitro inhibitory effect of essential oils against Colletotrichum gloeosporioides*. Acta Agrícola y Pecuaria.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2023). *Informe de progreso ¡bienvenidos!*
- Pérez, S., Ávila, G., & Coto, O. (2015). *The Avocado Persea americana Lauraceae Crop in Mesoamerica 10000 Years of History*. Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal, 36(1819–4087), 111–123. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193239249016>
- Pineda, J., Principal, J., Barrios, C., Milla, D., Solano, Y., & Gil, E. (2010). *Propiedad fungistática in vitro de propóleos sobre tres aislamientos de Colletotrichum gloeosporioides*. Scielo- Zootecnia Tropical, 28(1), 83–91. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692010000100011
- Quintero - Mercado, A., Dangon-Bernier, F., & Páez-Redondo, A. (2019). *Aislamientos endofíticos de Colletotrichum spp. a partir de hojas y ramas de mango (Mangifera indica L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia*. Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 43(166), 65. <https://doi.org/10.18257/raccefyfyn.788>
- Quispe, E. R. (2020). *Metabolomic analysis by MALDI TOF TOF mass spectrometry of pitahaya (Hylocereus sp.) Seedlings subjected to different conditions of biotic and abiotic stress*. Universidad Nacional de Tumbes (UNT).
- Ramsay, G. (2021). Frutas y hortalizas oportunidades y desafíos para la agricultura sostenible a pequeña escala. In *Frutas y hortalizas*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Centro de Cooperación en Investigación Agrícola para el Desarrollo (CIRAD). <https://doi.org/10.4060/cb4173es>
- Rodríguez, B., Canales Martínez, M., Guillermo, J., Carrillo, P., & Cruz Sánchez, A. (2020). *Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis*. Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM). <http://doi.org/10.15174.au.2020.2435>
- Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017). *Situación actual de Colletotrichums spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control*. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology, 35(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>
- Romero, C. A. (2019). *La Situación del Mercado Internacional de la Palta Su análisis desde una perspectiva de las exportaciones peruanas*.
- Ruiz, M. L. (2020). *Guía de laboratorio cromatografía en capa fina y en columna*.
- Ruiz, N. A. (2024). *“Estrategias operativas en pequeños y medianos productores para la exportación de palta (Persea americana) cv. Hass.”* Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).
- Sandoval, A., Forero, F., García, J., & Londoño, M. (2020). *Cosecha, manejo de poscosecha y agroindustria*.

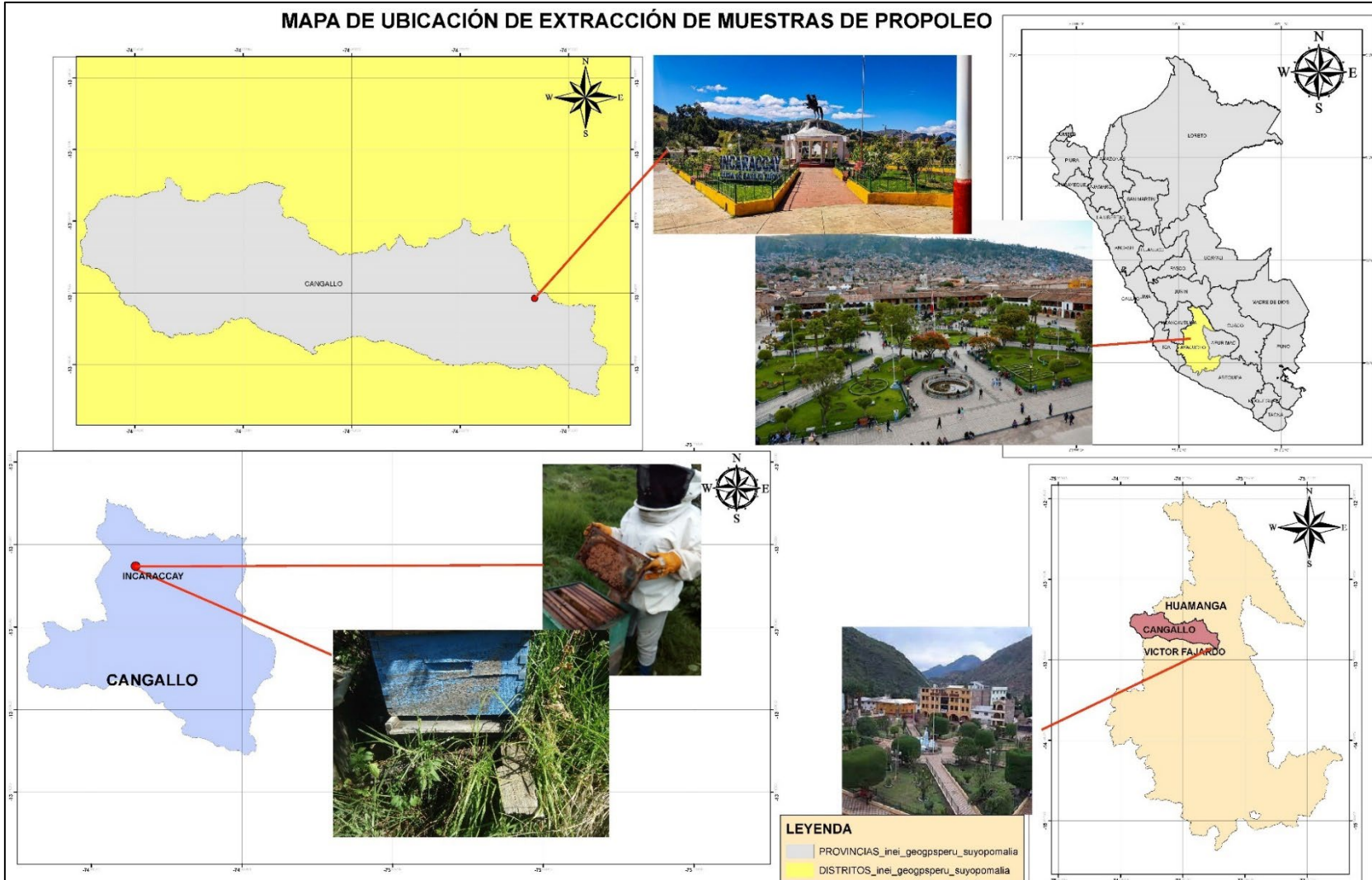
- Servicio de Investigación Económica (USDA), (U.S. Department of Agriculture). (2011). *Composición nutricional del aguacate Hass*.
- Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., & Whiley, A. W. (2013). *The avocado: botany, production and uses* (S. Hulbert, Ed.; Segunda Edición).
- Sistema de Información para el Desarrollo Empresarial Rural (SIDER). (2024). *Exportación de palta superó los US\$ 217 millones en el primer trimestre de 2024*.
- Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D. (2011). *Phylogenetic and morphological identification of Colletotrichum boninense: A novel causal agent of anthracnose in avocado*. *Plant Pathology*, 60(5), 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Suárez, D. (2023). *“Evolución de la industria peruana de palta (Persea americana Mill.) en los últimos 10 años y los principales retos.”* Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).
- Superintendencia Nacional de Administración Tributaria (SUNAT). (2022). *Las exportaciones de palta cayeron un 9.5% entre enero y agosto de este año*.
- Tapia, A., Ramírez, J. F., Siclán, M. L., Castañeda, Á., Maldonado, F. I., & Lara, A. V. (2020). *Spatial distribution of anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides Penz) in avocado in the State of Mexico, Mexico*. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.004>
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Armando Ulloa, J., Ramírez-Ramírez, J. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., & Bautista-Rosales, P. U. (2017). *Identification and characterization of Colletotrichum spp. causing anthracnose in avocado Nayarit, Mexico*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 19.
- Vallejo-Rosero, Y., Barrios-Correa, L., & Anaya-Gil, J. (2021). *La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica*. *Revista Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP)*, 35(2518–2803), 19. <http://revistas.pucp.edu.pe/quimica>
- Villa, A. (2019). *Control químico de antracnosis (Colletotrichum spp.) en flor y fruto en lima “persa.” in 2019*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Facultad de Ingeniería Agrohídrica.
- Villa Gañay, P. A., Guzmán Aldas, J. C., & Bravo Crespo, D. I. (2025). *Evaluación de la Susceptibilidad Antifúngica y el Efecto Inhibitorio del Extracto de Propóleo frente a Aspergillus Fumigatus*. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 9(1), 5965–5977. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i1.16294
- Villar, M. (2016). *Composición nutricional y componentes bioactivos de cuatro variedades de paltas (Persea americana) comerciales chilenas. comparación de componentes bioactivos, cosechas 2011-20112*. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/137794/Composicion-nutricional-y-componentes-bioactivos-de-cuatro-variedades-de-paltas-persea-americana.pdf>

Zapata, E., Ochoa, S., Ceja, J., Gómez, F. A., & Ríos, A. F. (2020). *Manual Técnico poscosecha aguacate Hass (Persea americana Mill)*.

ANEXOS

Anexo 1. *Mapa de ubicación de muestras de propóleo de Cangallo*

MAPA DE UBICACIÓN DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE PROPOLEO



NOMBRE DEL PROYECTO:

TESIS: "EFECTO ANTI FUNGICO INVITRO DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE PROPOLEOS DE APIS MELLIFERA SOBRE COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES DE PALTO AYACUCHO, 2024"

UBICACIÓN

DISTRITO: CANGALLO
 PROVINCIA: CANGALLO
 REGIÓN: AYACUCHO

CADISTA:

BAYGORREA CUBA, YENNY MILUZCA

PLANO:

PLANO DE UBICACIÓN

SISTEMA DE COORDENADAS ESCALA

PROYECCIÓN: UTM 1/50000
 ZONA SUR: 18
 FECHA:
 COORDENADAS: UTM - 84 Agosto -2024

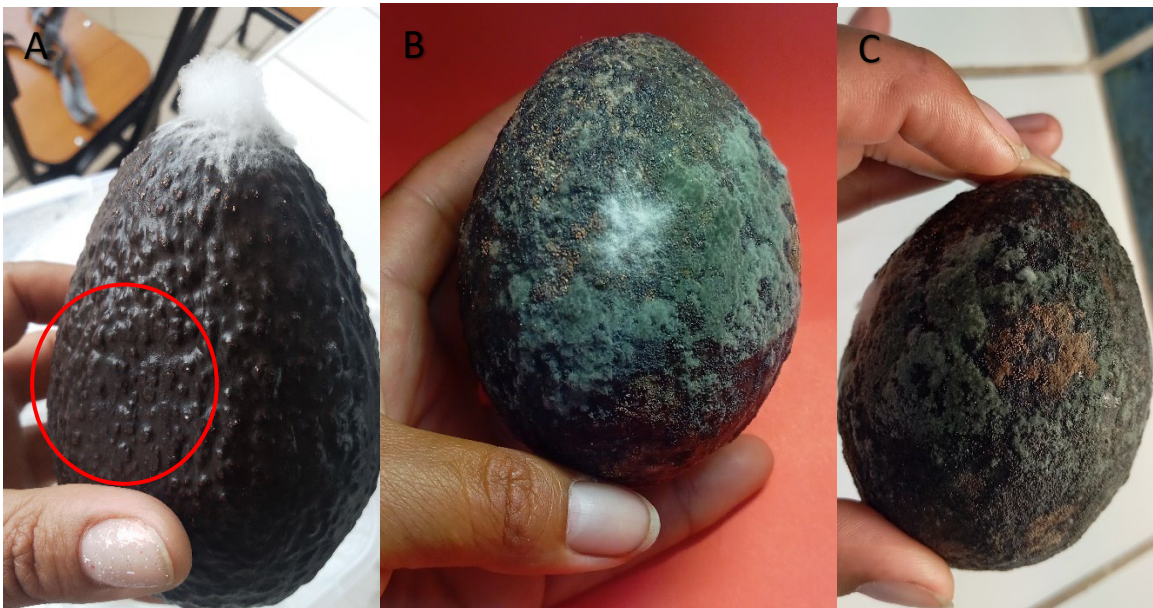
Anexo 2. *Catálogo de fotos de ejecución de tesis*

Anexo 2.1. *Colección de muestras de propóleo*



Nota: A: extracción de bastidores con presencia de propóleo, B: propóleo extraído por método de raspado

Anexo 2.2. *Identificación de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de palto Hass*

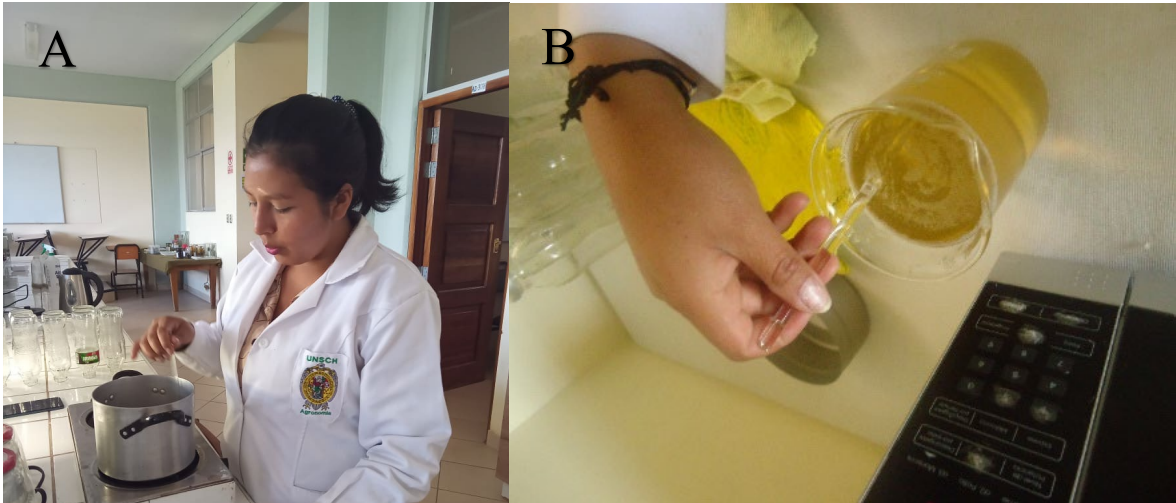


Nota:

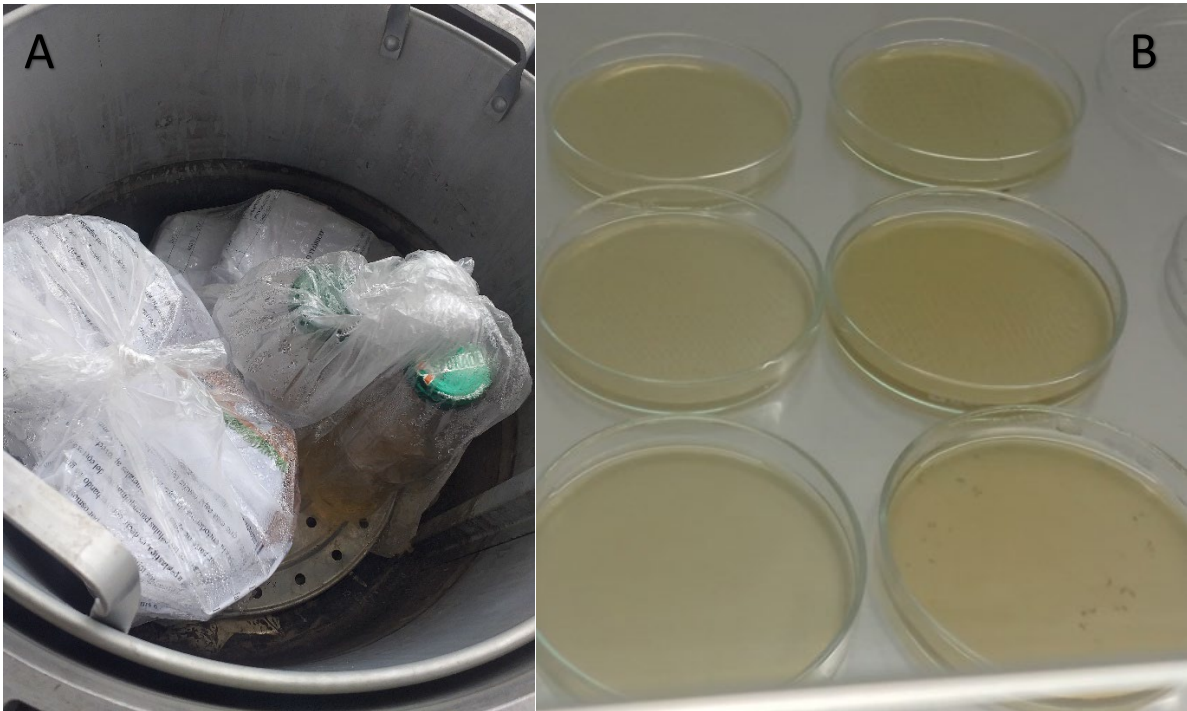
A: Síntomas de antracnosis en frutos de palta Hass instalados en cámara húmeda,

B y C: Frutos de palta Hass en cámara húmeda con presencia del patógenos.

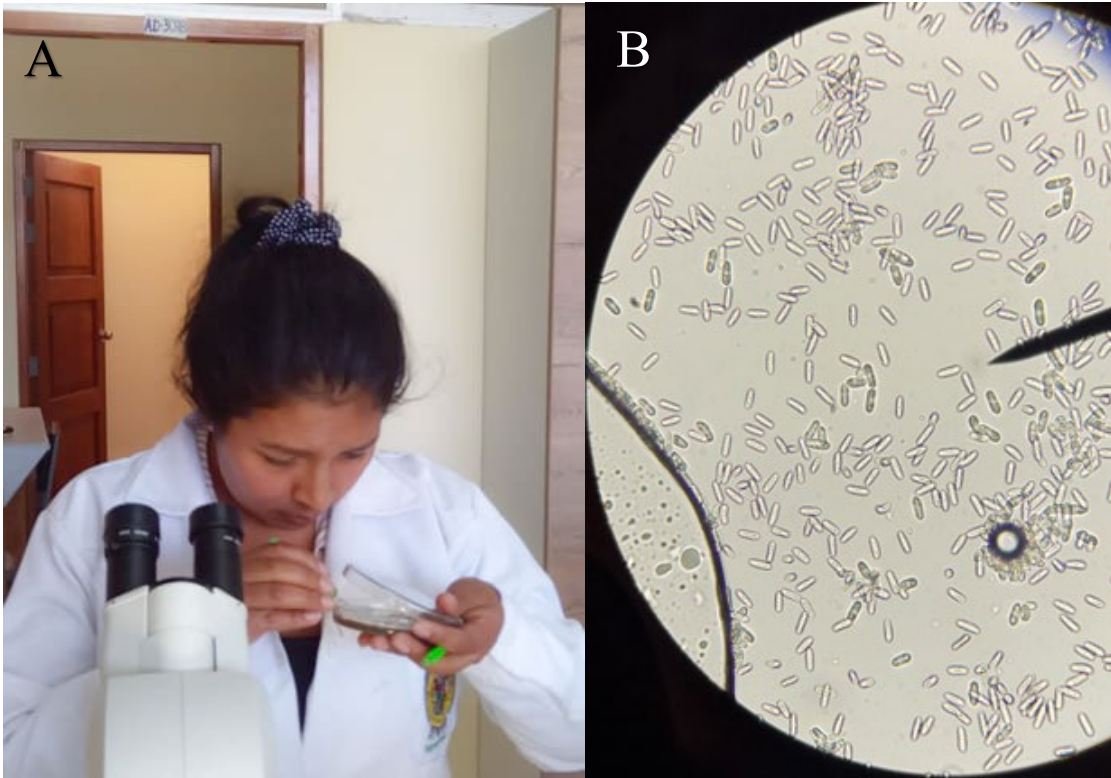
Anexo 2.3. *Preparación de medio PDA, identificación y purificación de *C. gloeosporioides**



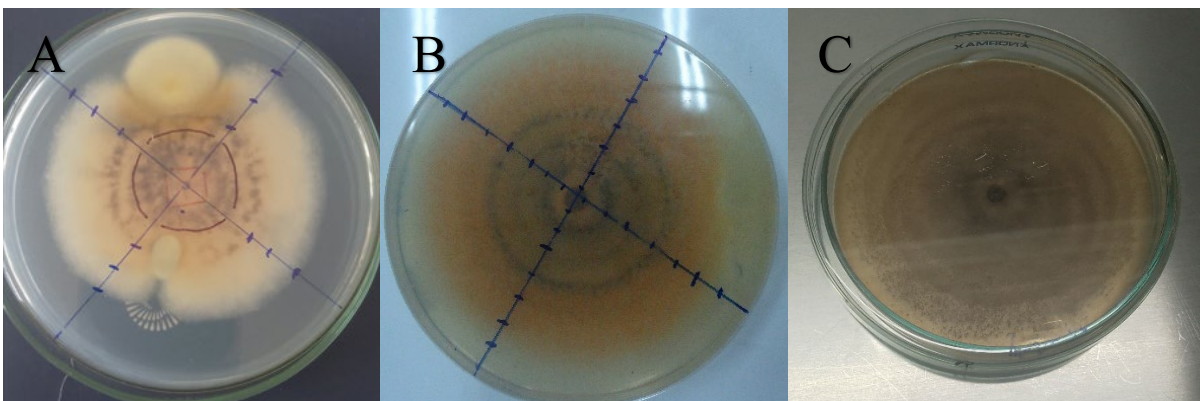
Nota: A y B: Preparación de medio de cultivo PDA (papa- dextrosa - agar)



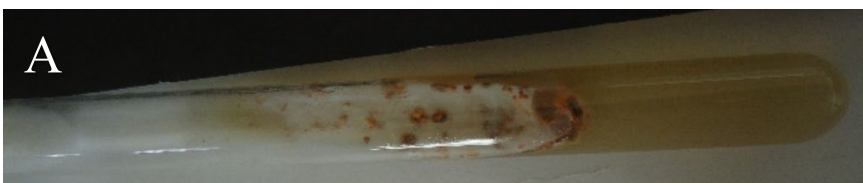
Nota: A: Esterilización de medio de cultivo, placas y otros materiales, B: plaqueo de medio en cámara de flujo laminar



Nota: A y B: Identificación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de frutos de palto Hass en microscopio.

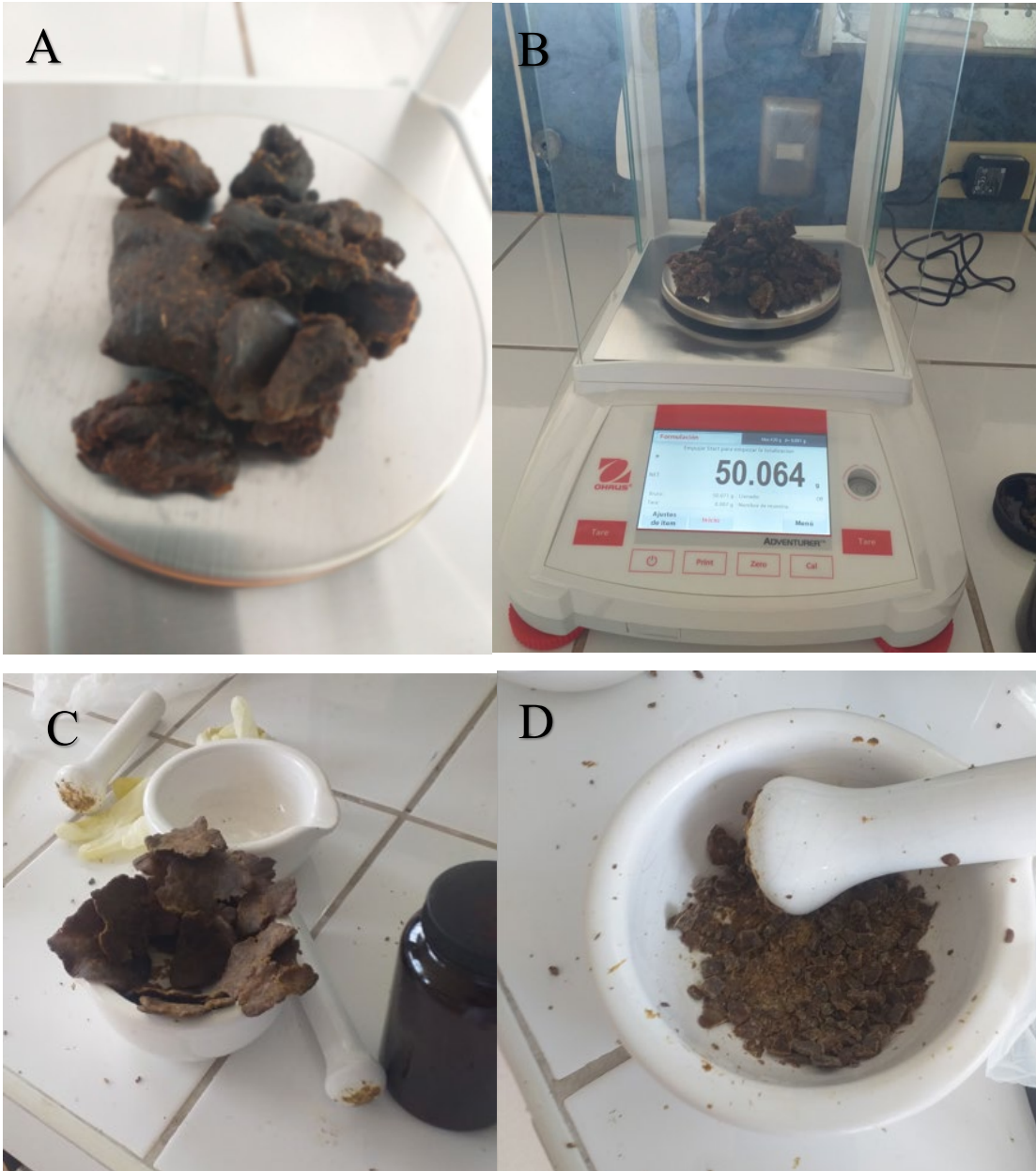


Nota: A, B y C: proceso de purificación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.



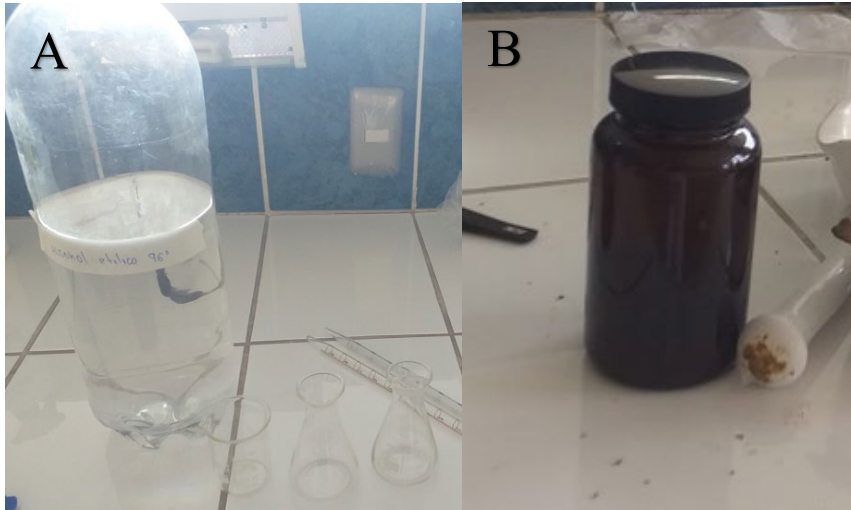
Nota: A: Conservación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en tubos de ensayo.

Anexo 2.4. Proceso de obtención de Extractos Etanólicos de Propóleo de *Apis mellifera*



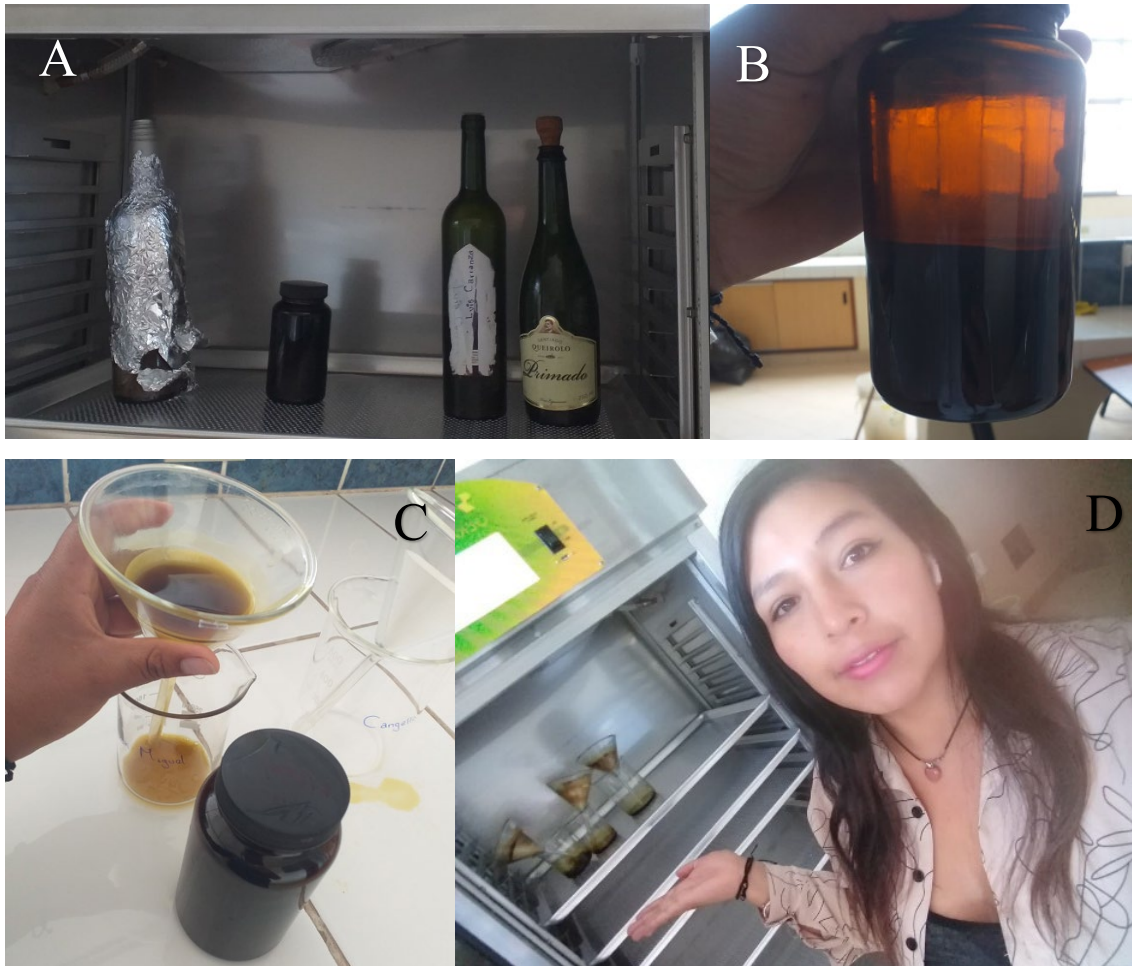
Nota:

A: Muestra de propóleo, B, C y D: Pesado, laminado y triturado de los propóleos



Nota:

A: alcohol etílico de 96°, B: frascos ámbar con propóleo y alcohol etílico



Nota:

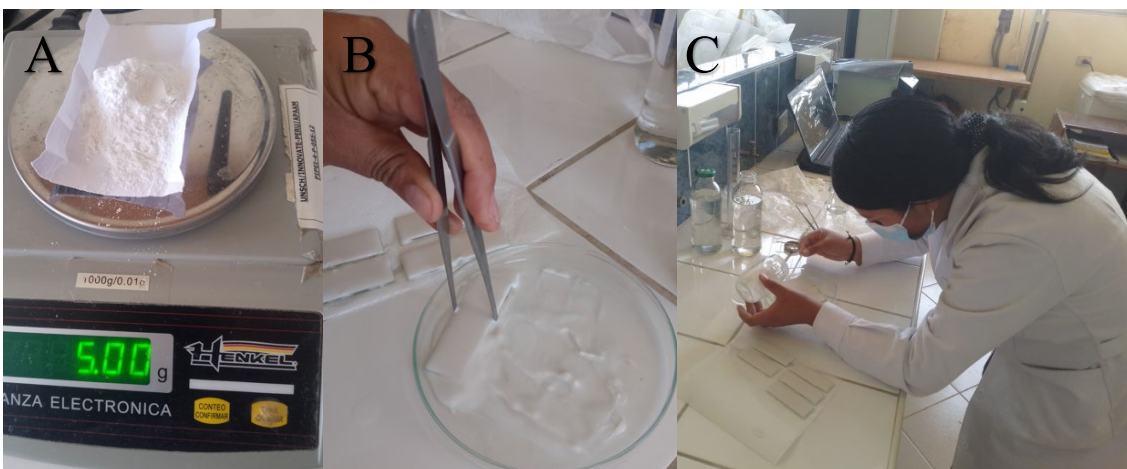
A: alcohol etílico de 96° más propóleo triturado en cámara germinadora a 37°C de temperatura,
 B: agitación de los frascos, C: filtrado de los extractos etanólicos de propóleo, D: proceso de secado de EEP a una temperatura de 50°C.



Nota:

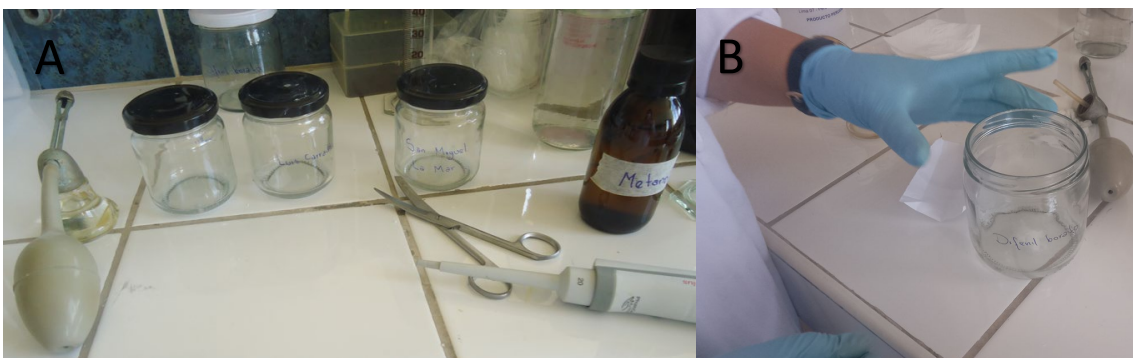
A: EEP reactivado al 96°, B: EEP a tres concentraciones (25, 50 y 75%) de las tres zonas.

Anexo 2.5. Estandarización de protocolo y preparación del solvente para cromatografía de capa fina



Nota:

A: pesado de silica gel, B: preparado de silica gel y placas con silica, C: secado de placas de vidrio con silica gel.



Nota:

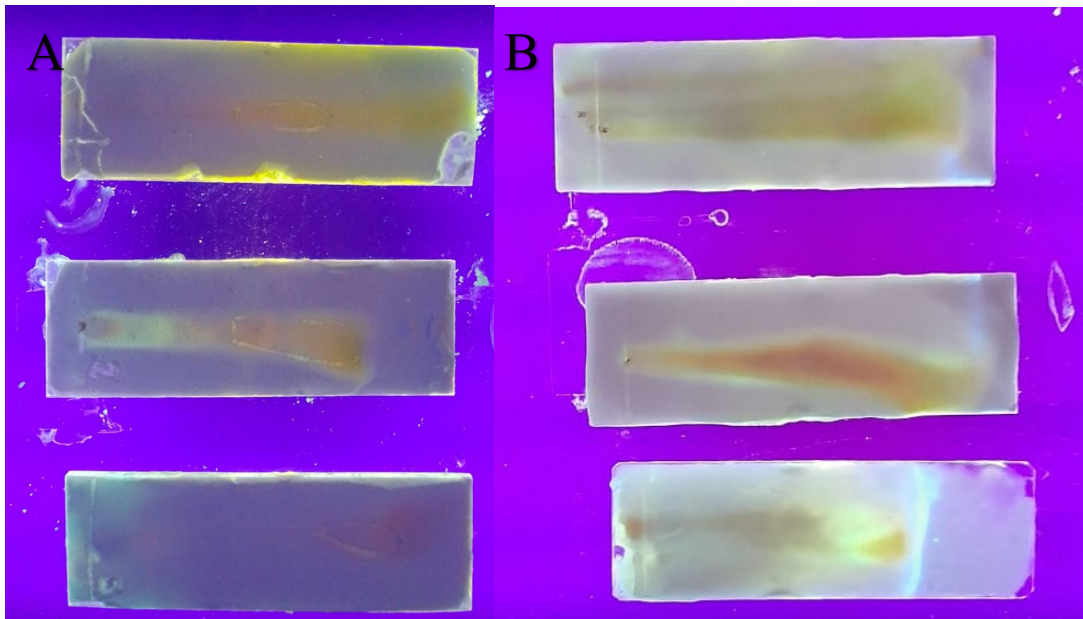
A: preparación de solvente (cloroformo, metanol y agua), B: preparación del revelador (Difenil borato)

**Nota:**

A: placas de vidrio con silica gel con muestras de propoleos de las tres zonas, B: incorporación a frascos con solvente para la corrida.

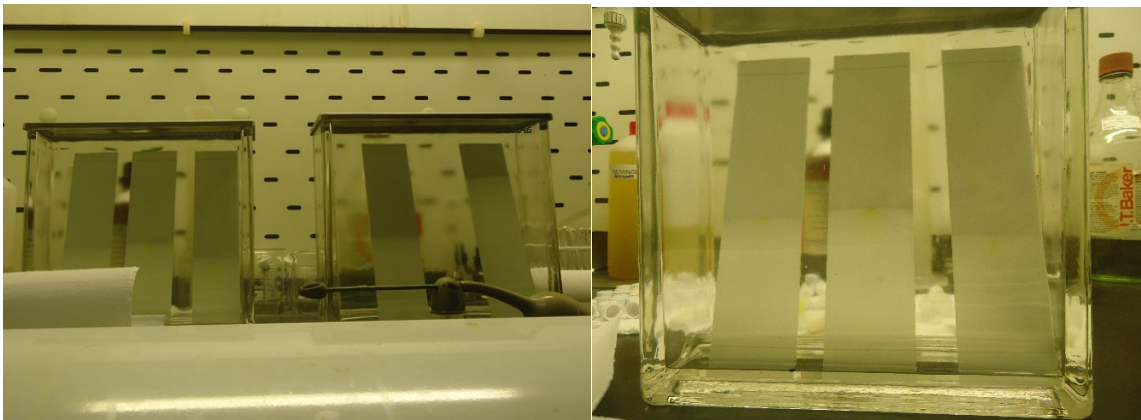
**Nota:**

A: corrida de placas en el solvente para estandarización de protocolo.

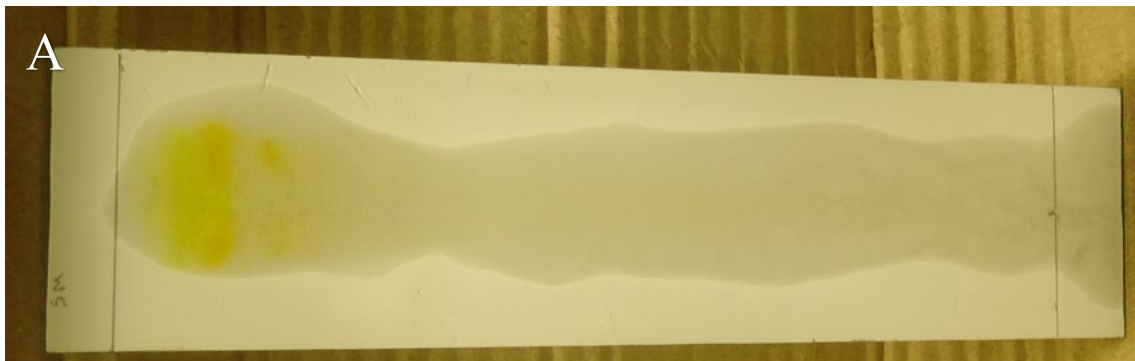
**Nota:**

A y B: revelado de placas el cámara de rayos UV a 100nm

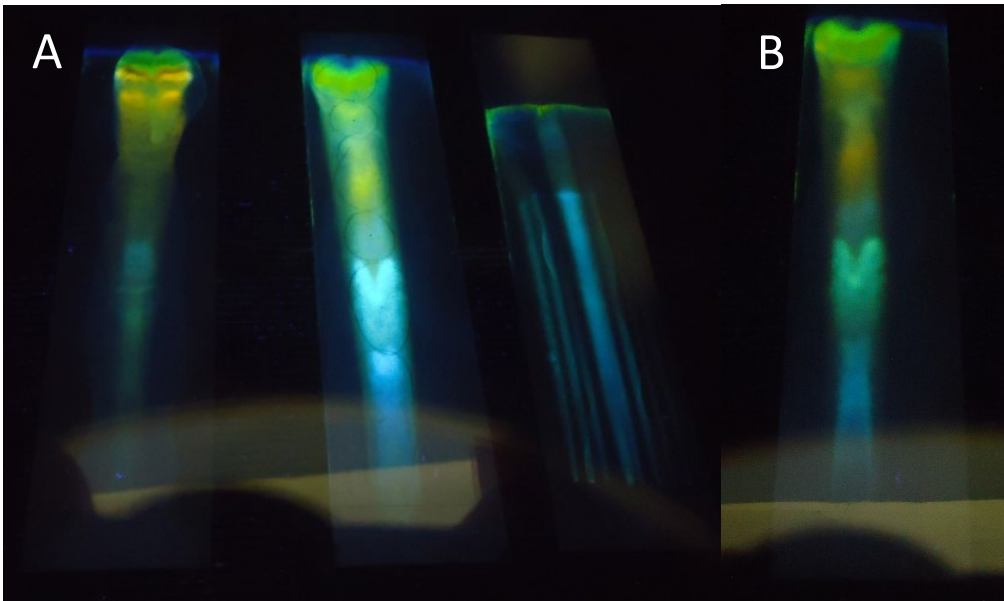
Anexo 2.6. *Corrida de cromatografía en capa fina de las muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, San Miguel y Luis Carranza*

**Nota:**

A y B: Corrida de muestras en cubas cromatográficas y en placas de 50x200mm.

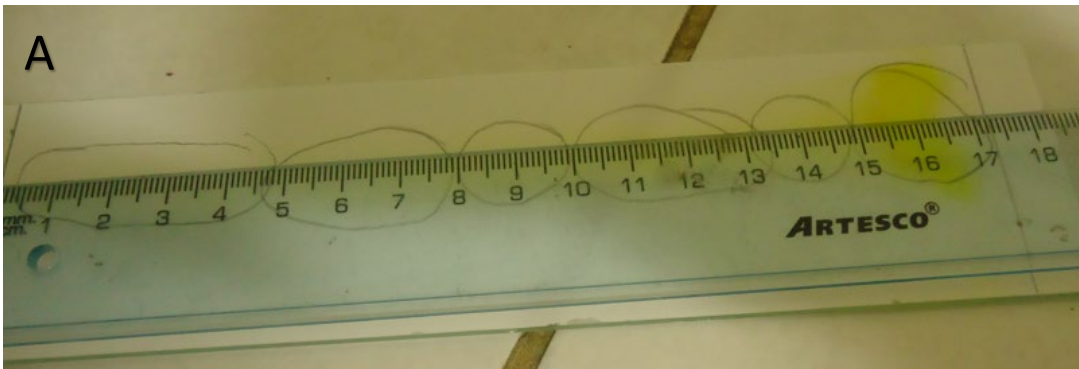
**Nota:**

A: proceso de secado después de asperjar con el revelador (Difenil borato).



Nota:

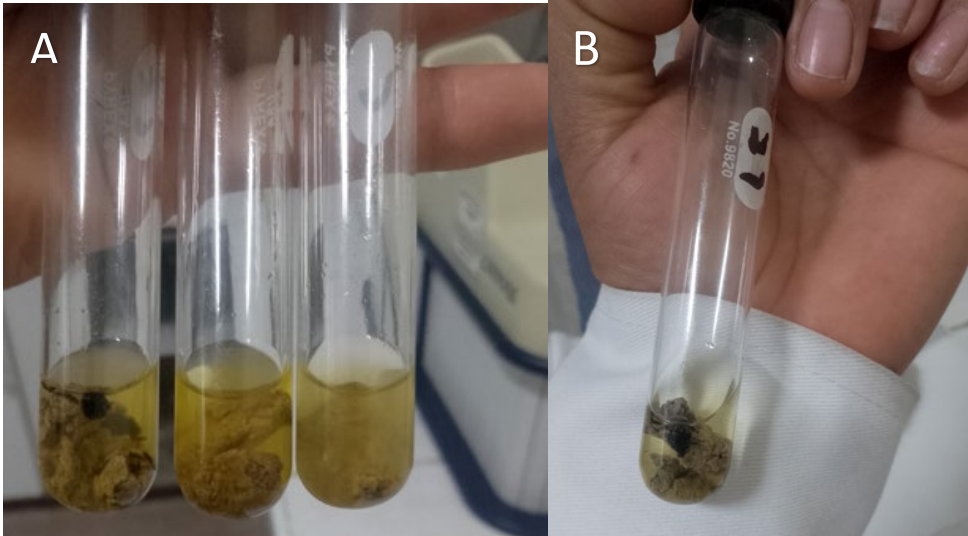
A: proceso de revelado en cámara Uv a 336nm de muestras de propóleo



Nota:

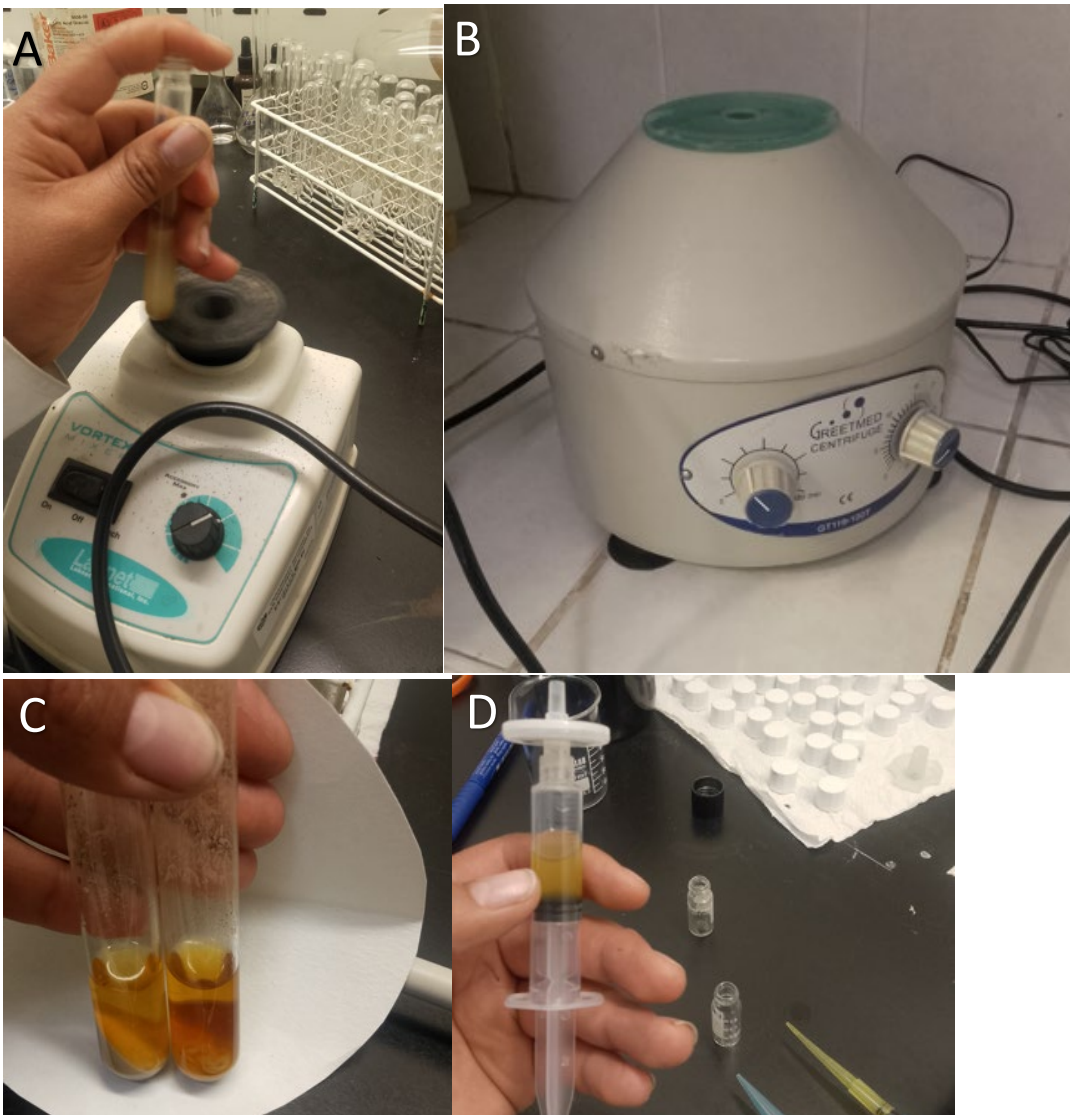
A: proceso de medición del factor de retención (Rf).

Anexo 2.7. *Preparación de muestras de propóleos para Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas*



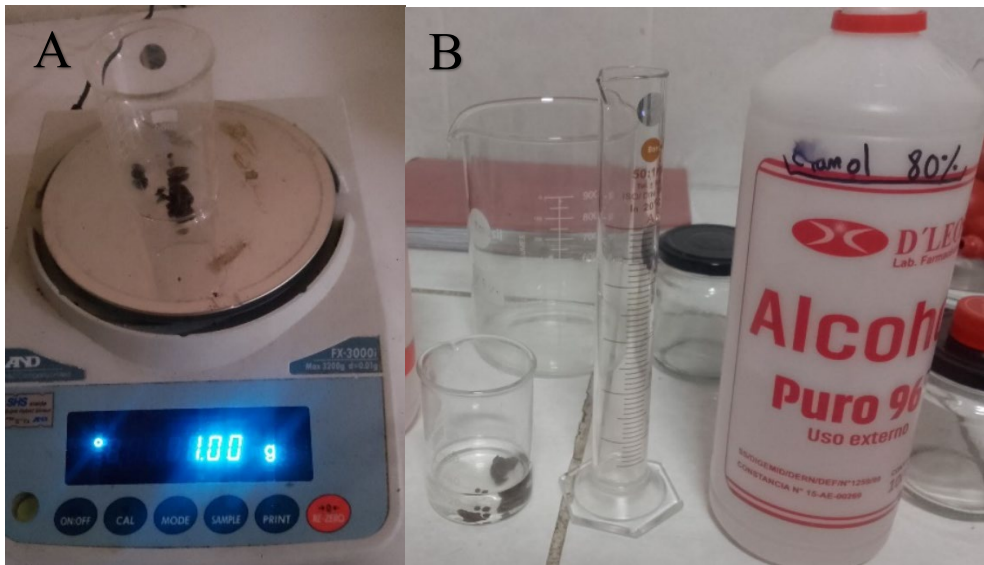
Nota:

A y B: muestras de propóleos de las tres zonas de Ayacucho con 3ml de metanol

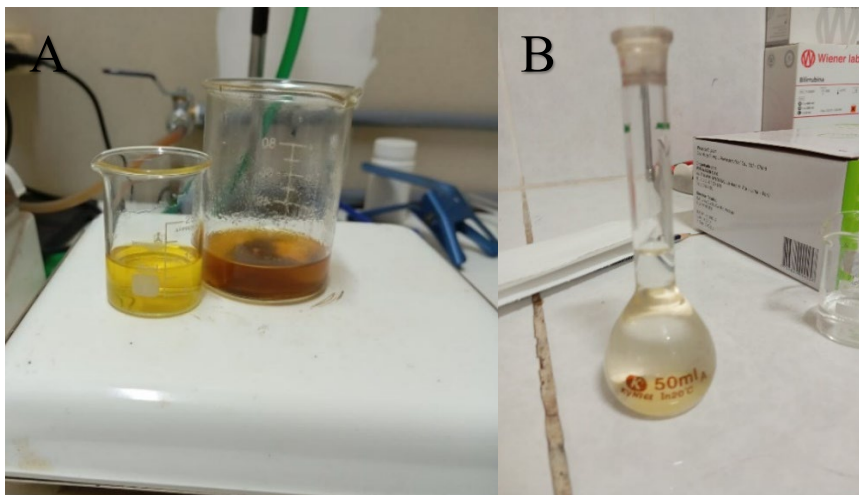


Nota: A: agitado del propoleo, B y C: centrifugado de propóleos, C: filtrado de propóleos

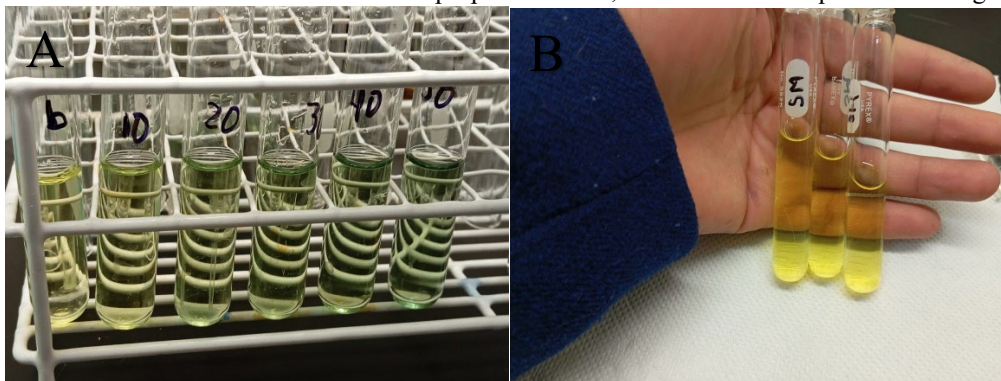
Anexo 2.8. Preparación de muestras de propóleos para Cuantificación de Flavonoides y Fenoles



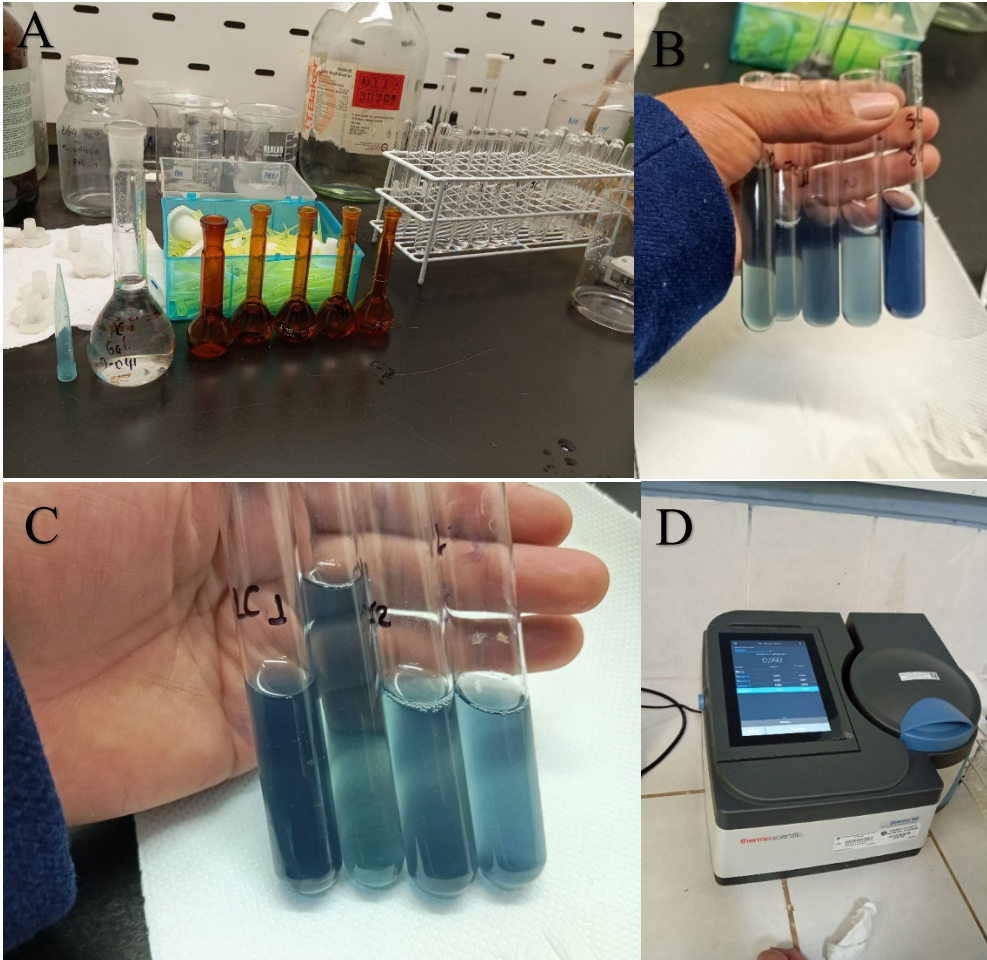
Nota: A: Pesado de muestras de propóleo de las tres localidades de Ayacucho: Cangallo, San Miguel y Luis Carranza, B: Disolución de muestras de propóleo en etanol al 80%



Nota: A: Calentamiento de muestras de propóleo a 40°C, B: Disolución de quercetina en agua estéril



Nota: A: Preparación de solución para curva de calibración de quercetina, B: Solución de muestras de propóleo para cuantificación de flavonoides.



Nota: A: Disolución de ácido gálico, B: Preparación de solución para curva de calibración de ácido gálico estándar para fenoles totales, C: Solución de muestras de propóleo y D: Lectura de absorbancia para fenoles a 725 nm y flavonoides a 415nm.

Anexo 3. Resultados de análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Anexo 3.1. Resultados de muestras de propóleo de Cangallo

N	TR	COMPOUND	AREA	COMMENT
1	9.799	4-VINYLGUAIACOL	87963	
2	10.63	para-anisic acid	31296	
3	10.68	Mandelic acid	322277	
4	11.98	APIOL	2183103	TERPENO
5	12.06	FURANONE,5-(2,5-DIMETHYLPHENYL)	2510761	AROMA EN PLANTAS
6	12.11	COPAENE	112379	TERPENO
7	12.53	alpha cedrene	471549	TERPENO
8	13.48	4,5,6,7,8-pentahydro-1,4,9,9-tetramethyl-3H-3A,7-Methanoazulen-2-one	556703	
9	14.36	hydroquinone	1468621	
10	17.01	nootkatone	837159	SESQUITERPEN O DEFENSA DE PLANTAS
11	17.26	caryophylla-3(12),7(13)-dien-6-ol	2224657	
12	17.44	6-hydroxy-2,2,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydro-gamma-carboline	2641161	
13	17.76	5 ALPHA-ANDROSTANE-3 ALPHA, 17 ALPHA DIOL	38174428	
14	18.39	NI	15238	
15	19.17	NI	5682521	
16	19.92	allyl crotonate	34319	
17	21.05	15-METHOXYBICYCLO(8,3,2),10(15),11-TRIEN-14-ONE	14202655	
18	21.26	ANDROST-5,16-DIENE-OL	4131	hormona
19	22.12	2,6,6,9-tetramethyl-5alpha,8 beta-tricyclo(6.3.0.0(1,5))undeca-2,9-diene	45616	

20	23.01	hexadecanol	915311	
21	23.67	s-Indacen-1(2H)-one, 3,5,6,7-tetrahydro-3,3,5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-	2524055	
22	24.57	heptadienoic acid dihexyl ester	1005417	

Anexo 3.2. Resultados de muestras de propóleo de Luis Carranza

N	TR	COMPOUND	AREA	COMMENT
1	9.8206	3-PHENYL-2-PROPEN-1-OL	105670	
2	10.69	mandelic acid	473408	
3	11.997	alpha-phenylcinnamic acid	267057	
4	12.002	apiol	10130316	
5	12.071	tetramethyl-2-tetrazene	3080	
6	12.077	Propionic acid, 3-(2,5-dimethylbenzoyl)-	2332172	
7	12.125	alpha copaene	418038	
8	12.551	alpha cedrene	91532	
9	13.282	adamantane acetic acid	25553	
10	13.491	NI	53421	
11	14.373	hydroquinone	707268	
12	16.362	alpha himachalene	4910783	
13	17.238	eremophilene	704937	
14	17.776	5 ALPHA-ANDROSTANE-3 ALPHA, 17 ALPHA DIOL	57742907	HORMONA
15	19.172	ni	1164573	
16	20.235	4-methoxy-4-phenylbut-1-ene	655208	
17	20.238	2-(4-methoxyphenyl)ethanol	2191628	comp volatil en plantas
18	20.887	allyl crotonate	2294	
19	21.261	Androst-5,16-diene-3 β -ol	2832457	hormona
20	22.073	glaucyl alcohol	17876189	monoterpeno alcohol
21	22.539	1,1,6-trimethylindan	106078	encontrada en Baccharis salicifolia
22	22.851	ni	421837	

23	24.067	2,6,6,9-tetramethyl-5 alpha, 8 beta-tricyclo(6,3,0(1,5) undeca-2,9- diene	16323411	
24	24.599	2-hexyldecanoc acid methyl ester	530008	

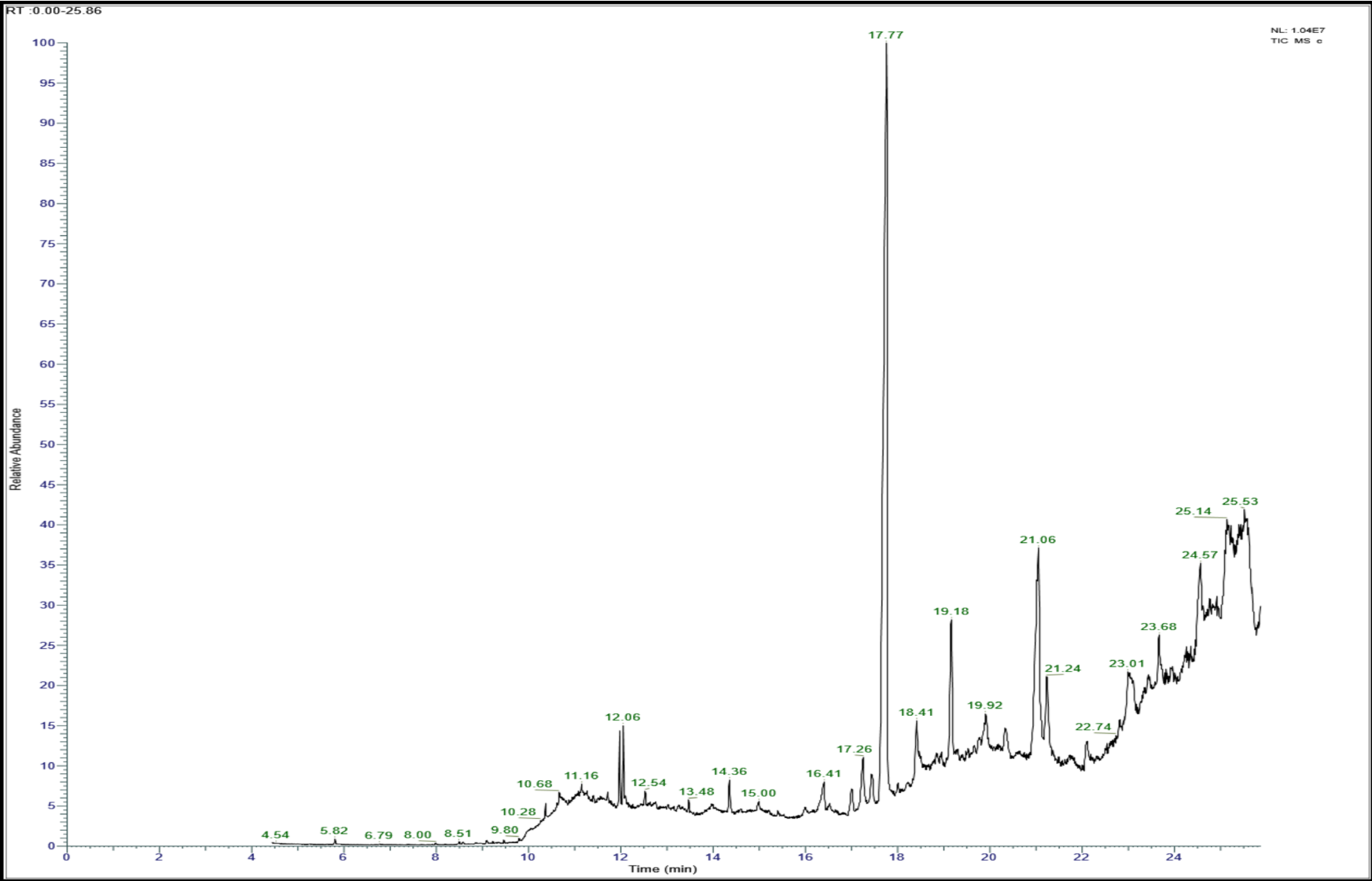
Anexo 3.3. Resultados de muestras de propóleo de San Miguel

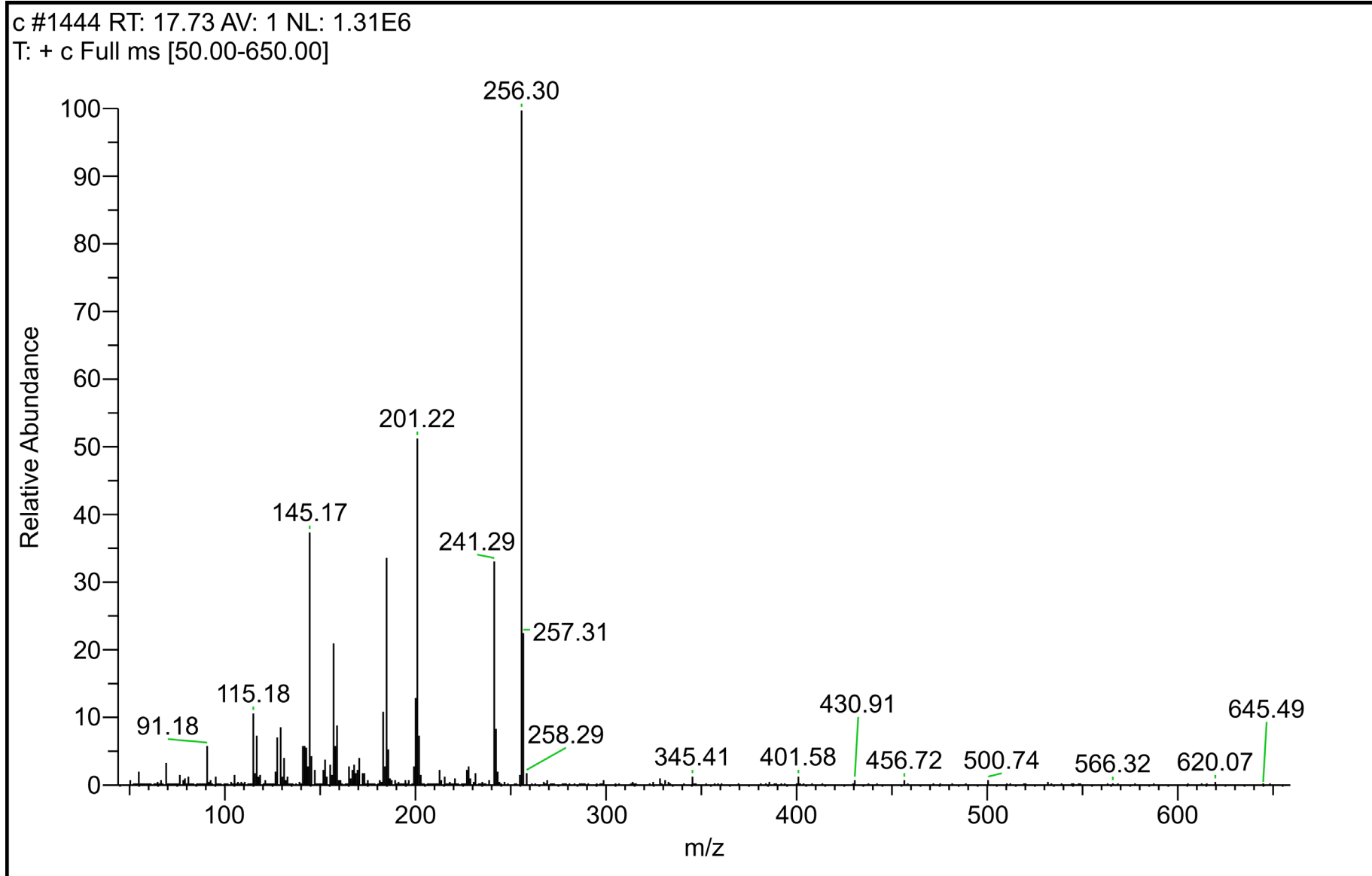
N	TR	COMPOUND	AREA	COMMENT
1	10.6043	4- Methoxyphenylacetone	796136	acetona volatil , agente aroma a nais
2	10.7	Mandelic acid// Benzeneethanol, 4-hydroxy-	151402	
3	11.7064	2H-PYRIMIDO(1,2- A)(1,3,5)Triazine-2,4,8(1H,3H) trione	56733	
4	11.7594	spathulenol	219594	
5	11.8937	2'6' dihydroxyacetophenone	227643	
6	12.0071	apiol	365538	
7	12.0848	NI	73572	
8	16.366	n-Hexadecanoic acid	497403	
9	17.2242	P-CYMEN-8-OL	20198	
10	17.6732	5 ALPHA-ANDROSTANE-3 ALPHA, 17 ALPHA DIOL	2105964	
11	19.4577	6-carboxylavonol	39844	
12	19.09866	methylciclohexane	156520	EN ACACIA
13	20.3483	2-(methoxyphenyl) ethanol/	15378731	COMPVOLATIL EN PLANYTAS PARA ATRAER POLINIZADORES
14	22.0802	orthoethylphenol	875979	
15	22.0988	p-hydroxyphenylacetic acid	558122	
16	23.0004	paramethoxyphenylacetone	6636041	EN PLANTAS PARA ATRAER INSECTOS
17	23.5986	NI	11707	
18	23.8745	NI	62663	

19	23.9505	2,6,6,9-tetramethyl-5alpha,8 beta-tricyclo(6,3,0(1,5))undeca-2,9-diene	1944096	
20	24.1331	NI	135906	

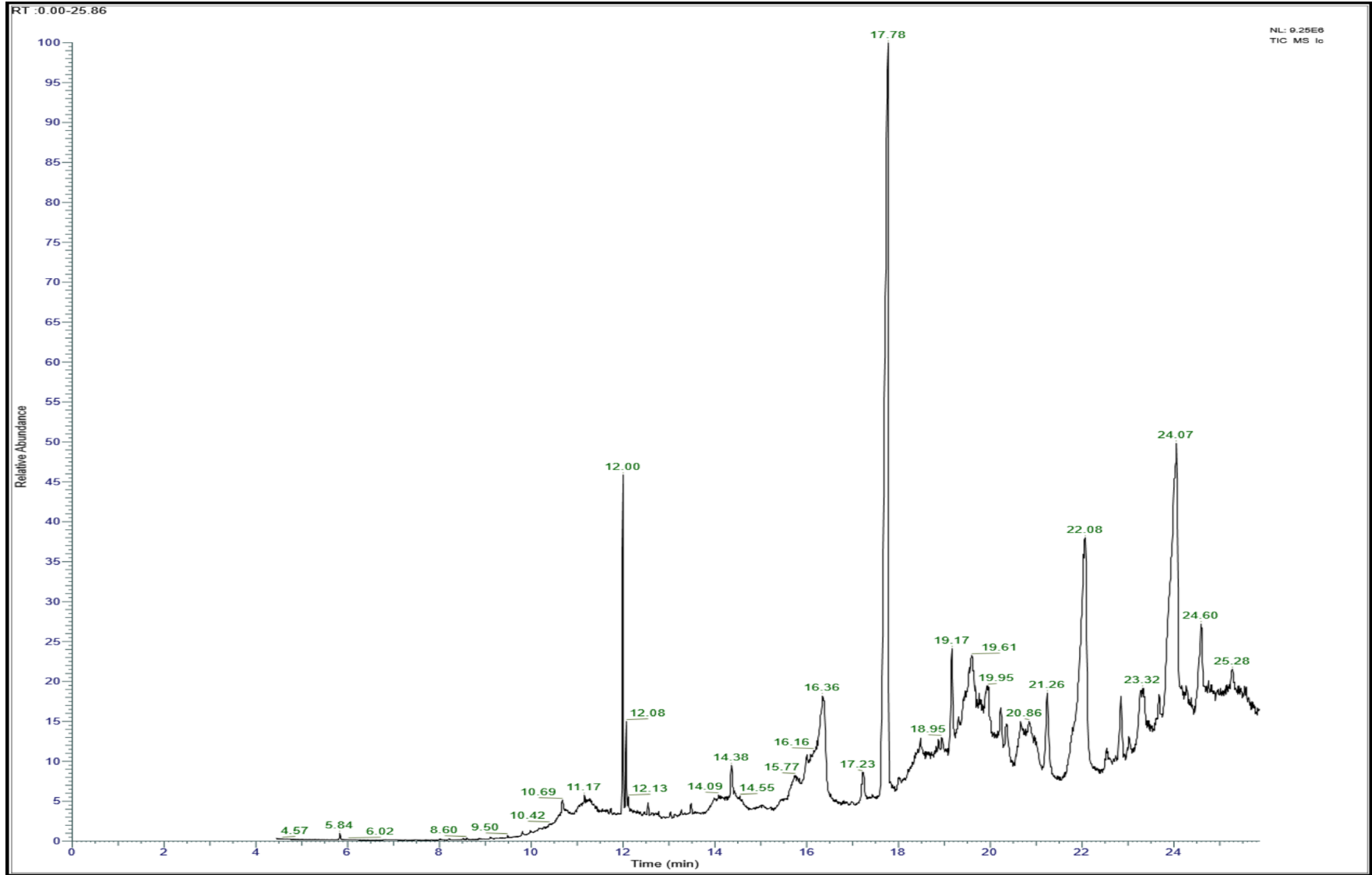
NOTA: No se cuantificó porque la línea base se distorsiona, las áreas deben ser tomadas sólo como referencia de abundancia

Anexo 3.4. *Parámetros de la relación señal/ruido de las bandas cromatográficas de propóleos de Cangallo.*



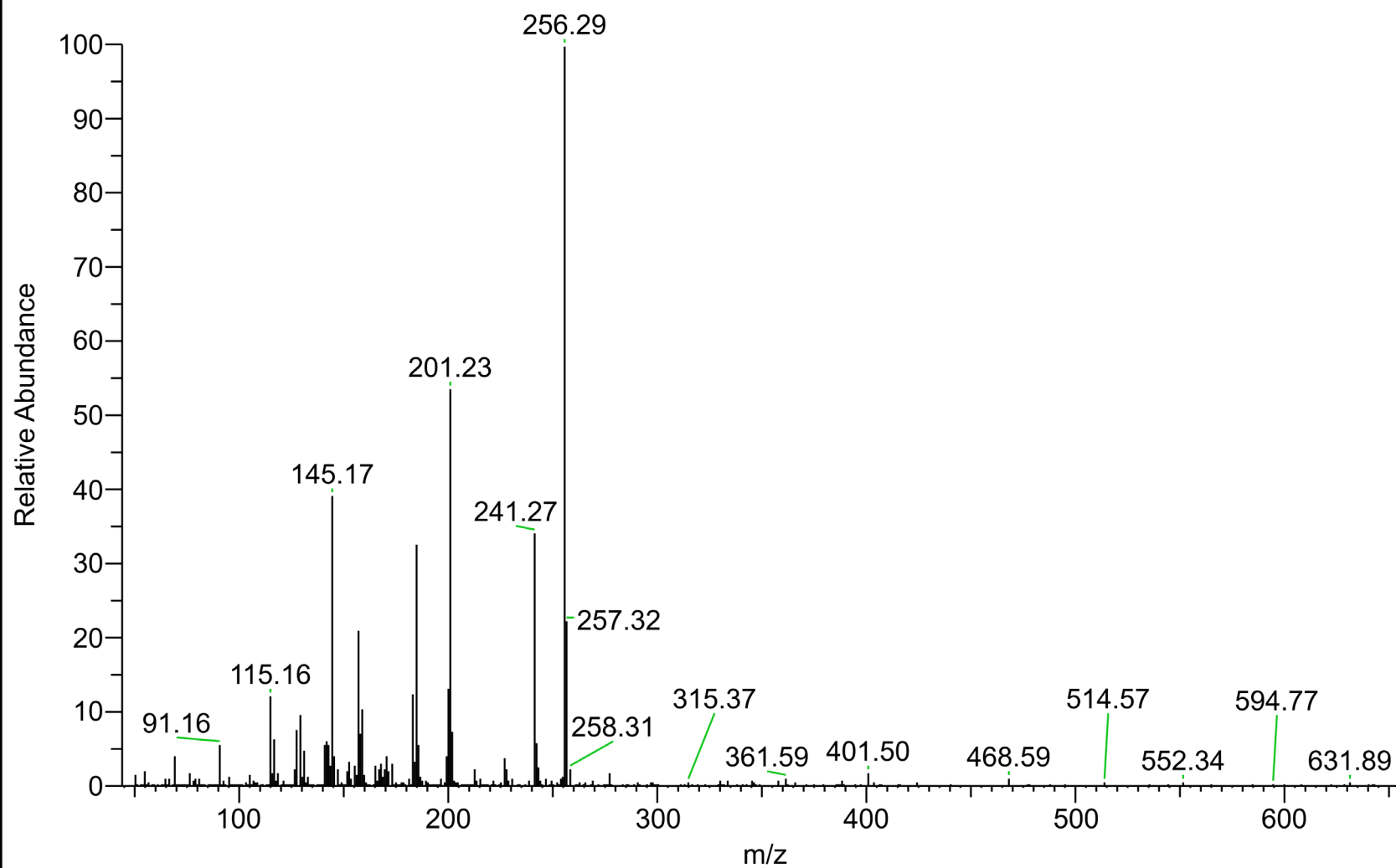


Anexo 3.5 *Parámetros de la relación señal/ruido de las bandas cromatográficas de propóleos de Luis Carranza*

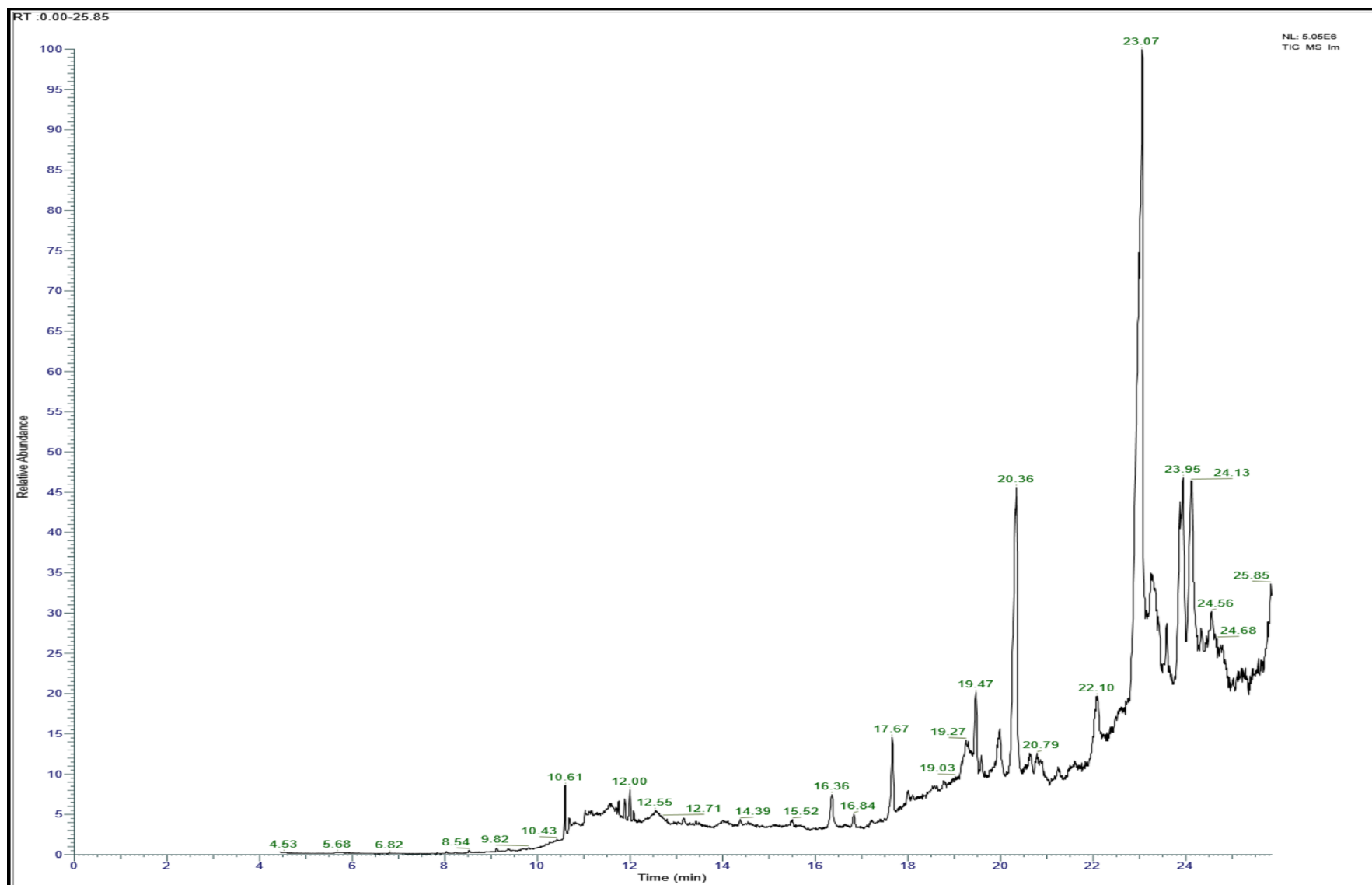


Ic #1457 RT: 17.75 AV: 1 NL: 1.34E6

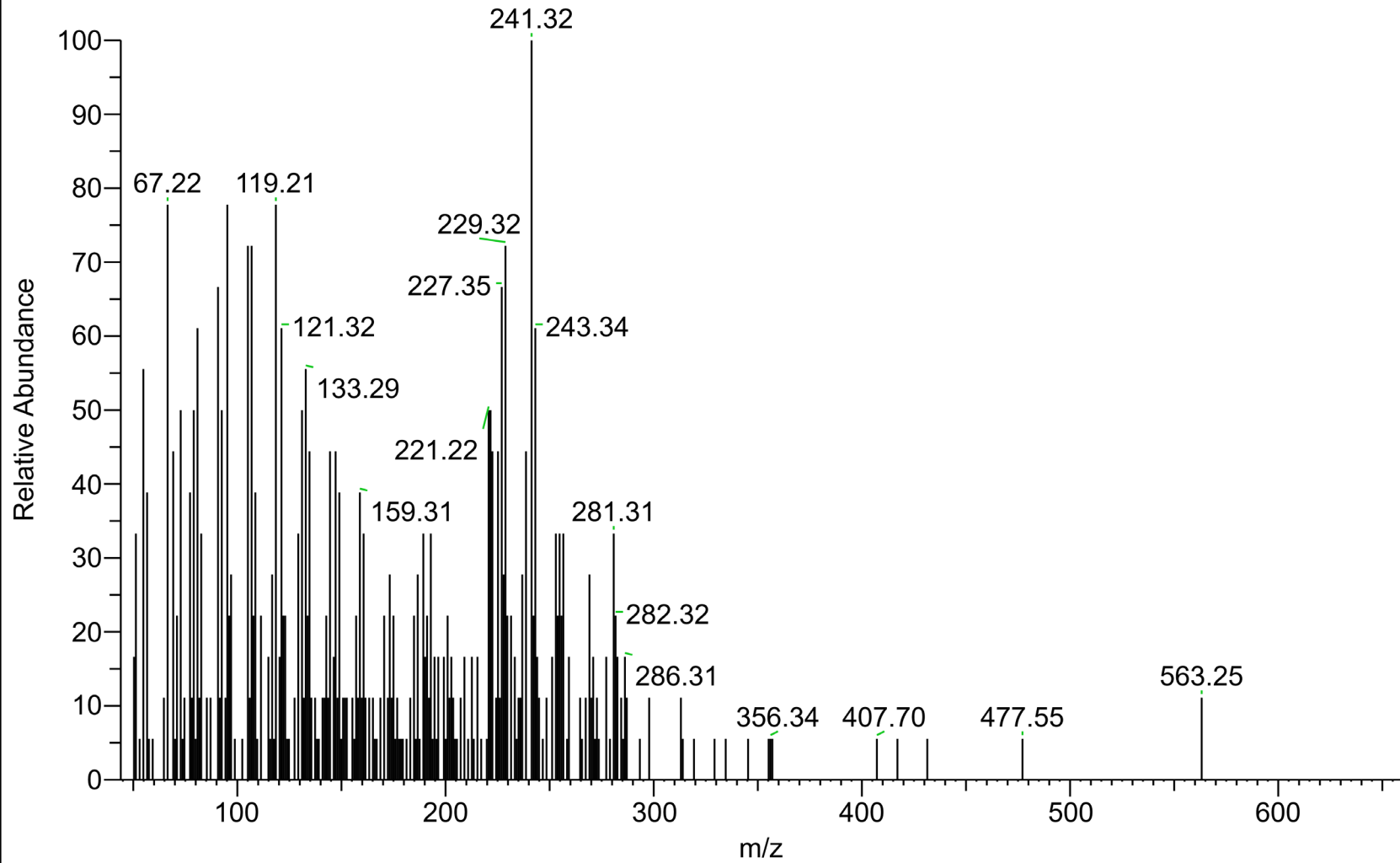
T: + c Full ms [50.00-650.00]



Anexo 3.6. *Parámetros de la relación señal/ruido de las bandas cromatográficas de propóleos de San Miguel*



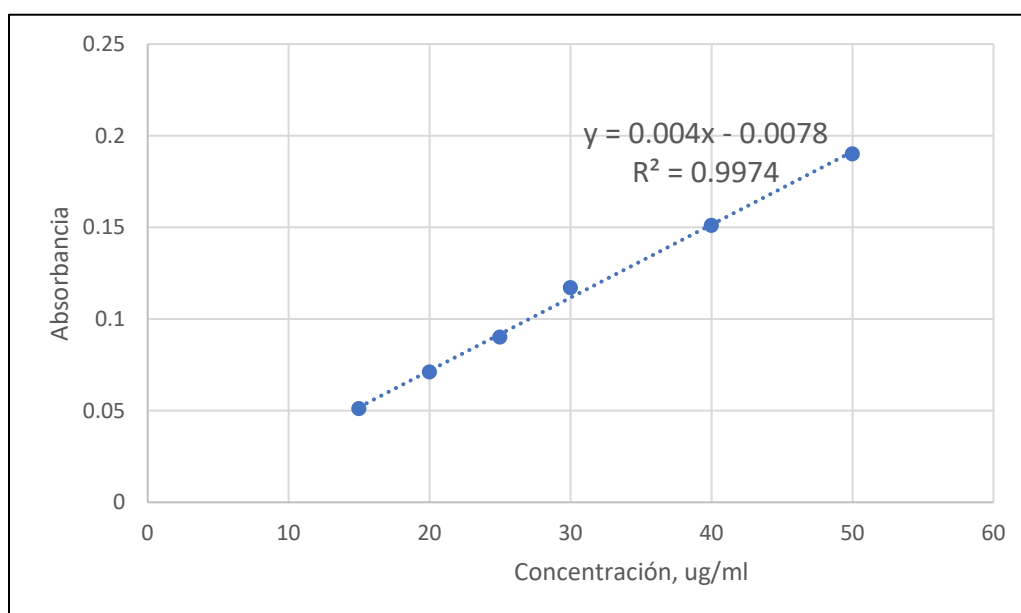
Im #1 RT: 4.45 AV: 1 NL: 4.50E2
T: + c Full ms [50.00-650.00]



Anexo 3.7. *Tabla de curva de calibración de flavonoides*

Estándar	Concentración (ug/ml)	Absorbancia
Quercetina	15	0.051
	20	0.071
	25	0.090
	30	0.117
	40	0.151
	50	0.190

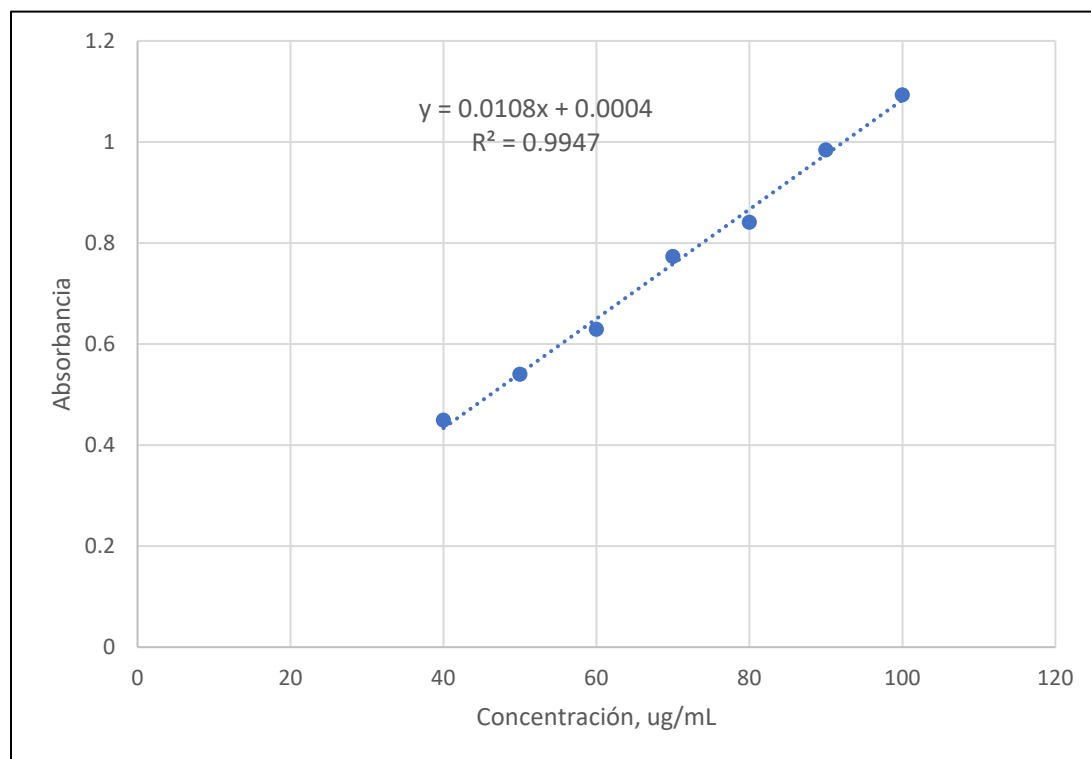
Anexo 3.8. *Figura de curva de calibración de flavonoides*



Anexo 3.9. *Tabla de curva de calibración de fenoles*

Estándar	Concentración (ug/ml)	Absorbancia
Ácido gálico	40	0.449
	50	0.54
	60	0.629
	70	0.773
	80	0.841
	90	0.984
	100	1.093

Anexo 3.10. *Figura de curva de calibración de fenoles*



Anexo 3.11. *Medida de las conidias de Colletotrichum gloeosporioides*



	LARGO	ANCHO	61	15.64	4.94	122	16.5	6.22
1	16.16	4.49	62	16.65	5.16	123	15.77	6.07
2	15.69	4.53	63	14.4	5.26	124	14.14	4.82
3	14.64	4.49	64	15.44	5.05	125	14.89	6
4	16.27	4.65	65	16.53	5.3	126	14.07	4.91
5	14.75	4.14	66	14.45	4.82	127	14.66	5.96
6	14.24	4.38	67	15.72	5.97	128	14.94	6.23
7	14.72	4.98	68	13.42	5.74	129	15.85	5.47
8	14.01	4.62	69	14.43	5.11	130	16.53	6.52
9	13.87	4.2	70	15.96	5.07	131	14.89	5.22
10	16.41	3.92	71	15.58	6.47	132	15.36	5.07
11	15.44	4.98	72	15.12	5.09	133	15.93	6.64
12	16.49	4.41	73	16.42	4.93	134	15.2	5.23
13	16.29	5.49	74	14.85	5.16	135	15.59	4.95
14	14.78	4.68	75	13.76	5.47	136	14.69	6.29
15	15.24	5.43	76	15.33	5.29	137	16.27	6.24
16	14.71	5.23	77	12.78	4.27	138	16.05	5.22
17	16.22	5.17	78	16.22	5.81	139	17.68	5.96
18	15.1	5.37	79	16.8	5.48	140	14.91	5.99
19	15.32	5.6	80	14.1	4.87	141	14.43	6.43
20	15.33	4.52	81	14.84	4.41	142	16.93	6.1
21	14.35	5.05	82	14.98	5.11	143	16.61	5.72
22	15.53	4.78	83	13.87	5.58	144	16.73	6.71
23	13.38	4.69	84	15.62	4.78	145	15.55	5.17
24	14.57	5.15	85	16.1	5.19	146	13.5	5.6
25	16.11	4.78	86	16.01	6.95	147	15.67	5.52
26	15.56	5.19	87	14.43	4.74	148	11.9	5.16
27	16.39	4.93	88	11.19	4.78	149	14.61	5.47
28	14.11	5.05	89	17.34	5.37	150	15.33	4.91
29	12.49	5.32	90	14.18	4.91	151	11.43	5.32
30	8.7	5.19	91	12.81	5.37	152	14.87	4.97
31	15.15	5.3	92	16.01	6.38	153	16.49	5.77
32	15.44	5.37	93	15.9	5.48	154	16.27	5.32
33	14.61	5.7	94	12.49	5.29	155	14.98	5.42
34	15.36	4.82	95	14.65	4.59	156	15.21	6.33
35	17.06	6.02	96	15.87	5.88	157	15.42	4.82
36	14.74	5.44	97	17.68	6.58	158	16.18	5.51
37	14.4	5.32	98	15.93	5.56	159	15.93	5.55
38	16	5.14	99	16.42	5.52	160	14.67	4.85
39	15.02	6.2	100	14.64	6.07	161	13.97	4.78
40	14.53	5.42	101	16.92	6.55	162	15.97	5.81
41	15.09	5.44	102	16.33	5.73	163	15.36	4.79
42	14.93	5.42	103	15.19	5.8	164	16.92	4.61
43	15.35	4.58	104	13.87	5.11	165	15.52	5.37
44	15.17	4.41	105	16.24	4.22	166	15.05	4.53
45	15.23	5.67	106	15.88	4.67	167	15.36	5.63
46	14.4	6.28	107	13.96	4.66	168	14.59	5.29
47	13.09	4.65	108	13.37	5.22	169	15.66	4.65
48	15.4	4.57	109	15.08	4.9	170	16.87	5.43
49	15.78	4.62	110	14.79	6.21	171	17.01	5.73
50	15.23	4.79	111	15.15	4.9	172	15.59	5.82
51	14.34	5.32	112	15.49	5.19	173	16.58	5.42
52	15.7	5.44	113	16.01	4.7	174	14.84	6.64
53	17.23	4.91	114	15.93	4.25	175	16.82	5.23
54	16.1	5.34	115	16.05	4.65	176	17.75	4.91
55	16.02	5.55	116	17.47	3.65	177	17.25	5.88
56	16.45	4.38	117	15.01	4.62	178	15	4.47
57	17.36	6.03	118	16.93	3.95	179	15.05	6.17
58	15.18	5.62	119	16.76	5.87	180	16.9	4.26
59	13.82	5.44	120	16.3	4.39	181	14.6	5.81
60	16.15	5.14	121	14.24	4.9	182	14.61	6.22
						183	15.3	6.47
						184	16.31	5.48
						185	17.51	5.52
						186	15.49	5.96
						187	16.1	4.73
						188	15.51	6.07
						189	15.1	5.97
						190	17.06	5.11
						191	16.01	6.87
						192	16.24	5.04
						193	15.18	5.16
						194	13.49	5.96
						195	16.24	6.66
						196	17.01	5.77
						197	15.69	6.61
						198	12.11	5.15
						199	16.33	5.8
						200	14.74	4.87

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**
Bach. YENNY MILUZCA BAYGORREA CUBA**R.D. N° 374-2024-UNSCH-FCA-D**

En la ciudad de Ayacucho a los diez días del mes de diciembre del año dos mil veinticuatro, siendo las dieciocho horas, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, bajo la presidencia del Dr. Felipe Escobar Ramírez Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias; los miembros del jurado conformado por M.Sc. Julio Danilo Vilca Vivas, M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla como asesora, M.Sc. Francisco Condeña Almora y M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino; actuando como secretario de actas el Mtro. Rodolfo Alca Mendoza, para recibir la sustentación de la Tesis titulado: **Efecto anti fúngico in vitro de Extractos Etanólicos de Propóleos de Apis mellifera sobre Colletotrichum gloeosporioides de palto. Ayacucho, 2024**, para obtener el Título Profesional de Ingeniera Agrónoma presentado por la Bachiller **YENNY MILUZCA BAYGORREA CUBA**.

El señor Decano (e) previa verificación de los documentos exigidos solicitó se proceda con la sustentación y posterior defensa de la tesis en un periodo de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento de grados y títulos vigente. Terminado la exposición, los miembros del Jurado, formularon sus preguntas, aclaraciones y/o observaciones correspondientes. Luego se invito a los miembros del jurado pasar a otra aula para la deliberacion y calificación del trabajo de tesis, teniendo el siguiente resultado:

Jurado evaluador	Exposición	Respuestas a las preguntas	Generación de conocimiento	Promedio
M.Sc. Julio Danilo Vilca Vivas	15	12	13	13
M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla	17	15	17	16
M.Sc. Francisco Condeña Almora	17	15	16	16
M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino	15	14	15	15
PROMEDIO GENERAL				15

Acto seguido se invita al sustentante y publico en general para dar a conocer el resultado final. Firman el acta.


.....
M.Sc. Julio Danilo Vilca Vivas
Presidente


.....
M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla
Asesor


.....
M.Sc. Francisco Condeña Almora
Jurado


.....
M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino
Jurado


.....
Mtro. Rodolfo Alca Mendoza
Secretario Docente



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE CONTROL DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe coordinador responsable de la valoración y verificación de originalidad de los trabajos de investigación y de tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, designado mediante la RCF N° 005-2024-UNSCH-FCA-CF; hace constar que el trabajo de tesis titulado;

Efecto anti fúngico *in vitro* de Extractos Etanólicos de Propóleos de *Apis mellifera* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* de palto. Ayacucho, 2024

Autor : Yenny Miluzca BAYGORREA CUBA

Asesor : Angela Juana REQUIS QUINTANILLA

Ha sido sometido al control de originalidad mediante el software TURNITIN UNSCH, acorde al Reglamento de originalidad de trabajos de investigación, aprobado mediante RCU N° 039-2021-UNSCH-CU, y RCU N° 1530-2023-UNSCH-CU, emitiendo un resultado de **diecisiete (17 %)** de índice de similitud, realizado con **depósito de trabajos estándar**.

En consecuencia, se otorga la presente Constancia de Originalidad para los fines pertinentes.

Nota: Se adjunta el resultado con Identificador de la entrega: 2690665728

Ayacucho, 2 de junio de 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
Facultad de Ciencias Agrarias

Dr. Yuri Gálvez Gastelú
Coordinador de Control de originalidad de

Efecto anti fúngico in vitro de
Extractos Etanólicos de
Propóleos de Apis mellifera
sobre Colletotrichum
gloeosporioides de palto.
Ayacucho, 2024

por YENNY MILUZCA BAYGORREA CUBA

Fecha de entrega: 02-jun-2025 10:31a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2690665728

Nombre del archivo: TESIS_SUSTENTADA_CORRECCIÓN.docx (24.85M)

Total de palabras: 18788

Total de caracteres: 105852

Efecto anti fúngico in vitro de Extractos Etanólicos de Propóleos de Apis mellifera sobre Colletotrichum gloeosporioides de palto. Ayacucho, 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	repositorio.uaaan.mx Fuente de Internet	1%
4	cienciasagricolas.inifap.gob.mx Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
6	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
7	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
8	colposdigital.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	1%

9	repositorio.umsa.bo Fuente de Internet	<1 %
10	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
11	www.redalyc.org Fuente de Internet	<1 %
12	biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
13	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
14	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
15	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
17	www.repositorio.ugto.mx Fuente de Internet	<1 %
18	www.scielo.cl Fuente de Internet	<1 %
19	partespormillonppm.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
20	1library.co Fuente de Internet	<1 %

21 issuu.com Fuente de Internet <1 %

22 repositorio.xoc.uam.mx Fuente de Internet <1 %

23 ve.scielo.org Fuente de Internet <1 %

24 www0.umoncton.ca Fuente de Internet <1 %

25 Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante <1 %

26 Edwin C. Enciso, Enrique J. Aguilar, Pablo W. Común, Yovani M. Condorhuamán. "Efecto hepatoprotector y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico del fruto de dos variedades de *Opuntia megacantha* "Tuna"", *Ciencia e Investigación*, 2020
Publicación <1 %

27 revistas.sena.edu.co Fuente de Internet <1 %

28 Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD, UNAD Trabajo del estudiante <1 %

29 dgsa.uaeh.edu.mx:8080 Fuente de Internet <1 %

www.smf.org.mx

30

Fuente de Internet

<1 %

31

agraria.pe

Fuente de Internet

<1 %

32

ciencialatina.org

Fuente de Internet

<1 %

33

www.javeriana.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

34

www.dspace.uce.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

35

www.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

Efecto anti fúngico *in vitro* de Extractos Etanólicos de Propóleos de *Apis mellifera* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* de palto. Ayacucho, 2024

Baygorrea Cuba, Yenny Miluzca
yenny.baygorrea.01@unsch.edu.pe

Angela Juana Requis Quintanilla
angela.requis@unsch.edu.pe

Rocío E. Quispe Medina
rocio.quispe@unsch.edu.pe

kirianova Bautista Godoy
kirianova.bautista@unsch.edu.pe

Área de investigación: Medio ambiente

Línea de investigación: Biotecnología aplicada a la agricultura

RESUMEN

La antracnosis en frutos de palto es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno que provoca la descomposición de los frutos durante la poscosecha. El propóleo producido por las abejas (*Apis mellifera* L.) es una resina que posee efectos antifúngicos y antibacterianos atribuidas a su contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos. El objetivo fue evaluar el efecto antifúngico de Extractos Etanólico de Propóleos (EEP) frente a *C. gloeosporioides*, para lo cual se utilizaron muestras de propóleos procedentes de las localidades de Cangallo, Luis Carranza y San Miguel preparadas a tres concentraciones 25%, 50% y 75%. Se trabajó con un Diseño Completo al Azar (DCA), con 10 tratamientos y 5 repeticiones, empleando la metodología de medio contaminado. El hongo fue inoculado en medio PDA mediante discos de micelio con mediciones diarias. Para el análisis químico de los EPP, se utilizó la metodología de cromatografía en capa fina para la identificación de flavonoides y cromatografía gases acoplado a espectrometría de masas para la detección de compuestos volátiles. Los resultados obtenidos con la fórmula de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM) evidenciaron que todos los EEP inhiben el crecimiento del *C. gloeosporioides*. Las mayores inhibiciones se registraron a la concentración del 75 %, con valores de 69.85 % para Luis Carranza, 68.91 % para Cangallo y 59.37 % para San Miguel. Asimismo, los análisis cromatográficos revelaron que los propóleos de Luis Carranza y Cangallo presentaron mayor diversidad de flavonoides, mientras que los de Luis Carranza mostraron la mayor cantidad de compuestos volátiles según los resultados obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Palabras claves: Propóleo, *Colletotrichum gloeosporioides*, cromatografía de capa fina y de gases, Extractos Etanólico de Propóleos (EEP) y efecto antifúngico.

***In vitro* antifungal effect of ethanolic extracts of *Apis mellifera* propolis on *Colletotrichum gloeosporioides* of avocado. Ayacucho, 2024**

ABSTRACT

Anthrachnose in avocado fruit is caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, a pathogen that causes fruit decay during postharvest. Propolis produced by honeybees (*Apis mellifera* L.) is a resin that possesses antifungal and antibacterial effects attributed to its content of phenolic compounds, flavonoids, and terpenes. The objective was to evaluate the antifungal effect of Ethanolic Propolis Extracts (EEP) against *C. gloeosporioides*. Propolis samples from the localities of Cangallo, Luis Carranza, and San Miguel were used, prepared at three concentrations: 25%, 50%, and 75%. A completely randomized design (CRD) was used, with 10 treatments and 5 replicates, using the contaminated medium methodology. The fungus was inoculated into PDA medium using mycelial discs with daily measurements. For the chemical analysis of the PPE, thin-layer chromatography was used to identify flavonoids, and gas chromatography-mass spectrometry was used to detect volatile compounds. The results obtained using the percentage of mycelial growth inhibition (PGMI) formula showed that all PPE inhibit the growth of *C. gloeosporioides*. The highest inhibitions were recorded at a concentration of 75%, with values of 69.85% for Luis Carranza, 68.91% for Cangallo, and 59.37% for San Miguel. Furthermore, chromatographic analyses revealed that propolis from Luis Carranza and Cangallo presented a greater diversity of flavonoids, while those from Luis Carranza showed the highest amount of volatile compounds, according to the results obtained by gas chromatography-mass spectrometry.

Keywords: Propolis, *Colletotrichum gloeosporioides*, thin layer and gas chromatography, Ethanolic Extracts of Propolis (EEP) and antifungal effect.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de palto (*Persea americana* Mill.) ha sido parte de la alimentación humana desde tiempos antiguos y, en las últimas décadas, ha adquirido gran relevancia a nivel mundial debido a sus propiedades nutricionales y beneficios para la salud. Su creciente importancia económica se debe, en parte, a los avances en manejo agronómico, mejora genética, riego tecnificado, fertilización y control de plagas, lo que ha permitido incrementar tanto el rendimiento como la calidad del fruto. En nuestro país, la variedad Hass la más apreciada por su buena composición nutricional y su cáscara gruesa, que facilita su transporte y almacenamiento (Zapata et al., 2020). No obstante, las pérdidas durante la poscosecha continúan siendo una limitante significativa principalmente por prácticas inadecuadas de manipulación, daños mecánicos y condiciones deficientes de almacenamiento y transporte. Estos factores no solo comprometen la calidad del fruto, sino que también favorecen el desarrollo de enfermedades que disminuyen su valor comercial (Benítez et al., 2021; MIDAGRI, 2008).

La palta enfrenta serios problemas durante su almacenamiento y comercialización debido al ataque de patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis. Este hongo penetra la cutícula del fruto y puede permanecer en estado latente

hasta que se presente las condiciones favorables de temperatura y humedad o el fruto alcance su madurez, momento en la que se activa y genera lesiones que puedan ocasionar pérdidas económicas de hasta el 20% de la producción (Tapia et al., 2020; Mayek - Pérez et al., 2009).

Según Beno y Prusky (2000) y Mayek - Pérez et al. (2009), la antracnosis causa pérdidas significativas durante la etapa de poscosecha, principalmente por el deterioro de los frutos que afecta su calidad comercial. Los síntomas iniciales se manifiestan como manchas circulares, blandas y húmedas que, con el tiempo, se oscurecen y desarrollan masas conidiales de color rosa o salmón. Estas lesiones avanzan hasta provocar el ablandamiento y la pudrición del mesocarpio, lo que puede llevar a la pérdida total del fruto.

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de exudados de brotes, néctar de flores y otras secreciones de las plantas. En la colmena, es utilizado para sellar grietas, embalsamar invasores y proteger el ambiente interno contra microorganismos patógenos. Su composición incluye más de 300 compuestos bioactivos, cuya concentración y variedad dependen del origen botánico y geográfico, esta compleja combinación le confiere propiedades antimicrobianas y antifúngica (Luna y Polo, 2024; Rodríguez, 2020). Ante la creciente preocupación por los efectos negativos asociados a los fungicidas, crece el interés en

alternativas más ecológicas para controlar enfermedades poscosecha. En este contexto, los extractos etanólicos de propóleo (EEP), han demostrado capacidad para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en frutos de palto, siendo así una alternativa sostenible para mantener la calidad del fruto durante almacenamiento y transporte.

Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera* en *Colletotrichum gloeosporioides* de palto.

Objetivos específicos

1. Obtener extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera*.
2. Reconocer las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* de palto.
3. Realizar el análisis químico de los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera*.
4. Comparar *in vitro* el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera* en *Colletotrichum gloeosporioides* de palto.

II. METODOLOGÍA

Lugar del experimento

La investigación se realizó en tres laboratorios; la obtención, purificación y prueba de medio contaminado se realizó en el Laboratorio de Fitopatología, la estandarización de la metodología de cromatografía en capa fina para

el análisis de los EEPs en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, ambos laboratorios son de la Escuela Profesional de Agronomía. El análisis final de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, capa fina, la cuantificación de fenoles y flavonoides en el Laboratorio de Control de Calidad de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Los tres laboratorios pertenecen a la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, a una altitud de 2792 msnm. Ubicándose en las coordenadas geográficas de 13°08'38" latitud Sur y 74°13'17" longitud Oeste, provincia de Huamanga y región Ayacucho.

Obtención de muestras de propóleo

Las muestras de propóleo fueron recolectadas mediante raspado en tres localidades: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel. Posteriormente, se almacenaron en frascos ámbar y se trasladaron al laboratorio para su análisis

Colección de frutos de palto Hass

Los frutos palto Hass del distrito de San Miguel fueron seleccionados en la etapa de madurez verde opaco y enviados al laboratorio vegetal para evaluar la presencia de patógenos, especial *Colletotrichum gloeosporioides*. Los frutos fueron acondicionados en cámaras húmedas para identificar posibles infecciones durante la poscosecha.

Aislamiento y purificación

Los frutos se lavaron con agua de caño, se secó con papel toalla estéril y la desinfección se realizó en hipoclorito de sodio al 2% por 2 min, seguidos de dos enjuagues con agua destilada estéril. Luego se dejó secar sobre papel toalla estéril y se colocaron en cámara húmeda para favorecer la esporulación, observando diariamente hasta visualizar los signos de la enfermedad. Para aislar el patógeno, se tomó micelio con un estilete y se sembró en placas con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), incubando a 27 °C durante 5 días. Se repitió la siembra hasta obtener cultivos puros.

Caracterización morfológica

Los aislamientos puros se caracterizaron morfológicamente considerando el color de las colonias, formación de halos concéntricos, forma (cilíndricas, piriforme, ovaladas) y tamaño (largo y ancho) de las conidias. Se midió 200 conidias utilizando un microscopio óptico Acu-scope a 400X de aumento, lo que permitió realizar mediciones directas.

Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleos

Siguiendo el protocolo de Checalla y Sánchez-Tito, (2021), se pesó 50 gr de las muestras de propóleo, se cortaron en láminas, se introdujeron en recipientes con nitrógeno líquido y se trituraron hasta obtener un polvo fino. Este polvo se maceró en 250 ml de alcohol etílico al 96% a 37°C por 15 días, agitando

diariamente para asegurar la correcta mezcla de los componentes. Luego, el extracto se filtró y se evaporó el solvente a 50°C por 4 días para obtener el EEP puro al 96%. Finalmente, se colocó 7.5 ml, 5 ml y 2.5 ml de agua destilada en distintos frascos ámbar donde se agregó 2.5 ml, 5 ml y 7.5 ml del EEP puro, para obtener las concentraciones de 25%, 50% y 75%

Análisis de cromatografía en capa fina de los propóleos

Para la cromatografía en capa fina se siguió las pautas propuestas por Campo-Fernández et al. (2008) y Quispe (2020). Se preparó muestras de EEP mezclando 1 ml de extracto con 1 ml de metanol. Se empleó una placa de Sílica gel (SIGMA ALDRICH) activadas previamente a 100°C, aplicando 10 µL de muestra con micropipeta. y luego se dejó secar al ambiente. La corrida ascendente se realizó con una mezcla de cloroformo, metanol y agua (7.5:4:0.5) durante 17.4 cm durante 59 min 50 s, 1 h 24 min y 1 h 41 min para las muestras de San Miguel, Cangallo y Luis Carranza respectivamente a 16 °C. Tras la corrida, las placas se secaron y se revelaron flavonoides con Difenil borato al 1% en etanol, utilizando la luz ultravioleta (336 nm).

Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los propóleos

Para la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se siguió el protocolo propuesto por Rodríguez et al. (2020).

El análisis GC-MS de los propóleos de *Apis mellifera* de Ayacucho fueron realizados con un equipo Thermo Scientific Trace GC- Ultra- ITQ 900. Se utilizó el Helio como gas portador y modo de inyección Splitless con un volumen de 2 μ l. Las condiciones de separación comenzaron a 60°C con incrementos progresivos hasta 240 °C manteniendo esta última por dos minutos, en un tiempo total de 25 minutos y 85 segundos. La identificación cualitativa de los compuestos se realiza mediante la comparación de espectros de masas utilizadas como la biblioteca de la base de datos NIS LIBRARY y GCMS DB-PUBLIC-KOVATSRI-VS3.MSP.Library.

Cuantificación de fenoles y flavonoides

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides se utilizó el protocolo propuesto por Hernández et al. (2018). Se disolvió 1 g de propóleo en 25 ml de etanol al 80%, se calentó a 40 °C por 2 horas, luego se filtró y centrifugó para eliminar ceras. El sobrenadante se concentró a sequedad a 40 °C y reconstituyó en 25 ml de solvente.

Cuantificación de fenoles se realizó por el método de Folin Ciocalteu, se realizó una dilución 1:20 del EEP y se mezcló 1 ml de esta solución con 1 ml del reactivo de folin (diluido 1:10) y 4 ml de Na₂CO₃ al 1%. Se mezcla se trasladó a oscuridad por 2 h y se leyó la absorbancia a 725 nm. Se elaboró una curva de calibración con ácido gálico y los resultados

fueron expresados en mg equivalente de ácido gálico/g muestra.

Cuantificación de flavonoides, se realizó una dilución 1:20 del EEP, se tomó 500 μ l de esta solución y se adicionó 100 μ l de cloruro de aluminio al 1%, 100 μ l de acetato de potasio 1M y 4 ml de etanol al 80%. Se trasladó a la oscuridad por 40 min y se leyó la absorbancia a 415 nm. Se elaboró una curva de calibración con quercetina. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de quercetina/g muestra.

Prueba de medio contaminado

Se trabajó con medio PDA estéril a 37° - 38°C, al cual se añadieron diferentes concentraciones de EEP, utilizando una dosis de 3 L de EEP/cilindro (200 L). Se utilizó el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, sembrado 8 días antes de la prueba, colocando discos del micelio de 5 mm de diámetro, los discos se colocaron en el centro de la placa Petri con medio contaminado. Las placas se incubaron a 27 °C durante 7 días (hasta que el testigo lleno la placa). Se tomaron datos del crecimiento micelial, para lo cual se dibujó cuatro cuadrantes y todos los días a la misma hora se registró el crecimiento por cuadrante, para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM).

El porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo (PICM) se estimó según la fórmula señalada por Salazar et al. (2012).

$$\% \text{ PICM} = \frac{\text{Diametro en PDA sinEEP} - \text{diametro en PDA con EEP}}{\text{diametro en PDA sinEEP}} \times 100$$

Análisis de datos

Tabla 2.1

Descripción de los tratamientos en estudio.

TRAT.	Descripción
T0	PDA solo (testigo)
T1	PDA+ EEP de Cangallo – Incaacay al 25%
T2	PDA+ EEP de Cangallo – Incaacay al 50%
T3	PDA+ EEP de Cangallo – Incaacay al 75%
T4	PDA+ EEP de San Miguel al 25%
T5	PDA+ EEP de San Miguel al 50%
T6	PDA+ EEP de San Miguel al 75%
T7	PDA+ EEP de Luis Carranza al 25%
T8	PDA+ EEP de Luis Carranza al 50%
T9	PDA+ EEP de Luis Carranza al 75%

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención de extractos etanólicos

Se obtuvo Extractos Etanólicos de Propóleos de los distritos de Cangallo, Luis Carranza y San Miguel. De los extractos puros (96% de alcohol etílico), mediante dilución se elaboró tres concentraciones; 25%, 50% y 75%, con las cuales se prepararon el medio contaminado para las pruebas posteriores.

Caracterización morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides*

Características macroscópicas

Los aislamientos obtenidos mostraron inicialmente micelio gris claro – blanco con crecimiento superficial. Con el tiempo, el micelio central se volvió algodonoso y blanco cremoso, desarrollando masas de color salmón-negro. En el reverso de las placas Petri el hongo presentó una tonalidad salmón – naranja. Además, los aislamientos crecieron

rápidamente formando anillos concéntricos, coincidiendo con lo descrito por Villanueva-Arce et al. (2008, citado por Morales-Chávez et al. 2024).

Figura 3.1

Caracteres morfológicos macroscópicos de C. gloeosporioides en medio PDA

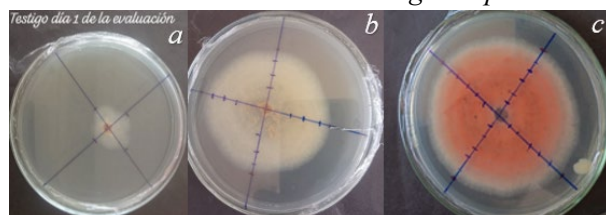


Nota: a y b) anverso de la colonia, c) coloración de conidias

En medio de cultivo de PDA, la tasa de crecimiento micelial fue de 0.7 – 8.9 cm (media= 2.60 cm). El crecimiento es similar a lo reportado por Silva – Rojas y Ávila – Quezada (2011), quienes observaron de 0.8 -8 cm y Granados y Guevara, (2010), con una tasa promedio de 8 mm/día.

Figura 3.2

Ratio de crecimiento diario de C. gloeosporioides



Nota: a) ratio de crecimiento el primer día de evaluación, b) ratio de crecimiento al cuarto día de crecimiento c) ratio de crecimiento al sexto día de crecimiento.

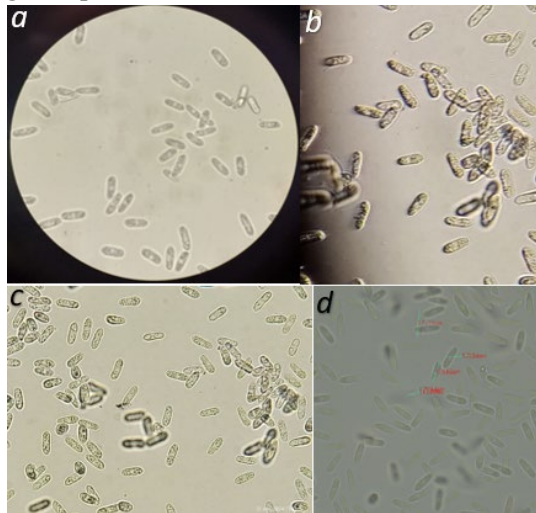
Características microscópicas

Microscópicamente, las conidias fueron hialinas, cilíndricas, no septadas y en ambos extremos redondeadas, lo que contrasta con lo mencionado por Saccardo (1991, como se citó en Morales et al., 2009), quienes describieron

conidias cilíndricas redondeadas en su parte terminal después de haber aislado el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de palto. El tamaño promedio de las conidias fue 8.7 a 17.8 μm de longitud y de 3.7 a 6.9 μm de ancho, similar a los rangos reportados por Villanueva-Arce et al. (2008, como se citó en Morales-Chávez et al., 2024), Rojo-Báez et al. (2017) y Silva – Rojas & Ávila – Quezada (2011) para esta especie.

Figura 3.3

Forma y tamaño de las conidias de *C. gloeosporioides*



Nota: a) Conidias vista en microscopio, c-b) conidias asexuales de *C. gloeosporioides* y d) medición de largo y ancho de conidias.

Tabla 3.1

Resumen de características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides*

Aislado	Colonia		Conidias (n=200)		
	Color	RC ($\text{cm}/\text{día}^{-1}$)	Largo (μm)	Ancho (μm)	Forma
<i>C. gloeosporioides</i>	Blanco cremoso	0.64	8.7 – 17.8	3.7 – 6.9	Cilíndrica

Nota. Esta tabla muestra el resumen de las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de frutos de palto, donde: RC = Ratio de crecimiento (incubación 27 °C por 7 días) en medio de cultivo PDA (papa- dextrosa - agar).

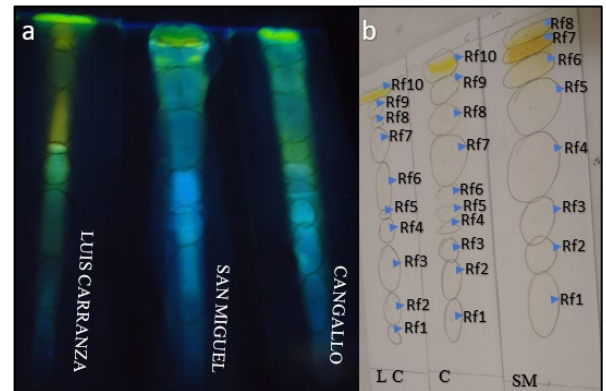
Análisis químico de los EEP

Factor de retención de cromatografía de capa fina

En la figura 3.4 se observa que cada Extracto Etanólico de Propóleo presenta un perfil cromatográfico distinto, lo que sugiere la presencia de distintos flavonoides en cada muestra. Esto indica que cada extracto tiene una composición química única, cuya variabilidad puede influir en sus propiedades biológicas.

Figura 3.4

Tipo de flavonoides y factor de retención



Nota: Cromatografía de capa fina de muestras de propóleo a) Cromatoplasmas de propóleo derivatizadas con difenil borato y reveladas con luz UV A a 336 nm b) Cromatoplasmas de sílica gel sectorizadas con el factor de retención.

En la cromatografía mostró que los extractos etanólicos de propóleo de Luis Carranza y Cangallo poseen una composición más diversa de flavonoides que el de propóleo de San Miguel, usando difenil borato y luz ultravioleta. El análisis reveló que los perfiles de flavonoides varían según su procedencia de las muestras. En total, se identificaron 10 tipos diferentes de flavonoides, algunos comunes y exclusivos de una o dos muestras.

Tabla 3.2

Procedencia y RF de propóleos de Apis mellifera

cromatografía en capa fina (TLC)	PROPORCIÓN: CLOROFORMO - METANOL - AGUA (ml)	Rf	
		Fr	Rf
San Miguel	7.5:4:0.5	Fr1	0.22
		Fr2	0.36
		Fr3	0.45
		Fr4	0.60
		Fr5	0.76
		Fr6	0.87
		Fr7	0.92
		Fr8	0.96
Cangallo	7.5:4:0.5	Fr1	0.17
		Fr2	0.30
		Fr3	0.39
		Fr4	0.46
		Fr5	0.56
		Fr6	0.65
		Fr7	0.80
		Fr8	0.89
		Fr9	0.97
		Fr10	0.98
Luis carranza	7.5:4:0.5	Fr1	0.12
		Fr2	0.22
		Fr3	0.39
		Fr4	0.49
		Fr5	0.55
		Fr6	0.65
		Fr7	0.76
		Fr8	0.88
		Fr9	0.93
		Fr10	0.97

Nota. Este cuadro muestra la proporción de eluyente utilizado para el análisis cromatográfico en capa fina, el factor de retención y la polaridad de los propóleos de las tres zonas analizadas.

Se observó que algunos factores de retención de diferentes localidades coincidían, indicando la

presencia de flavonoides similares en las muestras de propóleo. Sin embargo, el número y tipo de flavonoides varió entre las tres muestras, siendo el más variado en las de Luis Carranza y Cangallo que en San Miguel. Esto refleja la diversidad florística presente en la región de Ayacucho, la cual impacta directamente en el perfil de flavonoides de las muestras analizadas, lo que contrasta lo mencionado por Forero et al., (2020) quienes mencionan que si la vegetación circundante en los apiarios es similar los componentes químicos también son similares o con pequeñas diferencias.

Cromatografía de gases

Los perfiles de CG- MS obtenidos de las muestras de propóleo de las localidades de San Miguel, Cangallo y Luis Carranza facilitan un análisis comparativo exhaustivo entre los diferentes orígenes geográficos de los propóleos, lo que nos permite discernir variaciones significativas en su composición.

Como se puede apreciar en las figuras 4.5 (Cangallo), 4.6 (Luis Carranza) y 4.7 (San Miguel) se detectaron 22, 24 y 20 picos cromatográficos, respectivamente. Las señales identificadas resultaron ser las de mayor intensidad.

Figura 3.5

Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de Cangallo.

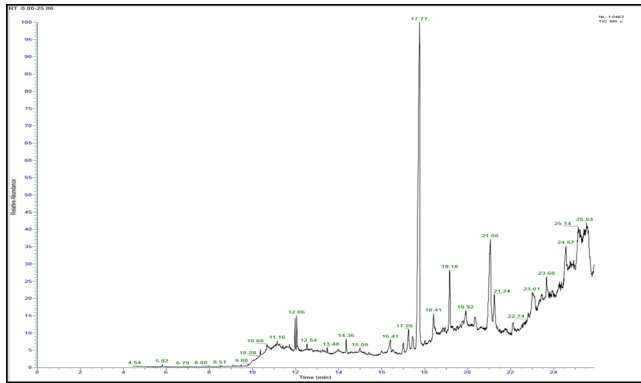


Figura 3.6
Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de Luis Carranza

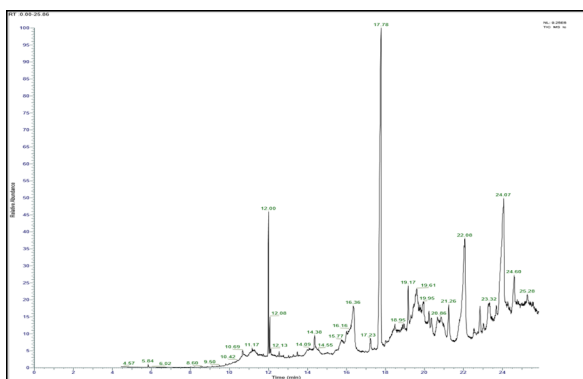
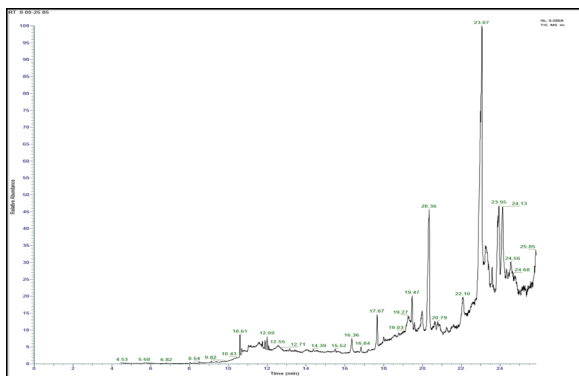


Figura 3.7
Resultado de análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de San Miguel.



Los perfiles de las tres muestras analizadas son diferentes, lo cual nos indica que existe una variación en su composición relacionada con la procedencia. Esto indica que las características climáticas, geográficas y composición floral de cada localidad influyen en la composición.

Cuantificación de fenoles y flavonoides

En relación con la cuantificación de flavonoides totales, (tabla 3.3. y figura 3.8), los valores varían entre 12,39 y 21.73 mg QE/g EEP, siendo el propóleo de San Miguel el que presenta el mayor contenido con 21.73 mg QE/g EEP, seguido del propóleo de Cangallo con 19.18 mg QE/g EEP y Luis Carranza con 12,39 mg QE/g EEP con diferencia estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3.1

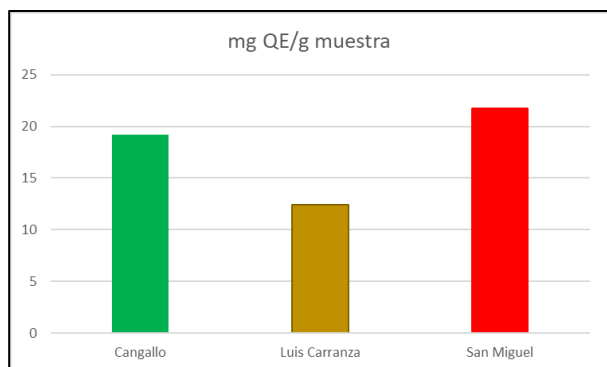
Cuantificación de flavonoides en muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg de quercetina/ g muestra

MUESTRA	PROMEDIO	DESV
C	19.1833333	1.5121039
LC	12.3916667	1.1614467
SM	21.725	2.1028255

El espectro de absorbancia ultravioleta nos permite identificar la presencia de flavonoides en las muestras analizadas, observando picos de absorción 415 nm

Figura 3.8

Cuantificación de flavonoides en muestras de propóleo de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg de quercetina/ g muestra



Nota: EQ/g expresados como quercetina

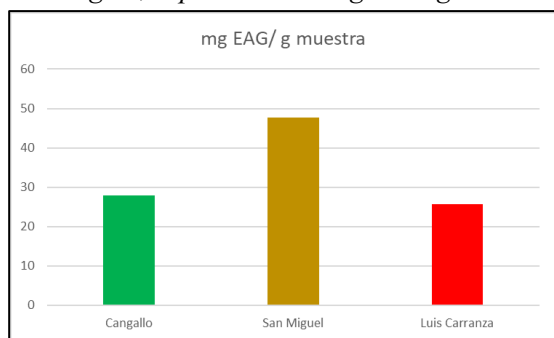
Tabla 3.4

Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico de muestras de propóleos de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg EAG/g muestra

MUESTRAS	mg EAG/ g muestra	DESV ESTANDAR
C	27.882716	0.669836131
SM	47.6203704	1.16018186
LC	25.691358	0.92746785

Figura 3.9

Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico de muestras de propóleos de los tres distritos de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, expresados en mg EAG/g muestra.



Nota: EAG/g expresados como ácido gálico

Se afirma que a partir de las gráficas observadas hay diferencia significativa en contenido de fenoles de las tres localidades de Ayacucho.

La cantidad de fenoles y flavonoides en las muestras de propóleo varía según la localidad

de origen, la flora resinífera y los factores climáticos en el entorno, lo que coincide con Soto-Vásquez (2015), quien señala que estas variaciones están principalmente influenciadas por la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas que proporcionan resinas, microorganismos presentes y condiciones climáticas, que determinan la composición química del propóleo.

Porcentaje de inhibición de EEP de *Apis mellifera* sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Los extractos etanólicos de propóleo tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro* las primeras 24 horas. A concentraciones del 50% y 75%, el hongo mostró un crecimiento ascendente (aéreo), que cubrió completamente el área de siembra, sugiriendo que el propóleo pudo haber formado una barrera física que impidió el contacto directo con el medio contaminado. Este efecto inhibitorio se atribuye a los flavonoides y fenoles presentes en el propóleo, compuestos bioactivos que interfieren en el crecimiento y metabólicos del hongo. Rodríguez (2020) menciona que la actividad antifúngica de los EEP está relacionada con flavonoides y fenoles. Además, otros compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, como apiol, alpha cedrene y terpenos, también contribuyen a este efecto al alterar la membrana celular del hongo,

inhibir enzimas y destruir sus sistemas de defensa.

Los EEP al 25% lograron inhibir el crecimiento del hongo en un 50% en promedio, coincidiendo con Barrera et al., (2012) quienes reportaron una inhibición del 57% a concentraciones de 5000 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ después de 24 horas.

Figura 3.10

Comportamiento del patógeno en medio con PDA y con extracto etanólico de propóleo

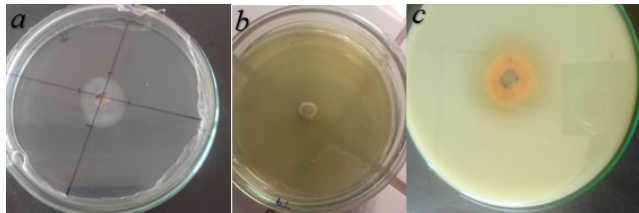


Tabla 3. 5.

Análisis de varianza del Porcentaje de inhibición de Colletotrichum gloeosporioides

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20771.07	9	2307.90	177.83	<0.0001
Trat.	20771.07	9	2307.90	177.83	<0.0001
Error	519.13	40	12.98		
Total	21290.20	49			

Tabla 3. 6.

Prueba de Tukey del porcentaje de inhibición Colletotrichum gloeosporioides

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=7.62779

Error: 12.9783 gl: 40

Trat.	Medias	n	E.E.	
T9	67.11	5	1.61	A
T3	66.05	5	1.61	A
T6	57.37	5	1.61	B
T8	51.03	5	1.61	B C
T2	45.16	5	1.61	C
T5	43.63	5	1.61	C
T1	27.54	5	1.61	D
T4	24.32	5	1.61	D
T7	23.29	5	1.61	D
T0	0.00	5	1.61	E

En la tabla 3.5, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos,

indicando que los EEP inhibieron el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en porcentaje distintos según la concentración y procedencia del extracto.

Las concentraciones de EEP al 25%, 50% y 75% inhibieron el crecimiento del patógeno. La prueba de Tukey con un nivel de confianza al 95% nos indica que los mejores tratamientos fueron el T9 (EEP Luis Carranza al 75%) y T3 (EEP Cangallo al 75%), que inhibieron 67.11% y 66.05%, respectivamente, seguido por los tratamientos T6 (EEP San Miguel al 75%) y T8 (EEP Luis Carranza al 50%), que inhibieron 57.37 % y 51.03% respectivamente, así como los tratamientos T2 (EEP Cangallo al 50%) y T5 (EEP San Miguel al 50%), que inhibieron 45.16% y 43.63% respectivamente, los tratamientos T1 (EEP Cangallo al 25%), T7 (EEP San Miguel al 25%) y T4 (EEP Luis Carranza al 25%), que inhibieron 27.54%, 24.32% y 23.29 %, respectivamente, como se detalla en la tabla 3.6. estos resultados contrastan con lo reportado por Pineda et al., (2010) sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp., donde tuvo un 30% de inhibición con diluciones de 15%, 20% y 30% y Cupull et al. (2013), quienes reportaron valores de hasta 32 mm de inhibición con extractos etanólicos de propóleo obtenidos de tres provincias en Cuba a una dosis de 400 mg/L^{-1} , lo cual respalda el planteamiento de que los EEP tienen un efecto supresor en el crecimiento de *C. gloeosporioides* a nivel *in vitro*.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron extractos etanólico de propóleos de *Apis mellifera* recolectados tres localidades de Ayacucho: Cangallo, Luis Carranza y San Miguel, utilizando concentraciones de etanol al 25%, 50% y 75%. Las distintas concentraciones permitieron evaluar la eficiencia del mejor extracto en el control del patógeno.

2. Las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* fueron reconocidos mediante cultivo e inspección microscópica. El micelio presentó aspecto algodonoso y masas conidiales naranja – salmón con formación de halos concéntricos. Las conidias fueron cilíndricas, hialinas de bordes redondeados con dimensiones promedio de 8.7 a 17.8 μm de longitud y 3.7 a 6.9 μm de ancho.

3. Se identificó variabilidad en la composición y cantidad de flavonoides, así como en los perfiles de compuestos volátiles y semivolátiles presentes en los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera*, recolectados en las tres localidades evaluadas.

4. Los extractos etanólicos de propóleos de *Apis mellifera* mostraron actividad antifúngica in vitro frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, con porcentajes de inhibición variables según la concentración y origen geográfico del propóleo. Los tratamientos más

efectivos fueron T9 (EEP Luis Carranza al 75%) y T3 (EEP Cangallo al 75%), con niveles de inhibición del 67.11% y 66.05%, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benítez, J., Sánchez, A., Bolaños, C., Bernal, L., Ochoa- Martínez, C., Vélez, C., & Sandoval, Á. (2021). *Physicochemical changes of avocado hass during cold storage and accelerated ripening*. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial, 19(2), 18–26.
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1363>

Checalla, J., & Sánchez-Tito, M. (2021). *Caracterización Química y Actividad Antibacteriana in vitro de un Extracto Etanólico de Propóleo Peruano Frente a Streptococcus mutans* Chemical Characterization and in vitro Antibacterial Activity of a Peruvian Propolis Ethanol Extract Against *Streptococcus mutans*. *Int. J. Odontostomat*, 15(1), 145–151.

Forero, L., Henao, A., Sánchez, S., & Meneses, E. (2020). *Búsqueda de compuestos anticancerígenos en propóleos antioqueños por medio de fluidos supercríticos*. Universidad CES.

- Granados, G., & Guevara, Y. (2010). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos de Colletotrichum spp. obtenidos de frutales de clima frío moderado con síntomas de antracnosis.*
- Herrera-González, J. A., Bautista-Baños, S., Salazar-García, S., & Gutiérrez-Martínez, P. (2020). *Current situation of postharvest handling and fungal diseases of avocado "Hass" for export in Michoacán, Mexico.* Revista Mexicana Ciencias Agrícolas, 11(7), 1–14. <https://avocadosfrommexico.com/>
- Mayek - Pérez, N., Rodríguez - López, E. S., & Gonzáles- Prieto, J. M. (2009). *La Infección de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (Persea americana Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos.* Revista Mexicana de Fitopatología, 27.
- Morales, J. L., Azpiróz, H. S., & Pedraza, M. E. (2009). *Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de Colletotrichum gloeosporioides Penz., causante de la antracnosis del aguacate (Persea americana Mill.) en Michoacán, México.* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 9(4).
- Morales-Chávez, F. M., Rodríguez-Núñez, J. R., Morales-Vargas, A. T., Mariscal-
Amaro, L. A., & Núñez-Colín, C. A. (2024). *In vitro inhibitory effect of essential oils against Colletotrichum gloeosporioides.* Acta Agrícola y Pecuaria.
- Quispe, E. R. (2020). *Metabolomic analysis by MALDI TOF TOF mass spectrometry of pitahaya (Hylocereus sp.) Seedlings subjected to different conditions of biotic and abiotic stress.* Universidad Nacional de Tumbes (UNT).
- Rodríguez, B., Canales Martínez, M., Guillermo, J., Carrillo, P., & Cruz Sánchez, A. (2020). *Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis.* Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM). <http://doi.org/10.15174.au.2020.2435>
- Rojó-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017). *Situación actual de Colletotrichums spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control.* Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology, 35(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703>

- Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D. (2011). *Phylogenetic and morphological identification of Colletotrichum boninense: A novel causal agent of anthracnose in avocado*. *Plant Pathology*, 60(5), 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Tapia, A., Ramírez, J. F., Siclán, M. L., Castañeda, Á., Maldonado, F. I., & Lara, A. V. (2020). *Spatial distribution of anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides Penz) in avocado in the State of Mexico, Mexico*. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.004>
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Armando Ulloa, J., Ramírez-Ramírez, J. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., & Bautista-Rosales, P. U. (2017). *Identification and characterization of Colletotrichum spp. causing anthracnose in avocado Nayarit, Mexico*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 19.
- Villa, A. (2019). *Control químico de antracnosis (Colletotrichum spp.) en flor y fruto en lima “persa.” in 2019*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Facultad de Ingeniería Agrohidráulica.
- Zapata, E., Ochoa, S., Ceja, J., Gómez, F. A., & Ríos, A. F. (2020). *Manual Técnico poscosecha aguacate Hass (Persea americana Mill)*.