

00381
24
71



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DETECCIÓN Y MANEJO DE EXTRACTOS
VEGETALES PARA EL CONTROL DE *Aspergillus*
flavus EN MAÍZ**

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

ROBERTO MONTES BELMONT

1997

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

**A María Elena, Genaro, Tania ,
Angel y toda mi familia.**

**A la memoria de Angel, Angelina y
Miguel Angel.**

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo reconocimiento a todas las autoridades del Instituto Politécnico Nacional, quienes en todos sus niveles, desde el Director General hasta el Jefe del Departamento de Entomología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, que me brindaron su apoyo en lo económico, laboral, administrativo y operativo para iniciar y concluir mis estudios. En especial a la Dra. Gloria Dávila Ortiz responsable del centro en donde laboro.

A las autoridades de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado la oportunidad de superarme académicamente y en particular a las del Instituto de Biología, por las facilidades brindadas para desarrollar parte del trabajo de investigación.

A la Dra. Magda Carvajal Moreno, Directora de la tesis, por haberme permitido desarrollar mis ideas de investigación, por ponderarlas y enriquecerlas. Sus críticas constructivas y sus esmeradas revisiones durante todo el proceso de redacción del documento de tesis fueron fundamentales. Mi reconocimiento por su gran calidad humana y profesionalismo.

Al Biól. Rodolfo Figueroa Brito por su apoyo en el desarrollo experimental de la primera parte de la tesis y en los asuntos académicos y administrativos en el CEPROBI durante mi ausencia.

A la Biól. Abigail Aguilar por la identificación y/o confirmación de las especies de plantas usadas en el trabajo y al Dr. Fernando Chiang Cabrera por las sugerencias en la Taxonomía Vegetal.

Al Dr. Ignacio Méndez Ramírez por su apoyo en el procesamiento de datos y su asesoría estadística.

A la Dra. María Cristina Pérez Amador y Barrón por su participación en mi Comité Tutorial y su disponibilidad para colaborar en mi formación académica y en la revisión de la tesis.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez por su participación en mi Comité Tutorial y en la revisión de la tesis.

Al Dr. Teófilo Herrera Suárez, por su disponibilidad incondicional para apoyarme en mis actividades académicas, participar en el Jurado y en la revisión del escrito.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang por haber accedido a participar en mi examen predoctoral, doctoral y por revisarme el manuscrito de la tesis.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por haber accedido a participar como jurado en el examen doctoral y por sus observaciones al documento de tesis.

Al Dr. Gustavo Frías Treviño por haber accedido a participar como jurado en el examen doctoral y por sus observaciones al documento de tesis.

A mis compañeros de estudio: Sergio Ayvar, María Teresa Álvarez, Guadalupe Moctezuma, Isaac Luna y Luis Villareal por las vivencias compartidas.

DETECTION AND MANAGEMENT OF PLANT EXTRACTS FOR *ASPERGILLUS FLAVUS* CONTROL IN MAIZE.

A screening was made with powders, essential oils, aqueous and hexanic extracts of one hundred and six plant species in order to detect effect on both, spore germination and mycelial growth of *Aspergillus flavus* and maize kernel protection against this fungus. The best treatments were tested to optimize the dosage for maize protection, essential oil combinations, residual effect and toxicity to maize plants. Seven essential oils' principal components were tested for maize kernel protection.

Forty three species of plants were antifungal in at least one of the biological events: spore germination, mycelial growth or maize kernel protection. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum* and *Thymus vulgaris* caused a total inhibition of fungal development on maize kernels. Thymol and 2-methoxycinnamaldehyde significantly reduced maize grain contamination; the remaining oil components were affected by environmental conditions. Optimal maize protection dosage fluctuated from three to eighth percent. Combinations of *C. zeylanicum* with the remaining essential oils gave efficient control. Residual effect of *C. zeylanicum* was detected after four weeks of kernel treatment. No phytotoxic effect on germination and maize growth was detected with any of the oils tested.

CONTENIDO

	Páginas
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Contenido	iii
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Apéndices	viii
Resumen	ix
Abstract	x
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia del maíz	1
1.2 Hongos fitopatógenos y su importancia	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Historia de la Micotoxicología	3
2.2 Taxonomía de <i>Aspergillus flavus</i>	3
2.3 Características de las aflatoxinas	4
2.4 Efecto de las aflatoxinas	5
2.5 Ecología y Epidemiología de <i>Aspergillus flavus</i>	8
2.6 Prevención y control de las aflatoxinas en maíz	10
2.7 Estrategias para desintoxicar alimentos	11
2.8 Pesticidas y diversidad vegetal	12
2.9 Plantas con propiedades contra plagas	14
2.10 Plantas con propiedades contra patógenos	14
2.11 Selección de especies de plantas	16
2.12 Producción de principios activos	17
2.13 Procesamiento de las plantas	18
2.14 Bioensayos	18
2.15 Manejo de extractos vegetales	19
2.16 Efecto de productos de plantas sobre <i>Aspergillus</i>	20
III OBJETIVOS	21
IV METODOLOGÍA	22
3.1 Selección de plantas	22
3.1.1 Procesamiento e identificación de las plantas	22
3.2 Aislamiento, identificación y conservación del patógeno <i>Aspergillus flavus</i>	22
3.3 Pruebas biológicas generales	26
3.3.1 Elaboración de extractos vegetales	26

3.3.2	Polvos y aceites esenciales-----	26
3.3.3	Germinación de esporas y desarrollo micelial-----	26
3.3.4	Desarrollo micelial con polvos y extractos hexánicos-----	28
3.3.5	Protección de granos de maíz-----	28
3.4	Técnicas de manejo de plantas antifúngicas-----	30
3.4.1	Dosis óptima de protección-----	30
3.4.2	Efecto de la combinación de extractos-----	30
3.4.3	Efecto residual de los extractos-----	30
3.4.4	Eficiencia de componentes de aceites esenciales en la protección de granos-----	30
3.5	Pruebas de fitotoxicidad-----	31
3.5.1	Efecto de granos tratados a dosis altas en la germinación y desarrollo del maíz-----	31
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	32
4.1	Pruebas biológicas generales-----	32
4.1.1	Germinación de esporas y desarrollo micelial-----	32
4.1.2	Desarrollo micelial con polvos-----	37
4.1.3	Desarrollo micelial con extractos hexánicos-----	42
4.1.4	Protección de granos de maíz-----	46
4.1.4.1	Extractos acuosos y aceites esenciales-----	46
4.1.4.2	Extractos hexánicos-----	55
4.1.5	Selección de especies antifúngicas para el desarrollo de técnicas de manejo-----	62
4.2	Técnicas de manejo-----	62
4.2.1	Dosis óptima de protección-----	62
4.2.2	Efecto de la combinación de extractos-----	65
4.2.3	Efecto residual de los extractos-----	66
4.2.4	Efecto de componentes de aceites esenciales en la protección de granos de maíz-----	67
4.3	Pruebas de fitotoxicidad-----	68
4.3.1	Efecto de granos tratados a dosis altas en la germinación y desarrollo del maíz-----	68
VI	CONCLUSIONES-----	71
VII	BIBLIOGRAFÍA-----	72
VIII	APÉNDICES-----	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Páginas
1	Micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i> -----	4
2	Espectro de acción de algunas especies de plantas antifúngicas y grupos químicos de sus principios activos.-----	16
3	Especies de plantas colectadas y partes de las plantas usadas para la elaboración de los extractos.-----	23
4	Lotes 1-11. Efecto de extractos en la germinación de esporas. Promedio de porcentaje de esporas germinadas en 3 repeticiones.-----	33
5	Lotes 11 y 12. Efecto de extractos acuosos y aceites esenciales en la germinación de esporas. Promedio de % de esporas germinadas en 3 repeticiones.-----	36
6	Lotes 1-6. Prueba de Tukey para área de crecimiento (cm ²) de <i>A. flavus</i> en medio de cultivo con polvos vegetales-----	38
7	Prueba de Tukey para área de crecimiento (cm ²) de <i>A. flavus</i> en medio de cultivo con extractos hexánicos-----	43
8	Lotes 1-10. Efecto de fitoextractos acuosos en la protección de granos de maíz. Prueba de Tukey para porcentaje de granos contaminados-----	48
9	Lotes 11.y 12. Efecto de fitoextractos acuosos y aceites esenciales en la protección de granos de maíz. Prueba de Tukey para porcentaje de contaminación.-----	53

Tabla	Páginas
10 Lotes 1-6. Efecto de fitoextractos hexánicos en la protección de granos de maíz. Prueba de Tukey para porcentaje de granos contaminados. -----	55
11 Especies de plantas con propiedades antifúngicas.-----	63
12 Efecto de diferentes dosis de fitoextractos seleccionados en la protección de granos de maíz. Porcentaje de contaminación y de reducción con relación al testigo.-----	64
13 Determinación de dosis óptima de protección en maíz con aceites esenciales.-----	65
14 Efecto de diferentes combinaciones de aceites esenciales seleccionados en la protección de granos de maíz. Porcentaje de contaminación y de reducción con relación al testigo.-----	66
15 Efecto de metabolitos de aceites esenciales en la protección de granos de maíz contra <i>A. flavus</i> . Prueba de Tukey para porcentaje de granos contaminados.-----	68

LISTA DE FIGURAS

Figura	Páginas
1. Principales familias de plantas con especies antifúngicas.-----	15
2. Pruebas biológicas con extractos y polvos vegetales.-----	27
3. Pruebas de protección de granos de maíz.-----	29
4. Efecto de polvo vegetal de <i>Origanum vulgare</i> en el crecimiento micelial de <i>Aspergillus flavus</i> , después de 5 días de incubación comparado con el testigo.--	41
5. Diferencias de coloración del micelio del hongo en medio con polvos de <i>Chenopodium album</i> , <i>Coriandrum sativum</i> y <i>Eucalyptus globulus</i> .-----	41
6. Efecto de aceites de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>) y timol en la protección de granos de maíz comparados con el testigo.-----	54
7. Efecto de extracto de <i>Raphanus raphanistrum</i> en la protección de los granos de maíz comparado con el testigo.-----	54
8. Efecto residual de los aceites esenciales-----	67
9. Efecto de la aplicación de aceites esenciales en la germinación y emergencia de plantas. Porcentaje de plantas germinadas por día.-----	69
10. Efecto de la aplicación de aceites esenciales sobre el peso fresco y seco del maíz. Peso promedio en gramos por planta.-----	70

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice	Páginas
1 Plantas usadas con antecedentes bibliográficos y géneros de hongos sobre los que actúan.-----	88
2 Área de crecimiento (cm ²) de <i>A. flavus</i> en medio de cultivo con polvos vegetales-----	90
3 Área de crecimiento (cm ²) de <i>A. flavus</i> en medio de cultivo con extractos hexánicos-----	93
4 Efecto de fitoextractos acuosos en la protección de granos de maíz-----	99
5 Efecto de fitoextractos acuosos y aceites esenciales en la protección de granos de maíz.-----	104
6 Efecto de diferentes dosis de fitoextractos acuosos seleccionados en la protección de granos de maíz.-----	105
7 Determinación de dosis óptima de protección en maíz con aceites esenciales.-----	106
8 Efecto de combinaciones de fitoextractos seleccionados en la protección de granos de maíz.-----	108
9 Efecto residual de los aceites esenciales de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> y <i>Mentha piperita</i> en dos concentraciones. Promedio del porcentaje de granos sanos por tratamiento.-----	108

RESUMEN

Se estudió el efecto de polvos, de extractos acuosos y hexánicos y de aceites esenciales de 106 especies vegetales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* y la protección del maíz contra la contaminación por este hongo; asimismo se determinaron algunas técnicas de manejo de los mejores tratamientos para optimizar su acción. Cada especie después de colectada e identificada, fue secada y pulverizada y paralelamente se aisló una cepa del hongo que se multiplicó y conservó para todo el trabajo. Con cada especie vegetal, se hicieron bioensayos para determinar: el efecto de extractos acuosos sobre la germinación y desarrollo del micelio de *A. flavus* (asi como con aceites esenciales de 9 especies) y con los hexánicos y polvos sólo se observó el desarrollo del micelio. Con todos estos tipos de tratamientos (a excepción de los polvos) se trataron granos de maíz para después inocularlos con esporas del hongo y determinar si existía un efecto protector. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey. Con los 13 mejores tratamientos de todo el proceso anterior, se realizó la prueba de dosis óptima de protección que consistió en tratar granos de maíz con dosis desde 0.1 a 10 % y después inocularlos con esporas del hongo para determinar el porcentaje de contaminación/dosis. Posteriormente, se hicieron tratamientos de granos de maíz con las combinaciones de los siete mejores tratamientos en pares y se siguió el mismo procedimiento de inoculación y cuenta de granos contaminados. Más tarde se hizo un tratamiento a granos de maíz por lotes y por producto y en intervalos de 7, 14, 21, 28 y 35 días se hicieron inoculaciones por lote a fin de determinar por producto, el tiempo en que los tratamientos mantenían su efecto protector en forma eficiente. Por otra parte, se probaron siete componentes de aceites esenciales y se trataron granos de maíz con ellos, se inocularon, se incubaron y se les determinó el porcentaje de granos contaminados. Finalmente, se trataron granos de maíz con cada uno de los siete aceites a dosis de 10 % y se sembraron en invernadero para determinar su efecto en la germinación, emergencia de plantas y peso de la parte aérea de las plantas para ver si existían problemas de toxicidad de los productos. Los resultados mostraron que de las 106 especies de plantas probadas 43 mostraron algún tipo de efecto sobre la germinación de esporas, desarrollo micelial y/o protección de granos de maíz. Las más destacadas en cuanto a protección de granos de maíz fueron los aceites esenciales de: *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris*, *Telexys ambrosioides*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* y *Ocimum basilicum* que inhibieron totalmente la contaminación por el hongo. No se obtuvo dosis óptima con los extractos acuosos seleccionados, lo que posiblemente se debió a que *A. flavus* desarrolló resistencia a estos productos. En cuanto a los aceites esenciales la dosis óptima fluctuó entre 3 y 8 %, lo cual se considera alta para fines prácticos. De las combinaciones probadas, las que mejor resultado dieron fueron las de *C. zeylanicum* con los demás aceites, lo cual implica un efecto sinérgico. En cuanto al efecto residual el mayor se obtuvo con *C. zeylanicum* que mantuvo su efecto protector durante cuatro semanas. No se presentó efecto fitotóxico con ninguno de los aceites probados. De los componentes de aceites esenciales sólo el timol y el 2-metoxicinamaldehído redujeron significativamente la contaminación del maíz, lo cual mostró la vulnerabilidad de los demás componentes a la acción de factores ambientales.

ABSTRACT

DETECTION AND MANAGEMENT OF PLANT EXTRACTS FOR *ASPERGILLUS FLAVUS* CONTROL IN MAIZE

A screening was made with powders, essential oils, aqueous and hexanic extracts of one hundred and six plant species in order to detect effect on both, spore germination and mycelial growth of *Aspergillus flavus* and maize kernel protection against this fungus. The best treatments were tested to optimize the dosage for maize protection, essential oil combinations, residual effect and toxicity to maize plants. Seven essential oils' principal components were tested for maize kernel protection.

Forty three species of plants were antifungal in at least one of the biological events: spore germination, mycelial growth or maize kernel protection. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum* and *Thymus vulgaris* caused a total inhibition of fungal development on maize kernels. Thymol and 2-methoxycinnamaldehyde significantly reduced maize grain contamination; the remaining oil components were affected by environmental conditions. Optimal maize protection dosage fluctuated from three to eight percent. Combinations of *C. zeylanicum* with the remaining essential oils gave efficient control. Residual effect of *C. zeylanicum* was detected after four weeks of kernel treatment. No phytotoxic effect on germination and maize growth was detected with any of the oils tested.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del maíz.

Junto con el arroz y el trigo el maíz es uno de los 3 principales cereales en el mundo. Cada año se siembran alrededor de 100 millones de hectáreas en regiones templadas, subtropicales y tropicales desde el nivel del mar hasta 3, 500 metros de altura. La producción media anual mundial es de 250 millones de toneladas métricas y es la base de la alimentación en México, donde se consumen aproximadamente 10 millones de toneladas (C.I.M.M.Y.T. 1994; Reyes, 1990). Estudios arqueológicos han mostrado la presencia de polen de maíz desde hace 8, 000 años, siendo originario de México, América Central y parte de Sudamérica (Ramos, 1994). Además de su consumo humano también es utilizado en alimentación de animales y se industrializa en más de 500 formas (Shurtleff, 1980).

1.2 Hongos fitopatógenos y su importancia.

El maíz está asociado con más de 250 especies de hongos de los cuales más de un centenar de ellas son fitopatógenas (Farr *et al.*, 1989). Todas las partes de la planta, en todas sus etapas fenológicas son susceptibles a hongos fitopatógenos; algunas de las enfermedades que ocasionan han llegado a causar grandes pérdidas en la producción como sería el caso del "tizón sureño" causado por *Bipolaris maydis* raza "T", que en 1970 causó pérdidas calculadas entre 500 millones y un billón de dólares en la región denominada "cinturón del maíz" de Estados Unidos (Horsfall, 1972).

De particular importancia son los denominados hongos productores de micotoxinas, ya que a parte del daño directo al grano en sí, también ocasionan serias enfermedades en animales y en el hombre cuando consumen alimentos contaminados (Shane, 1994; Moreno *et al.*, 1992). Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son los principales productores de toxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, esterigmatocistinas, tricotecenos, zearalenona, citrininas, ácido penicílico, entre las principales). Dentro del género *Aspergillus* se encuentran las únicas especies que sintetizan aflatoxinas, consideradas como unos de los carcinógenos más potentes y que por la magnitud de sus daños han sido minuciosamente estudiadas en las últimas tres décadas, dando origen al desarrollo de la Micotoxicología (Cole & Kendrick, 1981). En maíz la especie más frecuente y de mayor importancia económica es *A. flavus*.

Las pérdidas por aflatoxinas ocurren en todos los niveles de producción, mercado y procesos para la elaboración de alimentos. En el sureste de Estados Unidos se ha considerado a la contaminación por aflatoxinas como el principal factor limitante del maíz y se han calculado pérdidas entre 1977 y 1980 de 438 millones de dólares (Nichols, 1983). En México no se tienen datos precisos sobre la magnitud de este problema, pero en 1989 se detectó contaminación por aflatoxinas en el norte de Tamaulipas en una área de 157,000 has. de riego que producen 440,000 ton. detectándose que el 87 % de esta producción tenía más de 20 microgramos por kilogramo de aflatoxinas, lo cual rebasa los límites permitidos para consumo humano (Juan-López *et al.*, 1995). A partir de 1991 el gobierno mexicano

estableció un programa anual para detección de aflatoxinas en el estado mencionado con costo de alrededor de 2 millones de dólares (Carvajal & Arroyo, 1997).

Para solucionar este problema se ha recurrido a diversas opciones como: la búsqueda de variedades resistentes al hongo, regulación de la humedad del grano para evitar su crecimiento, uso de productos químicos que eviten el crecimiento del hongo o que degraden las aflatoxinas y el uso de microorganismos antagónicos a *A. flavus* o capaces de degradar sus toxinas (Zuber *et al.*, 1987). Estas medidas son complementarias y aplicables bajo determinadas circunstancias, por lo que no se descartan otras opciones que demuestren su viabilidad práctica y económica.

Una de las alternativas para el control de problemas fitosanitarios ha sido el aprovechamiento de la gran diversidad de metabolitos secundarios que las plantas han desarrollado en su proceso evolutivo y que en gran medida están relacionadas con su capacidad de autodefensa.

Partiendo de estos antecedentes y dada la importancia del problema desde el punto de vista agrícola, de sanidad animal y salud humana con este trabajo se pretendió explorar dentro de la gran gama de vegetales la posibilidad de controlar a *Aspergillus flavus* con una técnica de bajo costo y que evitara el uso de productos sintéticos de alto costo y de efectos colaterales en el ambiente.

II. ANTECEDENTES

2.1. Historia de la Micotoxicología.

Las micotoxinas probablemente han estado vinculadas a las fuentes alimenticias desde tiempos remotos. Se tienen registros de que el ergotismo (enfermedad producida por una toxina derivada del hongo del centeno *Claviceps purpurea*) tuvo caracteres epidémicos en la Edad Media en Europa (González, 1995). Según Mislivec (1981) en el presente siglo, el primer antecedente de micotoxicosis ocurrió en Ucrania con un problema en caballos en la década de los treinta atribuido a *Stachybotrys alternans*.

En 1940 se detectó que *Penicillium citreo-viride* estaba asociado con una polineuritis derivada del consumo de arroz contaminado con mohos y que causó estragos entre militares japoneses en 1894-1895 durante la guerra chino-japonesa (Kinosita & Shikata, 1965). En la etapa final de la segunda guerra mundial e inicios de la postguerra (1942-1947), se presentó una seria enfermedad en Rusia tanto en animales como en humanos ocasionada por la ingestión de granos contaminados con mohos y que habían sido dejados durante el invierno en el campo. La enfermedad se denominó aleukia tóxica alimentaria y se concluyó que era causada por especies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Cladosporium* (Mislivec, 1981).

El origen de la Micotoxicología ocurrió con la aparición de la enfermedad "X" de los pavos, la cual causó la muerte de 100,000 animales en Inglaterra en 1960 y que posteriormente se extendió a otros países. Esto ocasionó una minuciosa investigación en la que participaron numerosos investigadores de muy diversas disciplinas quienes concluyeron que el único factor común en la muerte de los pavos fue el consumo de harina de cacahuete procedente de Brasil, de la cual se aisló consistentemente a *Aspergillus flavus*. A partir de entonces, las investigaciones sobre este tipo de problemas se intensificaron y actualmente se sabe que hay más de 50 géneros de hongos con especies productoras de micotoxinas siendo los más importantes en general, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Mislivec, 1981.)

2.2. Taxonomía de *Aspergillus flavus*

El género *Aspergillus* se considera que tiene 170 especies válidas divididas en 18 grupos, de las cuales 16 producen toxinas (Tabla 1). Desde el punto de vista taxonómico *Aspergillus flavus* pertenece al grupo de especies de *Aspergillus* que lleva su nombre y que incluye a *A. oryzae* (Ahlburg) Cahn y *A. sojae* Sakaguichi & Yamada que no producen aflatoxinas (Wicklow, 1983). Son tres las especies que producen este tipo de micotoxinas: *A. flavus* Link ex. Fries, *A. nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine y *A. parasiticus* Speare (Wilson & Payne, 1994).

A. flavus es la especie más frecuentemente encontrada en maíz, ya que por lo común, sólo un 10 % de las muestras colectadas tienen *A. parasiticus* (Davis & Diener, 1983) y esta última especie aparece con más frecuencia en cacahuete; en cuanto a *A. nomius* hasta el

momento se desconoce su importancia en la contaminación de cultivos ya que sólo se ha aislado de insectos y alimentos procesados (Wilson & Payne, 1994). La diferencia esencial **Tabla 1. Micotoxinas producidas por *Aspergillus* (modificado de Betina, 1989)**

Especie	Micotoxinas
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, aflatrem y ac. aspergílico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas
<i>A. clavatus</i>	Ascladiol y patulina
<i>A. microcysticus</i>	Aspocalasinas
<i>A. ustus</i>	Austocistinas
<i>A. terreus</i>	Citreoviridina y ácido terreico
<i>A. wentii</i>	Emodina
<i>A. glaucus</i>	Eritroglaucina, fisciona, questina y cateratina
<i>A. fumigatus</i>	Fumagilina, fumitremorginas, gliotoxin G, ác. helvónico y ac. kójico.
<i>A. niger</i>	Malforminas
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, viomeleina y xantomegnina
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina y versicolarinas
<i>A. nidulans</i>	Esterigmatocistina
<i>A. oryzae</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>A. repens</i>	Fisciona, eritroglaucina, flavoglaucina, asperentina y equinulina

en cuanto a morfología entre *A. flavus* y *A. parasiticus* es que en esta última especie los esterigmas están en una sola serie y sus conidióforos son generalmente menores de 500 μ , en cambio *A. flavus* presenta sus esterigmas en una o dos series y sus conidióforos son de tamaño variable (de 400 a 1,000 μ); la principal diferencia entre estas dos especies radica en sus toxinas producidas. *A. parasiticus* genera toxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y algunas cepas M₁, mientras que *A. flavus* produce sólo B₁ y B₂ con algunas cepas con M₁ (Christensen, 1981; Klich & Pitt, 1988). También se menciona como diferencia entre estas especies la presencia de enzimas proteolíticas en *A. flavus* y de enzimas lipolíticas en *A. parasiticus* (Carvajal & Arroyo, 1995). Todas estas diferencias entre las dos especies han sido cuestionadas por Hesseltine *et al.* (1970), quienes encontraron aislamientos intermedios en características taxonómicas entre las dos especies; inclusive existe otra propuesta de Kurtzman, *et al.* (1986), quienes con base en las semejanzas en la estructura de su ADN entre las tres especies productoras de aflatoxinas consideran sólo dos especies: *A. flavus* con dos variedades: *A. flavus* var. *flavus* y *A. flavus* var. *parasiticus* y la otra especie *A. nomius*.

2.3. Características de las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios que se generan por la vía biosintética de los poliquétidos a partir de acetatos y se consideran los contaminantes biológicos de los alimentos más extendidos a nivel mundial y los más peligrosos que se conocen debido a sus propiedades cancerígenas, mutágenas y teratógenas (Jelinek *et al.*, 1989).

Desde el punto de vista químico se consideran compuestos heterocíclicos del tipo de las bis dihidrofurano-cumarinas, altamente oxigenadas (Krishna & Sinha, 1991). Su fórmula mínima es $C_{17}H_{12}O_6$, su peso molecular es de 312 y su rotación óptica es $+558$ (Carvajal & Arroyo, 1995). Para separar los diferentes tipos de aflatoxinas se usa la luz ultravioleta y su velocidad de corrimiento cromatográfico de capa fina, siendo las principales las siguientes: B_1 que da fluorescencia azul y es la de mayor velocidad de corrimiento en la cromatografía; B_2 con el mismo tipo de fluorescencia pero menor velocidad de corrimiento; G_1 con fluorescencia verde; G_2 con el mismo tipo de fluorescencia y menor velocidad de corrimiento que la anterior; M_1 con fluorescencia púrpura, con mayor velocidad y caracterizado por ser metabolizado por el consumidor, pasando a la leche; M_2 de las mismas características del anterior pero con menor velocidad en la cromatografía de capa fina.

No se conoce su papel fisiológico en el desarrollo del hongo sin embargo, se ha establecido que existe una estrecha asociación entre la biosíntesis de aflatoxinas y la de los lípidos (Townsend *et al.*, 1984; Cleveland & Bhatnagar, 1991) y que además en algunos casos, la síntesis de proteínas disminuye durante la fase de producción de aflatoxinas (Maggon *et al.*, 1977). Al crecer inicialmente el hongo existe muy poca o ninguna producción de aflatoxinas, pero al reducirse los niveles de fosfatos y nitrógeno en el medio, el metabolismo primario se desorganiza, se acumulan varios metabolitos primarios y se empiezan a producir las aflatoxinas (Drew & Demian, 1987). Aún cuando su papel ecológico no está bien comprendido, al ser sus estructuras de resistencia (esclerocios) repelentes a ser ingeridos por insectos, se infiere que tienen un papel defensivo (Dowd, 1991; Wicklow, 1988). Existen cepas en ambas especies en las que no hay producción de esas toxinas, por lo que se asume que estos metabolitos no son esenciales para su desarrollo.

Originalmente se consideraba *A. flavus* como un problema de almacén, pero posteriormente se demostró que era capaz de infectar antes de la cosecha (Payne, 1983). Las toxinas que produce fueron descubiertas en 1960 sin que antes de eso se tuvieran evidencias de su existencia, por lo que Lillehoj (1982) postuló la teoría de que este problema surge como consecuencia del desarrollo de agroecosistemas con prácticas intensivas y homogeneidad genética, lo cual creó agronichos en los que surgieron cepas productoras de aflatoxinas y con capacidad parasítica sobre algodón, cacahuete y maíz, las que desplazaron a las cepas atoxicógenas y saprófitas.

2.4. Efecto de las aflatoxinas.

En cuanto a su importancia se sabe que prácticamente todos los seres vivos son susceptibles a las aflatoxicosis. *A. flavus* está adaptado a utilizar un amplio espectro de fuentes orgánicas, además de ser saprófito, es un organismo patógeno oportunista en plantas, insectos y vertebrados incluyendo al hombre y animales domésticos (Bhatnagar *et al.*, 1994)); sus efectos pueden ser agudos o crónicos dependiendo del organismo afectado, la dosis y frecuencia de exposición. La sensibilidad varía con las especies, edad y sexo en los animales, así como la composición de la dieta y la ruta de ingestión (Krishna & Sinha, 1991); algunas bacterias se inhiben en su presencia, existen otras plantas que desarrollan

albinismo, las semillas pierden capacidad de germinación y el grado de toxicidad (que puede ser cancerígena, teratógena o mutágena) varía de acuerdo con las especies de animales (Peña & Durán, 1990).

Las aflatoxinas (AF) son consideradas como genotoxinas que se unen al ADN de su hospedero y que pueden activar elementos genéticos móviles: provirus y retrovirus del genoma, generando una desestabilización del mismo que conduce a diversas anomalías (Lillehoj, 1991). De todas las aflatoxinas la B₁ se considera la más tóxica y en orden decreciente le siguen: G₁, B₂, G₂, M₁ y Q₁ (Betina, 1989).

Desde el punto de vista bioquímico se consideran inhibidores biosintéticos y en el caso de la B₁ se ha encontrado que su actividad biológica tiene varias fases: 1) interacción con el ADN e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis de ADN y ARN; 2) Supresión de la síntesis del ADN; 3) reducción de la síntesis del ARN e inhibición del ARN mensajero; 4) alteraciones en la morfología del nucleolo y 5) reducción de la síntesis de proteínas (Clifford & Rees, 1966).

En contraste con la mayoría de las micotoxinas, la AFB₁ requiere una biotransformación para ejercer su acción. La parte activa de la molécula de la AFB₁ se atribuye al dihidrofurano ya que la pérdida de la doble ligadura en C-2-C-3 del furano terminal resulta en una fuerte disminución de la actividad tóxica. La unión de la aflatoxina al ADN (aducto) se da en varios pasos: 1.-Intercalamiento de la toxina en la estructura helicoidal del ADN; 2.-Oxidación de los carbonos no saturados (C-8 y C-9) de la parte terminal furano de la molécula de AFB₁ por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unidas al citocromo P-450) para formar un intermediario y 3.-El ataque del C-8 de la AFB₁ sobre el N7 de la guanina y la formación de una ligadura covalente en la interacción AFB₁-N7-Guanina. El daño en la molécula de ADN por esta interacción se manifiesta de varias maneras; el aducto es cortado de la molécula de ADN y se inducen errores en el mensaje o bien, el aducto no es cortado de la molécula de ADN pero es convertido en AFB₁-formamidopirimidina que también causa errores en la transcripción. Como consecuencia del daño en el ADN se origina la mutagénesis y carcinogénesis y si se trata de un feto se presenta la teratogénesis (Eaton *et al.*, 1994).

Además de la inhibición de la replicación del ADN, de la síntesis de ARN y proteínas la AFB₁ origina un efecto en las membranas del retículo endoplásmico y en la fosforilación oxidativa interfiriendo con la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente en los citocromos b y c. El metabolismo de los carbohidratos también es afectado, inhibe la síntesis de glicógeno a través de su acción sobre las enzimas glicógeno sintetasa y transglicosilasa. Otro problema que originan las aflatoxinas es incrementar el nivel citosólico del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, por lo que se produce una acumulación de grasa en el hígado (Betina, 1989).

Las primeras lesiones observables de aflatoxicosis son la necrosis hepática y cambios degenerativos en grasas. La inducción de cáncer hepático es común en ratas, truchas y

cerdos. En aves se producen diversas reacciones desde una mala absorción de nutrimentos, coagulopatía, desarrollo ineficiente, vulnerabilidad a las infecciones, incapacidad para reaccionar a las vacunas, problemas reproductivos, etc. En mamíferos producen necrosis hepática, disfunción hepática y extensas lesiones hemorrágicas que resultan letales (Peña & Durán, 1990). En el hombre las intoxicaciones se asocian con cáncer digestivo, hepatomegalias, hígado graso, cirrosis y además producen diarreas, vómitos, abortos, causan inmunodepresión y hemorragias internas (Organización Panamericana de la Salud, 1983).

Comparado con los estudios hechos en animales el efecto de las micotoxinas en plantas es menos conocido sin embargo, se sabe que las aflatoxinas producen una gran variedad de desórdenes fisiológicos y bioquímicos en plantas superiores, helechos, algas y microorganismos. En plantas superiores con dosis altas, inhiben la germinación, pueden reducir la síntesis de clorofila, ADN, ARN y proteínas así como reducir el desarrollo de la radícula en dosis bajas. Como consecuencia de todo esto las plantas en general reducen su valor nutritivo para consumo habiendo deficiencias en azúcares, proteínas y valor calórico. En general, se considera que la aflatoxina actúa como un antimetabolito que se une al ADN e interfiere con la biosíntesis de ARN y proteínas. En los helechos se ha detectado una reducción en la germinación, así como una reducción en la producción de células. En el alga *Chlorella pyrenoidosa* se ha visto una disminución en el desarrollo de las colonias. Varias de las micotoxinas como las aflatoxinas, ocratoxinas y patulinas tienen propiedades antibióticas teniendo efecto inhibitorio contra virus, bacterias, hongos y protozoarios. Inclusive se ha observado que la AFB₁ actúa contra el propio *A. flavus* (Betina, 1989).

Destoxificación. Los efectos de las micotoxinas dependen fundamentalmente de las actividades de sistemas enzimáticos conocidos como "enzimas metabolizadoras de drogas" que son responsables de su destoxificación; sin embargo, algunos pasos de este proceso resultan en la producción de compuestos poco menos tóxicos que su precursor, por lo tanto para quedar exento de su acción biológica un organismo necesita que haya un balance entre las diversas vías que metabolizan la toxina, las que forman los metabolitos activos y las que los transforman en derivados inactivos. En el caso de la AFB₁ por procesos de hidroxilación y o-demetilación se producen las aflatoxinas AFQ₁, AFM₁ y AFP₁ que son menos mutágenas y cancerígenas que la primera. Los epóxidos intermediarios de los aductos son conjugados con el glutatión al igual que las aflatoxinas M₁ y Q₁ que forman conjugados glucurónidos, mientras que una reducción del grupo 1-keto de la AFB₁ forma otro producto destoxificante: el aflatoxicol. No todos los metabolitos resultantes de esta biotransformación han sido identificados en todas las especies estudiadas. (Eaton *et al.*, 1994).

La excreción de la AFB₁ y sus metabolitos ocurre principalmente a través de la vía biliar y la urinaria. En los animales lactantes una fracción considerable de la AFB₁ ingerida, es excretada en la leche en forma de AFM₁ y otros metabolitos. La eliminación en general es relativamente lenta, en ratones, ratas y monos a las 100 hs. de haber ingerido aflatoxinas se había eliminado entre el 72 y 80 % de lo consumido. Los metabolitos excretados por la orina están en relación con la susceptibilidad al cáncer; el menos susceptible a esta anomalía el ratón, produce gran cantidad de metabolitos solubles en agua y el mono y la

rata que son más susceptibles producen menos de estos metabolitos (Hsieh, & Wong, 1994).

2.5. Ecología y Epidemiología de *A. flavus*.

En el caso de *A. flavus* es difícil definir una fuente de inóculo primario, ya que es un hongo que se encuentra en el aire, suelo e insectos vectores (Anderson *et al.*, 1975; Bhotast *et al.*, 1978; Diener *et al.*, 1987; Widstrom, 1979; Lillehoj *et al.*, 1980; Holtmeyer & Wallin, 1981). Los propágulos de esta especie pueden ser conidios, micelio, esclerocios o las combinaciones de ellos. Cada fuente de inóculo puede ser individualmente importante dependiendo de las circunstancias y una o más de ellas pueden constituir el inóculo inicial (Wilson & Payne, 1994). Abdalla (1988) monitoreó en Sudan a *A. flavus* en el aire por 12 meses y encontró que en el verano seco, cálido y con mucho viento el 68 % de las esporas atrapadas correspondían al género *Aspergillus* y de ellas el 31 % eran de *A. flavus*; durante la estación lluviosa y el invierno esta especie fue poco frecuente. Jones *et al.* (1980) demostraron una correlación positiva de los conidios en el aire con la irrigación de parcelas de maíz en Carolina del Norte. También encontraron que cuando los híbridos de maíz eran polinizados durante las semanas con mayor población de esporas en el aire, tenían un alto porcentaje de mazorcas con daño visible de *A. flavus* al momento de la cosecha. Ilag (1975) encontró que la infección en maíz estaba directamente relacionada con la cantidad de esporas en el aire y que ésta era mínima en campos de maíz, alta en áreas secas y muy alta en los almacenes. En general, se considera que en regiones donde las aflatoxicosis son un problema recurrente, la más importante fuente de inóculo es el aire y en zonas de clima templado sólo ocurre en años muy secos (Wilson & Payne, 1994).

El suelo también es una fuente de inóculo importante antes de la cosecha. El hongo sobrevive en el suelo en forma de conidios, micelio asociado a materia orgánica o esclerocios (Diener & Davis, 1987). La población de *A. flavus* en el suelo no parece estar relacionada con ningún factor particular. De acuerdo con Wicklow (1983) los esclerocios son la fuente de inóculo primaria y los conidios y micelio la secundaria, sin embargo, muchas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* no producen esclerocios (Wilson & Payne, 1994). Angle *et al.* (1989) determinaron que la población de propágulos en el suelo permanecía sin cambio después de un año cuando usaban cepas no productoras de esclerocios y que la población de esclerocios es más alta en suelos de temporal que en suelos con riego. Wilson *et al.* (1989) estimaron que en suelos irrigados el porcentaje de propágulos recuperados disminuye con relación a suelos secos.

Hay evidencias que señalan a los insectos como vectores eficientes de *A. flavus*, inclusive aquellos que no son plaga y que sólo visitan las plantas. Mc Millan (1983) menciona entre los insectos que son capaces de transportar propágulos de *A. flavus* interna o externamente a: abejas no identificadas, *Heliothis zea*, *Sitophilus oryzae*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Zea diatraea grandiosella* y especies de escarabajos de la familia Nitidulidae (Lussenhop & Wicklow, 1990). Este autor concluye que la diseminación de *A. flavus* se incrementa significativamente por insectos y que esta asociación está influenciada por la localidad geográfica, la estación del año y la especie de insecto; sin embargo, Lillehoj *et al.* (1978) determinaron que la infestación de insectos por *A. flavus* está ampliamente

diseminada, mientras que la contaminación por aflatoxinas tiende a estar localizada, lo que implica que la presencia de los insectos tiene que combinarse con otros factores para convertirse en problema.

El período crítico para la infección por *A. flavus* en el campo es entre la segunda y cuarta semana después de que se han formado las inflorescencias cuando el hongo ha sido llevado por el aire o los insectos sin embargo, la infección puede ocurrir en cualquier etapa (Widstrom, 1991; Payne, 1987). La penetración de las hifas ocurre directamente o a través de hendiduras o heridas. Los granos en formación son invadidos superficialmente y posteriormente el hongo penetra al tejido parenquimatoso (Hill *et al.*, 1985; Smart *et al.*, 1990). Una vez que las inflorescencias externas son invadidas el hongo llega a la base de la mazorca en 4 a 8 días (Marsh & Payne, 1984). Se ha estimado que entre 20 y 86 % de los aislamientos de *A. flavus* producen aflatoxinas y que la producción de estas no tiene que ver con el grado de patogenicidad de los aislamientos (Widstrom, 1991). Payne *et al.* (1988) determinaron que las variaciones térmicas día/noche influyen en la contaminación de los granos; en periodos con temperaturas de 34 °C en el día y 30 °C en la noche, hubo 28 % de infección y con periodos de 34/22 °C la infección bajó al 7 % (Widstrom *et al.*, 1990).

La incidencia y severidad de la contaminación con *A. flavus* depende fundamentalmente del inóculo y las condiciones ambientales. Los más serios brotes de contaminación en maíz han ocurrido en años muy secos en Estados Unidos y el problema es continuo en el sureste de este país, donde las temperaturas promedio son altas y la sequía es más prolongada que en otras regiones (Payne, 1992; Dickens, 1987). El estrés se considera el principal factor que incrementa la susceptibilidad del maíz a *A. flavus* y se puede inducir por la falta de agua, escasa fertilidad del suelo y competencia con malezas (Lillehoj, 1983).

Se considera que los hongos de almacén productores de aflatoxinas, son capaces de contaminar casi cualquier producto, si las condiciones de humedad relativa son de más de 85 % durante un período de tiempo y esto en maíz se traduce en humedades de grano mayores de 16 %. La producción de aflatoxinas es afectada por la temperatura y sólo se producen entre 7.5 y 40 °C, aún cuando el hongo puede crecer hasta los 46 °C. El rango óptimo para la producción de aflatoxinas es entre 25 y 35 °C (Sorenson *et al.*, 1967). Humedades relativas de más de 92 % son óptimas para su producción. El pH óptimo para el desarrollo de *A. flavus* es de 5.0, pero puede crecer desde pH de 3.0 a 7.0 (Holmquist *et al.*, 1983; Cotty, 1988).

La producción de aflatoxinas puede estar influenciada por otros factores como el O₂, ya que se ha demostrado que en almacenes con menos de 0.5 % de O₂ no hay producción de aflatoxinas (Wilson & Jay, 1975); los niveles de CO₂ mayores del 20 % inhiben su crecimiento. Para iniciar la síntesis de la toxina requiere zinc, una elevada concentración de carbohidratos (Lacey, 1989) y la presencia de ciertos aminoácidos como la prolina (Payne & Hagler, 1983). Compuestos como las metilxantinas del cacao impiden la síntesis (Buchanan & Fletcher, 1978).

En general, las especies productoras de aflatoxinas se consideran competidores pobres en contacto con otros organismos, así se han encontrado que se inhiben en presencia de:

Penicillium ovalicum (Ehrlich *et al.*, 1985), *Fusarium moniliforme* (Wicklów *et al.*, 1988) y de *Aspergillus niger* (Horn & Wicklów, 1983).

2.6. Prevención y control de las aflatoxinas en maíz.

Una extensa cantidad de observaciones indican que la maquinaria biosintética generadora de las aflatoxinas es muy sensible a diversas condiciones ambientales, genéticas o bioquímicas, lo que permite el desarrollo de estrategias para manejar a *A. flavus* tanto en condiciones de campo como en almacén (Bhatnagar *et al.*, 1994). A continuación se exponen las medidas más sobresalientes.

En el campo existen zonas ecológicas definidas en las que *A. flavus* es un problema endémico y son las áreas temporales con clima cálido-seco en donde el manejo adecuado del cultivo es esencial; esto incluye las siembras en fechas adecuadas para evitar altos índices de contaminación en la etapa más susceptible del cultivo, además de proveer a las plantas de los riegos necesarios, la fertilización apropiada y el combate de las malezas que favorecen la dispersión del hongo (Payne, 1983; Fortnum & Manwiller, 1985; Jones, 1987; Fortnum, 1987).

Las evaluaciones de los bancos de germoplasma de maíz en todo el mundo han permitido la identificación de variedades de maíz con baja susceptibilidad a la infección o a la contaminación con aflatoxinas (Brown *et al.*, 1995; Campbell & White, 1995; Gorman & Kang, 1991; Lisker & Lillehoj, 1991; Darrah *et al.*, 1987; Widstrom, 1987; Scott & Zummo 1988; McMillan, 1987). Con estas variedades se pueden hacer cruza con material comercial ya sea usando las técnicas convencionales de mejoramiento genético o bien mediante Ingeniería Genética (Cleveland & Bhatnagar, 1992). Para este último aspecto es necesaria la identificación de los genes específicos, su clonación y su inserción en los cromosomas de las plantas. A pesar de la gran cantidad de investigaciones que se han hecho en cuanto a resistencia a *A. flavus*, hasta el momento no se tiene ningún material genético liberado que pueda ofrecerse a los productores como resistente a este hongo.

Otra posibilidad sería aprovechar la baja capacidad competitiva de *A. flavus* en el campo con la microflora asociada al maíz como *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus* spp., los cuales suprimen su desarrollo *in vitro* y podrían utilizarse para el control biológico (Kimura & Hirano, 1988; Karunaratne *et al.*, 1990). El uso de cepas no toxicógenas es otra posibilidad de control biológico, ya que esas cepas se ha demostrado que pueden reducir la contaminación de la cosecha en algodón, cacahuete y maíz (Cotty *et al.*, 1990; Cotty & Bhatnagar, 1994; Brown *et al.*, 1991; Cole & Cotty, 1990); sin embargo hasta el momento no se tiene información de intentos exitosos de este método de control a nivel comercial. El principal medio de prevenir la contaminación por aflatoxinas en almacén es cosechar con el menor contenido de humedad del grano y/o su secado posterior a niveles inferiores del 15% de humedad, así como su mantenimiento a temperaturas inferiores a 7 ° C (Sauer & Tuite, 1987). El control de la atmósfera de almacenamiento mediante la adición de gases (CO₂ o N₂) humedeciendo los granos en silos cerrados ha dado buen resultado cuando se mantiene a 40 % de CO₂, 99 % de humedad y temperatura menor de 15 ° C (Lacey, 1989).

Se ha visto que la irradiación ultravioleta no da buenos resultados en el caso específico de los hongos productores de aflatoxinas (Northolt & Bullerman, 1982).

En los últimos años se han probado infinidad de productos químicos para el control de *A. flavus* en maíz almacenado y sólo con el diacetato y el propionato de sodio se han obtenido resultados efectivos, sin embargo, se ha comprobado que los animales alimentados con estos productos presentan problemas nutricionales (Draughon, 1983). Existe un producto comercial aprobado por la Food & Drug Administration, de Estados Unidos denominado Fungex (cuyos principios activos son el ácido butírico y el ácido propiónico) que se recomienda contra hongos de granos en general, sin embargo no está clara su eficiencia contra *A. flavus*.

2.7. Estrategias para desintoxicar alimentos

Las aflatoxinas son resistentes a la inactivación térmica y no se destruyen ni por ebullición ni por ningún procedimiento de incremento de temperatura. En la elaboración de pan sólo hay una parcial destrucción de las aflatoxinas durante todas las etapas del proceso (Jemmalí & Lafont, 1972; Riess, 1978). Durante los procesos de pasteurización, esterilización y preparación de la leche evaporada se obtienen reducciones de entre 32 y 87 % de la aflatoxina M₁ y también en la elaboración de queso cottage con leche contaminada, las aflatoxinas se separan del queso y quedan únicamente en el suero (Purchase *et al.*, 1972).

Durante el proceso de nixtamalización del maíz para producir tortillas se ha visto una aparente reducción de los niveles de aflatoxinas (Ulloa-Sosa & Schroeder, 1969) sin embargo, una parte de ellas son reconstituidas durante la acidificación de los productos (Price & Jorgensen, 1985). Se sugiere que el hidróxido de calcio en agua, que se emplea en este proceso reacciona con la aflatoxina perdiendo su fluorescencia original y cambiando la capacidad de extracción de las aflatoxinas con solventes como el cloroformo, lo cual enmascara la presencia de ellas por lo que no son detectadas por los métodos usuales (Bailey *et al.*, 1990, 1991). Además otra importante reconstitución de las aflatoxinas puede ocurrir bajo las condiciones de acidez del estómago del consumidor (Price & Jorgensen, 1985).

Varios solventes son capaces de extraer las aflatoxinas de diferentes productos con un mínimo de efecto en el contenido de proteínas o en su cualidad nutritiva (Anderson, 1983). Entre estos se encuentran: etanol 95 %, acetona acuosa 90 %, isopropanol 80 % y las combinaciones hexano-etanol, hexano-metanol, hexano-acetona-agua y hexano-etanol-agua (Rayner *et al.*, 1977; Goldblatt & Doller, 1979); sin embargo, la tecnología de extracción es muy costosa e impráctica (Shantha, 1987).

También se utilizan métodos para separar maíces contaminados mediante densidad de separación, lavado en seco, lavado húmedo y fragmentación preferencial, lográndose reducciones efectivas del contenido de aflatoxinas (Brekke *et al.*, 1975). En función a que las aflatoxinas están más concentradas en la sémola, la molienda en seco da buenos resultados (Brekke *et al.*, 1975) y en el molido húmedo las aflatoxinas se concentran en el macerado y fibras, siendo mucho menor su contenido en el gluten y en el germen (Yahl *et al.*, 1971).

Un método novedoso para reducir la concentración de aflatoxinas en maíz es el de flotación y segregación por densidad de los granos tóxicos (Huff, 1980; Huff & Hagler, 1985). También se ha visto que materiales adsorbentes como el carbón activado, la arcilla y los minerales zeolíticos son eficientes para separar las aflatoxinas de la cerveza y de la leche (Decker, 1980; Masimanco *et al.*, 1973).

Existen diversos microorganismos como levaduras, mohos y bacterias que son capaces de degradar las aflatoxinas sin generar otros compuestos tóxicos como sucede con *Flavobacterium aurantiacum* (Ciegler *et al.*, 1966) y otras bacterias (Roy & Chourasia, 1990). La fermentación de los granos contaminados permite la degradación de las aflatoxinas, pero no así con el ensilado (Dam *et al.*, 1977).

Se han probado una diversidad de compuestos químicos para la degradación o inactivación de las aflatoxinas obteniéndose resultados promisorios con: ácidos, bases, aldehídos, bisulfitos, agentes oxidantes y varios gases (Mann *et al.*, 1970; Goldbatt & Dollear, 1979). Estos compuestos sin embargo, resultan inseguros por formar residuos tóxicos o alterar el contenido nutricional, sabor, olor, color, textura o propiedades funcionales de los productos. Solamente el tratamiento de los granos con amonio parece viable. La amonificación implica el tratamiento de alimento molido utilizando hidróxido de amonio o amoniaco bajo condiciones de alta presión y temperatura o a la presión atmosférica y temperatura ambiental en granos recién cosechados. Esto implica la hidrólisis del anillo de lactona y la conversión del compuesto original en numerosos productos con un decreciente grado de toxicidad (Phillips *et al.*, 1994). Este proceso se ha usado para desintoxicar granos de maíz, pasta de cacahuete, semillas de algodón y sus subproductos en Estados Unidos, Francia y Africa, sin embargo, aún no ha sido aprobado por la Food & Drug Administration de Estados Unidos.

También se han tenido resultados promisorios con bisulfito de sodio con varios regímenes de temperatura, concentraciones y tiempos, lográndose la formación de compuestos solubles en agua. Ese método se ha aplicado con éxito en higos deshidratados (Altug *et al.*, 1990).

2.8. Pesticidas y diversidad vegetal

Desde la aparición del libro "Primavera Silenciosa" (Carlson, 1961) se viene cuestionando el uso indiscriminado de pesticidas, pero es hasta hace relativamente poco tiempo que la presión social se ha fortalecido. En el caso específico de los fungicidas, el Consejo Nacional de Investigación en Agricultura de la Academia de Ciencias de Estados Unidos, determinó que estos productos constituyen el 60 % de los pesticidas usados en la producción de alimentos con riesgos cancerígenos por lo que su uso debe ser restringido (Wilson & Wisniewski, 1992), además hasta el momento se conocen 150 especies de patógenos, principalmente hongos, que han desarrollado resistencia a los productos existentes en el mercado (Wierenga *et al.*, 1994).

Una alternativa que merece mayor atención es la posibilidad de utilizar los metabolitos secundarios desarrollados por las plantas para el control de fitopatógenos, ya que hasta ahora el interés se ha centrado principalmente en las fitoalexinas, antibióticos formados en las plantas por vías metabólicas como respuesta a inductores de naturaleza biótica, química o ambiental y muy poco se sabe del papel de las sustancias metabólicas estructurales que se sintetizan durante el desarrollo de la planta siendo capaces de actuar contra cualquier invasor, antes de su acción patogénica y que podrían servir de base para la generación de pesticidas de origen natural.

Existen antecedentes paleobotánicos de la presencia de hongos parásitos de plantas desde hace alrededor de 400 millones de años (Swain, 1978), lo que indica que estos microorganismos probablemente han sido un factor importante en la presión de selección de especies habiendo surgido infinidad de variables anatómicas y fisiológicas (polimorfismo genético) intraespecíficas e interespecíficas, relacionadas con su defensa al ataque de patógenos. Cuando los propágulos de un patógeno (esporas, células bacterianas, partículas virales, fragmentos de micelio etc.) establecen contacto con una planta hospedera se enfrentan a una serie de barreras defensivas que pueden impedir su activación preinfectiva (germinación de esporas, activación de enzimas etc.), su penetración, colonización de los tejidos, reproducción o su futura supervivencia. Estas barreras pueden ser físicas (como el grosor de la cutícula), biológicas (rizosfera, filoplano, etc.) o químicas (aleloquímicos). Parker (1992) sugiere que ha existido una intensa coevolución dinámica entre las plantas y sus patógenos en los ecosistemas naturales y esto definitivamente ha influido en la estabilidad de las especies.

De acuerdo con Wilson & Peter (1988), se han descrito alrededor de 220,000 especies de plantas superiores y se estima que en el trópico hay un 10 % por descubrir y un 20 % que aunque ya están en herbarios todavía no han sido descritas formalmente. De todas esas plantas se calcula que sólo el 25 % tienen algún uso (Sarukhán, 1995). En México se estima que existen entre 23,000 y 30,000 especies de plantas, por lo que se considera uno de los países con mayor riqueza florística en el mundo (Toledo, 1994). A pesar del progreso alcanzado en el país el 85 % de la población recurre a las plantas medicinales, lo que nos indica el arraigo cultural que tienen (Sarukhán, 1995).

Según Beckstrom-Strenberg (1993) que elaboró una base de datos denominada "Phytochemeco", existe información detallada de 1,164 especies de plantas, en las que se han descrito 16, 332 compuestos químicos y sus propiedades biológicas más importantes. Anton *et al.* (1987) mencionan que se han investigado una gran cantidad de familias de compuestos químicos, cada una con su casi infinita variedad de substituyentes; sin embargo, sólo se conoce la actividad biológica potencial de una pequeña parte de ellos y eso referido únicamente a sus propiedades farmacológicas, siendo más dramático el desconocimiento en cuanto a su uso agrícola.

2.9 Plantas con propiedades contra plagas

Del conocimiento empírico han surgido innumerables propiedades de las plantas y su diversidad química ha contribuido en gran parte al desarrollo industrial. La industria de los pesticidas agrícolas en sus inicios, tuvo como base la utilización de plantas como el tabaco, el crisantemo y *Derris* spp. y posteriormente con el desarrollo de los productos sintéticos se abandonó su uso. A pesar del limitado desarrollo de las investigaciones realizadas en esta área se ha mostrado que existen alrededor de 2,400 especies de plantas con propiedades contra plagas agrícolas incluyendo desde malezas y roedores hasta ácaros, insectos, nemátodos, hongos, bacterias y virus (Grainge & Ahmed, 1988); el conocimiento químico de los vegetales ha dilucidado la estructura de aproximadamente 10,000 metabolitos secundarios y se calcula que podrían existir alrededor de 400,000 de ellos (Swaminathan, 1988).

En México se tienen antecedentes del uso de polvos vegetales para el control de insectos plaga de granos almacenados como una técnica tradicional transmitida verbalmente de generación en generación (Lagunes & Rodríguez, 1989). Actualmente se han desarrollado grupos de investigación en diversas instituciones nacionales, que han generado información importante sobre esta línea de investigación entomológica y que inclusive ya se difunde a nivel de productores agrícolas.

2.10. Plantas con propiedades contra patógenos.

En el caso de microorganismos también existen antecedentes remotos, así por ejemplo se sabe que los egipcios empleaban aceites de canela, clavo y *Cassia* spp dentro del proceso de momificación de sus muertos (Bullerman *et al.*, 1977). En Japón (Kurita *et al.*, 1981) y la India (Singh *et al.*, 1980) existe un uso tradicional de compuestos naturales de origen vegetal para la preservación de alimentos.

De microorganismos fitopatógenos existe información sobre alrededor de 400 plantas con propiedades contra 142 especies de hongos y otras plantas contra 23 taxa de bacterias, 19 virus y 43 especies de nemátodos (Grainge & Ahmed, 1988).

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la propiedad antifúngica de los metabolitos secundarios es un fenómeno frecuente. De la información recabada se desprende que hay alrededor de 60 familias de plantas en las que se han encontrado especies antifúngicas destacando algunas de ellas como la Asteraceae, Fabaceae y Brassicaceae (Fig.1). Maruzzella & Balter (1959) de 112 aceites esenciales que probaron (la mayor parte de origen vegetal) contra 12 hongos fitopatógenos, 100 tuvieron actividad antifúngica contra por lo menos 2 de los hongos probados. Montes *et al.* (1990), de 74 especies de plantas evaluadas para inhibir la germinación de *Uromyces phaseoli var typica* tuvieron resultados prometedores con 24 especies. La diversidad de hongos fitopatógenos también genera diversidad de respuestas al interactuar con los vegetales. Maruzzella & Balter (1959) encontraron que *Claviceps purpurea* fue el hongo más susceptible a los aceites esenciales que probaron y *Alternaria tenuis* fue el más resistente a la acción de

varios de ellos. En contraste, Cruz & Montes (1992) encontraron que *Alternaria tenuis* era muy susceptible a los extractos de *Pithecellobium dulce*, *Acacia farnesiana*, *Tribulus cistoides*, *Spathodea campanulata*, *Chenopodium album* y *Eucalyptus* sp y *Oidium mangiferae* solo fue susceptible a *P. dulce* y *C. album*.

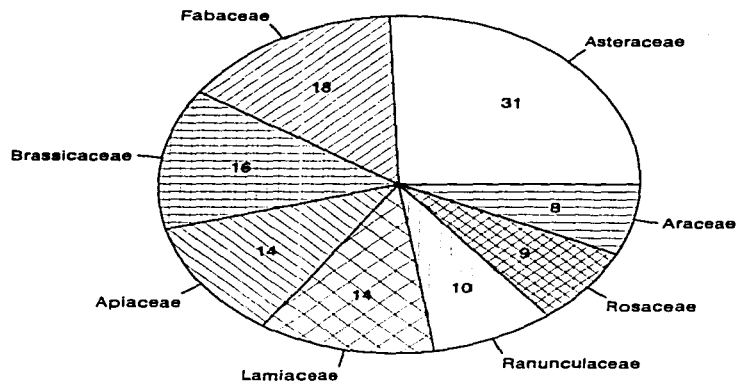


Fig. 1. Principales familias de plantas con especies antifúngicas (Modificado de Grainge & Ahmed, 1988).

En general se puede decir que puede haber extractos vegetales con un rango de acción amplio contra hongos fitopatógenos (Tabla 2), pero la mayor parte de los conocidos tienden a ser específicos. Dentro de las especies destacan como las de mayor espectro el ajo (*Allium sativum*) con acción contra 45 especies de hongos, además de su acción bactericida (Ark & Thompson, 1959) y la cebolla (*Allium cepa*) que tienen compuestos azufrados como principios activos (Harborne, 1987), sin embargo en pruebas de invernadero y campo del autor, estos productos han mostrado un efecto residual muy pobre por la volatilidad de sus principios activos. En cuanto a la generación de productos comerciales derivados de estas investigaciones, a diferencia de los insecticidas en donde es posible encontrar en los supermercados presentaciones comerciales de tabaco así como bioinsecticidas industriales a base de *Azadirachta indica* (Margosan) y ajo (Biocrack) para el combate de insectos, hasta hace apenas unos cuantos años surgió un producto derivado de extracto de semillas de toronja conocido comercialmente como BC-1000 en Chile, en donde se recomienda para *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Erwinia carotovora* en vid y frambuesa; en

México se le denomina Citricidal, pero todavía está en proceso de aprobación (Apodaca & Gerardo, 1993).

Tabla 2. Espectro de acción de algunas especies de plantas antifúngicas y grupos químicos de sus principios activos.

Planta	Nombre común	No. de especies de hongos	Grupos químicos en sus principios activos.
<i>Allium sativum</i>	Ajo	45	Comp. azufrados
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	27	Comp. azufrados
<i>Cestrum diurnum</i>		15	Alcaloides
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	16	Triterpenoides
<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete	10	Alcaloides
<i>Origanum majorana</i>	Mejorana	10	Triterpenoides
<i>Anagallis arvensis</i>		8	Alcaloides
<i>Avena sativa</i>	Avena	8	Alcaloides
<i>Beta vulgaris</i>	Betabel	7	Flavonoides
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	7	Triterpenoides
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	6	Triterpenoides
<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla	6	Alcaloides

Modificado de Grainge y Ahmed, 1988.

A continuación se exponen algunos aspectos a considerar para el estudio de las plantas con uso potencial contra fitopatógenos.

2.11. Selección de especies de plantas.

Como se mencionaba anteriormente, la enorme diversidad de metabolitos secundarios y sus propiedades biológicas todavía son materia de estudio sumamente amplia, el conocimiento tan limitado que se tiene actualmente da lugar a poder comenzar con plantas de casi cualquier tipo. Existen sin embargo, algunas bases derivadas del conocimiento fitoquímico como el hecho de que la mayoría de los químicos con acción antifúngica (Grayer & Harborne, 1994) quedan comprendidos entre: terpenoides (dentro de los que se incluyen iridioides, sesquiterpenoides y saponinas); compuestos con nitrógeno o azufre (alcaloides, aminas y amidas); compuestos alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos); compuestos aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos bibenzilos, xantonas y

benzoquinonas); los compuestos que interfieren con las infecciones virales son de naturaleza proteica, polisacáridos o taninos (Sadasivam *et al.*, 1991, Hirai, 1977); contra los nemátodos la acción directa es principalmente de ácidos grasos volátiles, sulfuro de hidrógeno y amoniaco (Zavaleta, 1987), aunque en este grupo es difícil diferenciar si son compuestos de la planta o productos de la degradación de la materia orgánica, ya que se aplican directamente al suelo.

De esto se puede inferir que algunas familias de plantas pueden ser más viables para su estudio como sería el caso de las Solanaceae con alto contenido de alcaloides o las Mimosaceae con muchas especies ricas en taninos, las Lamiaceae y Meliaceae con amplia diversidad de triterpenoides. Wood (1967) concluye que la resistencia a *Phymatotrichum omnivorum* en las Amaryllidaceae es debida a su alto contenido de alcaloides. También se puede partir de la base de que existen algunas plantas con muy pocos patógenos reportados, como es el caso de *Ginkgo biloba* de la que no se conocen enfermedades bacterianas y sólo hay reportes de 9 especies de hongos, ninguno que cause daños de consideración (Wood, 1967).

Otro aspecto a considerar es la zona ecológica donde se puede coleccionar, Levin y York (1978) sugieren que la concentración de alcaloides en el follaje de plantas con alto contenido de estos compuestos es mayor en regiones tropicales bajas que en regiones subtropicales y templadas altas. En la selva africana se ha determinado que en los ecosistemas oligotróficos las plantas tienen una mayor cantidad de fenoles que en los ecosistemas eutróficos ricos en nutrientes (Feeny, 1976).

Otro aspecto que se puede tomar en cuenta para seleccionar las especies a probar serían los antecedentes bibliográficos para fitopatógenos en la mencionada cita de Grainge y Ahmed o bien en trabajos con microorganismos patógenos de animales y el hombre en libros y artículos científicos sobre plantas medicinales (Maruzzella and Henry, 1958; Maruzzella *et al.*, 1960; Barnes, 1963; Mori *et al.*, 1974; Overeem, 1976; Mansfield, 1983; Pandey, 1983; Marston and Hostettmann, 1987; Harborne, 1987; Zaika and Buchanan, 1987; Madrigal y González, 1991; Salazar *et al.*, 1991; Duke, 1992; Greger *et al.*, 1992; Harborne & Baxter, 1993; Rojas *et al.*, 1992).

2.12. Producción de principios activos.

Existen factores que determinan variabilidad cualitativa y cuantitativa de los metabolitos. Una planta puede tener diferente concentración de un químico en sus diferentes partes: raíz, tallo, hojas, flores y fruto e inclusive puede estar ausente en una o varias partes por lo que al coleccionar es conveniente tomar muestras integrales. Zangerl y Bazzaz (1992) mencionan que las plantas durante su evolución tienden a crear más defensas en sus órganos reproductivos. La avenacina que es el principio activo de *Avena sativa* sólo se encuentra en las raíces (Mansfield, 1983); en cambio *Cinnamomum zeylanicum* en su corteza tiene aldehído cinámico y en sus hojas eugenol (Heath, 1978). Las condiciones ambientales también pueden ser determinantes, la producción de un metabolito puede ser alta en una época del año y escasa en otra, como sucede con la gobernadora *Larrea tridentata* (Hurtado *et al.*,

1981) las altas temperaturas hacen que los alcaloides y los aceites esenciales en general disminuyan; las concentraciones de estos compuestos mencionados aumentan en las primeras horas del día; el inicio de la floración hace que los alcaloides aumenten y los glicósidos disminuyan (Estrada *et al.*, 1991). Algunas plantas como *Cestrum nocturnum* liberan sus compuestos aromáticos durante la noche.

2.13. Procesamiento de las plantas.

Existen dos posibilidades para la utilización de las plantas en forma de extractos o de polvos. En el caso de extractos se pueden realizar con tejidos frescos o bien pulverizar la planta para su posterior uso. En ambos casos es necesario conservar ejemplares para la identificación de la especie siguiendo las normas usuales en Botánica.

En el caso de elaboración de polvos es necesario secar las plantas de preferencia, bajo condiciones naturales (a la sombra) o con hornos a temperatura no mayor a 60 ° C. El secado al sol no se recomienda porque en este proceso se puede alterar la composición química de las plantas.

Para la extracción del mayor número de compuestos presentes en la planta se pueden utilizar varios solventes de diferentes grados de polaridad, desde los altamente polares como el agua hasta los no polares como el hexano. En el caso de las plantas aromáticas se recomienda extraer aceites esenciales con muestras frescas y procesadas por el método de destilación con arrastre de vapor (Dominguez, 1978).

2.14. Bioensayos.

Para tener una mayor información de las propiedades de los extractos es conveniente secuenciar el proceso de pruebas para ir reduciendo el universo de plantas a probar en laboratorio, invernadero y campo.

En el caso de bacterias se pueden realizar ensayos con métodos semejantes a las pruebas usadas para antibióticos con discos de papel filtro sumergidos en el extracto bajo condiciones asépticas y sembrados en los medios adecuados con el patógeno de prueba (Kenneth, 1986). Con los hongos es conveniente tener una visión amplia en cuanto a su efecto en: germinación de esporas, desarrollo micelial (en el caso de los cultivables en medios artificiales), esporulación e infección.

En el invernadero se pueden hacer inoculaciones artificiales después de asperjar los extractos y transcurrido el respectivo periodo de incubación evaluar su eficiencia.

Para las pruebas de germinación de esporas es necesario conocer la Fisiología del hongo, ya que existen algunas especies que germinan fácilmente en agua, otras (como las royas) poseen sustancias autoinhibidoras que es necesario eliminar para lograr un óptimo resultado; otras requieren condiciones ambientales especiales de temperatura, humedad, luz, etc. y algunas más sólo inician el proceso germinativo en presencia de determinado

elemento o compuesto químico. En todos los casos es fundamental tener un buen tratamiento testigo para poder inferir las propiedades de los extractos. Recientemente ha surgido una prueba para detectar efecto antifúngico en cientos de extractos de plantas en una forma rápida y se basa en la utilización de placas con pozos microvolumétricos en los que se colocan mezclas de extractos y esporas de un hongo y después de un periodo de incubación es factible mediante la determinación de la densidad óptica de cada pozo (con un lector de placas unido a una computadora con un software apropiado) medir el grado de inhibición de la germinación de esporas (Wilson *et al.*, 1997).

Para el desarrollo micelial y esporulación el polvo o el extracto, se pueden agregar directamente al medio de cultivo al momento de prepararlo o bien después de esterilizado éste, esperando a que alcance una temperatura cercana a los 45 °C vaciándolo con la ayuda de un filtro bacteriológico y finalmente llenar las cajas de Petri.

Para las pruebas de invernadero y campo el procedimiento es el mismo que para cualquier producto químico (Kenneth, 1986).

El efecto en el proceso infectivo se puede ver en el caso de enfermedades de las partes aéreas de las plantas, cubriendo la superficie susceptible con el extracto (mediante aspersión o inmersión) y después exponiéndola a propágulos del patógeno (esporas, micelio, etc.) bajo las condiciones óptimas para el mismo. Para las enfermedades con origen en el suelo, se puede agregar a suelo infestado (inmediatamente después del trasplante) el extracto en forma de riego o como abono en polvo.

2.15. Manejo de extractos vegetales.

La selección de una planta promisoría puede implicar además de su eficiencia para el control de una enfermedad otra serie de pruebas para su óptima utilización, como sería la determinación de las partes de la planta productoras del principio activo; la dosis óptima; el rango de patógenos que es capaz de controlar; los cultivos en los que se puede aplicar; la producción de los principios activos durante el año; la determinación del o los principios activos; el efecto aditivo o sinérgico al combinarse con otros extractos; pruebas toxicológicas y la producción masiva del o los metabolitos mediante técnicas Biotecnológicas. También hay que considerar que siendo esta alternativa de carácter ecológico, si la planta seleccionada no es cultivada, se debe dar un manejo racional al recurso trabajando técnicas de propagación y cultivo además de evitar una sobre explotación del mismo.

Finalmente, habría que estar conscientes que el uso de extractos vegetales tiene que ser un componente más en un sistema de control integral y que su uso tiene limitaciones como sería la disponibilidad de la planta, el peligro de que existan en el extracto otros componentes tóxicos, la tendencia a que sean productos de estabilidad y efecto residual limitados. No obstante, por ser productos biodegradables y por el enorme acervo cultural que los campesinos tienen de las plantas en general, sus perspectivas de aceptación sobre todo entre los pequeños productores son muy amplias.

2.16. Efecto de productos de plantas sobre *Aspergillus*.

La literatura relacionada con los metabolitos vegetales que afectan el desarrollo de las especies de *Aspergillus* o la síntesis de sus toxinas es limitada, sin embargo existen datos importantes, tanto de productos vegetales, metabolitos de diferentes plantas y metabolitos del propio maíz. Batt *et al.* (1980) encontraron que el extracto clorofórmico de la raíz de la zanahoria detiene el desarrollo y la producción de la aflatoxina de *A. parasiticus*. Hitoko *et al.* (1978), probaron que la corteza de *Philodendron* sp y los extractos de *Brassica nigra* y *Zanthophyllum* sp inhiben la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* y tienen menor nivel de acción sobre *A. flavus*. Los mismos autores en 1980, determinaron que de 29 polvos de plantas de especias hubo efecto inhibitorio del desarrollo de: *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. versicolor* con los extractos de: *Syzygium aromaticum*, *Illicium anisatum* y *Pimenta dioica*, mientras que la mayoría de las otras plantas inhiben la producción de sus toxinas únicamente. En trabajo realizado con aceites esenciales de clavo y canela, Bullerman *et al.* (1977) concluyeron que estos productos afectan el desarrollo de *A. parasiticus* pero no su producción de toxinas. Sakai *et al.* (1988), de 60 especies de plantas que probaron contra *A. parasiticus*, 20 de ellas inhibieron al hongo y la producción de sus toxinas, otras 20 actuaron únicamente contra la producción de aflatoxinas y sólo 10 no afectaron ningún proceso. En Filipinas, García & García (1988) de 96 especies vegetales que probaron contra *A. flavus* y *A. parasiticus* sólo encontraron actividad inhibitoria en 6 especies. Desafortunadamente todos estos estudios se han quedado únicamente en la relación directa de los metabolitos con los hongos en medios artificiales sin que se haya determinado su comportamiento con substratos naturales como maíz, algodón o cacahuete, bajo ambiente crítico.

En los aceites de canela y clavo Bullerman *et al.* (1977) encontraron que los principios activos responsables de la acción contra *A. parasiticus* eran el aldehído cinámico y el eugenol. Morozumi (1978) encontró que el o-metoxicinamaldehído extraído de la canela actuaba sobre *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* y *A. versicolor*. Hitokoto *et al.* (1980) determinaron que el timol extraído de *Thymus vulgaris* y el anethol de *Illicium anisatum* inhibían el crecimiento de *A. flavus* y *A. versicolor*. Morozumi *et al.* (1989) encontraron que además de los metabolitos mencionados anteriormente, también había efecto antifúngico contra *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. versicolor* en el aril isotiocianato extraído de la mostaza (*Brassica nigra*), en el citronelol, alcohol cumínol y geraniol del pimiento japonés, además en la cafeína de *Coffea arabica*. Paster *et al.* (1995) detectaron que ni el carvacrol ni el timol daban buenos resultados para controlar las infestaciones de hongos en granos de trigo. Por otra parte Wilson (1987), detectó que los metabolitos de maíz: 1-heptanol, 2-nonanol, 1-nonanol, geraniol, 2-octanol 2-decanol, brionona, 2-4-hexadienal, trans-2-hexanal y 2,4-decadienal inhiben completamente a *A. flavus* en medio de cultivo PDA.

Ante esta perspectiva de la investigación realizada con *Aspergillus flavus* se plantearon los siguientes objetivos.

III. OBJETIVOS

- 1 **Detectar extractos, polvos y aceites esenciales de especies vegetales que contengan metabolitos secundarios capaces de inhibir el desarrollo de *A. flavus* y proteger al maíz.**
- 2 **Determinar las técnicas de manejo de los productos vegetales seleccionados para un óptimo resultado.**
- 3 **Determinar el efecto de los productos vegetales seleccionados sobre la germinación de las semillas de maíz y el desarrollo de las plántulas.**
- 4 **Determinar la eficiencia de principios activos de las plantas en la protección del maíz.**

IV. METODOLOGÍA

El trabajo comprendió una fase inicial de búsqueda de extractos, polvos y aceites esenciales de plantas con acción fungicida o fungistática, mediante pruebas biológicas directas con la germinación de las esporas y el desarrollo micelial de *Aspergillus flavus* y en forma indirecta al someter el maíz a un baño protector con los diferentes productos vegetales para después inocularlos con el hongo. Con los productos de las especies de plantas que dieron los mejores resultados se desarrolló la siguiente fase que consistió en técnicas de manejo, fitotoxicidad y eficiencia de sus principios activos como protectores del maíz.

3. 1. Selección de plantas.

Primeramente hubo una selección de plantas con base en antecedentes bibliográficos (tanto contra hongos fitopatógenos como productores de dermatofitosis) y a la factibilidad de la colecta de cada planta . Se reunió un total de 106 especies (Tabla 3), correspondientes a 50 familias, incluidas plantas hortícolas, frutales, forestales, medicinales y arvenses. La mayoría fueron colectadas en el estado de Morelos con algunos ejemplares obtenidos en Oaxaca y en el Distrito Federal, tanto en campo como en terrenos abandonados y mercados populares.

3.1.1 Procesamiento e identificación de las plantas

Una vez colectadas fueron sometidas a un secamiento a la sombra (tratando de evitar el uso de medios artificiales para el secado) con la finalidad de mantener el máximo de las propiedades químicas de cada especie, para posteriormente someterlas a una pulverización, mediante un molino eléctrico y finalmente almacenarlas para gradualmente ir haciendo las pruebas biológicas correspondientes.

Paralelamente al procesamiento de las muestras de cada especie se separaron ejemplares completos para su prensado, etiquetado y su envío a especialistas en Taxonomía Vegetal, en el Herbario del Departamento de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, en donde quedaron depositados duplicados de los ejemplares colectados.

3. 2. Aislamiento, identificación y conservación del patógeno *Aspergillus flavus*

De muestras de maíz contaminado proveniente de Tamaulipas se tomaron esporas con una asa de transferencia y se sembraron (bajo condiciones asépticas) en medio de cultivo Extracto de Malta-Sal-Agar (MSA). De las colonias que desarrollaron en forma pura se hicieron transferencias y se incubaron hasta el pleno desarrollo de las colonias y se observaron conidios y conidióforos al microscopio. En función al color de las colonias (verde amarillento) conidióforos de 750 a 1000 μ de longitud y sus conidios lisos se identificó el hongo como *Aspergillus flavus*.

Tabla 3. Especies de plantas colectadas y partes usadas para la elaboración de los extractos.

Especie vegetal	Familia	Partes usadas	Nombre común
1. <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Mimosaceae	Fr.	Huizache
2. <i>Aldama dentata</i> L.	Asteraceae	T.P.	
3. <i>Allium cepa</i> L.	Liliaceae	B.	Cebolla
4. <i>Allium sativum</i> Mill.	Liliaceae	B.	Ajo
5. <i>Aloe barbadensis</i> Mill.	Liliaceae	T.P.	Zábila
6. <i>Amaranthus hybridus</i> L.	Amaranthaceae	T.P.	Quelite
7. <i>Amaranthus sanguineus</i> L.	Amaranthaceae	T.P.	Acalifa
8. <i>Amphipterygium adstringens</i> Schiede	Julaniaceae	C.	Cuachalalate
9. <i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	H.	Guanábana
10. <i>Arachis hypogaea</i> L.	Fabaceae	H.T.	Cacahuat
11. <i>Argemone mexicana</i> L.	Papaveraceae	S.	Chicalote
12. <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	Asteraceae	T.P.	Estafiate
13. <i>Asclepias curassavica</i> L.	Asclepiadaceae	T.P.	
14. <i>Asclepias glaucescens</i> H.B.K.	Asclepiadaceae	T.P.	
15. <i>Avena fatua</i> L.	Asteraceae	T.P.	
16. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Meliaceae	H.	Neem
17. <i>Baccharis salicifolia</i> H.B.K.	Asteraceae	H.	Chamizo
18. <i>Beta vulgaris</i> L.	Brassicaceae	B.	Betabel
19. <i>Brassica napus</i> L.	Brassicaceae	B.	Nabo
20. <i>Brassica nigra</i> (L.) Koch.	Brassicaceae	S.	Mostaza
21. <i>Brassica oleracea</i> L.	Brassicaceae	H.	Col
22. <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) H.B.K.	Malpighiaceae	C.	Nanche
23. <i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	R.	Papaya
24. <i>Cassia</i> sp.	Caesalpiniaceae	H.	
25. <i>Casuarina equisetifolia</i> L.	Casuarinaceae	H.	Casuarina
26. <i>Cestrum nocturnum</i> L.	Solanaceae	T.P.	Huele de noche
27. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blum.	Lauraceae	C.	Canela
28. <i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae	Fr.	Café
29. <i>Coleus blumei</i> Benth.	Lamiaceae	H.	
30. <i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	T.P.	Cilantro
31. <i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	S.	Melón
32. <i>Cynodon dactylon</i> Pers.	Poaceae	T.P.	
33. <i>Cyperus rotundus</i> L.	Cyperaceae	T.P.	Coquillo
34. <i>Chenopodium album</i> Moq.	Chenopodiaceae	T.P.	Epazote borrego
35. <i>Chenopodium nuttaliae</i> L.	Chenopodiaceae	T.P.	Huauzontle
36. <i>Datura stramonium</i> L.	Solanaceae	T.P.	Toloache

Tabla 3. (Continuación).

Especie vegetal	Familia	Partes usadas	Nombre común
37. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	H.	Eucalipto
38. <i>Euphorbia dentata</i> Michx.	Euphorbiaceae	T.P.	
39. <i>Euphorbia lasiocarpa</i> Jacq.	Euphorbiaceae	T.P.	
40. <i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd.	Euphorbiaceae	H.	Nochebuena
41. <i>Equisetum arvense</i> L.	Equicetaceae	T.P.	Cola de caballo
42. <i>Ficus tecolutensis</i> Miq.	Moraceae	H.	Amate
43. <i>Gomphrena</i> sp.	Amaranthaceae	T.P.	
44. <i>Gnaphalium</i> sp.	Asteraceae	T.P.	Gordolobo
45. <i>Heterotheca inuloides</i> Cass.	Asteraceae	T., Fl.	Arnica
46. <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Malvaceae	H.	Tulipán
47. <i>Hippocratea excelsa</i> H.B.K.	Hyppocrataceae	C.	Cancerina
48. <i>Juglans regia</i> L.	Jungladaceae	H., T.	Nogal
49. <i>Kallstroemia maxima</i> (L.) Torr. & Gray	Zygophyllaceae	T.P.	Abrojo
50. <i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	H., Fl.	
51. <i>Larrea tridentata</i> (D.C.) Cov.	Zygophyllaceae	H., T.	Gobernadora
52. <i>Leucaena leucocephala</i> (L.) de Wit.	Mimosaceae	H.	Guaje
53. <i>Lepidium virginicum</i> L.	Brassicaceae	T.P.	Lentejilla
54. <i>Ligustrum japonicum</i> Thunb.	Oleaceae	H.	Trueno
55. <i>Litsea glaucescens</i> H.B.K..	Lauraceae	H.	Laurel
56. <i>Lupinus campestris</i> Cerv.	Fabaceae	S.	
57. <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	Fabaceae	S.	
58. <i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiaceae	H.	Mango
59. <i>Marrubium vulgare</i> L.	Lamiaceae	H.	Marrubio
60. <i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	T.P.	Yerbabuena
61. <i>Mimosa tenuiflora</i> Poir.	Mimosaceae	C.	Tepezcohuite
62. <i>Nephrolepis</i> sp.	Davalliaceae	T.P.	Helecho
63. <i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae	H.	Rosa-laurel
64. <i>Nicotiana glauca</i> Grah.	Solanaceae	T.P.	Tabaquillo
65. <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Solanaceae	H.	Tabaco
66. <i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	T.P.	Albahaca
67. <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	Cactaceae	Cl.	Nopal
68. <i>Origanum mejorana</i> L.	Lamiaceae	T.P.	Mejorana
69. <i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	T.P.	Orégano
70. <i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Asteraceae	T.P.	Flor de pajarito
71. <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Degener	Passifloraceae	H.	Maracuyá
72. <i>Pileus mexicanus</i> (D.C.) John.	Caricaceae	R.	Cuagayote

Tabla3. (Continuación).

Especie vegetal	Familia	Partes usadas	Nombre común
73. <i>Pimenta dioica</i> L.	Myrtaceae	Fr.	Pimienta gorda
74. <i>Pinus</i> sp.	Pinaceae	H.	Pino
75. <i>Piper auritum</i> H.B.K.	Piperaceae	H.	Yerbasanta
76. <i>Piper nigrum</i> L.	Piperaceae	H.	Pimienta negra
77. <i>Pithecellobium dulce</i> Benth.	Mimosaceae	Fr.	Guamuchil
78. <i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	T.P.	Verdolaga
79. <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) D.C.	Mimosaceae	H.	Mezquite
80. <i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	C.	Guayaba
81. <i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Fr.	Granada
82. <i>Pyrostegia venusta</i> Miers	Bignoniaceae	Fl.	Llamarada
83. <i>Quercus</i> sp.	Fagaceae	C.	Encino
84. <i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Brassicaceae	T.P.	Rabanillo
85. <i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	H.	Higuerilla
86. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	T.P.	Romero
87. <i>Rhynchosia</i> sp.	Fabaceae	T.P.	
88. <i>Ruta chalepensis</i> L.	Rutaceae	T.P.	Ruda
89. <i>Salvia riparia</i> Burch.	Lamiaceae	T.P.	
90. <i>Sanvitalia procumbens</i> L.	Asteraceae	T.P.	Ojo de gallo
91. <i>Satureja macrostema</i> (Benth.) Briquet	Lamiaceae	T.P.	Poleo
92. <i>Sida rhombifolia</i> L.	Malvaceae	T.P.	
93. <i>Solanum verbascifolium</i> Lam.	Solanaceae	H.	
94. <i>Solanum rostratum</i> Dun.	Solanaceae	H.	
95. <i>Spathodea campanulata</i> Beauv.	Bignoniaceae	Fl.	Tulipán India
96. <i>Syzygium aromaticum</i> Merr. & Perry	Myrtaceae	Fr.	Clavo de especia
97. <i>Tagetes erecta</i> L.	Asteraceae	Fl.	Cempazúchil
98. <i>Tamarindus indica</i> L.	Caesalpinaceae	H.	Tamarindo
99. <i>Teloxys ambrosioides</i> (L.) Weber	Chenopodiaceae	H.	Epazote
100. <i>Tillandsia usneoides</i> L.	Bromeliaceae	T.P.	Heno
101. <i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	T.P.	Tomillo
102. <i>Tournefortia densiflora</i> Mart. & Gal.	Boraginaceae	T.P.	Hierba del cáncer
103. <i>Tribulus cistoides</i> L.	Zygophyllaceae	T.P.	Abrojo
104. <i>Tridax coronopifolia</i> (H.B.K.) Hemsl.	Asteraceae	T.P.	
105. <i>Vinca rosea</i> L.	Apocynaceae	T.P.	
106. <i>Wigandia urens</i> H.B.K.	Hydrophyllaceae	H.	Ortiga

* T.P.= Toda la planta; H. = Hojas; T.= Tallos; Fl.= Flores; Fr.= Frutos; R. = Raíces; B.=Bulbos; C.= Corteza; Cl.=Cladodios; S = Semillas.

Las cepas se mantuvieron en refrigeración y periódicamente se realizaron inoculaciones y reaislamientos de maíces enfermos a fin de evitar la pérdida de su capacidad de producir aflatoxinas.

3. 3. Pruebas biológicas generales.

3. 3. 1 Elaboración de extractos vegetales.

Cada polvo vegetal fue procesado para extracción de sus principios activos con dos solventes: uno polar, el agua y otro no polar, el hexano, a fin de que se pudieran extraer los principales grupos químicos de compuestos presentes en cada planta. Para cada extracto se usaron 20 g. de polvo por litro de solvente; en el caso del agua una vez colocado el polvo, se dejó en reposo durante 12 horas y después se filtró para su utilización en las pruebas biológicas; con el hexano la suspensión del polvo con el solvente se dejó hervir durante 5 minutos y se filtró como en el caso del agua.

3. 3. 2 Polvos y aceites esenciales

También se efectuaron pruebas biológicas directamente con los polvos de cada planta. En el caso de las plantas aromáticas comerciales, (canela, clavo, cebolla, ajo, pimienta negra, eucalipto, orégano, epazote, albahaca, tomillo y yerbabuena) se obtuvieron aceites esenciales de la empresa Aceites y Esencias S. A.

3. 3. 3. Germinación de esporas y desarrollo micelial

Esta prueba se efectuó únicamente con extractos acuosos y aceites esenciales en función de que el hexano tenía la propiedad de inhibir la germinación de las esporas y en consecuencia no había un testigo que permitiera ver el efecto del extracto en sí.

De cultivo de *A. flavus* en caja de Petri con medio MSA de 5 días de edad, se raspaba con una asa de transferencia las esporas y se depositaban éstas en un matraz Erlenmyer que contenía 200 ml de agua destilada estéril, procurando que la concentración no fuera menor a 1×10^4 conidios/ ml para cada lote de prueba (Fig. 2). Simultáneamente se preparaban lotes de entre 7 y 13 extractos de diferentes plantas, (de acuerdo a la metodología mencionada anteriormente). De ambos concentrados, (tanto de esporas como de cada extracto) se tomaban gotas y en un portaobjetos excavado se mezclaban. una gota de suspensión de esporas con una de extracto, para posteriormente colocarlo en cámara húmeda con una caja de Petri con agua y un objeto (corcholata o tapón de frasco de plástico) que sobresaliera del agua, encima del cual se colocaba el portaobjetos excavado y después se tapaba la caja. Al término de 12 a 14 horas de incubación se observaba cada portaobjetos al microscopio y se determinaba el porcentaje de esporas germinadas en 3 campos microscópicos, así como el grado de desarrollo del micelio en comparación a un testigo. Cada tratamiento consistía de 3 mezclas de gotas, de la observación de

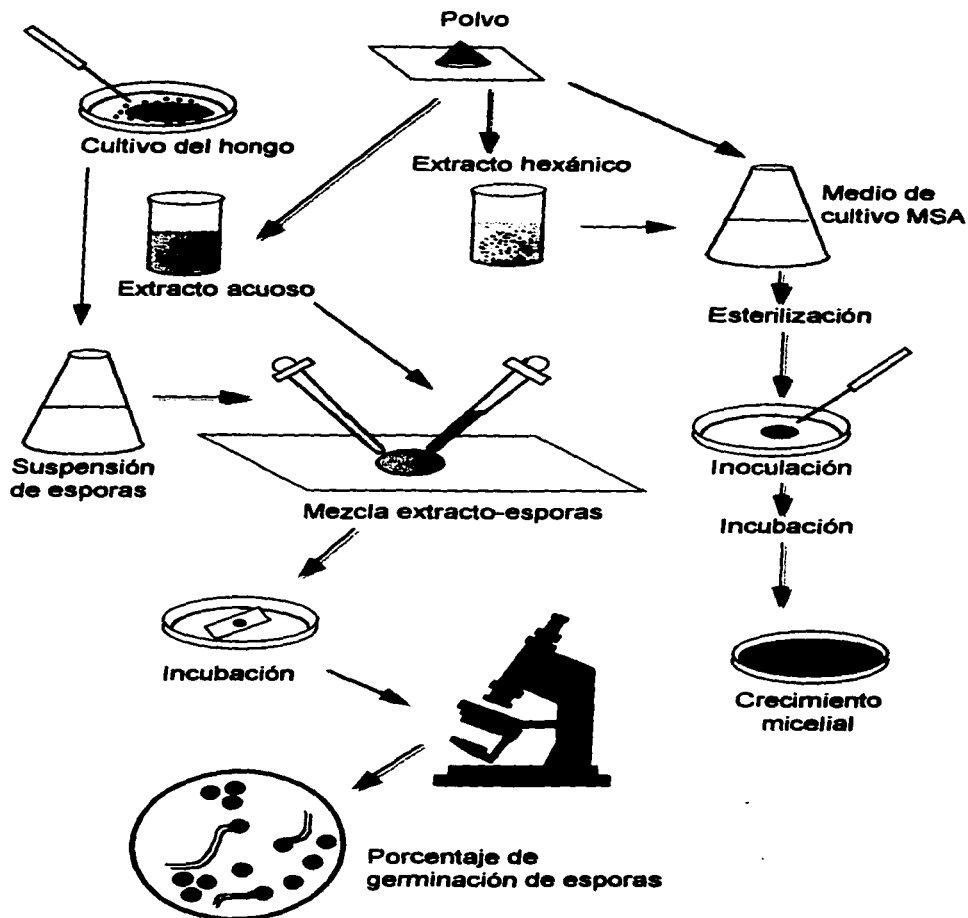


Fig. 2. Pruebas biológicas con extractos y polvos vegetales

las cuales se determinaba un promedio por extracto en cuanto a porcentaje de germinación y grado de desarrollo micelial. Con los aceites esenciales se procedió a usar concentraciones comerciales puras y se siguió el mismo procedimiento de la mezcla de gotas. El testigo originalmente se planteó hacerlo con agua, pero dado que la germinación de las esporas era muy pobre se probaron otros tratamientos: extracto de harina de maíz, de tortilla y de “guamúchil” (*Pithecellobium dulce*). Con el extracto de harina se obtuvo en promedio 78.5 % de germinación, con el de tortilla 67.9 % y con el de guamuchil 100 %, por lo que a partir de entonces se usó este último como testigo.

3. 3. 4. Desarrollo micelial con polvos y extractos hexánicos.

Con los polvos y los extractos hexánicos también se hicieron pruebas por lotes de plantas, pero aquí se preparaba medio de cultivo MSA y se le agregaban en el primer caso, 2 g de polvo por cada 100 ml de medio de cultivo y en el segundo 20 ml de cada extracto por la misma proporción de medio de cultivo; posteriormente cada medio combinado se esterilizaba en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Una vez enfriado el medio (MSA-extracto o MSA-polvo) a temperatura cercana a los 45 ° C, se vaciaba en cajas de Petri y posteriormente se sembraban discos de cultivo del hongo en el centro de la caja.

Por cada polvo o extracto se preparaban 4 cajas con el hongo y se dejaban incubar a temperatura ambiente (de 22 a 28 ° C aproximadamente, durante el tiempo en que se efectuaron las pruebas) durante 5 días al término de los cuales se determinaba el área de crecimiento del hongo calcando esta sobre papel transparente y después recortándola y midiéndola en papel milimétrico, para finalmente definir el promedio por tratamiento. Cuando el hongo cubría totalmente la caja al final del periodo de incubación, se calculaba el área total de la caja como área de crecimiento ($r^2 (5 \text{ cm})^2 \times \pi (3.1416) = 78.5 \text{ cm}$). Como en el caso de la prueba anterior para cada lote se usaba un testigo con extracto de guamuchil.

Con todos los datos obtenidos, se hicieron análisis de varianza por lote y pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey.

3. 3. 5. Protección de granos de maíz

Con granos sanos de maíz de la variedad “pozolero” se realizó esta prueba, que consistió en sumergir 120 granos sanos por cada extracto (acuoso o hexánico) o aceite esencial durante 30 minutos (Fig. 3), después se sacaron y se pusieron a secar sobre papel periódico durante 30 minutos y posteriormente se distribuyeron en 4 cajas de Petri con algodón humedecido en la base; enseguida se asperjaron con un concentrado de esporas del hongo y se incubaron durante 5 días, para al final de ese tiempo determinar el número de granos contaminados por repetición y por extracto con ayuda de una lupa. De cada extracto se hicieron 4 repeticiones. Al igual que con la prueba anterior, se hicieron análisis de varianza por lote y pruebas de Tukey.

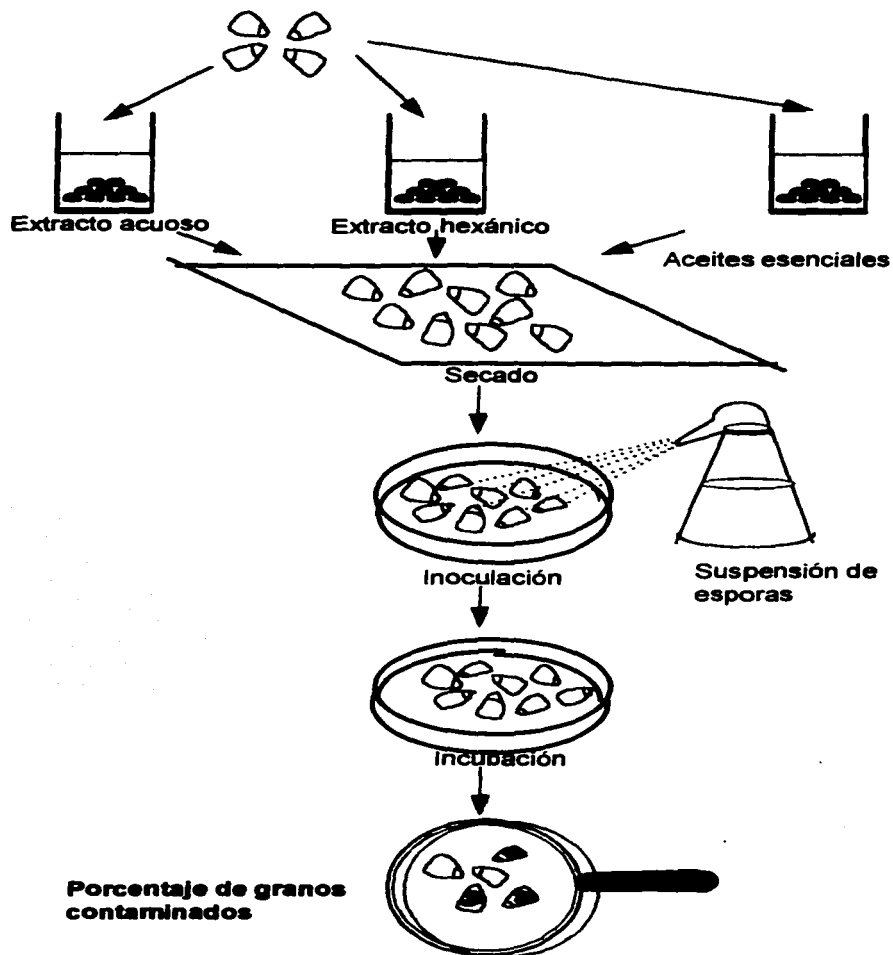


Fig. 3. Pruebas de protección de granos de maíz.

3. 4. Técnicas de manejo de plantas antifúngicas

De acuerdo al balance de todas las pruebas biológicas se seleccionaron los 13 productos vegetales que dieron los mejores resultados en las pruebas de protección de granos, tratamientos con los que se hicieron las siguientes pruebas:

3. 4. 1. Dosis óptima de protección. Con cada extracto seleccionado se hicieron pruebas usando dosis de: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10 % para los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*, *Teloxys ambrosioides* y *Thymus vulgaris*; para los extractos acuosos de *Coffea arabica*, *Euphorbia dentata*, *Coleus blumei*, *Larrea divaricata*, *Raphanus raphanistrum* y *Tridax coronopifolia* se usaron dosis de 2, 4 y 6 %. En cada una de estas concentraciones se sumergieron 120 granos de maíz durante 30 minutos; después se secaron a temperatura ambiental y finalmente fueron colocados en cajas de Petri con algodón humedecido en el fondo para su inoculación con suspensión de esporas . Después de 5 días de incubación se determinó el % de granos contaminados en 4 repeticiones por dosis. Con los promedios obtenidos por tratamiento se elaboró un cuadro.

3. 4. 2. Efecto de la combinación de extractos. Partiendo de los resultados de la prueba de dosis óptima de protección, se realizó esta parte del trabajo con base en la posibilidad de aumentar la eficiencia de los extractos mediante efecto aditivo o sinérgico. Con las mejores dosis obtenidas con los aceites esenciales de: *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*, *Teloxys ambrosioides* y *Thymus vulgaris* (reducidas en un 50 % de su concentración) se hicieron combinaciones por pares de tratamientos de manera de obtener todas las combinaciones posibles. En cada una de estas combinaciones se sumergieron 120 granos de maíz durante 30 minutos; después se secaron a temperatura ambiental y finalmente fueron colocados en cajas de Petri con algodón humedecido en el fondo para su inoculación con suspensión de esporas. Después de 5 días de incubación se determinó el porcentaje de granos contaminados en 4 repeticiones por combinación. También en esta prueba se hizo un cuadro con los promedios obtenidos por tratamiento.

3. 4. 3. Efecto residual de los extractos. También esta prueba tuvo como base los resultados de la dosis óptima de protección, habiéndose trabajado con los aceites esenciales de. *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*, *Teloxys ambrosioides* y *Thymus vulgaris*. La prueba consistió en tratar lotes de granos de maíz (un lote por aceite) con los aceites a su dosis óptima protectora e inocularlos posteriormente a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días después del tratamiento, para después de 24 hs en cámara húmeda dejarlos en incubación por 5 días y determinar el % de granos sanos. Con los dos primeros aceites también se probaron dosis de 10 %. Cada tiempo de inoculación/aceite tuvo un total de 120 granos que fueron colocados en cajas de Petri. Con los promedios obtenidos por tratamiento se elaboró una gráfica.

3. 4. 4. Eficencia de componentes de aceites esenciales en la protección de granos de maíz. Con componentes químicos de aceites esenciales obtenidos de la compañía Aceites y Esencias S.A. de C. V. se hicieron pruebas para determinar si estas sustancias, de las que existían antecedentes de acción antimicrobiana (Bullerman *et al.*, 1977; Morozumi, 1978;

Hitokoto *et al.*, 1980; Morozumi *et al.*, 1989) en pruebas *in vitro*, eran capaces de mantener sus propiedades al aplicarlas a granos de maíz. Para esto se usaron los componentes que a continuación se mencionan y en las plantas en que están presentes:

1. Mentol	<i>Mentha piperita.</i>
2. Timol	<i>Thymus vulgaris</i> y <i>Origanum vulgare</i>
3. Borneol	<i>Rosmarinus officinalis</i>
4. Linalol	<i>Ocimum basilicum</i>
5. Cineol	<i>Eucalyptus globulus</i> , <i>O. basilicum</i> y <i>R. officinalis</i>
6. 2- metoxi-cinamaldehido	<i>C. zeylanicum</i>
7. Eugenol	<i>C. zeylanicum</i> y <i>Syzygium aromaticum</i>
8. Aldehido cinámico	<i>C. zeylanicum.</i>

Con cada uno de estos compuestos se prepararon soluciones al 2 % usando como solvente el hexano en los componentes 2 4 y 5 y etanol para el resto de ellos. En cada una de las soluciones se sumergieron 120 granos de maíz y después de 30 minutos se escurrió todo el solvente y se dejaron secar durante 30 minutos. Se distribuyeron los granos de cada tratamiento en 4 cajas de Petri con algodón humedecido e inmediatamente después todos los tratamientos fueron asperjados con una suspensión de esporas del hongo. Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente se determinó el % de granos contaminados. El experimento fue repetido en tres ocasiones para mayor confiabilidad de los resultados y los datos promedio de los 3 experimentos. fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey.

3. 5. Pruebas de fitotoxicidad.

3. 5. 1. Efecto de granos tratados a dosis altas en la germinación y desarrollo del maíz.

Partiendo de los resultados de la prueba de dosis óptima de protección se realizó esta fase de la investigación con objeto de definir si no existía efecto tóxico de los tratamientos en el proceso germinativo y el desarrollo inicial de las plantas de maíz con una dosis de 10 %. Los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*, *Teloxys ambrosioides* y *Thymus vulgaris* al 10 % fueron usados para sumergir 100 semillas de maíz por tratamiento durante 30 minutos y después de secados fueron inoculados con el hongo y puestos en cámaras húmedas durante 48 horas; después de ese tiempo fueron sembrados en cajas de plástico conteniendo suelo estéril. Los tratamientos se evaluaron determinando el % de germinación y emergencia de plantas del sexto al octavo día después de la siembra y a los veinte días las plantas fueron arrancadas para determinar peso fresco y peso seco del follaje por planta comparada con un testigo sin tratamiento. Con los datos obtenidos se elaboraron una gráfica de emergencia de plantas y otra de efecto de los tratamientos en el peso fresco y seco. También los datos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas biológicas generales

4.1.1. Germinación de esporas y desarrollo micelial

En función a que los datos en esta prueba, fueron bastante contrastantes no hubo necesidad de realizar el análisis estadístico ya que al estar la mayoría de los valores entre 0 y 100 la variancia era de 0, lo que no permitía detectar diferencias entre tratamientos, sin embargo, desde el punto de vista biológico son evidentes las diferencias. A continuación se presentan los resultados obtenidos por lotes de plantas probadas (Tabla 4). En los lotes 1, 2, 4 y 5 no hubo inhibición de la germinación de esporas ni en el desarrollo del micelio y en el tercer lote sólo se presentó un retraso en el desarrollo del micelio en *Pinus* sp. De esas primeras 50 especies vegetales, 21 (1, 3, 11, 13, 16, 22, 23, 26, 28, 63, 70, 74, 77, 78, 79, 80, 85, 86, 97, 98 y 103) habían sido reportadas en la literatura (Grainge & Ahmed, 1988; Cáceres *et al.*, 1991; Farag *et al.*, 1989; García & Montes, 1994; Morozumi *et al.*, 1989; Montes & Fraire, 1994; Montes *et al.*, 1990; Rai, 1993) con acción contra hongos diferentes a *A. flavus*, lo que indica limitaciones en su capacidad inhibitoria en extractos acuosos. En el lote 6 se observó un efecto inhibitorio temporal en el 100 % de las esporas con los extractos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y *Syzygium aromaticum* (clavo), pero después de 3 días de exposición al extracto en la primera planta y de dos en la segunda se perdió el efecto y el hongo germinó y se desarrolló normalmente, esto puede deberse a que estas plantas que poseen propiedades fungicidas (Bullerman *et al.*, 1977) tienen los principios activos en sus aceites esenciales y sólo una mínima parte de los compuestos que los integran, tienen cierto grado de solubilidad en agua y son muy inestables. En el lote 7 *Chenopodium album* presentó un 80 % de inhibición de la germinación y las esporas que germinaban desarrollaban un tubo germinativo anormalmente corto y su desarrollo micelial era lento; además en este lote *Lepidium virginicum*, *Teloxys ambrosioides*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Amaranthus hybridus*, *Piper auritum*, *Equisetum arvense* y *Ligustrum japonicum* aun cuando no inhibieron la germinación, tuvieron un efecto fungistático en el micelio, existiendo antecedentes antifúngicos de todas ellas con excepción de la última especie (Apéndice 1); un factor que pareció influir en esto fue la consistencia viscosa de la mayoría de estos extractos. El lote 8 no tuvo ninguna especie que inhibiera la germinación pero hubo efecto fungistático en el micelio con: *Punica granatum*, *Coriandrum sativum*, *Pyrostegia venusta*, *Eucalyptus globulus*, *Asclepias glaucescens* y *Euphorbia pulcherrima*, de las cuales no existían antecedentes en *P. venusta* y las dos últimas. En el lote 9 se observó un efecto antigerminativo en *Ficus tecolotensis* y en *Raphanus raphanistrum* con sólo un 15 y 20 % de germinación respectivamente. Este es el primer reporte de esta propiedad. También se detectó fungistasis en *Lupinus campestris*. El lote 10 mostró otras 4 especies con actividad antigerminativa *Larrea tridentata* (80 %), *Nicotiana tabacum* (85 %), *Pimenta dioica* (95 %) y *Mangifera indica* (75 %), de ellas sólo la última no estaba reportada en la literatura y en *P. dioica* se asume que sus principios activos son aceites esenciales, los componentes de los cuales deben ser en su mayoría solubles en agua y estables para que este efecto sea persistente.

Tabla 4. Lotes 1-11. Efecto de extractos de plantas en la germinación de esporas. Promedio del porcentaje de esporas germinadas en 3 repeticiones.

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% e.g.*	Observaciones
1	23	<i>Carica papaya</i>	100	
1	16	<i>Azadirachta indica</i>	100	
1	64	<i>Nicotiana glauca</i>	100	
1	13	<i>Asclepias curassavica</i>	100	
1	85	<i>Ricinus communis</i>	100	
1		Testigo	100	
1	77	<i>Pithecellobium dulce</i>	100	
1	97	<i>Tagetes erecta</i>	100	
1	11	<i>Argemone mexicana</i>	100	
1	70	<i>Portulaca oleracea</i>	100	
1	72	<i>Pileus mexicanus</i>	100	
2	93	<i>Solanum verbascifolium</i>	100	
2	32	<i>Cynodon dactylon</i>	100	
2	22	<i>Byrsonima crassifolia</i>	100	
2	20	<i>Brassica nigra</i>	100	
2	106	<i>Wigandia urens</i>	100	
2	62	<i>Nephrolepis</i> sp	100	
2	102	<i>Tournefortia densiflora</i>	100	
2	9	<i>Annona muricata</i>	100	
2	79	<i>Prosopis juliflora</i>	100	
2		Testigo	100	
3	74	<i>Pinus</i> sp	100	Efecto fungistático
3	92	<i>Sida rhombifolia</i>	100	
3	98	<i>Tamarindus indica</i>	100	
3	4	<i>Allium sativum</i>	100	
3	70	<i>Parthenium hysterophorus</i>	100	
3	24	<i>Cassia</i> sp.	100	
3	63	<i>Nerium oleander</i>	100	
3	1	<i>Acacia farnesiana</i>	100	
3	49	<i>Kallstroemia maxima</i>	100	
3	103	<i>Tribulus cistoides</i>	100	
3		Testigo	100	
4	87	<i>Rhynchosia</i> sp	100	
4	39	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	100	
4	100	<i>Tillandsia usneoides</i>	100	
4	26	<i>Cestrum nocturnum</i>	100	
4	25	<i>Casuarina equisetifolia</i>	100	

Tabla 4 (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	%	Observaciones
4	88	<i>Ruta chalepensis</i>	100	
4	89	<i>Salvia riparia</i>	100	
4	71	<i>Passiflora edulis</i>	100	
4	3	<i>Allium cepa</i>	100	
4	43	<i>Gomphrena</i> sp	100	
4		Testigo	100	
5	86	<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	
5	35	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	100	
5	28	<i>Coffea arabica</i> (fruto integral)	100	
5	15	<i>Avena fatua</i>	100	
5	1	<i>Acacia farnesiana</i>	100	
5	94	<i>Solanum rostratum</i>	100	
5	105	<i>Vinca rosea</i>	100	
5	80	<i>Psidium guajava</i>	100	
5	21	<i>Brassica oleracea</i>	100	
5	38	<i>Euphorbia dentata</i>	100	
5		Testigo	100	
6	101	<i>Thymus vulgaris</i>	100	
6	19	<i>Brassica napus</i>	100	
6	2	<i>Aldama dentata</i>	100	
6	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	100	Germinación al 3er día
6	60	<i>Mentha piperita</i>	100	
6	76	<i>Piper nigrum</i>	100	
6	66	<i>Ocimum basilicum</i>	100	
6	96	<i>Syzygium aromaticum</i>	100	Germinación al 2o. día
6	69	<i>Origanum vulgare</i>	100	Efecto fungistático
6	68	<i>Origanum majorana</i>	100	
6		Testigo	100	
7		Testigo	100	
7	41	<i>Equisetum arvense</i>	100	Efecto fungistático
7	54	<i>Ligustrum japonicum</i>	100	Efecto fungistático
7	90	<i>Sanvitalia procumbens</i>	100	
7	52	<i>Leucaena leucocephala</i>	100	
7	34	<i>Chenopodium album</i>	20	
7	7	<i>Amaranthus sanguineus</i>	100	
7	18	<i>Beta vulgaris</i>	100	
7	95	<i>Spathodea campanulata</i>	100	
7	53	<i>Lepidium virginicum</i>	100	Efecto fungistático

Tabla 4 (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	%	Observaciones
7	99	<i>Teloxys ambrosioides</i>	100	Efecto fungistático
7	46	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	100	Efecto fungistático
7	6	<i>Amaranthus hybridus</i>	100	Efecto fungistático
7	75	<i>Piper auritum</i>	100	Efecto fungistático
8	31	<i>Cucumis melo</i>	100	
8	81	<i>Punica granatum</i>	100	Efecto fungistático
8	33	<i>Cyperus rotundus</i>	100	
8	67	<i>Opuntia ficus-indica</i>	100	
8	30	<i>Coriandrum sativum</i>	100	Efecto fungistático
8	82	<i>Pyrostegia venusta</i>	100	Efecto fungistático
8	61	<i>Mimosa tenuiflora</i>	100	
8	37	<i>Eucalyptus globulus</i>	100	Efecto fungistático,
8	14	<i>Asclepias glaucescens</i>	100	Efecto fungistático
8	91	<i>Satureja macrostema</i>	100	
8	10	<i>Arachis hypogaea</i>	100	
8	40	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	100	Efecto fungistático
8		Testigo	100	
9		Testigo	100	
9	63	<i>Nerium oleander</i>	100	
9	45	<i>Heterotheca inuloides</i>	100	
9	17	<i>Baccharis salicifolia</i>	100	
9	48	<i>Juglans regia</i>	100	
9	56	<i>Lupinus campestris</i>	100	Efecto fungistático
9	42	<i>Ficus tecolotensis</i>	15	Efecto fungistático
9	36	<i>Datura stramonium</i>	100	
9	57	<i>Lupinus mutabilis</i>	100	
9	84	<i>Raphanus raphanistrum</i>	20	Efecto fungistático
9	8	<i>Amphipterygium adstringens</i>	100	
9	12	<i>Artemisia ludoviciana</i>	100	
10	51	<i>Larrea tridentata</i>	20	Efecto fungistático
10	29	<i>Coleus blumei</i>	100	
10	5	<i>Aloe barbadensis</i>	100	
10	59	<i>Marrubium vulgare</i>	100	
10	65	<i>Nicotiana tabacum</i>	15	
10	73	<i>Pimenta dioica</i>	5	Efecto fungistático
10	44	<i>Gnaphalium</i> sp.	100	
10	50	<i>Lantana camara</i>	100	
10	58	<i>Mangifera indica</i>	25	Efecto fungistático
10	83	<i>Quercus</i> sp.	100	
10		Testigo	100	

En los lotes 11 y 12 (Tabla 5) se incluyeron los aceites esenciales los cuales resultaron con un efecto totalmente eficiente impidiendo el desarrollo del hongo, coincidiendo con los trabajos de Morozumi *et al.* (1989), Bullerman *et al.* (1977) e Hitokoto *et al.* (1980) ; también sobresalió *Coffea arabica* en su forma despulpada y tostada lo cual coincide con los resultados de Morozumi *et al.* (1989) de que la cafeína (que es el principio activo), para poder actuar contra los hongos necesita estar en forma libre, lo cual ocurre durante el proceso de sublimación, rompiéndose el complejo que forma con el ácido clorogénico en los frutos íntegros. El timol se considera el principio activo de *Thymus vulgaris* (Buchanan & Shepherd, 1981), lo cual fue confirmado con los resultados obtenidos en el lote 12.

En general, se confirma la alta frecuencia de las propiedades antifúngicas en las plantas, ya que de las 106 hubo 25 que como extractos acuosos, actuaron contra *A. flavus* inhibiendo la germinación de sus esporas o el desarrollo de su micelio, a pesar de ser un hongo con alta capacidad de metabolizar una diversidad de sustratos.

El fenómeno de fungistasis observado en las pruebas de germinación de esporas, se presentó en un 24.5 % de las especies probadas, lo cual se explica en función a la acción de posibles inhibidores de procesos metabólicos que se presentan en cantidades muy pequeñas y que sólo actúan temporalmente, permitiendo posteriormente, el normal desarrollo del micelio.

Tabla 5. Lotes 11 y 12. Efecto de extractos acuosos y aceites esenciales* de plantas en la germinación de esporas. Promedio de % de esporas germinadas en 3 repeticiones.

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% e. g. **	Observaciones
11	96	<i>Syzygium aromaticum</i> *	0	Inhibición total
11	47	<i>Hippocratea excelsa</i>	100	
11	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> *	0	Inhibición total
11	37	<i>Eucalyptus globulus</i> *	0	Inhibición total
11	28	<i>Coffea arabica</i> (molido y sublimado)	0	Inhibición total
11	101	Timol*	0	Inhibición total
11		Testigo	100	
12	55	<i>Litsea glaucescens</i>	100	
12	69	<i>Origanum vulgare</i> *	0	Inhibición total
12	99	<i>Teloxys ambrosioides</i> *	0	Inhibición total
12	76	<i>Piper nigrum</i> *	0	Inhibición total
12	101	<i>Thymus vulgaris</i> *	0	Inhibición total
12	66	<i>Ocimum basilicum</i> *	0	Inhibición total
12	104	<i>Tridax coronopifolia</i>	100	
12	3	<i>Allium cepa</i> *	0	Inhibición total
12	60	<i>Mentha piperita</i> *	0	Inhibición total
12		Testigo	100	

** porcentaje de esporas germinadas

4. 1. 2. Desarrollo micelial con polvos.

A continuación se describen los resultados obtenidos por lotes (Tabla 6).

Lote 1. En este lote hubo una diferencia altamente significativa en la Prueba de Tukey (en cuanto a porcentaje de reducción del crecimiento micelial con respecto al testigo) con los extractos de: *S. aromaticum* (100 %), *B. salicifolia* (82.2 %), *L. tridentata* (92.4 %) y *O. vulgare* (95 %); una reducción menos drástica se presentó con los polvos de *D. stramonium* (68 %), *P. edulis* (66.2 %), *R. raphanistrum* (57 %) y *Ruta chalepensis* (70 %). En *O. vulgare* aparte de la reducción en crecimiento hubo también ausencia de pigmentación y esporulación (Fig. 4) La acción de los polvos de las plantas mencionadas se explica en función a que sus principios activos en un medio semi-sólido no se volatilizan fácilmente como en el extracto acuoso y su acción es más eficiente en el caso de *S. aromaticum* y se hace evidente en las demás plantas. Los diferentes grados de inhibición del desarrollo micelial pueden estar relacionados con las concentraciones de los principios activos que pudieran ser insuficientes para la máxima expresión del efecto. En todas las plantas anteriormente mencionadas existían antecedentes de propiedades antifúngicas sobre otros hongos con excepción de *P. edulis* (Apéndice 1), *J. regia*, *N. oleander*, *F. tecolutensis*, *T. indica* y *E. arvense* que tenían antecedentes como antifúngicas, no inhibieron el crecimiento del hongo; esto se puede explicar en función a lo limitado de su espectro de acción.

Lote 2. En este grupo de plantas hubo 4 especies con diferencia significativa en la prueba de Tukey; el de mayor efecto fungistático fue el extracto de hojas de *A. farnesiana* (76.4 % de reducción del crecimiento) seguido de *S. rostratum* (63 %), *H. rosa-sinensis* (60 %) y *C. album* (57 %). Además, fue notorio en algunos tratamientos como *C. album* y *C. sativum* cambios en la consistencia y coloración del micelio (Fig. 5). En este lote sólo *C. album* y *H. rosa-sinensis* habían demostrado propiedades antifúngicas en extracto acuoso, por lo que se infiere la misma explicación (para los resultados con las otras dos plantas) que lo ocurrido en el primer lote. Las plantas antifúngicas *A. farnesiana*, *C. sativum*, *L. virginicum*, *P. guajava*, y *O. basilicum* no afectaron el crecimiento de *A. flavus*, lo que indica también un limitado espectro de acción.

Lotes 3 y 4. Aquí *C. arabica* dio la diferencia más altamente significativa al causar la inhibición total de esporas y micelio de *A. flavus*. Se presentó fungistasis en *R. officinalis* (70.3 % de reducción del crecimiento), y *P. dioica* (70 %) por lo que se confirman los resultados con sus extractos acuosos y demuestran estabilidad de sus principios activos. En los casos de *L. campestris*, *P. auritum*, *C. zeylanicum*, *E. pulcherrima*, *T. ambrosioides* y *P. granatum* que habían dado resultados como extractos acuosos, aquí no manifestaron su acción antifúngica, debido posiblemente a que durante el proceso de esterilización del medio de cultivo sus principios activos se desnaturalizan, o bien al entrar en contacto con los componentes químicos del medio MSA, reaccionen con algunos de ellos y pierdan su propiedad antifúngica.

Lote 5 y 6. En ninguno de estos dos lotes de plantas se manifestó fungistasis, aquí únicamente había habido resultados en extracto acuoso con *Pinus* sp por lo que se asume la misma explicación que en los lotes anteriores.

Tabla 6. Lotes 1-6. Prueba de Tukey* para área de crecimiento (cm²) de *A. flavus* en medio de cultivo con polvos vegetales.

Lote	No de especie	Especie vegetal	Promedio	% de reducción**
1	17	<i>Baccharis salicifolia</i>	14.0 c	82.2
1	48	<i>Junglans regia</i>	78.5 a	-
1	63	<i>Nerium oleander</i>	78.5 a	-
1	42	<i>Ficus tecolutensis</i>	78.5 a	-
1	6	<i>Amaranthus hybridus</i>	78.5 a	-
1	51	<i>Larrea tridentata</i>	6.0 c	92.4
1	105	<i>Vinca rosea</i>	78.5 a	-
1	88	<i>Ruta chalepensis</i>	23.7 b	70.0
1	12	<i>Ariemisia ludoviciana</i>	78.5 a	-
1	69	<i>Origanum vulgare</i>	4.1 c	95.0
1	64	<i>Nicotiana glauca</i>	78.5 a	-
1	87	<i>Rhynchosia sp.</i>	78.5 a	-
1	36	<i>Datura stramonium</i>	25.2 b	68.0
1	98	<i>Tamarindus indica</i>	78.5 a	-
1	71	<i>Passiflora edulis</i>	26.5 b	66.2
1	96	<i>Syzygium aromaticum</i>	0 c	100.0
1	84	<i>Raphanus raphanistrum</i>	34.1 b	57.0
1	15	<i>Avena fatua</i>	78.5 a	-
1	35	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	78.5 a	-
1	41	<i>Equisetum arvense</i>	78.5 a	-
1		Testigo	78.5 a	-
2	57	<i>Lupinus mutabilis</i>	78.5 a	-
2	82	<i>Pyrostegia venusta</i>	78.5 a	-
2	14	<i>Asclepias glaucescens</i>	78.5 a	-
2	1	<i>Acacia farnesiana</i> (fruto)	78.5 a	-
2	30	<i>Coriandrum sativum</i>	78.5 a	-
2	21	<i>Brassica oleracea</i>	78.5 a	-
2	34	<i>Chenopodium album</i>	33.8 b	57.0
2	53	<i>Lepidium virginicum</i>	78.5 a	-
2	2	<i>Aldama dentata</i>	78.5 a	-
2	80	<i>Psidium guajava</i>	78.5 a	-
2	1	<i>Acacia farnesiana</i> (hojas)	18.5 b	76.4
2	37	<i>Eucalyptus globulus</i>	78.5 a	-
2	94	<i>Solanum rostratum</i>	29.1 b	63.0
2	46	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	31.4 b	60.0
2	66	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5 a	-
2		Testigo	78.5 a	-
3	56	<i>Lupinus campestris</i>	78.5 a	-

Tabla 6. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	Promedio	% de reducción
3	60	<i>Mentha piperita</i>	78.5 a	-
3	78	<i>Portulaca oleracea</i>	78.5 a	-
3	58	<i>Mangifera indica</i>	78.5a	-
3	75	<i>Piper auritum</i>	78.5 a	-
3	86	<i>Rosmarinus officinalis</i>	23.3 b	70.3
3	38	<i>Euphorbia dentata</i>	78.5 a	-
3	73	<i>Pimenta dioica</i>	23.7 b	70.0
3	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	78.5 a	-
3	25	<i>Casuarina equisetifolia</i>	78.5 a	-
3	85	<i>Ricinus communis</i>	78.5 a	-
3	83	<i>Quercus</i> sp.	78.5 a	-
3	67	<i>Opuntia ficus-indica</i>	78.5 a	-
3	40	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	78.5 a	-
3	99	<i>Teloxys ambrosioides</i>	78.5 a	-
3		Testigo	78.5 a	-
4	9	<i>Annona muricata</i>	78.5 a	-
4	13	<i>Asclepias curassavica</i>	78.5 a	-
4	72	<i>Pileus mexicanus</i>	78.5 a	-
4	106	<i>Wigandia urens</i>	78.5 a	-
4	55	<i>Litsea glaucescens</i>	78.5 a	-
4	4	<i>Allium sativum</i>	78.5 a	-
4	22	<i>Byrsonima crassifolia</i>	78.5 a	-
4	11	<i>Argemone mexicana</i>	78.5 a	-
4	20	<i>Brassica nigra</i>	78.5 a	-
4	26	<i>Cestrum nocturnum</i>	78.5 a	-
4	65	<i>Nicotiana tabacum</i>	78.5 a	-
4	3	<i>Allium cepa</i>	78.5 a	-
4	18	<i>Beta vulgaris</i>	78.5 a	-
4	16	<i>Azadirachta indica</i>	78.5 a	-
4	79	<i>Prosopis juliflora</i>	78.5 a	-
4	101	<i>Thymus vulgaris</i>	78.5 a	-
4	28	<i>Coffea arabica</i>	0 b	100.0
4	52	<i>Leucaena leucocephala</i>	78.5 a	-
4	81	<i>Punica granatum</i>	78.5 a	-
4	33	<i>Cyperus rotundus</i>	78.5 a	-
4		Testigo	78.5 a	-
5	23	<i>Carica papaya</i>	78.5 a	-
5	97	<i>Tagetes erecta</i>	78.5 a	-
5	70	<i>Parthenium hysterophorus</i>	78.5 a	-

Tabla 6. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	Promedio	% de reducción
5	74	<i>Pinus</i> sp.	78.5 a	-
5	103	<i>Tribulus cistoides</i>	78.5 a	-
5	90	<i>Sanvitalia procumbens</i>	78.5 a	-
5	95	<i>Spathodea campanulata</i>	78.5 a	-
5	61	<i>Mimosa tenuiflora</i>	78.5 a	-
5	77	<i>Pithecellobium dulce</i>	78.5 a	-
5	62	<i>Nephrolepis</i> sp.	78.5 a	-
5	102	<i>Tournefortia densiflora</i>	78.5 a	-
5	49	<i>Kallstroemia maxima</i>	78.5 a	-
5	24	<i>Cassia</i> sp.	78.5 a	-
5	39	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	78.5 a	-
5	100	<i>Tillandsia usneoides</i>	78.5 a	-
5	89	<i>Salvia riparia</i>	78.5 a	-
5	43	<i>Gomphrena</i> sp.	78.5 a	-
5	19	<i>Brassica napus</i>	78.5 a	-
5	68	<i>Origanum majorana</i>	78.5 a	-
5	7	<i>Amaranthus sanguineus</i>	78.5 a	-
5		Testigo	78.5 a	-
6	54	<i>Ligustrum japonicum</i>	78.5 a	-
6	31	<i>Cucumis melo</i>	78.5 a	-
6	91	<i>Satureja macrostema</i>	78.5 a	-
6	10	<i>Arachis hypogaea</i>	78.5 a	-
6	45	<i>Heterotheca inuloides</i>	78.5 a	-
6	8	<i>Amphipterygium adstringens</i>	78.5 a	-
6	29	<i>Coleus blumei</i>	78.5 a	-
6	47	<i>Hippocratea excelsa</i>	78.5 a	-
6	5	<i>Aloe barbadensis</i>	78.5 a	-
6	59	<i>Marrubium vulgare</i>	78.5 a	-
6	44	<i>Gnaphalium</i> sp.	78.5 a	-
6	50	<i>Lantana camara</i>	78.5 a	-
6	32	<i>Cynodon dactylon</i>	78.5 a	-
6	92	<i>Sida rhombifolia</i>	78.5 a	-
6	93	<i>Solanum verbascifolium</i>	78.5 a	-
6	104	<i>Tridax coronopifolia</i>	78.5 a	-
6	76	<i>Piper nigrum</i>	78.5 a	-
6		Testigo	78.5 a	-

*Tratamientos con la misma letra dentro de cada lote experimental no tienen diferencia estadísticamente significativa. **Con relación al testigo

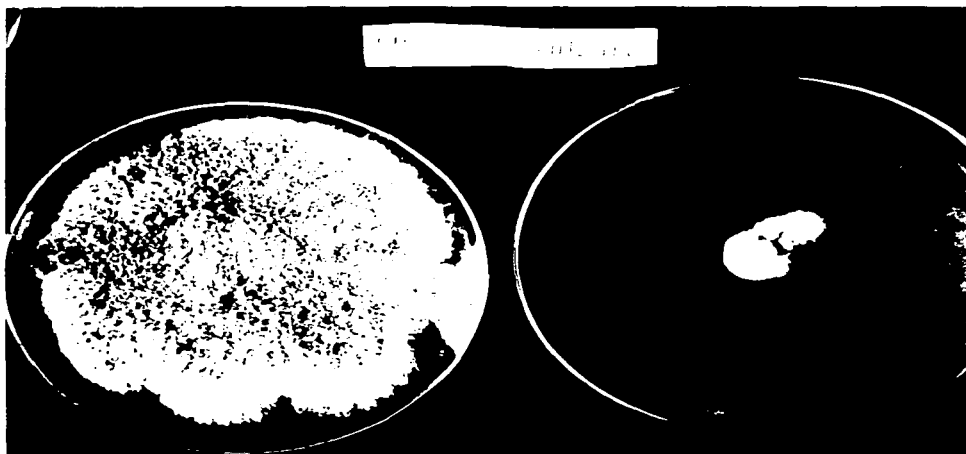


Figura. 4. Efecto del polvo de *Origanum vulgare*.(derecha) en el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* después de 5 días de incubación comparado con el testigo (izquierda).



Figura. 5. Diferencias de coloración de *Aspergillus flavus* en medio con polvos de: *Chenopodium album*, *Coriandrum sativum*, y *Eucalyptus globulus*.

4. 1. 3. Desarrollo micelial con extractos hexánicos.

A continuación se describen los resultados encontrados por lote (Tabla 7).

Lote 1. Únicamente dos extractos: los de *P. dioica* y *A. dentata* redujeron el porcentaje de crecimiento micelial en relación al testigo, sin embargo, no tuvieron diferencia estadísticamente significativa, aun cuando biológicamente estos porcentajes (45 y 58 %, respectivamente) si sean de consideración, lo que implica que en la primera especie además de los principios activos solubles en agua, existen otros solubles en hexano y la segunda especie se reporta por primera vez con esta propiedad. La no inhibición en *E. globulus* y *O. basilicum* puede estar relacionada con el efecto de la temperatura de esterilización del medio de cultivo en sus principios activos, ya sea desnaturalizándolos o bien ocasionando su evaporación, esto en función de que los aceites esenciales de estas plantas causaron inhibición total de sus esporas (Tabla 5).

Lote 2. En este lote nuevamente *S. aromaticum* tuvo diferencia significativa con el testigo en función a su efecto fungicida, evitando totalmente el crecimiento del hongo, lo que refuerza los resultados anteriores con su aceite esencial y extracto acuoso. *H. rosa-sinensis* (59 % de reducción con relación al testigo) y *C. zeylanicum* (80.2 %) tuvieron un efecto fungistático, por lo que se asume que sus principios activos son de naturaleza polar y no polar ya que también dieron resultado en extracto acuoso y descarta la posible acción de compuestos lipídicos. La ausencia de resultados con *M. piperita* (que resultó eficiente en forma de aceite esencial) indican inestabilidad térmica de sus principios activos.

Lote 3. En este lote sólo *Rosmarinus officinalis* (55 %), tuvo diferencia estadística con el testigo y también se presentó cierto grado de fungistasis en: *Origanum vulgare* (28 %), *Solanum rostratum* (26.4 %) y *Larrea tridentata* (40.4 %). En estos últimos 2 tratamientos y *O. vulgare* y *O. majorana* se presentó en la mitad de las repeticiones un cambio en la consistencia y coloración de la colonia, siendo que en lugar del color verde amarillento y el aspecto polvoso de la colonia, hubo en dichos tratamientos un color blanco en toda la colonia (con excepción de la parte central) y una consistencia algodonosa, lo que implica que hay otras alteraciones metabólicas aparte de la inhibición del crecimiento.

Lote 4. Aquí tampoco se obtuvieron tratamientos con diferencia estadística con el testigo, únicamente *Cynodon dactylon* y *Punica granatum* redujeron moderadamente el desarrollo de *A. flavus* (26.4 %), por lo que se asume que con el otro extracto que dió resultados en forma de aceite esencial *Thymus vulgaris* sus principios activos son termolábiles.

Lote 5. Ninguno de los extractos de este lote tuvo efecto inhibitorio del desarrollo, por lo que se descartan para pruebas posteriores.

Lote 6. En este grupo de tratamientos hubo en general un menor desarrollo que los anteriores lotes lo cual puede deberse a que durante esta prueba se presentaron temperaturas menores a las que habían ocurrido, sin embargo, en comparación al testigo hubo un tratamiento

estadísticamente diferente *Piper nigrum* (85.3 %) y otro *Ruta chalepensis* (72.1 %) redujo notablemente el crecimiento del micelio.

De las 106 especies de plantas sólo dos tuvieron efecto antifúngico claro y otras once aparentemente también lo tienen, sin embargo, el porcentaje es muy bajo comparado con el obtenido en extractos acuosos y polvos, esto implica que quizá se pueda mejorar esta metodología en trabajos futuros añadiendo el extracto después de la esterilización mediante filtros bacteriológicos para descartar la posibilidad de desnaturalización de los principios activos de las plantas. La mayoría de los investigadores en esta línea de investigación con extractos antifúngicos, utilizan como solventes etanol, metanol, agua o hexano y no hay intentos de utilizar solventes de polaridad intermedia como el cloroformo, la acetona o el acetato de etilo que podían extraer otro tipo de compuestos, lo que también se podría mejorar con mezclas de solventes de diferente polaridad (Valencia, 1995).

Tabla 7. Prueba de Tukey* para área de crecimiento (cm²) de *A. flavus* en medio MSA con extractos hexánicos.

Lote	No. de especie	Especie vegetal	Prom.	% de reducción **
1	34	<i>Chenopodium album</i>	78.5 a	-
1	37	<i>Eucalyptus globulus</i>	78.5 a	-
1	66	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5 a	-
1	53	<i>Lepidium virginicum</i>	78.5 a	-
1	73	<i>Pimenta dioica</i>	43.3 a	45.0
1	2	<i>Aldama dentata</i>	33.2 a	58.0
1	78	<i>Portulaca oleracea</i>	78.5 a	-
1	1	<i>Acacia farnesiana</i>	78.5 a	-
1	14	<i>Asclepias glaucescens</i>	78.5 a	-
1	58	<i>Mangifera indica</i>	78.5 a	-
1	100	<i>Tillandsia usneoides</i>	78.5	-
1		Testigo	78.5 a	-
2	46	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	32.1 b	59.0
2	85	<i>Ricinus communis</i>	78.5 a	-
2	84	<i>Raphanus raphanistrum</i>	78.5 a	-
2	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	15.5 b	80.2
2	42	<i>Ficus tecolutensis</i>	78.5 a	-
2	60	<i>Mentha piperita</i>	78.5 a	-
2	36	<i>Datura stramonium</i>	78.5 a	-
2	80	<i>Psidium guajava</i>	78.5 a	-
2	30	<i>Coriandrum sativum</i>	78.5 a	-
2	48	<i>Juglans regia</i>	78.5 a	-
2	6	<i>Amaranthus hybridus</i>	78.5 a	-
2	62	<i>Nephrolepis</i> sp.	78.5 a	-

Tabla 7. (Continuación).

Tabla 7. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	Prom.	% de reducción**
2	21	<i>Brassica oleracea</i>	78.5 a	-
2	102	<i>Tournefortia densiflora</i>	78.5 a	-
2	25	<i>Casuarina equisetifolia</i>	78.5 a	-
2	82	<i>Pyrostegia venusta</i>	78.5 a	-
2	41	<i>Equisetum arvense</i>	78.5 a	-
2	96	<i>Syzygium aromaticum</i>	0 b	100.0
2	15	<i>Avena fatua</i>	78.5 a	-
2	83	<i>Quercus</i> sp.	78.5 a	-
2	87	<i>Rhynchosia</i> sp.	78.5 a	-
2		Testigo	78.5 a	-
3	98	<i>Tamarindus indica</i>	78.5 a	-
3	105	<i>Vinca rosea</i>	78.5 a	-
3	69	<i>Origanum vulgare</i>	56.5 a	28.0
3	64	<i>Nicotiana glauca</i>	78.5 a	-
3	71	<i>Passiflora edulis</i>	78.5 a	-
3	56	<i>Lupinus campestris</i>	78.5 a	-
3	95	<i>Spathodea campanulata</i>	78.5 a	-
3	98	<i>Tamarindus indica</i>	78.5 a	-
3	86	<i>Rosmarinus officinalis</i>	35.5 b	55.0
3	1	<i>Acacia farnesiana (H)</i>	78.5 a	-
3	68	<i>Origanum majorana</i>	78.5 a	-
3	20	<i>Brassica nigra</i>	78.5 a	-
3	70	<i>Parthenium hysterophorus</i>	78.5 a	-
3	38	<i>Euphorbia dentata</i>	78.5 a	-
3	63	<i>Nerium oleander</i>	78.5 a	-
3	94	<i>Solanum rostratum</i>	57.7 a	-
3	12	<i>Artemisia ludoviciana</i>	78.5 a	-
3	35	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	78.5 a	-
3	43	<i>Gomphrena</i> sp.	78.5 a	-
3	17	<i>Baccharis salicifolia</i>	78.5 a	-
3	51	<i>Larrea tridentata</i>	46.8 a	40.4
3	18	<i>Beta vulgaris</i>	78.5 a	-
3	97	<i>Tagetes erecta</i>	78.5 a	-
4		Testigo	78.5 a	-
4	93	<i>Solanum verbascifolium</i>	78.5 a	-
4	22	<i>Byrsonima crassifolia</i>	78.5 a	-
4	92	<i>Sida rhombifolia</i>	78.5 a	-
4	23	<i>Carica papaya</i>	78.5 a	-

Tabla 7 (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	Prom.	% de reducción**
4	26	<i>Cestrum nocturnum</i>	78.5 a	-
4	61	<i>Mimosa tenuiflora</i>	78.5 a	-
4	91	<i>Satureja macrostema</i>	78.5 a	-
4	81	<i>Punica granatum</i>	57.7 a	26.4
4	10	<i>Arachis hypogaea</i>	78.5 a	-
4	3	<i>Allium cepa</i>	78.5 a	-
4	101	<i>Thymus vulgaris</i>	78.5 a	-
4	103	<i>Tribulus cistoides</i>	78.5 a	-
4	77	<i>Pithecellobium dulce</i>	78.5 a	-
4	55	<i>Litsea glaucescens</i>	78.5 a	-
4	31	<i>Cucumis melo</i>	78.5 a	-
4	24	<i>Cassia sp.</i>	78.5 a	-
4	89	<i>Salvia riparia</i>	78.5 a	-
4	33	<i>Cyperus rotundus</i>	78.5 a	-
4	32	<i>Cynodon dactylon</i>	57.7 a	26.4
4	54	<i>Ligustrum japonicum</i>	78.5 a	-
4	49	<i>Kallstroemia maxima</i>	78.5 a	-
5		Testigo	78.5 a	-
5	11	<i>Argemone mexicana</i>	78.5 a	-
5	87	<i>Opuntia ficus-indica</i>	78.5 a	-
5	65	<i>Nicotiana tabacum</i>	78.5 a	-
5	90	<i>Sanvitalia procumbens</i>	78.5 a	-
5	13	<i>Asclepias curassavica</i>	78.5 a	-
5	23	<i>Carica papaya</i>	78.5 a	-
5	80	<i>Psidium guajava</i>	78.5 a	-
5	16	<i>Azadirachta indica</i>	78.5 a	-
5	8	<i>Amphipterygium adstringens</i>	78.5 a	-
5	74	<i>Pinus sp.</i>	78.5 a	-
5	2	<i>Aldama dentata</i>	78.5 a	-
5	53	<i>Lepidium virginicum</i>	78.5 a	-
5	19	<i>Brassica napus</i>	78.5 a	-
5	66	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5 a	-
5	39	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	78.5 a	-
5		Testigo	78.5 a	-
6	52	<i>Leucaena leucocephala</i>	25.4 a	-
6	4	<i>Allium sativum</i>	22.8 a	-

Tabla 7. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	Prom.	% de reducción**
6	57	<i>Lupinus mutabilis</i>	25.6 a	-
6	45	<i>Heterotheca inuloides</i>	17.5 a	-
6	44	<i>Gnaphalium</i> sp.	20.6 a	-
6	59	<i>Marrubium vulgare</i>	26.6 a	-
6	79	<i>Prosopis juliflora</i>	22.7 a	-
6	7	<i>Amaranthus sanguineus</i>	22.8 a	-
6	47	<i>Hippocratea excelsa</i>	22.9 a	-
6	76	<i>Piper nigrum</i>	3.9 b	85.3
6	28	<i>Coffea arabica</i>	25.4 a	-
6	9	<i>Anona muricata</i>	25.0 a	-
6	40	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	34.8 a	-
6	75	<i>Piper auritum</i>	22.6 a	-
6	99	<i>Teloxys ambrosioides</i>	33.7 a	-
6	88	<i>Ruta chalepensis</i>	7.4 a	72.1
6	104	<i>Tridax coronopifolia</i>	35.7 a	-
6	50	<i>Lantana camara</i>	30.7 a	-
6	5	<i>Aloe barbadensis</i>	26.2 a	-
6	29	<i>Coleus blumei</i>	31.2 a	-
6		Testigo	26.5 a	-

*Tratamientos con la misma letra dentro de cada lote experimental no tienen diferencia estadísticamente significativa. ** Con relación al testigo.

4. 1. 4. Protección de granos de maíz

4. 1. 4. 1 Extractos acuosos y aceites esenciales.

A continuación se presentan los resultados por lotes con el mismo arreglo de tratamientos de las pruebas de germinación y desarrollo micelial (Tabla 8). En el lote 1 se presentó una ligera reducción de la contaminación en *Nicotiana glauca* (12.6 %) y *Portulaca oleracea* (11.3 %) que no es estadísticamente significativa y está en función del manejo experimental. En los lotes 2 y 4 se presentó una situación similar con *Cynodon dactylon* (5.1 %), *Rhynchosia* sp. (7.8 %) y *Passiflora edulis* (11.2 %) y en el lote 3 no hubo ninguna respuesta a los extractos, por lo que estos resultados confirman los obtenidos en las pruebas de germinación de esporas e indican en el caso de *Pinus* sp. que el efecto fungistático no es suficiente para detener el crecimiento del hongo en el maíz. En el lote 5 se presentaron varios tratamientos con reducciones de contaminación

mayores del 20 %: *Psidium guajava* (23.3 %), *Coffea arabica* fruto integral (24.2 %), *Euphorbia dentata* (27.4%) aún cuando ninguno de ellos tuvo diferencia significativa con el testigo y el más notable fue *Rosmarinus officinalis* (61 %) que sí dió diferencia significativa; ninguno de estos tratamientos había dado resultados en las pruebas de germinación de esporas y desarrollo micelial, por lo que se infiere que la acción de sus principios activos está relacionada con la penetración de la hifa infectiva o con la colonización de los tejidos internos de la semilla; de estas especies existen reportes de actividad antifúngica en las dos primeras y *R. officinalis* (Cáceres *et al.*, 1991; Moruzumi *et al.*, 1989) y se reportan por primera vez en *E. dentata*. En el lote 6 a pesar de que *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* habían dado resultado parcial en las pruebas de germinación de esporas y de que *Piper nigrum* y *Origanum vulgare* habían manifestado fungistasis en las mismas, esto no se reflejó en la protección de granos, debido probablemente a la inestabilidad de sus principios activos en extracto acuoso, por un período de tiempo como el usado para esta prueba (5 días). Esta situación se repitió en los lotes 7 y 8 en donde los grupos de plantas que habían manifestado inhibición de la germinación o fungistasis en extracto acuoso como: *Chenopodium album*, *Lepidium virginicum*, *Teloxys ambrosioides*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Amaranthus hybridus* y *Ligustrum japonicum*, en esta prueba de protección de granos no dieron resultados promisorios. En el lote 9 sólo *Raphanus raphanistrum* tuvo una reducción de la contaminación promisoriosa (28.2 %), por lo que se constituyó en un extracto susceptible de mejorar su acción con las pruebas de dosis óptima y demás pruebas de técnicas de manejo. En el lote 10 destacó *Larrea tridentata* (48.1 %) que sí dió diferencia significativa y confirmó sus propiedades observadas en las pruebas de germinación de esporas, lo cual no ocurrió con *Pimenta dioica*, *Nicotiana tabacum* y *Mangifera indica*, lo cual se puede explicar por una parte, por la inestabilidad de sus principios activos o bien porque las pocas esporas que germinan son suficientes para desarrollar una contaminación amplia y esto no ocurre con *L. tridentata* porque también es capaz de detener la colonización de los tejidos por las esporas que germinan. En este lote también destacó *Coleus blumei* (40.3 %) por reducir la contaminación significativamente; en tanto que *Marrubium vulgare* (22.7 %) y *Lantana camara* (20 %), si bien no tuvieron un efecto antigerminativo fueron capaces de detener la colonización de los tejidos internos en forma parcial. En los lotes 11 y 12 (Tabla 9) la mayor parte de los aceites esenciales (*Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, *Teloxys ambrosioides*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* y *Mentha piperita*) mostraron una alta eficiencia en el control de *Aspergillus flavus* obteniéndose con ellos 100 % de control (Fig. 6). Hubo un control cercano al 50 % en *Eucalyptus globulus* y *Piper nigrum*, lo que muestra problemas posiblemente de volatilidad de sus principios activos y en *Allium cepa* se observó un efecto nulo, lo cual no coincide con los resultados de Hassan & Mahmoud (1993) quienes encontraron que el aceite de *A. cepa* suprime la producción de lipasas y el desarrollo de *A. parasiticus* y *A. fumigatus* por lo que se infiere que en *A. flavus* existen mecanismos de destoxicación de los componentes antifúngicos del aceite de *A. cepa*. En el caso de *Coffea arabica* (despulpado y sublimado) que tuvo un efecto antigerminativo al 100 %, en esta prueba redujo la contaminación en 43.6 % lo que indica que es factible mejorar su eficiencia con técnicas de manejo. Los aceites esenciales presentaron el inconveniente de su olor penetrante por un período de tiempo considerable, sin embargo, esto se puede evitar con pruebas de efecto residual durante períodos de tiempo largo o también como sucedió con el timol (metabolito derivado de *Thymus vulgaris*, que se incluyó en las pruebas) separar sus principios activos para evitar este problema.

**Tabla 8. Lotes 1-10. Efecto de fitoextractos acuosos en la protección de granos de maíz
Prueba de Tukey para porcentaje de granos contaminados.**

Lote	No. d especie	Especie vegetal	% de Cont.*	% de Red.**
1	23	<i>Carica papaya</i>	72.0 a	0
1	16	<i>Azadirachta indica</i>	79.0 a	0
1	64	<i>Nicotiana glauca</i>	62.0 a	12.6
1	13	<i>Asclepias curassavica</i>	70.0 a	2.0
1	85	<i>Ricinus communis</i>	77.0 a	0
1		Testigo	71.0 a	-
1	77	<i>Pithecellobium dulce</i>	85.0 a	0
1	97	<i>Tagetes erecta</i>	83.0 a	0
1	11	<i>Argemone mexicana</i>	85.0 a	0
1	78	<i>Portulaca oleracea</i>	63.0 a	11.3
1	72	<i>Pileus mexicanus</i>	90.0 a	0
2	93	<i>Solanum verbascifolium</i>	85.7 a	0
2	32	<i>Cynodon dactylon</i>	81.0 a	5.1
2	22	<i>Byrsonima crassifolia</i>	86.8 a	0
2	20	<i>Brassica nigra</i>	92.5 a	0
2	106	<i>Wigandia urens</i>	87.2 a	0
2	62	<i>Nephrolepis</i> sp.	86.5 a	0
2	102	<i>Tournefortia densiflora</i>	86.5 a	0
2	9	<i>Annona muricata</i>	98.4 a	0
2	41	<i>Equisetum arvense</i>	82.3 a	3.6
2	79	<i>Prosopis juliflora</i>	85.0 a	0.5
2		Testigo	85.4 a	-
3	74	<i>Pinus</i> sp.	96.7 a	0
3	92	<i>Sida rhombifolia</i>	99.2 a	0

Tabla 8. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% de Cont.*	% de Red.**
3	98	<i>Tamarindus indica</i>	91.1 a	0
3	4	<i>Allium sativum</i>	100 a	0
3	70	<i>Parthenium hysterophorus</i>	100 a	0
3	24	<i>Cassia</i> sp.	99.1 a	0
3	63	<i>Nerium oleander</i>	91.9 a	0
3	1	<i>Acacia farnesiana</i>	100 a	0
3	49	<i>Kallstroemia maxima</i>	100 a	0
3	103	<i>Tribulus cistoides</i>	98.3 a	0
3		Testigo	95.5 a	-
4	87	<i>Rhynchosia</i> sp.	58.8 a	7.8
4	39	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	73.9 a	0
4	100	<i>Tillandsia usneoides</i>	75.8 a	0
4	26	<i>Cestrum nocturnum</i>	78.3 a	0
4	25	<i>Casuarina equisetifolia</i>	56.9 a	10.8
4	88	<i>Ruta chalepensis</i>	52.9 a	17.1
4	89	<i>Salvia riparia</i>	68.0 a	0
4	71	<i>Passiflora edulis</i>	56.6 a	11.2
4	3	<i>Allium cepa</i>	71.8 a	0
4	43	<i>Gomphrena</i> sp.	69.7 a	0
4		Testigo	63.8 a	-
5	86	<i>Rosmarinus officinalis</i>	35.9 b	61.0
5	35	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	84.2 a	8.6
5	28	<i>Coffea arabica</i> (fruto integral)	69.9 a	24.2
5	15	<i>Avena fatua</i>	87.0 a	5.6

Tabla 8. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% de Cont.*	% de Red.**
5	1	<i>Acacia farnesiana</i>	77.1 a	9.6
5	94	<i>Solanum rostratum</i>	89.3 a	3.1
5	105	<i>Vinca rosea</i>	87.6 a	4.9
5	80	<i>Psidium guajava</i>	70.7 a	23.3
5	21	<i>Brassica oleracea</i>	86.5 a	6.2
5	38	<i>Euphorbia dentata</i>	66.9 a	27.4
5		Testigo	92.2 a	--
6	101	<i>Thymus vulgaris</i>	79.4 a	1.2
6	19	<i>Brassica napus</i>	89.3 a	0
6	2	<i>Aldama dentata</i>	68.4 a	14.9
6	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	79.8 a	0.6
6	60	<i>Mentha piperita</i>	76.6 a	4.6
6	76	<i>Piper nigrum</i>	71.5 a	10.9
6	66	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5 a	2.2
6	96	<i>Syzygium aromaticum</i>	75.8 a	0.6
6	69	<i>Origanum vulgare</i>	84.0 a	0
6	68	<i>Origanum majorana</i>	80.3 a	0
6		Testigo	80.3 a	-
7		Testigo	96.7 a	-
7	54	<i>Ligustrum japonicum</i>	96.5 a	0
7	90	<i>Sanvitalia procumbens</i>	94.2 a	2.6
7	52	<i>Leucaena leucocephala</i>	97.5 a	0
7	34	<i>Chenopodium album</i>	93.3 a	3.5
7	7	<i>Amaranthus sanguineus</i>	94.1 a	2.7

Tabla 8. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% de Cont.*	% de Red.**
7	18	<i>Beta vulgaris</i>	93.3 a	3.5
7	95	<i>Spathodea campanulata</i>	95.0 a	1.7
7	53	<i>Lepidium virginicum</i>	98.4 a	0
7	99	<i>Teloxys ambrosioides</i>	96.8 a	0
7	46	<i>Hibiscus rosa -sinensis</i>	94.2 a	2.5
7	6	<i>Amaranthus hybridus</i>	82.2 a	14.9
7	76	<i>Piper nigrum</i>	93.2 a	3.6
8	31	<i>Cucumis melo</i>	79.3 a	0
8	81	<i>Punica granatum</i>	84.3 a	0
8	33	<i>Cyperus rotundus</i>	72.5 a	0
8	67	<i>Opuntia ficus-indica</i>	46.2 a	18.3
8	30	<i>Coriandrum sativum</i>	90.0 a	0
8	82	<i>Pyrostegia venusta</i>	91.9 a	0
8	61	<i>Mimosa tenuiflora</i>	89.6 a	0
8	37	<i>Eucalyptus globulus</i>	70.3 a	0
8	14	<i>Asclepias glaucescens</i>	87.5 a	0
8	91	<i>Satureja macrostema</i>	64.7 a	0
8	10	<i>Arachis hypogaea</i>	72.5 a	0
8	40	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	67.5 a	0
8		Testigo	56.6 a	-
9		Testigo	90.9 a	-
9	45	<i>Heterotheca inuloides</i>	91.8 a	0
9	17	<i>Baccharis salicifolia</i>	76.1 a	15.6
9		<i>Juglans regia</i>	76.7 a	9.6
9	56	<i>Lupinus campestris</i>	93.3 a	0
9	36	<i>Datura stramonium</i>	88.3 a	2.8

Tabla 8. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% de Cont.*	% de Red.**
9	57	<i>Lupinus mutabilis</i>	90.0 a	0
9	84	<i>Raphanus raphanistrum</i>	65.2 a	28.2
9	8	<i>Amphipterygium adstringens</i>	100 a	0
9	12	<i>Artemisia ludoviciana</i>	79.6 a	12.4
9	42	<i>Ficus tecolutensis</i>	94.2 a	0
10	51	<i>Larrea tridentata</i>	44.9 b	48.1
10	29	<i>Coleus blumei</i>	51.6 b	40.3
10	5	<i>Aloe barbadensis</i>	94.1 a	0
10	59	<i>Marrubium vulgare</i>	66.9 a	22.7
10	65	<i>Nicotiana tabacum</i>	80.6 a	0
10	73	<i>Pimenta dioica</i>	74.5 a	13.9
10	44	<i>Gnaphalium</i> sp.	91.5 a	0
10	50	<i>Lantana camara</i>	69.3 a	20.0
10	58	<i>Mangifera indica</i>	90.9 a	0
10	83	<i>Quercus</i> sp.	91.7 a	0
10		Testigo	86.6 a	-

* % de Cont.= Porcentaje de contaminación.

** % de Red.= Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo.

Tabla 9. Lotes 11 y 12. Efecto de fitoextractos acuosos y aceites esenciales en la protección de granos de maíz. Prueba de Tukey para porcentaje de contaminación.

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% de Cont.*	% de Red.**
11	96	<i>Syzygium aromaticum</i> *	0 c	100.0
11	47	<i>Hippocratea excelsa</i>	95.7 a	0
11	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> *	0 c	100.0
11	37	<i>Eucalyptus globulus</i> *	42.8 b	52.8
11	28	<i>Coffea arabica</i> (m.s.)	51.2 b	43.6
11	101	Timol*	0 c	100.0
11		Testigo	90.8 a	-
12	55	<i>Litsea glaucescens</i>	49.0 a	18.0
12	69	<i>Origanum vulgare</i> *	0 c	100.0
12	99	<i>Teloxys ambrosioides</i> *	0 c	100.0
12	76	<i>Piper nigrum</i> *	35.0 b	42.0
12	101	<i>Thymus vulgaris</i> *	0 c	100.0
12	66	<i>Ocimum basilicum</i> *	0 c	100.0
12	104	<i>Tridax coronopifolia</i>	34.0 b	43.0
12	3	<i>Allium cepa</i> *	65.0 a	0
12	60	<i>Mentha piperita</i> *	0 c	100.0
12		Testigo	60.0 a	-

m.s. = Molido y sublimado

*** aceites esenciales.**

* % de Cont.= Porcentaje de contaminación.

** % de Red.= Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo.

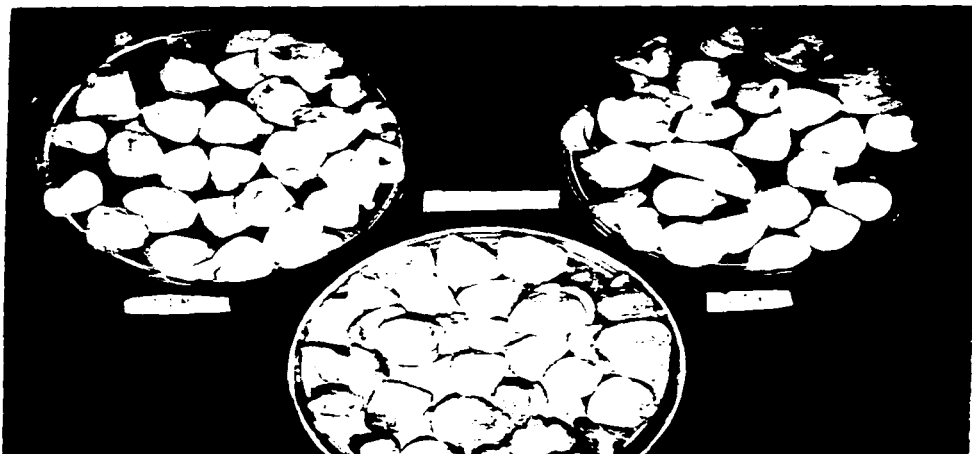


Figura 6. Efecto del aceite de clavo y el metabolito timol en la protección de granos de maíz comparados con el testigo.

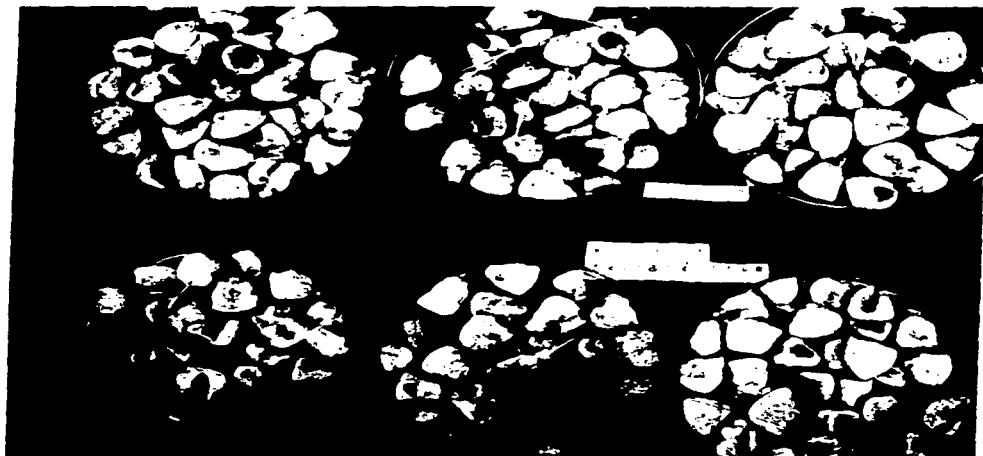


Figura 7. Efecto del extracto de *Raphanus raphanistrum* en la protección de granos, comparado con el testigo.

4. 1. 4.2. Extractos hexánicos.

Los resultados por lotes (Tabla 10) fueron los siguientes: en el lote 1 no hubo ningún tratamiento que mostrara efecto protector, sin embargo, como se puede observar, hubo una muy baja infección en el testigo (10.8 %), lo cual posiblemente se debió a que los granos de maíz no se humedecieron antes de las pruebas, lo que implicó que su contenido de humedad fuera insuficiente y en consecuencia los resultados sean inconsistentes. En el lote 2 sólo *Mentha piperita* tuvo una reducción mayor al 20 % lo que implica que su principio activo el mentol, obtenido con el extracto hexánico está en cantidades pequeñas, algo semejante debe ocurrir con *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* en donde el efecto fue muy pobre en la primera especie y nulo en la segunda. En el lote 3 no hubo tratamientos que protegieran los granos de maíz, por lo que en los casos de *Rosmarinus officinalis* y *Larrea divaricata* (que dieron resultados prometedores en extractos acuosos) se confirma que sus principios activos son polares. En cuanto a *Origanum vulgare* se asume que ocurre lo mismo que con las especies mencionadas del lote 2. En los lotes 4 a 6 no hubo ningún efecto protector por lo que se descartan estos tratamientos para pruebas posteriores.

Por otra parte, el hecho de que ninguno de los tratamientos hallan dado diferencias significativas, no obstante que algunos de ellos (como *Hibiscus rosa-sinensis*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Piper nigrum*) se diferenciaron estadísticamente del testigo en las pruebas de desarrollo micelial, implica posiblemente problemas para penetrar tejidos internos y cubrir uniformemente la superficie de los granos, ya que al volatilizarse el solvente el extracto pudo haberse concentrado sobre determinadas áreas de esa superficie y dejar otras sin protección, donde el hongo pudo haber penetrado sin dificultad.

Tabla 10. Lotes 1-6. Efecto de fitoextractos hexánicos en la protección de granos de maíz. Prueba de Tukey para porcentaje de granos contaminados.

Lote	No. de especie	Especie vegetal	* % de Cont.	** % de Red.
1	34	<i>Chenopodium album</i>	78.3 a	0
1	37	<i>Eucalyptus globulus</i>	72.2 a	0
1	66	<i>Ocimum basilicum</i>	42.6 a	0
1	53	<i>Lepidium virginicum</i>	27.1 a	0
1		<i>Pimenta dioica</i>	80.8 a	0

Tabla 10. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	* % de Cont.	** % de Red.
1	2	<i>Aldama dentata</i>	39.0 a	0
1	78	<i>Portulaca oleracea</i>	44.0 a	0
1	1	<i>Acacia farnesiana</i>	40.1 a	0
1	14	<i>Asclepias glaucescens</i>	31.0 a	0
1	58	<i>Mangifera indica</i>	91.8 a	0
1		Testigo	10.8 a	-
2	46	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	100 a	0
2	85	<i>Ricinus communis</i>	100 a	0
2	84	<i>Raphanus raphanistrum</i>	100 a	0
2	27	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	90.9 a	9.1
2	42	<i>Ficus tecolutensis</i>	95.0 a	5.0
2	60	<i>Mentha piperita</i>	76.2 a	23.8
2	36	<i>Datura stramonium</i>	100 a	0
2	21	<i>Brassica oleracea</i>	100 a	0
2	80	<i>Psidium guajava</i>	100 a	0
2	30	<i>Coriandrum sativum</i>	100 a	0
2	48	<i>Juglans regia</i>	100 a	0
2	4	<i>Allium sativum</i>	100 a	0
2	25	<i>Casuarina equisetifolia</i>	100 a	0

Tabla 10. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	* % de Cont.	** % de Red.
2	6	<i>Amaranthus hybridus</i>	100 a	0
2	82	<i>Pyrostegia venusta</i>	98.2 a	1.7
2	41	<i>Equisetum arvense</i>	100 a	0
2	96	<i>Syzygium aromaticum</i>	100 a	0
2	15	<i>Avena fatua</i>	100 a	0
2	83	<i>Quercus</i> sp.	100 a	0
2	87	<i>Rhynchosia</i> sp.	100 a	0
2		Testigo	100 a	0
3	98	<i>Tamarindus indica</i>	100 a	0
3	105	<i>Vinca rosea</i>	100 a	0
3	69	<i>Origanum vulgare</i>	100 a	0
3	64	<i>Nicotiana glauca</i>	100 a	0
3	71	<i>Passiflora edulis</i>	100 a	0
3	56	<i>Lupinus campestris</i>	100 a	0
3	86	<i>Rosmarinus officinalis</i>	100 a	0
3	1	<i>Acacia farnesiana</i> (H)	100 a	0
3	69	<i>Origanum majorana</i>	100 a	0
3	20	<i>Brassica nigra</i>	100 a	0
3	70	<i>Parthenium hysterophorus</i>	100 a	0

Tabla 10. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	* % de Cont.	** % de Red.
3	38	<i>Euphorbia dentata</i>	100 a	0
3	63	<i>Nerium oleander</i>	100 a	0
3	94	<i>Solanum rostratum</i>	100 a	0
3	12	<i>Artemisia ludoviciana</i>	100 a	0
3	35	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	100 a	0
3	43	<i>Gomphrena</i> sp.	100 a	0
3	17	<i>Baccharis salicifolia</i>	100 a	0
3	51	<i>Larrea tridentata</i>	100 a	0
3	18	<i>Beta vulgaris</i>	100 a	0
3		Testigo	100 a	0
4	93	<i>Solanum verbascifolium</i>	100 a	0
4	22	<i>Byrsonima crassifolia</i>	100 a	0
4	92	<i>Sida rhombifolia</i>	100 a	0
4	23	<i>Carica papaya</i>	100 a	0
4	61	<i>Mimosa tenuiflora</i>	100 a	0
4	26	<i>Cestrum nocturnum</i>	100 a	0
4	81	<i>Punica granatum</i>	100 a	0
4	10	<i>Arachis hypogaea</i>	100 a	0
4	3	<i>Allium cepa</i>	100 a	0

Tabla 10. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	* % de Cont.	** % de Red.
4	101	<i>Thymus vulgaris</i>	100 a	0
4	103	<i>Tribulus cistoides</i>	100 a	0
4	77	<i>Pithecellobium dulce</i>	100 a	0
4	55	<i>Litsea glaucescens</i>	100 a	0
4	31	<i>Cucumis melo</i>	100 a	0
4	24	<i>Cassia sp.</i>	100 a	0
4	89	<i>Salvia riparia</i>	100 a	0
4	33	<i>Cyperus rotundus</i>	100 a	0
4	32	<i>Cynodon dactylon</i>	100 a	0
4	54	<i>Ligustrum japonicum</i>	100 a	0
4	49	<i>Kallstroemia maxima</i>	100	0
4		Testigo	100	0
5	11	<i>Argemone mexicana</i>	100	0
5	39	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	100	0
5	52	<i>Leucaena leucocephala</i>	100	0
5	65	<i>Nicotiana tabacum</i>	100	0
5	57	<i>Lupinus mutabilis</i>	100	0
5	59	<i>Marrubium vulgare</i>	100	0

Tabla 10. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	* % de Cont.	** % de Red.
5	62	<i>Nephrolepis</i> sp.	100	0
5	67	<i>Opuntia ficus-indica</i>	100	0
5	68	<i>Origanum majorana</i>	100	0
5	8	<i>Amphypterygium adstringens</i>	100	0
5	72	<i>Pileus mexicana</i>	100	0
5	74	<i>Pinus</i> sp.	100	0
5	79	<i>Prosopis juliflora</i>	100	0
5	90	<i>Sanvitalia procumbens</i>	100	0
5	91	<i>Satureja macrostema</i>	100	0
5	95	<i>Spathodea campanulata</i>	100	0
5		Testigo	100	0
6	97	<i>Tagetes erecta</i>	100	0
6	100	<i>Tillandsia usneoides</i>	100	0
6	102	<i>Tournefortia densiflora</i>	100	0
6	45	<i>Heterotheca inuloides</i>	100	0
6	44	<i>Gnaphalium</i> sp.	100	0
6	106	<i>Wigandia urens</i>	100	0
6	5	<i>Aloe barbadensis</i>	100	0

Tabla 10. (Continuación).

Lote	No. de especie	Especie vegetal	% de Cont. *	% de Red. **
6	7	<i>Amaranthus sanguineus</i>	100	0
6	47	<i>Hippocratea excelsa</i>	100	0
6	76	<i>Piper nigrum</i>	100	0
6	28	<i>Coffea arabica</i>	100	0
6	9	<i>Annona muricata</i>	100	0
6	40	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	100	0
6	75	<i>Piper auritum</i>	100	0
6	99	<i>Teloxys ambrosioides</i>	100	0
6	88	<i>Ruta chalepensis</i>	100	0
6	104	<i>Tridax coronopifolia</i>	100	0
6	50	<i>Lantana camara</i>	100	0
6		<i>Coleus blumei</i>	100	0
6		Testigo	100	0

* % de Cont.= Porcentaje de contaminación.

** % de Red.= Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo.

4. 1. 5. Selección de especies antifúngicas para el desarrollo de técnicas de manejo.

En la tabla 11 se presenta un resumen de las pruebas biológicas realizadas incluyendo únicamente las plantas en las que se obtuvo algún tipo de efecto antifúngico. Resalta que de 106 plantas probadas se obtuvo por lo menos un tipo de efecto en 43 de ellas lo que confirma el alto índice de probabilidad de encontrar este tipo de efecto. En cuanto al efecto directo sobre esporas y micelio de *Aspergillus flavus*, 15 especies tuvieron su efecto únicamente en forma de extracto acuoso, 4 solamente en forma de polvos, 3 como extracto hexánico y el resto tuvieron efecto antifúngico en por lo menos dos de los tres productos de plantas utilizados (extractos acuosos, hexánicos y polvos). *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Pimenta dioica* y *Larrea tridentata* tuvieron su efecto en todas las pruebas, lo que indica diversidad química en sus principios activos y su estabilidad bajo las condiciones en que se trabajó.

Dado que el interés era desarrollar una técnica de manejo para la protección de granos de maíz se descartaron todas aquellas especies en las que el efecto directo sobre el grano fuera nulo o muy pobre. Destacan en este sentido los extractos acuosos de *Coffea arabica*, *Coleus blumei*, *Euphorbia dentata*, *Larrea tridentata*, *Raphanus raphanistrum*, *Rosmarinus officinalis* y *Tridax coronopifolia*, los cuales redujeron la contaminación por *Aspergillus flavus* (en comparación a sus respectivos testigos) en más de un 25 %, porcentajes que se consideraron susceptibles de mejorarse con dosis más altas y otras técnicas de manejo. Los más notables fueron los aceites esenciales de: *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum* y *Thymus vulgaris* que inhibieron totalmente el desarrollo del hongo en el grano, restando únicamente encontrar una dosis adecuada. Con base a estas consideraciones estas 13 especies mencionadas se usaron para la siguiente fase de la investigación.

4. 2. Técnicas de manejo.

4. 2. 1. Dosis óptima de protección.

En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos con los 7 extractos acuosos a dosis de 2, 4 y 6 % con todos los cuales, se obtuvieron porcentajes de contaminación de 66 a 100 %, muy diferentes a los obtenidos inicialmente. Existiendo la posibilidad de que estos resultados pudieran deberse a la pérdida de la acción de los extractos por el tiempo de almacenamiento de los polvos (aproximadamente 5 meses) se repitió el experimento usando plantas frescas (y siguiendo la misma metodología) y nuevamente se obtuvieron este tipo de resultados.

Tabla 11. Principales especies de plantas con propiedades antifúngicas.

Especie vegetal	Extracto acuoso			Extracto hexánico		Polvo	Aceite esencial	
	Esporas ¹	Mic. ²	Prot.Gr.	Mic.	Prot. Gr. ³	Mic.	Esporas	Prot. Gr.
<i>Acacia farnesiana</i>						++	NP ⁴	NP
<i>Aldama dentata</i>						+	NP	NP
<i>Allium cepa</i>							+	
<i>Amaranthus hybridus</i>		+					NP	NP
<i>Asclepias glaucescens</i>		+					NP	NP
<i>Baccharis salicifolia</i>						+	NP	NP
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	+			++			++	100 %
<i>Coffea arabica</i>	+		43 %	++		++	NP	NP
<i>Coleus blumei</i>			40 %				NP	NP
<i>Coriandrum sativum</i>		+					NP	NP
<i>Chenopodium album</i>	+	+				+	NP	NP
<i>Eucalyptus globulus</i>		+					++	52.8
<i>Euphorbia dentata</i>			53 %			+	NP	NP
<i>Euphorbia pulcherrima</i>		+	27 %			+	NP	NP
<i>Equisetum arvense</i>		+					NP	NP
<i>Ficus tecolutensis</i>	+	+					NP	NP
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>		+		+		+	NP	NP
<i>Lantana camara</i>			20 %				NP	NP
<i>Larrea tridentata</i>	+	+	48 %	+		+	NP	NP
<i>Lepidium virginicum</i>		+					NP	NP
<i>Lupinus campestris</i>		+					NP	NP
<i>Mangifera indica</i>	+	+					NP	NP
<i>Marrubium vulgare</i>			23 %				NP	NP
<i>Mentha piperita</i>				+	23 %		+	100 %
<i>Ocimum basilicum</i>							+	100 %
<i>Psidium guajava</i>			23 %				NP	NP
<i>Origanum vulgare</i>		+		+		++	+	100 %
<i>Passiflora edulis</i>						+	NP	NP
<i>Pimenta dioica</i>	+	+		+		+	NP	NP
<i>Piper auritum</i>		+					NP	NP
<i>Piper nigrum</i>				+			+	42 %
<i>Punica granatum</i>		+		+			NP	NP
<i>Pyrostegia venusta</i>		+					NP	NP
<i>Raphanus raphanistrum</i>	+	+	28 %			+	NP	NP
<i>Rosmarinus officinalis</i>			61 %	+		+	NP	NP
<i>Ruta chalepensis</i>						+	NP	NP
<i>Solanum rostratum</i>				+		+	NP	NP
<i>Syzygium aromaticum</i>	+	+		++		++	+	100 %
<i>Teloxys ambrosioides</i>		+					+	100 %
<i>Thymus vulgaris</i>							+	100 %
<i>Tridax coronopifolia</i>			43 %				NP	NP

¹. Inhibición de la germinación de esporas. ². Fungistasis en el desarrollo del micelio. **Prot. Gr** ³. Protección de granos (% de reducción de contaminación con relación al testigo). + con efecto. ++ con efecto pronunciado. ⁴N.P. No probado.

En los casos de los extractos de: *Coffea arabica*, *Euphorbia dentata* y *Raphanus raphanistrum* que a pesar de expresar porcentajes de reducción de la contaminación mayores o iguales a 20 % en las pruebas biológicas, esos datos no fueron estadísticamente significativos, por lo cual con lo aquí obtenido se confirma que dichas reducciones no fueron debidas a los tratamientos si no más bien a otros factores fuera de control experimental. Con *Larrea tridentata*, *Rosmarinus officinalis*, *Coleus blumei* y *Tridax coronopifolia* (que si dieron diferencias significativas) lo obtenido se puede explicar en función a que al estar usando continuamente cepas nuevas obtenidas de aislamientos recientes de granos de maíz (tomados de ensayos anteriores) el hongo generó cepas que por selección natural predominaron sobre las susceptibles a los principios activos de los extractos. Se tienen antecedentes de diferencias en sensibilidad a compuestos antifúngicos de plantas en cepas de *Aspergillus parasiticus*, dándose incluso el caso de cepas estimuladas en su desarrollo por compuestos como el timol (Karapinar, 1990). En el caso de la cafeína (principio activo del café) se han detectado mutantes resistentes de *A. parasiticus* a la acción de este alcaloide (Buchanan *et al.*, 1988).

Tabla 12. Efecto de diferentes dosis de fitoextractos seleccionados en la protección de granos de maíz. Porcentaje de contaminación y de reducción con relación al testigo.

Especie vegetal	% de Contaminación	% de Reducción
<i>Coffea arabica</i> 2 %	99.2	-
<i>Coffea arabica</i> 4 %	100	-
<i>Coffea arabica</i> 6 %	99.1	-
<i>Coleus blumei</i> 2 %	96.8	-
<i>Coleus blumei</i> 4 %	100	-
<i>Coleus blumei</i> 6 %	100	-
<i>Euphorbia dentata</i> 2 %	91.9	-
<i>Euphorbia dentata</i> 4 %	66.1	-
<i>Euphorbia dentata</i> 6 %	98.2	-
<i>Rosmarinus officinalis</i> 2 %	100	-
<i>Rosmarinus officinalis</i> 4 %	77.8	-
<i>Rosmarinus officinalis</i> 6 %	100	-
<i>Larrea tridentata</i> 2 %	100	-
<i>Larrea tridentata</i> 4 %	98.3	-
<i>Larrea tridentata</i> 6 %	86.6	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> 2 %	95.7	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> 4 %	98.3	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> 6 %	97.4	-
<i>Tridax coronopifolia</i> 2 %	92.5	-
<i>Tridax coronopifolia</i> 4 %	81.6	-
<i>Tridax coronopifolia</i> 6 %	100	-
Testigo	34.2	-

En la Tabla 13 se presenta una síntesis de los resultados para los aceites esenciales (ver datos totales en Apéndice 7), siendo notorio que en ninguno se presentó acción eficiente a dosis bajas e inclusive con *Origanum vulgare* aún a dosis de 13 % no hubo resultados satisfactorios y por falta de material no se pudo continuar a dosis más altas. La dosis óptima más baja se obtuvo con *Teloxys ambrosioides* al 3 %, seguida de las de *Syzygium aromaticum* (5 %), *Ocimum basilicum* (5 %), *Thymus vulgaris* (6 %), *Cinnamomum zeylanicum* (7%) y *Mentha piperita* (8 %). Estos resultados difieren ampliamente de los obtenidos por Bullerman *et al.* (1977) quienes en estudios en medios de cultivo encontraron inhibición total del hongo con dosis de 200-250 ppm con aceites de canela y clavo; esto se explica en función al contacto directo del hongo con los principios activos, en tanto que nuestro estudio plantea condiciones más naturales por lo que se requieren dosis más altas. En estudio sobre el efecto de los aceites de 9 especies del género *Ocimum*, sobre el desarrollo micelial de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* spp, Gangrade *et al.* (1989) encontraron que concentraciones de 10 % reducen el efecto inhibitorio sobre estos hongos en 50 % y que concentraciones entre 10 y 5 % reducen el efecto a menos de 25 %, llegando a suprimirse totalmente a dosis de 0.1 %, lo que confirma nuestros resultados con *O. basilicum*.

Tabla 13. Determinación de dosis óptima de protección en maíz con aceites esenciales.

Porcentaje de concentración del aceite	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
Aceite esencial	Porcentaje de granos contaminados por concentración de aceite											
<i>Mentha piperita</i>	82.5	97.5	98.3	100	79.1	59.3	53.4	49.5	20	2.2	0	0
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	87.5	97.5	87.5	91.6	90.6	63.9	67.5	19.0	0	0	0	0
<i>Ocimum basilicum</i>	100	100	100	100	29.9	4.4	0.8	0	0	0	0	0
<i>Origanum vulgare</i>	95.7	100	99.1	100	41.1	42.2	22.6	68.2	64.1	68.8	12.3	13.6
<i>Syzygium aromaticum</i>	100	69.6	50.0	56.8	83.3	50.4	2.6	0	0	0	0	0
<i>Teloxys ambrosioides</i>	95.8	82.3	91.4	67.2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thymus vulgaris</i>	67.2	100	81.2	91.4	83.3	14.8	13.3	2.5	0	0	0	0

4. 2. 2. Efecto de la combinación de extractos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de dosis óptima de protección se descartaron los 7 extractos acuosos y aquí únicamente se trabajó con las combinaciones de los 7 aceites esenciales (Tabla 14). Únicamente se obtuvo un efecto eficiente con las combinaciones de *C. zeylanicum* con *T. ambrosioides*, *T. vulgaris*, *S. aromaticum*, *O. basilicum* y *M. piperita*, quedando por comprobar hasta qué dosis se pueden reducir las concentraciones de ambos componentes. En el caso de *C. zeylanicum* sus principios activos antifúngicos se han atribuido al aldehído cinámico (que es el componente predominante de su aceite esencial), al eugenol y al o-metoxicinamaldehído (Bullerman *et al.*, 1977; Morozumi, 1978); en *T. vulgaris* se atribuye al timol (Buchanan and Shepherd, 1981) y en *S. aromaticum* al eugenol (Bullerman *et al.*, 1977). En

los casos de *M. piperita* y *T. ambrosioides* no está bien definido el principio activo, sin embargo en el primer caso el principal componente es el mentol y en el segundo el ascaridol. Al existir una mayor variedad de metabolitos antifúngicos en estas combinaciones las posibilidades de resistencia de *A. flavus* son menores, sin embargo en algunos casos (como sucedió con el resto de las combinaciones) al mezclar dos tipos de aceites se puede dar el caso de reacciones entre sus componentes de manera que los componentes antifúngicos quedan en una forma inactiva o inclusive se pueden derivar compuestos que sean metabolizables por el hongo. En el extracto acuoso del café (*Coffea arabica*) se ha visto que la combinación con el ácido clorogénico hace que la cafeína pierda su acción antifúngica (Morozumi *et al.*, 1989).

Tabla 14. Efecto de diferentes combinaciones de aceites esenciales seleccionados en la protección de granos de maíz. Porcentaje de contaminación y de reducción con relación al testigo.

Especie vegetal	% de Contaminación.	% de Reducción
<i>T. ambrosioides</i> + <i>S. aromaticum</i>	50.8	49.2
<i>M. piperita</i> + <i>O. basilicum</i>	65.8	34.2
<i>M. piperita</i> + <i>C. zeylanicum</i>	6.6	93.4
<i>M. piperita</i> + <i>S. aromaticum</i>	46.7	53.3
<i>M. piperita</i> + <i>T. ambrosioides</i>	27.2	72.8
<i>M. piperita</i> + <i>T. vulgaris</i>	44.7	55.3
<i>C. zeylanicum</i> + <i>O. basilicum</i>	15.4	84.6
<i>C. zeylanicum</i> + <i>S. aromaticum</i>	0.8	99.2
<i>C. zeylanicum</i> + <i>T. vulgaris</i>	5.9	94.1
<i>C. zeylanicum</i> + <i>T. ambrosioides</i>	0.0	100
Testigo	100	-
<i>O. basilicum</i> + <i>S. aromaticum</i>	88.2	0.6
<i>T. ambrosioides</i> + <i>T. vulgaris</i>	36.1	59.7
<i>O. basilicum</i> + <i>T. ambrosioides</i>	58.1	35.1
<i>O. basilicum</i> + <i>T. vulgaris</i>	48.7	54.3
<i>S. aromaticum</i> + <i>T. vulgaris</i>	73.7	17.7
Testigo	89.6	-

4. 2. 3. Efecto residual de los extractos.

Una síntesis de los resultados de esta prueba se muestran en la Fig. 8 en donde es factible observar que el aceite esencial de *C. zeylanicum* al 10 % es el que muestra mayor efecto residual, ya que a cuatro semanas de aplicado aún muestra un porcentaje de granos sanos cercano al 100 %, mientras que a las cinco semanas empieza a mostrar una reducción de su efecto protector. Este mismo aceite al 7 % reduce su efecto residual a 3 semanas (Apéndice 9). En el caso de *Mentha piperita* también se observó el mismo fenómeno ya que mientras al 10 % su efecto duró tres semanas, al 6 % su acción se reduce a dos semanas. Esta influencia de la concentración explica el porqué del bajo poder residual de los aceites de *S. aromaticum*, *T. vulgaris*, *O. basilicum* y *T.*

ambrosioides, ya que con estos aceites únicamente se usó la dosis óptima protectora, por lo que sería necesario confirmar esta hipótesis con pruebas adicionales con dosis más altas. Patkar *et al.* (1994), al tratar semillas de arroz con aceites esenciales de canela y clavo para el control de *A. flavus*, encontraron un efecto inverso al nuestro, ya que detectaban el hongo después de 30 días de tratamiento y a los 45 días ya no lo detectaban; esto se puede explicar en función a: por una parte a la estructura y consistencia diferente de las semillas de arroz y a que los autores no mantuvieron a las semillas tratadas con suficiente humedad después de la aplicación y en consecuencia a mayor tiempo, la humedad de los granos era menor y las posibilidades de infección menores.

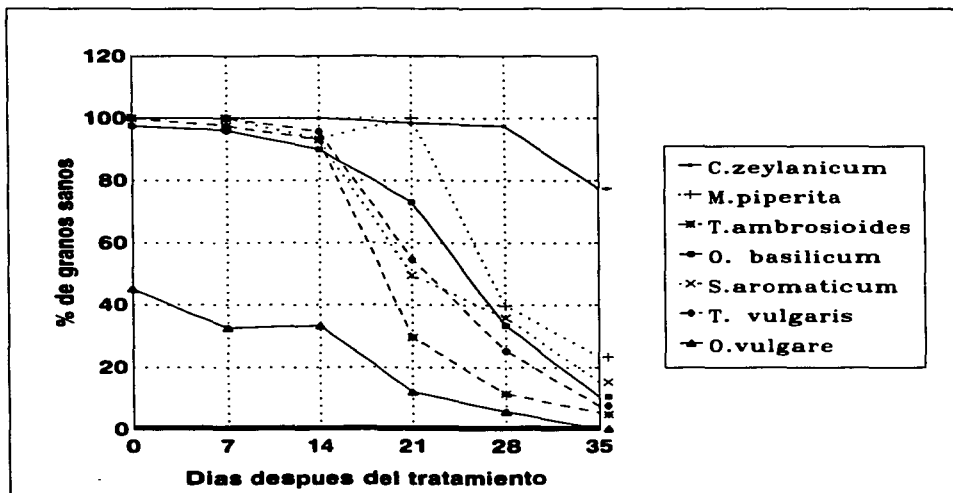


Fig. 8 Efecto residual de los aceites esenciales.

4. 2. 4. Efecto de componentes de aceites esenciales en la protección de granos de maíz

De todos los metabolitos probados únicamente el timol y el 2 metoxicinamaldehído mantuvieron su propiedad antifúngica en los granos (Tabla 15) siendo sus porcentajes de contaminación menores al testigo en un 53 y 44 % respectivamente, no siendo más eficientes en función a que no se determinó la dosis óptima. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron en la primera parte del trabajo para el caso del timol por lo que este metabolito tiene amplias perspectivas de

poder ser usado en una formulación comercial para uso específico contra este y otros hongos de acuerdo a los resultados obtenidos por Maruzzella y Balter (1959), Buchanan y Shepherd (1981) y Morozumi *et al.* (1989). Para el caso del 2-metoxi-cinamaldehído sólo existían antecedentes de su acción contra *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. versicolor* en estudios *in vitro*. En general se estableció que la mayoría de los componentes de los aceites esenciales son inestables al estar bajo las condiciones ambientales en que se desarrolló el trabajo. Esto confirma los resultados de Paster *et al.* (1995) quienes al tratar semillas de trigo para el control de *A. flavus*, *A. niger* y *A. ochraceus* con carvacrol y timol no encontraron diferencias significativas con su testigo, en el caso del timol posiblemente existan diferencias en sensibilidad entre biotipos.

Tabla 15. Efecto de componentes de aceites esenciales en la protección de granos de maíz contra *A. flavus*. Prueba de Tukey para el porcentaje de granos contaminados.

Tratamiento	% de contaminación	% de reducción
Mentol	86.7 a	5.7
Timol	43.7 b	53.0
Borneol	75.2 a	18.2
Linalol	95.0 a	-
Cineol	81.5 a	11.4
2-metoxicinamaldehído	64.0 b	44.0
Eugenol	78.7 a	14.4
Aldehído cinámico	76.0 a	17.4
Testigo	92.0 a	

4. 3. Pruebas de fitotoxicidad

4. 3. 1. Efecto de granos tratados a dosis altas en la germinación y desarrollo del maíz.

En la Fig. 9 se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la germinación y emergencia de plantas, en donde se manifiesta que con los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Sycyglum aromaticum*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris* no hubo reducción en el porcentaje de germinación, pero sí parece haber efecto en los casos de *Teloxys ambrosioides* y *Mentha piperita* en donde hubo reducciones de 20 %, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos. En cuanto a su efecto en el peso fresco y seco los resultados se muestran en la Fig. 10, en donde se observa que ninguno de los tratamientos fue inferior al testigo, siendo todos ligeramente superiores en peso fresco y sólo la yerbabuena fue menor en peso seco. Por todo lo anterior se infiere que es factible tratar semillas de maíz para siembra con aceites esenciales sin afectar su germinación ni el desarrollo de las plantas. El único antecedente de este tipo de pruebas era el tratamiento de granos de trigo con aceites de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* aplicados como fumigantes, siendo que en este caso sí hubo reducción del poder de germinación del trigo (Paster *et al.*, 1995).

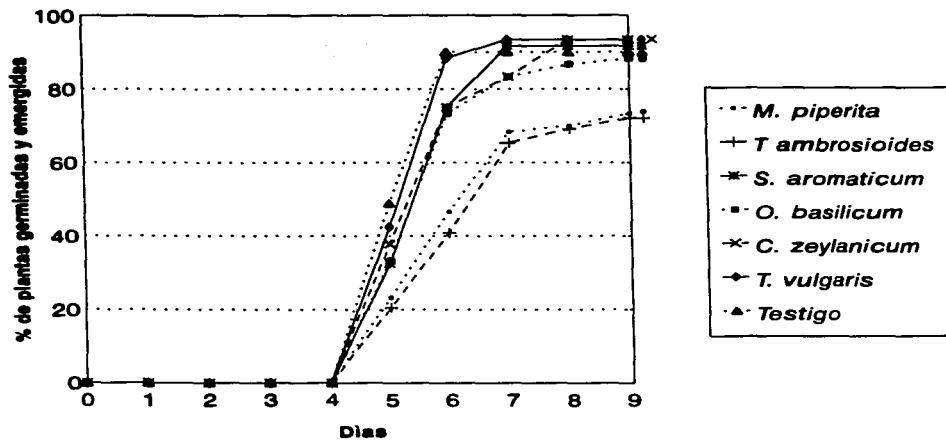


Fig. 9. Efecto de la aplicación de aceites esenciales en la germinación y emergencia de plantas. Porcentaje de plantas germinadas por día.

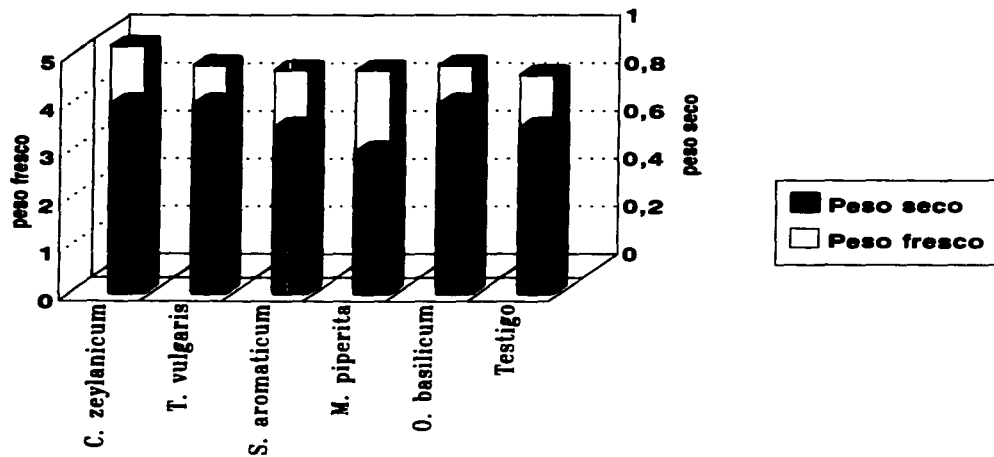


Fig. 10. Efecto de la aplicación de aceites esenciales sobre el peso fresco y seco del maíz. Peso promedio en gramos por planta.

VI. CONCLUSIONES

1. Existe una frecuencia de propiedades inhibitorias contra *Aspergillus flavus* en las plantas probadas de 25 %.
2. La acción inhibitoria de las plantas en general, se puede presentar en la germinación de las esporas, el desarrollo micelial o en la protección de granos de maíz; sólo en algunos casos la acción puede ser sobre los tres eventos biológicos y esto está en función del tipo de sustancias que actúan como principios activos.
3. Dentro de los extractos acuosos originalmente antifúngicos de: *Larrea tridentata*, *Rosmarinus officinalis*, *Coleus blumei* y *Tridax coronopifolia* existe la posibilidad de desarrollo de resistencia del hongo a sus propiedades biológicas.
4. Los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*, *Teloxys ambrosioides* y *Thymus vulgaris* fueron los tratamientos que inhibieron totalmente al hongo en la germinación de sus esporas, el desarrollo de su micelio y en la protección del maíz en su concentración comercial máxima.
5. La dosis óptima de protección de los aceites esenciales eficientes contra *A. flavus* fluctúa entre 3 y 8 %, lo que plantea problemas de costos para su posible aplicación práctica.
6. La combinación de los aceites esenciales entre sí produce acción sinérgica en las combinaciones en las que interviene *C. zeylanicum*.
7. El aceite esencial de *C. zeylanicum* mantiene su eficiencia de protección del maíz hasta por cuatro semanas y el resto de los aceites sólo la mantienen por 2 ó 3 semanas, lo cual se explica en función a su mayor diversidad de principios activos y a la capacidad de persistencia de los mismos.
8. Los componentes de aceites esenciales timol y 2-metoxi-cinamaldehído mantienen sus propiedades inhibitorias al ser aplicados a granos de maíz.
9. Ninguno de los aceites probados a dosis de 10 % afecta la germinación ni el desarrollo de las plantas de maíz.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdalla, M. H. 1988. Prevalence of airborne *Aspergillus flavus* in Khartoum (Sudan) airspora with reference to dusty weather and inoculum survival in simulated summer conditions. *Mycopathol.*, 104: 137-141.
- Altug, T., Yousef, A. E. and Marth, E. H. 1990. Degradation of aflatoxin B₁ in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. *J. Food Protect.*, 53: 581-582.
- Anderson, R. A. 1983. Detoxification of aflatoxin-contaminated corn. *In: Diener, U. L., Asquith R.L. and Dickens J.W. (Eds.). Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn.* Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama. 87-90.
- Anderson, H. W., Nehring, E. W. and Wichser, W. R. 1975. Aflatoxin contamination of corn in the field. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 775-782.
- Angle, J. S., Lindgren, R. L. and Gilbert-Effiong, D. 1989. Survival of *Aspergillus flavus* in soil. *Biodeterioration Research*, 2: 245-250.
- Anton, R., Beretz, A. and Haag-Burrier, M. 1987. New properties for old compounds. *In: Hostettmann, K. and Lea, P. J. (Eds.). Biologically active natural products.* Oxford Univ. Press. 117-125.
- Apodaca, S. M. A. y Gerardo, M. A. 1993. Extracto de semilla de toronja (*Citrus paradisi* Macf.) para el control de enfermedades de frutos en postcosecha.. *Memorias XX Congr. Nal. de Fitopatología, Zacatecas, Zac. R 67.*
- Ark, P. A. and Thompson, J. P. 1959. Control of certain diseases of plants with antibiotics from garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Dis. Rep.*, 43: 276-282.
- Bailey, R. H., Clement, B. A., Phillips, J. M., Sarr, A. B., Turner, T. A. and Phillips, T. D. 1990. Fate of aflatoxin in lime processed corn. *Toxicologist*. 10: 163.
- Bailey, R. H., Clement, B. A., Chase, T. A. and Phillips, T. D. 1991. The distribution of aflatoxins in the production of corn tortillas. *Toxicologist*, 11: 280.
- Barnes, G. L. 1963. *In vitro* toxicity of various fixed and essential oils to the pecan scab fungus *Fusicladium effusum*. *Plant Dis. Rep.*, 47: 114-117.
- Batt, C., Solberg, M. and Ceponis, M. 1980. Inhibition of aflatoxin production by carrot root extract. *J. Food Sci.*, (45): 1210-1213.
- Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. and Cotty, P. J. 1994. Mycological aspects of aflatoxin formation. *In: Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.). The Toxicology of aflatoxin*

- formation. Human Health, Veterinary and agricultural significance. Academic Press. N. Y. 327-346.
- Beckstrom-Strenberg, S. M. 1993. Utility of the Phytochemeco data-base. *In*: Downum, K. R., Romeo, J. T. and Stafford, H. A. (Eds). Phytochemical potential of tropical plants. Plenum Press. 267-286.
- Betina, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier. N. Y., U. S. A. 433 p.
- Bothast, R. J., Beuchat, L.R., Emswiller, B. S., Johnson, M. G. and Pierson, M. D. 1978. Incidence of airborne *Aspergillus flavus* spores in corn fields of five states. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 627-628.
- Brekke, O. L., Peplinski, A. J. and Griffin, E. L. Jr. 1975. Cleaning trials for corn containing aflatoxin. *Cereal. Chem.*, 52: 198-204.
- Brown, R. L., Cotty, P. J. and Cleveland, R. E. 1991. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.*, 54: 223-226.
- Brown, R. L., Cleveland, R. E., Payne, G. A., Woloshuk, R. L., Campbell, K. W. and White, D. G. 1995. Determination of resistance to aflatoxin production in maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* β -glucuronidase. *Phytopathol.*, 85: 983-989.
- Buchanan, R. L. and Fletcher, A. M. 1978. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. *J. Food Sci.*, 43: 654.
- Buchanan, R. L. and Shepherd, A. J. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. *J. Food Sci.*, 46: 976-977.
- Buchanan, R. L., Stahl, H. G., Wiseman, D. W., Zaika, L. L. and Mertz, S. E. 1988. Further characterization of a caffeine-resistant mutant of *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.*, 53: 1858-1862.
- Bullerman, L. B., Lieu Y. and Seier, S. A. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.*, 42: 1107-1109.
- Cáceres, A., López, B. R., Girón, M. A. y Logeman, H. 1991. Actividad antimicótica de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de dermatofitosis. *Rev. Mex. de Micología*, 7: 21-38.

Cáceres, A., López, B. R., Juárez, X., Del Aguila, J. and García, S. 1993. Plant used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J. Ethnofarm.*, 40: 207-213.

Campbell, K. W. and White, D. G. 1995. Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection and aflatoxin production. *Plant. Dis.*, 79: 1039-1045.

Carlson, R. 1961. *Silent Spring*. Houghton Mifflin, Boston. 273 pp.

Carvajal, M. y Arroyo, G. 1995. Las aflatoxinas, micotoxinas del hongo *Aspergillus* spp. Sus características, propiedades fisicoquímicas y efectos sobre plantas, animales y el hombre. *In: Bermúdez, K. y Jiménez A. (Eds.). Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición*. COFAA-IPN. Yauatepec, Mor. 18-25.

Carvajal, M. and Arroyo, G. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1301-1305.

Christensen, M. 1981. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 73: 1056-1084.

Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E. and Hall, H. H. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol.*, 14: 934-939.

C. I. M. M. Y T. 1994. World maize facts and trends. Maize seed industries. C. I. M. M. Y. T. México, D. F. 37 pp.

Cleveland, T. E. and Bhatnagar, D. 1991. Molecular regulation of aflatoxin biosynthesis. *In: Bray, G. and Ryan, D. (Eds.). Mycotoxin, Cancer and Health*. Louisiana State University Press., Baton Rouge, Louisiana. 270-287.

Cleveland, T. E. and Bhatnagar, D. 1992. Molecular strategies for reducing aflatoxin levels in crops before harvest. *In: Bhatnagar, D. and Cleveland, T. E. (Eds.) Molecular Approaches to Improving Food Quality and Safety*. Van Nostrand Reinhold, N. Y. 205-228.

Clifford, J. I. and Rees, K. R. 1966. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. *Nature*, 209: 312-315

Cole, G. T. and Kendrick, B. (Eds.) 1981. *Biology of conidial fungi*. Academic Press. N. Y. Volume 1. 789 p.

Cole, R. J. and Cotty, P. J. 1990. Biocontrol of aflatoxin production by using biocompetitive agents. *In: Perspectives on aflatoxin in field crops and animal food products in the United States. (ARS-83)*. National Technical Information Services. Springfield, Virginia. 62-66.

Cotty, P. J. 1988. Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: Influence of pH. *Phytopathol.*, 78: 1250-1253.

Cotty, P. J. and Bhatnagar, D. 1994. Variability among atoxicogenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2248-2251.

Cotty, P. J., Bayman, P. and Bhatnagar, D. 1990. Two potential mechanisms by which atoxicogenic strains of *Aspergillus flavus* prevent toxigenic strains from contaminating cottonseed. *Phytopathol.*, 90: 995.

Cruz, C. V. y Montes, R. 1992. Estudios fitoquímicos de plantas antifúngicas y su espectro de acción. *Memorias XIX Congreso Nal. de Fitopatología*. Saltillo, Coahuila. R-209.

Dam, R., Tam, S. W. and Satterlee, L. D. 1977. Destruction of aflatoxins during fermentation and by product isolation from artificially contaminated grain. *Cereal Chem.*, 54: 705-714.

Darrah, L. L., Zuber, M. S. and Lillehoj, E. B. 1987. Yield and the genetic control of aflatoxin in maize. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 236-245.

Davis, N. D. and Diener, U. L. 1983. Some characteristics of toxicogenic and non toxicogenic isolates. *In*: Diener, U. L., Asquith, R. L. and Dickens J. W. (Eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama. 1-6.

Decker, W. J. 1980. Activated charcoal absorbs aflatoxin B₁. *Vet. Human Toxicol.*, 22: 388-389.

Díaz, B. V. 1994. Evaluación del efecto fungicida y bactericida de extractos del árbol de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* S.) mediante antibiogramas y bioensayos *in vitro*. *Memorias XXI Congr. Nal. de Fitopatología*. Cuernavaca. Mor. R. 45.

Dickens, J.W. 1987. Sampling and detection techniques for aflatoxin in maize. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 92-99.

Diener, U. L. and Davis, N. D. 1987. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 33-40.

Diener, U. L., Cole, R. J., Sanders, T. H., Payne, G. A., Lee, L. S. and Klich, M. A. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopath.* 25: 249-270.

- Domínguez, X. A. 1978. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México, D. F. 204 pp.
- Dowd, P. F. 1991. Insect interactions with micotoxin producing fungi and their host. *In*: Bathnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. (Eds.). *Mycotoxins in Ecological Systems*. Marcel Dekker, N. Y. 23-58.
- Draughon, F. A. 1983. Control or suppression of aflatoxin production with pesticides. *In*: Diener, U. L., Asquith, R. L. and Dickens J. W. (Eds.). *Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn*. Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama. 81-86.
- Drew, S. W. and Demian, A. L. 1987. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 343-356.
- Duke, J. A. 1992. Handbook of biologically active phytochemicals and their activities. C. R. C. Press. Boca Raton, Florida. 415 pp.
- Eaton, D. L., Rammsdell, R. G., and Neal, G. E. 1994. Biotransformation of aflatoxins. *In*: Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.) *The Toxicology of aflatoxins. Human health, Veterinary, and Agricultural significance*. Academic Press. N. Y., U. S. A. 45-71.
- Ehrlich, K., Ciegler, A., Klich, M. and Lee, L. 1985. Fungal competition and mycotoxin production on corn. *Experientia*, 41: 691.
- Estrada, E. L., Aquino, V., Quintana, M. y Paz, A. 1991. Germinación y Fenología, revisión bibliográfica. En: Castillo, P. E. (Ed.). *Curso-Taller. Tópicos selectos en el estudio de las plantas medicinales*. Centro de Investigaciones Biológicas. Univ. Aut. del Est. de Morelos. 1-28.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y. and Abo-Raya, S. H. 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.*, 54: 74-76.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Rossman, A. Y. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. American Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota. U. S. A. 1252 p.
- Feeny, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry*, 10: 1-40.
- Fortnum, B. A. 1987. Effect of environment on aflatoxin development in preharvest maize. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). *Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop*. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 145-151.

Fortnum, B. A. and Manwiller, A. 1985. Effects of irrigation and kernel injury on aflatoxin B₁ production in selected maize hybrids. *Plant Dis.*, 69: 262-265.

Gangrade, S. K., Shrivastava, R. D., Sharma, O. P., Jain, N. K. and Trivedi, K. C. 1989. Evaluation of antifungal properties of essential oils of *Ocimum* species. *Indian Perfumer.*, 33: 97-101.

García, L. R. y Montes, R. 1994. Eficiencia de extractos vegetales para el control de *Alternaria solani* en jitomate. Resúmenes. VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Santiago de Chile. 19.

García, R. P. and García, M. L. 1988. Laboratory evaluation of plant extracts for the control of *Aspergillus* growth and aflatoxin formation. *In: Aibara, K., Kamagai, S., Ohtsubo, K. and Yoshizawa, T. (Eds.). Mycotoxins and Phycotoxins. Japanese Association of Mycotoxicology.* 190-193.

Goldblatt, L. A. and Dollear, F. G. 1979. Modifying mycotoxin contamination in feeds-use of molds inhibitors, ammoniation and roasting. *In: Interactions of Mycotoxins in Animal Production. National Academy of Sciences, Washington, D. C.* 167-184.

González, A. U. 1995. El maíz y su conservación. Trillas. México, D. F. 399 p.

Gorman, D. P. and Kang, M. S. 1991. Preharvest aflatoxin contamination in maize: Resistance and genetics. *Plant Breeding*, 107: 1-10.

Grainge, M. and Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley and Sons. N. Y. 470 pp.

Grayer, R. J. and Harborne, J. B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochem.*, 37: 19-42.

Greger, H., Hofer, O., Kahlig, H. and Wurtz, G. 1992. Sulfur containing cinnamides with antifungal activity from *Glycosmis cyanocarpa*. *Tetrahedron*, 48: 1209-1218.

Harborne, J. B. 1987. Natural fungitoxins. *In: Hostettmann, K. and Lea, P.J.(Eds.). Biologically active natural products. Oxford Univ. Press.* 195-212.

Harborne, J. B. and Baxter, H. (Eds.). 1993. *Phytochemical Dictionary.* Taylor and Francis, London. 867 pp.

Hassan, H. and Mahmoud, A. L. 1993. Inhibitory effect of spice oils on lipase and mycotoxin production. *Zentralblatt fuer Mikrobiologie*, 148: 543-548.

Heath, H. B. 1978. *Flavor Technology: profiles, products, applications.* Avi Publ. Inc. 542 p.

Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Van Dergraft, E. and Shannon, G. 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. *In: Herzberg, M. (Ed.). Toxic Microorganisms. United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR) and Department of the Interior, U.S. Government Printing Office, Washington, D. C. 202-210.*

Hill, R. A., Wilson, D. M., McMillan, W. W., Widstrom, N. W., Cole, R. J., Sanders, T. H., and Blankenship, P. D. 1985. Ecology of *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and peanuts. *In: Lacey, J. (Ed.). Trichotecenes and other mycotoxins. John Wiley and Sons. Chichester, England. 79-95.*

Hirai, T. 1977. Action of antiviral agents. *In: Horsfall, J. G. and Cowling, E. B. (Eds.) Plant Disease. An advanced Treatise. Academic Press. N. Y. Vol. V: 285-306.*

Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, S., Sakai, S. and Ueno, Y. 1978. Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxicogenic fungi. *Mycopathol., (66): 161-165.*

Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Kurata, H. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxicogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol., (39): 818-822.*

Holmquist, G. U., Walker, H. W. and Stahr, H. M. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Food Sci., 48: 778-783.*

Holtmeyer, M. G. and Wallin, J. R. 1981. Incidence and distribution of airborne spores of *Aspergillus flavus* in Missouri. *Plant Dis., 65: 58-60.*

Horn, B. W. and Wicklow, D. T. 1983. Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Canad. J. Microbiol., 29: 1087.*

Horsfall, J. G. 1972. Genetic vulnerability of major crops. *National Academy of Sciences. Washington, D. C. 67 p.*

Hsieh, D. P. H. and Wong, J. J. 1994. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. *In: Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.) The Toxicology of aflatoxins. Human health, Veterinary, and Agricultural significance. Academic Press. N. Y. 73-99.*

Huff, W. E. 1980. A physical method for the segregation of aflatoxin contaminated corn. *Cereal Chem., 57: 236-238.*

Huff, W. E. and Hagler, W. M. Jr. 1985. Density segregation of corn and wheat naturally contaminated with aflatoxin, desoxyxynivavenol and zearalenone. *J. Food Prot., 48: 416-420.*

Hurtado, R. L., Hernández R., Hernández, F., and Fernández, S. 1981. Fungitoxic compounds in the *Larrea* resin. In: Campos, L. E., Mabry, T. J. and Fernández, S. (Eds.). *Larrea*. CONACYT. México. 327-329.

Ilag, L. L. 1975. *Aspergillus flavus* infection of preharvest corn, drying corn and stored corn in the Philippines. Philippine Phytopathol., 74: 37-41.

Jelinek, C. F., Pohland, A. E. and Wood, G. E. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds: An update. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 223-230.

Jemmali, M. and Lafont, P. 1972. Evolution de l' aflatoxine B₁ au cours de la panification. Cah. Nut. Diet., 7: 319-322.

Jones, R. K. 1987. The influence of cultural practices on minimizing the development of aflatoxin in field maize. In: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 136-144.

Jones, R. K., Duncan, H. E., Payne, G. A. and Leonard, K. J. 1980. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk inoculated corn. Plant Dis., 64: 859-863.

Juan -López, M., Carvajal, M. and Ituarte, B. 1995. Supervising programme of aflatoxins in mexican corn. Food Additives and Contaminants. 12 (3): 297-312.

Karapinar, M. 1990. Influence of menthol and thymol on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 81: 287-295.

Karunaratne, A., Wezenberg, E. and Bullerman, L. B. 1990. Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. J. Food Prot., 53:230-236.

Kenneth, D. H. 1986. Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. Am. Phytopath. Soc. St. Paul, Minnesota. 312 pp.

Kimura, N. and Hirano, S. 1988. Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin production of aflatoxigenic fungi. Agri. Biol. Chem., 52: 1173-1178.

Kinosita, R. and Shikata, T. 1965. On toxic mouldy rice. In: Wogan, G. H. (Ed.). Mycotoxins in Food stuffs. MIT Press. Cambridge, Massachusetts. 111-132.

Klich, M. A. and Pitt, J. L. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Trans. Brit. Mycol. Soc., 91: 99-108.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Krishna, S. B. and Sinha, K. K. 1991. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. *In*: Bathnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. (Eds.). *Mycotoxins in ecological systems*. Marcel Dekker. N. Y. 59-85.

Kurita, Y., Makoto, M., Kurane, R. and Takahara, Y. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 945.

Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robbnet, C. J. and Wicklow, D. T. 1986. DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 78: 955-959.

Lacey, J. 1989. Prevention of mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. *In*: Natori, S., Hashimoto K., and Ueno Y. (Eds.). *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Netherlands. 161-168.

Lagunes, T. A. y Rodríguez C. 1989. Búsqueda de Tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. CONACYT. Colegio de Postgraduados. México. 150 pp.

Levin, D. A. and York, B. M. 1978. The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochemistry, Systematics and Ecology*, 6: 61-76.

Lillehoj, E. B. 1982. Evolutionary basis and ecological role of toxic microbial secondary metabolites. *Journal of Theoretical Biology*, 97: 325.

Lillehoj, E. B. 1983. Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. *In*: Diener, U. L., Asquith, R. L., and Dickens, J. W. (Eds.). *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama. 27-34.

Lillehoj, E. B. 1991. Aflatoxin: genetic mobilization agent. *In*: Bathnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. (Eds.). *Mycotoxins in ecological systems*. Marcel Dekker. N. Y. 1-22.

Lillehoj, E. B., Fennell, D. I., Kwolek, W. F., Adams, G. L., Zuber, M. S., Horner, E. S., Widstrom, N. W., Warren, H., Guthrie, W. D., Saner, D. B., Findley, W. R., Manwiller, A., Josephson, L. M., and Bockholt, A. J. 1978. Aflatoxin contamination of corn before harvest: *Aspergillus flavus* association with insects collected from developing ears. *Crop Sci.*, 18: 921-924.

Lillehoj, E. B., McMillian, W. W., Guthrie, W. D., and Barry, D. 1980. Aflatoxin producing fungi in preharvest corn: Inoculum source in insects and soils. *J. Environ. Qual.*, 9: 691-694.

- Lisker, N. and Lillehoj, E. B. 1991. Prevention of mycotoxin contamination (principally aflatoxins and *Fusarium* toxins) at preharvest stage. *In*: Smith, J. E. and Henderson, R. S. (Eds.). *Mycotoxins and Animal Foods*. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida. 689-719.
- Lussenhop, J. and Wicklow, D.T. 1990. Nitidulid beetles (Nitidulidae: Coleoptera) as vectors of *Aspergillus flavus* in preharvest maize. *Trans Mycol. Soc. Jpn*, 31: 63-74.
- Madrigal, P. D. y González C. 1991. Mitos y realidades del tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora*). *Memorias II Semana de la Investigación Científica*. Univ. Aut. Benito Juárez de Oax. Oaxaca, Oax. 63 p.
- Maggon, K. K., Gupta, S. K., and Venkitasubramanian, T. A. 1977. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 41: 822-855.
- Mann, G. E. , Codifer, L. P. Jr., Gradner, H. K., Koltun, S. P., and Dollear, F. G. 1970. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47: 173-176.
- Mansfield, J. W. 1983. Antimicrobial compounds. *In*: Callow, J. A. (Ed.) *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley and Sons. N. Y. 237-264.
- Marsh, S. F. and Payne, G. A. 1984. Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathol.*, 74: 557-561.
- Marston, A. and Hostettmann, K. 1987. Antifungal, molluscicidal, and citotoxic compounds from plants used in traditional medicine. *In*: Hostettmann, K. and Lea, P. J.(Eds.). *Biologically active natural products*. Oxford Univ. Press. 65-84.
- Maruzzella, J. C. and Balter, J. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Dis. Rep.*, 43: 1143-1147.
- Maruzzella, J. C. and Henry, P. A. 1958. The antimicrobial activity of perfume oils. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, 47: 471-476.
- Maruzzella, J. C., Scrandis, D. A., Scrandis, J. B., and Grabon, G. 1960. Action of odoriferous organic chemicals and essential oils on wood-destroying fungi. *Plant Dis. Rep.*, 44: 789-792.
- Masimanco, N., Remacle, J. and Ramaut, J. 1973. Elimination of aflatoxin B₁ by absorbent clays in contaminated substrates. *Ann. Nutr. Alim.*, 23: 137-147.
- McMillan, W. W. 1983. Role of arthropods in field contamination. *In*: Diener, U. L., Asquith, R. L., and Dickens, J. W. (Eds.). *Aflatoxin and Aspergillus flavus* in corn. Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama. 20-22.

McMillan, W. W. 1987. Maize plant resistance to insect damage and associated aflatoxin development. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B., and Renfro, B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 250-253.

Mislivec, P. B. 1981. Mycotoxin production by conidial fungi. *In*: Cole, G. T. and Kendrick, B. (Eds.). Biology of conidial fungi. Academic Press. N. Y. Volume 2. 37-73.

Montes, R. 1991. Protección de plantas de frijol contra enfermedades fungosas mediante extractos vegetales. *Universidad y Ciencia*, 7: 109-117.

Montes, R., Orozco, C. y Sandoval, G. 1990a. Extractos vegetales inhibidores de la germinación de urediosporas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. y su espectro de acción antesporulante. *Rev. Mex. de Fitopat.*, 8: 64-67.

Montes, R. y Fraire, L. 1994. Retraso en el desarrollo epidémico de *Phytophthora infestans* en jitomate con el uso de extractos vegetales. Resúmenes. VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Santiago de Chile. p 19-20 R 33.

Montes, R. y Martínez, G. 1992. Control de la cenicilla *Erysiphe cichoracearum* y el mildiú de la calabacita *Pseudoperonospora cubensis* mediante extractos vegetales en Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. *Rev. Mex. de Fitopat.*, 10: 186-191.

Moreno, E., Navarrete R., Vásquez, M. E. y Rodríguez, E. 1992. Producción natural de aflatoxinas en diferentes genotipos de maíz cultivados en el norte de Tamaulipas. *Rev. Mex. de Fitopat.*, 10 (2):161-165.

Mori, K., Sawada, H., Nobetani, O. and Murao, S. 1974. The effect of essential oils and spice extracts on the prevention of slimy spoilage of wieners. *J. Food Sci. Technol.*, 21: 285-287.

Morozumi, S. 1978. Isolation, purification, and antibiotic activity of o-methoxycinnamaldehyde from cinnamon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 577-583.

Morozumi, S., Wauke, T., Kudoh, Y. and Hitokoto, H. 1989. Antifungal effects of commercial foods and spices, and their components. *In*: Nattori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (Eds.). Mycotoxins and Phycotoxins'88. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands. 155-160.

Nichols, T. E. 1983. Economic impact of aflatoxin in corn. *In*: Diener, U. L., Asquith, R. L. and Dickens, J. W. (Eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama. 67-71.

Northolt, M. D. and Bullerman, L. B. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Prot.*, 45:519-526.

Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de salud ambiental. 11: Micotoxinas. Publicación científica No. 453: 69-82.

Overeem, J. C. 1976. Pre-existing antimicrobial substances in plants and their role in disease resistance. *In*: Friend, J. and Threlal, D. R. (Eds.). Biochemical aspects of plant-parasite relationships. Academic Press. 195-205.

Pandey, R. S. 1983. Control of *Pestalotia* fruit rot of guava by leaf extract of two medicinal plants. *Rev. Mex. de Fitopat.*, 2: 15-16.

Parker, J. 1992. Disease and plant population genetic structure. *In*: Fritz, R.S. and Simms, E.L. (Eds.) Plant Resistance to herbivores and pathogens. Ecology, Evolution and Genetics. Univ. of Chicago Press. 345-362.

Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U. and Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Prot.*, 58: 81-85.

Patkar, K. L., Usha, C. M., Shetty, H. S., Paster, N., and Lacey, J. 1994. Effects of spice oil treatment of rice on moulding and mycotoxin contamination. *Crop. Prot.*, 13: 519-524.

Payne, G. A. 1983. Natural field infection of corn by *Aspergillus flavus*. *In*: Diener, U. L., Asquith, R. L. and Dickens, J. W. (Eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Craftmaster Printers, Inc : 16-19.

Payne, G. A. 1987. *Aspergillus flavus* infection of maize: silks and kernels. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 119-129.

Payne, G. A. 1992. Aflatoxin in maize. *Critical review of Plant Science*, 10: 423-440.

Payne, G. A. and Hagler, W. M. 1983. Effect of specific amino acids on *Aspergillus flavus* in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 805-812.

Payne, G. A., Hagler, W. M. and Adkins, C. R. 1988. Aflatoxin acumulation in inoculated ears of field grown maize. *Plant Dis.*, 72: 422-424.

Peña, D. S. y Durán, M. C. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo*, (16) 9: 61-72.

Phillips, T. D., Clement, B. A. and Park, D. L. 1994. Approaches to reduction of aflatoxins in foods and feeds. *In*: Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.). The Toxicology of aflatoxin formation. Human Health, Veterinary and Agricultural significance. Academic Press. 383-398.

- Price, R. L. and Jorgensen, K. V. 1985. Effects of processing on aflatoxins levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *J. Food Sci.*, 50: 347-357.
- Purchase, I. F. H., Steyn, M., Rinsma, R. and Tustin, R. C. 1972. Reduction in the aflatoxin M content of milk by processing. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 10: 383-387.
- Rai, M. K. 1993. Laboratory evaluation of fungitoxic activity of crude extract of *Parthenium hysterophorus*. *J. Env. Biol.*, 14: 41-44.
- Ramos, S. A. 1994. La agricultura en las regiones tropicales de México. Apuntes del Taller de Fitopatología Tropical. Soc. Mex. de Fitopatología. H. Cárdenas, Tabasco, México. 1-6.
- Rayner, E. T., Koltun, S. P. and Dollear, F. G. 1977. Solvent extraction of aflatoxins from contaminated agricultural products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54: 242-244.
- Reyes, C. C. 1990. El cultivo del maíz. Trillas. México, D. F. 343 p.
- Riess, J. 1978. Mycotoxins in food stuffs. XI. Fate of aflatoxin B₁ during preparation and baking whole wheat bread. *Cereal Chem.*, 55: 421-423.
- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R. and Mata, R. R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*, 32: 275-283.
- Roy, A.K. and Chourasia, H.K. 1990. Inhibition of aflatoxin production by microbial interaction. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 53: 2250-2527.
- Sadasivam, S., Rajamaheswari, S. and Jeyarajan, R. 1991. Inhibition of certain plant viruses by plant extracts. *Journal of Ecobiology (India)*, 3: 53-57.
- Sakai, T., Kamezawa, S. and Kobashi, K. 1988. Aflatoxin inhibitor herbal drugs. *In: Aibara, K., Kamagai, S., Ohtsubo, K. and Yoshizawa, T. (Eds.). Mycotoxins and Phycotoxins. Japanese Association of Mycotoxicology. 77-78.*
- Salazar, J. F., García, E. R. y Tlalpal, B. B. 1991. Efecto de la incorporación de residuos secos de las plantas gobernadora (*Larrea tridentata*) y epazote (*Chenopodium ambrosioides*) en suelos infestados con *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* en la germinación y crecimiento de plantas de frijol. *Rev. Mex. de Fitopat.*, 9: 102-104.
- Sarukhán, J. 1995. Diversidad biológica. Universidad de México, 536: 3-10
- Sauer, D. B. and Tuite J. 1987. Conditions that affect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in stored maize. *In: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro B. L.*

(Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México, D. F. 41-47.

Scott, G. E. and Zummo, N. 1988. Sources of resistance in maize to kernel infection by *Aspergillus flavus* in the field. *Crop Sci.*, 28: 504-507.

Shane, M. 1994. Economic issues associated with aflatoxins. *In*: Eaton, D.L. and Groopman, J.D. (Eds.). *The Toxicology of aflatoxin formation. Human Health, Veterinary and Agricultural significance.* Academic Press. 513-528.

Shantha, T. 1987. Detoxification of groundnut seed and products in India. *In*: Summary and Recommendations of the International Workshop on Aflatoxin Contamination of Groundnut. ICRISAT Center, India. 16.

Shurtleff, M. C. (Ed.) 1980. A compendium of corn diseases. *Am. Phytopath. Soc.* Saint Paul , Minnesota. 325 pp.

Singh, A. K., Dickshit, A., Sharma, M. L. and Dixit, S. N. 1980. Fungitoxic activity of some essential oils. *Econ. Bot.*, 34: 186.

Smart, M. G., Wicklow, D. T. and Caldwell, R. W. 1990. Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: light microscopy of fungal spread from wounds. *Phytopathol.*, 80: 1287-1294.

Sorenson, W. G., Hesseltine, C. W. and Shotwell, O. L. 1967. Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 33: 49.

Swain, T. 1978. Plant-animal coevolution; a synoptic view of the paleozoic and mezozoic. *In*: Harbone, J. B. (Ed.). *Biochemical aspects of plant and animal evolution.* Academic Press. London. U. K. 3-19.

Swaminathan, S. M. 1988. Foreword. *In*: Grainge, M.S. and Ahmed, S. *Handbook of plants with pest control properties.* John Wiley and Sons. v.

Toledo, V. M. 1994. La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencias (UNAM)*, 34: 43-59.

Townsend, C. A., Christensen, S. B. and Trauwein, K. 1984. Hexanoate as a starter unit in polyketide synthesis.. *J. Amer. Chem. Soc.*, 106: 3868-3869.

Ulloa- Sosa, M. and Schroeder, H. W. 1969. Note on aflatoxin decomposition in the process of making tortillas from corn. *Cereal Chem.*, 46: 397-400.

Valencia, O. C. 1995. *Fundamentos de Fitoquímica.* Trillas. México, D. F. 235 p.

- Wicklow, D. T. 1983. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. *In*: Diener, U. L., Asquith, R.L., and Dickens, J.W. (Eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Craftmaster Printers, Inc. U.S.A. 6-12.
- Wicklow, D. T. 1988. Role of fungal sclerotia in the epidemiology of *Aspergillus flavus* in maize. *In*: Aibara, K., Kamagai, S., Ohtsubo, K., and Yoshizawa, T. (Eds.). Mycotoxins and Phycotoxins. Japanese Association of Mycotoxicology. 155-158.
- Wicklow, D. T., Horn, B. W., Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W. and Caldwell, R. W. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathol.*, 78: 68.
- Widstrom, N. W. 1979. The role of insects and other plant pests in aflatoxin contamination of corn, cotton, and peanuts. A review. *J. Environ. Qual.*, 8: 5-11.
- Widstrom, N. W. 1987. Breeding strategies to control aflatoxin contamination of maize through host plant resistance. *In*: Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México. D. F. 212-220.
- Widstrom, N.W. 1991. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent econiche factors. *In*: Bathagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. (Eds.). Mycotoxins in Ecological Systems. Marcel Dekker, New York. 23-58.
- Widstrom, N. W., Mc Millan, W. W, Beaver, R. W., and Wilson, D. M. 1990. Weather associated changes in aflatoxin contamination of preharvest maize. *J. Prod. Agric.*, 3: 196-199.
- Wierenga, J. M., Whalon, M. E, Maredia, K., and Hollingworth, R. 1994. Global Pest Resistance Management. Summer Institute. Book of Abstracts. Volume 1. Eight IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. July 4-9, Washington, D.C. 412.
- Wilson, C. L. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant. Dis.*, 81: 204-210.
- Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E. 1992. Future alternatives to synthetic fungicides for control of postharvest diseases. *In*: Tjamos, E. T. (Ed.). Biological control of plant diseases. Plenum Press, New York. 133-138.
- Wilson, D. M. 1987. Potential involvement of plant metabolites in maize resistance to aflatoxin contamination. *In*: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. (Eds.). Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop. C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México. D. F.246-249.

- Wilson, D. M. and Jay, E. 1975. Influence of modified atmosphere storage on aflatoxin production in high moisture corn. *Appl. Microbiol.*, 29: 224.
- Wilson, D. M. and Payne, G. A. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. *In*: Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.). *The Toxicology of aflatoxin formation. Human Health, Veterinary and Agricultural significance.* Academic Press. N. Y. 309-326.
- Wilson, D. M., Walker, M. E. and Gascho, G. J. 1989. Some effects of mineral nutrition on aflatoxin contamination of corn and peanut. *In*: Engelhard, A.W. (Ed.). *Soilborne Plant Pathogens: Management with macro and micro-elements.*American Phytopath. Soc. Press. St. Paul Minnesota. 137-151.
- Wilson, E. O. and Peter, F. M. 1988. *Biodiversity.* National Academic Press. 439 pp.
- Wood, R. K. S. 1967. Disease Resistance substances present in plants before infection. *In*: Wood, R. K. S. (Ed.). *Physiological Plant Pathology.* Blackwell Scientific. Publications. 399-414.
- Yahl, K. R., Watson, S. A., Smith, R. J. and Barabolak, R. 1971. Laboratory wet-milling of corn containing high levels of aflatoxin and a survey of commercial wet-milling products. *Cereal Chem.*, 48: 385-391.
- Zaika, L. L. and Buchanan, R. L. 1987. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *J. Food Prot.*, 50: 691-708.
- Zangerl, R. A. and Bazzaz, F. A. 1992. Theory and pattern in plant defense allocation. *In*: Fritz, R. S. and Simms, E. L.(Eds.). *Plant Resistance to herbivores and pathogens. Ecology, Evolution and Genetics.* Univ. of Chicago Press. 345-362.
- Zavaleta, M. E. 1987. Los modificadores orgánicos y su efecto sobre los nemátodos fitoparásitos. *Rev. Mex. de Fitopat.*, 5: 105-111.
- Zuber, M. S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. (Eds.). 1987. *Aflatoxin in maize. A proceedings of workshop.* C.I.M.M.Y T./ USAID/ UNDP. México. 389 pp.

VIII. APENDICES

Apéndice 1. Plantas usadas con antecedentes bibliográficos y géneros de hongos sobre los que actúan.

Especie vegetal	Géneros de hongos	Referencia bibliográfica
1. <i>Acacia farnesiana</i>	<i>Uromyces</i>	Montes <i>et al.</i> , 1990
3. <i>Allium cepa</i>	<i>Alternaria, Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Helminthosporium, Cladosporium, Pyricularia, Claviceps, Glomerella, Ustilago, Uromyces</i>	Grainge & Ahmed, 1988
4. <i>Allium sativum</i>	<i>Alternaria, Botrytis, Colletotrichum, Fusarium, Verticillium, Ceratocystis</i>	Ark & Thompson, 1959, Grainge & Ahmed, 1988
8. <i>Amphipterygium adstringens</i>	<i>Alternaria</i>	Díaz, 1994
9. <i>Annona muricata</i>	<i>Aspergillus, Trichophyton, Epidermophyton</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1994
11. <i>Argemone mexicana</i>	<i>Alternaria</i>	García y Montes, 1994
13. <i>Asclepias curassavica</i>	<i>Microsporium</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1991
16. <i>Azadirachta indica</i>	<i>Alternaria, Colletotrichum, Fusarium, Rhizoctonia, Sclerotium</i>	Grainge & Ahmed, 1988
18. <i>Beta vulgaris</i>	<i>Alternaria, Aspergillus, Curvularia, Fusarium, Helminthosporium, Rhizopus</i>	
22. <i>Byrsonima crassifolia</i>	<i>Microsporium</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1991
23. <i>Carica papaya</i>	<i>Drechslera</i>	Grainge & Ahmed, 1988
26. <i>Cestrum nocturnum</i>	<i>Trichophyton, Epidermophyton</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1993
27. <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Alternaria, Aspergillus, Curvularia, Drechslera, Fusarium, Lentinus, Lenzites, Polyporus</i>	Bullerman <i>et al.</i> , 1977, Grainge & Ahmed, 1988
28. <i>Coffea arabica</i>	<i>Aspergillus, Fusarium</i>	Morozumi <i>et al.</i> , 1989
30. <i>Coriandrum sativum</i>	<i>Lentinus, Lenzites, Polyporus</i>	Grainge & Ahmed, 1988
33. <i>Cyperus rotundus</i>	<i>Drechslera, Fusarium</i>	Grainge & Ahmed, 1988
34. <i>Chenopodium album</i>	<i>Erysiphe, Pseudoperonospora</i>	Montes & Martínez, 1992
36. <i>Datura stramonium</i>	<i>Alternaria, Curvularia</i>	Grainge & Ahmed, 1988
37. <i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Alternaria</i>	García & Montes, 1994
40. <i>Euphorbia pulcherrima</i>	<i>Cercospora, Drechslera, Pyricularia, Ustilago</i>	Grainge & Ahmed, 1988
41. <i>Equisetum arvense</i>	<i>Uromyces</i>	Montes <i>et al.</i> , 1990
42. <i>Ficus tecolutensis</i>	<i>Alternaria</i>	García & Montes, 1994
46. <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Colletotrichum</i>	Montes, 1991
48. <i>Juglans regia</i>	<i>Epidermophyton</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1993
51. <i>Larrea tridentata</i>	<i>Fusarium</i>	Hurtado <i>et al.</i> , 1981
52. <i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Cercospora</i>	Grainge & Ahmed, 1988
53. <i>Lepidium virginicum</i>	<i>Fusarium, Helminthosporium, Pythium, Rhizoctonia, Sclerotium</i>	Grainge & Ahmed, 1988

Apéndice 1 (Continuación)

Especie vegetal	Géneros de hongos	Referencia bibliográfica
55. <i>Litsea glaucescens</i>	<i>Epidermophyton, Microsporium</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1991
60. <i>Mentha piperita</i>	<i>Phytophthora</i>	Montes & Fraire, 1994
61. <i>Mimosa tenuiflora</i>	<i>Fusarium</i>	Madrigal & González, 1991
63. <i>Nerium oleander</i>	<i>Phytophthora</i>	Montes & Fraire, 1994
65. <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Peronospora</i>	Grayer & Harborne, 1994
66. <i>Ocimum basilicum</i>	<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium</i>	Gangrade <i>et al.</i> , 1989
69. <i>Origanum vulgare</i>	<i>Aspergillus</i>	Paster <i>et al.</i> , 1995
70. <i>Parthenium hysterophorus</i>	<i>Aspergillus, Rhizopus</i>	Rai, 1993
74. <i>Pinus</i> sp.	<i>Botrytis, Fusarium, Monilia, Rhizoctonia, Thielaviopsis</i>	Grainge & Ahmed, 1988
76. <i>Piper nigrum</i>	<i>Fusarium</i>	Grainge & Ahmed, 1988
77. <i>Pithecellobium dulce</i>	<i>Uromyces</i>	Montes <i>et al.</i> , 1990
78. <i>Portulaca oleracea</i>	<i>Drechslera</i>	Grainge & Ahmed, 1988
79. <i>Prosopis juliflora</i>	<i>Alternaria, Curvularia, Helminthosporium</i>	Grainge & Ahmed, 1988
80. <i>Psidium guajava</i>	<i>Drechslera, Ustilago</i>	Grainge & Ahmed, 1988
81. <i>Punica granatum</i>	<i>Colletotrichum, Pyricularia</i>	Grainge & Ahmed, 1988
83. <i>Quercus</i> sp.	<i>Endothia, Monilia</i>	Grainge & Ahmed, 1988
84. <i>Raphanus raphanistrum</i>	<i>Bipolaris</i>	Grainge & Ahmed, 1988
85. <i>Ricinus communis</i>	<i>Colletotrichum, Fusarium, Rhizoctonia</i>	Grainge & Ahmed, 1988
86. <i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Aspergillus</i>	Farang <i>et al.</i> , 1989
95. <i>Spathodea campanulata</i>	<i>Colletotrichum, Uromyces</i>	Montes, 1991
96. <i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Aspergillus</i>	Farang <i>et al.</i> , 1989
97. <i>Tagetes erecta</i>	<i>Alternaria, Drechslera, Pyricularia</i>	Grainge & Ahmed, 1988
98. <i>Tamarindus indica</i>	<i>Ustilago</i>	Grainge & Ahmed, 1988
99. <i>Teloxys ambrosioides</i>	<i>Alternaria</i>	García & Montes, 1994
101. <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Alternaria, Ceratocystis, Polyporus, Ustilago, Verticillium, Botrytis, Cladosporium, Claviceps, Diplodia, Fusarium, Gibberella</i>	Grainge & Ahmed, 1988
103. <i>Tribulus cistoides</i>	<i>Uromyces</i>	Montes <i>et al.</i> , 1990

Apéndice 2. Area de crecimiento (cm²) de *A. flavus* en medio de cultivo con polvos vegetales.

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio.
		I	II	III	IV		
1	<i>Baccharis salicifolia</i>	17.8	9.8	9.6	8.8	56.2	14.0
1	<i>Juglans regia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Nerium oleander</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Ficus tecolutensis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Amaranthus hybridus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Larrea tridentata</i>	7.2	5.7	5.9	5.2	24.1	6.0
1	<i>Vinca rosea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Ruta chalepensis</i>	30.8	17.4	24.5	22.1	94.9	23.7
1	<i>Artemisia ludoviciana</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Origanum vulgare</i>	3.0	5.5	2.3	5.4	16.3	4.1
1	<i>Nicotiana glauca</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Rhynchosia sp.</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Datura stramonium</i>	33.6	25.4	20.3	21.6	100.9	25.2
1	<i>Tamarindus indica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Passiflora edulis</i>	24.5	20.9	36.3	24.4	106.2	26.5
1	<i>Syzygium aromaticum</i>	0	0	0	0	0	0
1	<i>Raphanus raphanistrum</i>	26.1	39.2	34.2	36.9	136.0	34.1
1	<i>Avena fatua</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Equisetum arvense</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Lupinus mutabilis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Pyrostegia venusta</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Asclepias glaucescens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Acacia farnesiana</i> (fruto)	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Coriandrum sativum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Brassica oleracea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Chenopodium album</i>	28.1	35.5	37.5	33.8	135.5	33.8
2	<i>Lepidium virginicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Aldama dentata</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Psidium guajava</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Acacia farnesiana</i> (hojas)	16.5	20.5			37.0	18.5
2	<i>Eucalyptus globulus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Solanum rostratum</i>	32.8	18.2	35.4	30.0	116.6	29.1
2	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	25.3	35.0	35.4	30.0	125.8	31.4
2	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 2. (Continuación).

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	Promedio
		I	II	III	IV		
2	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Lupinus campestris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Mentha piperita</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Portulaca oleracea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Mangifera indica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Piper auritum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	26.8	13.3	30.5	22.4	93.2	23.3
3	<i>Euphorbia dentata</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Pimenta dioica</i>	16.0	24.2	20.6	34.0	94.9	23.7
3	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Casuarina equisetifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Ricinus communis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Quercus</i> sp.	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Opuntia ficus-indica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Teloxys ambrosioides</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Annona muricata</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Asclepias curassavica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Pileus mexicanus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Wigandia urens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Litsea glaucescens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Allium sativum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Byrsonima crassifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Argemone mexicana</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Brassica nigra</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cestrum nocturnum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Nicotiana tabacum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Allium cepa</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Beta vulgaris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Azadirachta indica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Prosopis juliflora</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Thymus vulgaris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Coffea arabica</i>	0	0	0	0	0	0
4	<i>Leucaena leucocephala</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Punica granatum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cyperus rotundus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Carica papaya</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 2. (Continuación).

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	Promedio
		I	II	III	IV		
5	<i>Tagetes erecta</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Parthenium hysterophorus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Pinus</i> sp.	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Tribulus cistoides</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Sanvitalia procumbens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Spathodea campanulata</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Mimosa tenuiflora</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Pithecellobium dulce</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Nephrolepis</i> sp.	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Tournefortia densiflora</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Kallstroemia maxima</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Cassia</i> sp.	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Tillandsia usneoides</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Salvia riparia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Gomphrena</i> sp.	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Brassica napus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Origanum majorana</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Amaranthus sanguineus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Ligustrum japonicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Cucumis melo</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Satureja macrostema</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Arachis hypogaea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Heterotheca inuloides</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Amphipterygium adstringens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Coleus blumei</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Hippocratea excelsa</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Aloe barbadensis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Marrubium vulgare</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Gnaphalium</i> sp.	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Lantana camara</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Cynodon dactylon</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Sida rhombifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Solanum verbascifolium</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Tridax coronopifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Piper nigrum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 3. Área de crecimiento (cm²) de *A. flavus* en medio de cultivo con extractos hexánicos.

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio
		I	II	III	IV		
1	<i>Chenopodium album</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Eucalyptus globulus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Lepidium virginicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Pimenta dioica</i>	42.1	45.5	44.1	41.8	173.5	43.3
1	<i>Aldama dentata</i>	36.8	23.3	40.5	32.4	133.1	33.2
1	<i>Portulaca oleracea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Acacia farnesiana</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Asclepias glaucescens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	<i>Mangifera indica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
1	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	34.8	30.4	31.5	31.8	128.5	32.1
2	<i>Ricinus communis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Raphanus raphanistrum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	15.1	16.4	15.8	14.9	62.3	15.5
2	<i>Ficus tecolutensis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Mentha piperita</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Datura stramonium</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Brassica oleracea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 3. (Continuación).

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio
		I	II	III	IV		
2	<i>Psidium guajava</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Coriandrum sativum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Juglans regia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Amaranthus hybridus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Mentha piperita</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Casuarina equisetifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Pyrostegia venusta</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Equisetum arvense</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Syzygium aromaticum</i>	0	0	0	0	0	0
2	<i>Avena fatua</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Quercus sp.</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	<i>Rhynchosia sp.</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
2	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Tamarindus indica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Vinca rosea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Origanum vulgare</i>	34.7	34.3	78.5	78.5	226.0	56.5
3	<i>Nicotiana glauca</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Passiflora edulis</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Lupinus campestris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 3 (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio
		I	II	III	IV		
3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	35.5	39.2	31.0	36.3	142.0	35.5
3	<i>Acacia farnesiana (H)</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Origanum majorana</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Brassica campestris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Parthenium hysterophorus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Euphorbia dentata</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Nerium oleander</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Solanum rostratum</i>	78.5	34.0	39.9	78.5	230.9	57.7
3	<i>Artemisia ludoviciana</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Baccharis salicifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
3	<i>Larrea tridentata</i>	34.4	38.6	38.9	75.3	187.2	46.8
3	<i>Beta vulgaris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Solanum verbascifolium</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Byrsonima crassifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Sida rhombifolia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Carica papaya</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Mimosa tenuiflora</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cestrum nocturnum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 3. (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio
		I	II	III	IV		
4	<i>Punica granatum</i>	78.5	34.0	39.9	78.5	230.9	57.7
4	<i>Arachis hypogaea</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Allium cepa</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Thymus vulgaris</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Tribulus cistoides</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Pithecellobium dulce</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Litsea glaucescens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cucumis melo</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cassia sp.</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Salvia riparia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cyperus rotundus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Cynodon dactylon</i>	78.5	34.0	39.9	78.5	230.9	57.7
4	<i>Ligustrum japonicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
4	<i>Kallstroemia maxima</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Litsea glaucescens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Salvia riparia</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Mimosa tenuiflora</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Nicotiana tabacum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Solanum verbascifolium</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5

Apéndice 3. (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio
		I	II	III	IV		
5	<i>Cyperus rotundus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Carica papaya</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Psidium guajava</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Cyperus rotundus</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Amphipterygium adstringens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Pimenta dioica</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Aldama dentata</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Lepidium virginicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Asclepias glaucescens</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Ocimum basilicum</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
5	<i>Kallstroemia maxima</i>	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	Testigo	78.5	78.5	78.5	78.5	314.0	78.5
6	<i>Ligustrum japonicum</i>	24.7	18.3	26.7	32.1	101.8	25.4
6	<i>Thymus vulgaris</i>	15.5	22.2	26.0	28.1	91.4	22.8
6	<i>Byrsonima crassifolia</i>	26.0	21.4	31.9	23.1	102.4	25.6
6	<i>Heterotheca inuloides</i>	17.5	17.4	17.4	17.7	70.0	17.5
6	<i>Gnaphalium sp.</i>	21.1	17.6	23.1	20.9	82.7	20.6
6	<i>Cassia sp.</i>	26.2	23.9	27.9	28.6	106.6	26.6
6	<i>Cynodon dactylon</i>	15.9	24.8	23.8	26.4	90.9	22.7
6	<i>Amaranthus sanguineus</i>	19.4	24.3	24.3	23.2	91.2	22.8

Apéndice 3. (continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Totales	Promedio
		I	II	III	IV		
6	<i>Hippocratea excelsa</i>	21.3	29.9	21.1	23.3	95.6	22.9
6	<i>Piper nigrum</i>	4.5	4.0	3.4	3.8	15.7	3.9
6	<i>Coffea arabica</i>	24.2	23.7	31.3	22.5	101.7	25.4
6	<i>Annona muricata</i>	26.1	17.0	27.3	29.6	100.0	25.0
6	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	35.0	27.2	39.3	37.8	139.3	34.8
6	<i>Piper auritum</i>	22.4	21.9	21.8	24.3	90.4	22.6
6	<i>Teloxys ambrosioides</i>	28.1	41.7	32.6	32.4	134.8	33.7
6	<i>Ruta chalepensis</i>	7.8	6.2	10.7	5.0	29.7	7.4
6	<i>Tridax coronopifolia</i>	31.3	42.7	28.2	40.6	142.8	35.7
6	<i>Lantana camara</i>	33.4	29.0	27.9	32.5	122.8	30.7
6	<i>Aloe barbadensis</i>	28.2	25.6	20.0	30.9	104.7	26.2
6	<i>Coleus blumei</i>	30.6	33.3	31.2	29.9	125.0	31.2
	Testigo	23.0	31.6	26.7	24.8	106.1	26.5

Apéndice 4. Lotes 1-10. Efecto de fitoextractos acuosos en la protección de granos de maíz. Relación de granos contaminados/granos sanos por repetición.

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	% Cont ¹	% Red. ²
		I	II	III	IV			
1	<i>Carica papaya</i>	15/2	14/5	14/6	20/5	63/18	72.0	0
1	<i>Azadirachta indica</i>	29/5	21/8	25/2	20/10	95/25	79.0	0
1	<i>Nicotiana glauca</i>	17/10	20/10	18/11	17/14	72/45	62.0	12.6
1	<i>Asclepias curassavica</i>	11/13	13/6	18/5	21/3	63/27	70.0	2.0
1	<i>Ricinus communis</i>	23/4	28/9	21/9	20/6	92/28	77.0	0
1	Testigo	21/9	21/6	20/11	22/8	84/34	71.0	-
1	<i>Pithecellobium dulce</i>	27/2	18/11	30/2	25/5	100/18	85.0	0
1	<i>Tagetes erecta</i>	22/10	29/3	21/6	25/1	97/20	83.0	0
1	<i>Argemone mexicana</i>	23/6	25/10	29/1	28/1	105/18	85.0	0
1	<i>Portulaca oleracea</i>	23/8	18/15	25/7	12/16	78/46	63.0	11.3
1	<i>Pileus mexicanus</i>	19/2	17/10	18/4	25/3	79/9	90.0	0
2	<i>Solanum verbascifolium</i>	23/7	28/3	24/5	27/2	102/17	85.7	0
2	<i>Cynodon dactylon</i>	24/4	27/3	21/8	22/7	94/22	81.0	5.1
2	<i>Byrsonima crassifolia</i>	27/4	28/2	24/6	26/4	105/16	86.8	0
2	<i>Brassica nigra</i>	25/5	30/0	29/1	27/3	111/9	92.5	0
2	<i>Wigandia urens</i>	22/5	30/3	29/3	28/5	109/16	87.2	0
2	<i>Nephrolepis sp.</i>	26/3	23/5	25/6	29/2	103/16	86.5	0
2	<i>Tournefortia densiflora</i>	30/1	28/5	22/7	19/3	99/16	86.5	0
2	<i>Annona muricata</i>	27/1	31/0	28/2	30/0	116/3	98.4	0
2	<i>Equisetum arvense</i>	25/5	26/3	24/7	23/6	98/21	82.3	3.6
2	<i>Prosopis juliflora</i>	28/5	21/7	27/3	26/3	103/18	85.0	0.5
2	Testigo	23/5	29/1	22/7	26/4	100/17	85.4	-
3	<i>Pinus sp.</i>	30/0	32/1	26/2	29/1	117/4	96.7	0
3	<i>Sida rhombifolia</i>	27/1	30/0	34/0	28/0	119/1	99.2	0

Apéndice 4. (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	% Cont ¹	% Red. ²
		I	II	III	IV			
3	<i>Tamarindus indica</i>	31/0	33/0	30/0	27/1	118/1	91.1	0
3	<i>Allium sativum</i>	30/0	32/0	27/0	29/0	118/0	100.0	0
3	<i>Parthenium hysterophorus</i>	35/0	34/0	19/0	32/0	121/0	100.0	0
3	<i>Cassia</i> sp.	36/0	29/0	19/1	31/0	115/1	99.1	0
3	<i>Nerium oleander</i>	25.3	34/2	32/3		91/8	91.9	0
3	<i>Acacia farnesiana</i>	27/0	30/0	32/0	30/0	119/0	100.0	0
3	<i>Kallstroemia maxima</i>	30/0	31/0	24/0	31/0	116/0	100.0	0
3	<i>Tribulus cistoides</i>	30/0	30/0	27/0	30/2	117/2	98.3	0
3	Testigo	24/3	27/1	33/0		84/4	95.5	-
4	<i>Rhynchosia</i> sp.	21/5	11/17	17/16	14/18	80/56	58.8	7.8
4	<i>Euphorbia lasiocarpa</i>	26/5	25/4	19/4	18/8	88/31	73.9	0
4	<i>Tillandsia usneoides</i>	21/7	23/9	16/13	31/0	91/29	75.8	0
4	<i>Cestrum nocturnum</i>	15/16	18/9	28/4	21/9	82/38	78.3	0
4	<i>Casuarina equisetifolia</i>	20/13	17/15	15/12	14/10	66/50	56.9	10.8
4	<i>Ruta chalepensis</i>	15/12	5/35	26/2	17/11	66/56	52.9	17.1
4	<i>Salvia riparia</i>	24/7	17/12	21/9	19/10	81/38	68.0	0
4	<i>Passiflora edulis</i>	20/12	15/16	18/8	20/11	73/56	56.6	11.2
4	<i>Allium cepa</i>	7/22	22/9	24/2	31/0	84/33	71.8	0
4	<i>Gomphrena</i> sp.	21/10	24/8	18/12	20/6	83/36	69.7	0
4	Testigo	24/5	17/9	21/8	14/21	76/43	63.8	-
5	<i>Rosmarinus officinalis</i>	7/26	17/14	13/14	5/21	42/75	35.9	61.0
5	<i>Chenopodium nuttaliae</i>	24/5	28/1	28/1	27/4	107/10	84.2	8.6
5	<i>Coffea arabica</i> (fruto integral)	17/12	27/12	18/6	24/7	86/37	69.9	24.2

Apéndice 4. (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	% Cont ¹	% Red. ²
		I	II	III	IV			
5	<i>Avena fatua</i>	27/4	23/4	25/4	26/3	101/15	87.0	5.6
5	<i>Acacia farnesiana</i>	21/10	29/3	19/8	22/6	91/27	77.1	9.6
5	<i>Solanum rostratum</i>	27/3	24/5	25/2	24/2	100/12	89.3	3.1
5	<i>Vinca rosea</i>	26/1	26/6	24/4	30/4	106/15	87.6	4.9
5	<i>Psidium guajava</i>	19/11	24/2	19/11	20/10	82/34	70.7	23.3
5	<i>Brassica oleracea</i>	26/2	24/4	27/4	26/6	103/16	86.5	6.2
5	<i>Euphorbia dentata</i>	22/10	20/4	25/9	12/16	79/39	66.9	27.4
5	Testigo	20/5	25/1	35/1	29/3	109/10	92.2	--
6	<i>Thymus vulgaris</i>	20/13	32/3	20/10	28/0	100/26	79.4	1.2
6	<i>Brassica napus</i>	30/3	29/2	23/5	26/3	108/13	89.3	0
6	<i>Aldama dentata</i>	18/6	19/15	24/9	21/8	82/38	68.4	14.9
6	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	18/8	22/15	30/1	25/10	95/24	79.8	0.6
6	<i>Mentha piperita</i>	13/17	29/1	21/8	29/2	92/28	76.6	4.6
6	<i>Piper nigrum</i>	23/5	24/7	17/13	19/8	83/33	71.5	10.9
6	<i>Ocimum basilicum</i>	26/4	20/11	23/5	26/5	95/26	78.5	2.2
6	<i>Syzygium aromaticum</i>	24/4	24/11	26/4	20/11	94/30	75.8	0.6
6	<i>Origanum vulgare</i>	20/7	27/3	26/4	27/5	100/19	84.0	0
6	<i>Origanum majorana</i>	20/8	24/7	24/7	26/1	94/23	80.3	0
6	Testigo	22/11	25/5	25/5	26/3	98/24	80.3	-
7	Testigo	29/2	30/2	30/0	30/30	119/4	96.7	-
7	<i>Equisetum arvense</i>	36/1	30/1	22/4	26/0	114/6	95.0	1.7
7	<i>Ligustrum japonicum</i>	28/0	34/0	29/0	24/5	125/5	96.5	0
7	<i>Sanvitalia procumbens</i>	32/2	29/0	26/4	27/1	114/7	94.2	2.6
7	<i>Leucaena leucocephala</i>	26/0	31/1	32/1	28/1	117/3	97.5	0

Apéndice 4. (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	% Cont ¹	% Red. ²
		I	II	III	IV			
7	<i>Amaranthus sanguineus</i>	27/2	35/0	25/3	26/2	113/7	94.1	2.7
7	<i>Beta vulgaris</i>	26/4	30/0	30/0	27/4	113/8	93.3	3.5
7	<i>Spathodea campanulata</i>	30/0	28/4	29/2	27/0	114/6	95.0	1.7
7	<i>Lepidium virginicum</i>	30/0	31/0	27/0	30/2	118/2	98.4	0
7	<i>Teloxys ambrosioides</i>	30/1	31/2	29/1	32/0	122/4	96.8	0
7	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	25/0	23/5	32/2	32/0	112/7	94.2	2.5
7	<i>Amaranthus hybridus</i>	25/3	31/4	21/8	25/7	102/22	82.2	14.9
7	<i>Piper auritum</i>	28/2	27/2	27/4	29/0	111/	93.2	3.6
8	<i>Cucumis melo</i>	22/12	27/5	23/6	24/2	96/25	79.3	0
8	<i>Punica granatum</i>	22/3	28/5	31/4	21/7	102/19	84.3	0
8	<i>Cyperus rotundus</i>	21/7	30/0	19/11	17/15	87/33	72.5	0
8	<i>Opuntia ficus-indica</i>	17/5	3/23	26/8	9/18	55/64	46.2	18.3
8	<i>Coriandrum sativum</i>	30/1	31/2	24/3	24/5	109/11	90.0	0
8	<i>Pyrostegia venusta</i>	31/2	27/2	32/2	25/4	114/10	91.9	0
8	<i>Mimosa tenuiflora</i>	25/1	26/3	27/5		78/9	89.6	0
8	<i>Eucalyptus globulus</i>	14/17	26/1	22/7	21/10	83/35	70.3	0
8	<i>Asclepias glaucescens</i>	24/5	28/3	23/6	30/1	105/15	87.5	0
8	<i>Satureja macrostema</i>	19/11	24/4	16/15	18/12	77/42	64.7	0
8	<i>Arachis hypogaea</i>	20/10	27/4	22/7	18/12	87/33	72.5	0
8	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	24/4	14/14	28/3	13/17	79/38	67.5	0
8	Testigo	15/15	16/19	21/4	16/14	68/52	56.6	-
9	Testigo	30/3	28/1	26/4	27/3	111/11	90.9	-
9	<i>Nerium oleander</i>	17/13	23/7	27/1	25/4	92/25	82.1	9.6
9	<i>Heterotheca inuloides</i>	23/7	18/0	27/2	34/0	102/9	91.8	0

Apéndice 4. (Continuación)

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	% Cont ¹	% Red. ²
		I	II	III	IV			
9	<i>Baccharis salicifolia</i>	32/3	29/9	27/1	11/18	99/31	76.1	15.6
9	<i>Juglans regia</i>	30/0	19/10	29/7	8/9	86/26	76.7	9.6
9	<i>Lupinus campestris</i>	26/4	26/0	32/2	29/3	113/9	93.3	0
9	<i>Datura stramonium</i>	30/6	26/5	25/2	25/1	106/14	88.3	2.8
9	<i>Lupinus mutabilis</i>	28/1	31/2	29/1	21/7	109/11	90.0	0
9	<i>Raphanus raphanistrum</i>	8/25	16/12	26/0	29/5	79/42	65.2	28.2
9	<i>Amphipterygium adstringens</i>	29/0	28/0	33/0	30/0	120/0	100.0	0
9	<i>Artemisia ludoviciana</i>	19/10	26/3	31/0	18/11	94/24	79.6	12.4
9	<i>Ficus tecolutensis</i>	32/2	25/4	32/0	25/1	114/7	94.2	0
10	<i>Larrea tridentata</i>	14/16	4/24	10/25	30/6	58/71	44.9	48.1
10	<i>Coleus blumei</i>	19/10	14/16	12/18	17/14	62/58	51.6	40.3
10	<i>Aloe barbadensis</i>	31/3	25/4	29/0	28/0	113/7	94.1	0
10	<i>Marrubium vulgare</i>	20/14	24/8	22/10	17/19	83/41	66.9	22.7
10	<i>Nicotiana tabacum</i>	25/3	24/8	25/9	30/5	104/25	80.6	0
10	<i>Pimenta dioica</i>	21/10	22/4	26/6	19/10	88/30	74.5	13.9
10	<i>Gnaphalium sp.</i>	30/2	28/1	30/1	20/6	108/10	91.5	0
10	<i>Lantana camara</i>	21/9	14/14	17/10	27/2	79/35	69.3	20.0
10	<i>Mangifera indica</i>	24/7	32/0	24/2	30/2	110/11	90.9	0
10	<i>Quercus sp.</i>	23/6	21/4	32/0	35/0	111/10	91.7	0
10	Testigo	25/6	26/5	26/3	27/2	104/16	86.6	-

¹ % de Cont. = Porcentaje de granos contaminados. ² % de Red. = Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo

Apéndice 5. Lotes 11.y 12. Efecto de fitoextractos acuosos y aceites esenciales en la protección de granos de maíz. Relación granos contaminados/granos sanos por repetición.

Lote	Especie vegetal	Repeticiones				Total	% de Cont. ¹	% de Red. ²
		I	II	III	IV			
11	<i>Syzygium aromaticum</i>*	0/29	0/35	0/31	0/26	0/121	0	100.0
11	<i>Hippocratea excelsa</i>	30/1	22/2	32/2	30/0	114/5	95.7	0
11	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>*	0/28	0/28	0/31	0/30	0/117	0	100.0
11	<i>Eucalyptus globulus</i> *	1/28	18/11	20/14	15/19	54/72	42.8	52.8
11	<i>Coffea arabica</i> (m.s.)	4/25	2/26	27/0	29/4	62/59	51.2	43.6
11	Timol*	0/29	0/27	0/28	0/32	0/116	0	100.0
11	Testigo	23/7	32/1	31/0	23/3	109/11	90.8	-
12	<i>Litsea glaucescens</i>	13/20	26/1	11/17	9/23	59/61	49.0	18.0
12	<i>Origanum vulgare</i>*	0/28	0/29	0/32	0/31	0/120	0	100.0
12	<i>Teloxys ambrosioides</i>*	0/29	0/28	0/33	0/30	0/120	0	100.0
12	<i>Piper nigrum</i> *	28/2	6/28	6/27	6/27	46/84	35.0	42.0
12	<i>Thymus vulgaris</i>*	0/30	0/31	0/28	0/32	0/121	0	100.0
12	<i>Ocimum basilicum</i>*	0/32	0/32	0/29	0/32	0/125	0	100.0
12	<i>Tridax coronopifolia</i>	10/22	1/28	27/3	3/26	41/79	34.0	43.0
12	<i>Allium cepa</i> *	30/4	0/33	24/0	23/5	77/42	65.0	0
12	<i>Mentha piperita</i>*	0/28	0/29	0/26	0/35	0/118	0	100.0
12	Testigo	13/16	32/1	8/22	18/9	71/48	60.0	-

¹ % de Cont. = Porcentaje de granos contaminados. ² % de Red. = Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo.

Apéndice 6. Efecto de diferentes dosis de fitoextractos acuosos seleccionados en la protección de granos de maíz. Relación de granos contaminados/granos sanos por repetición.

Especie vegetal	Repeticiones				Totales	% de Cont.	% de Red.
	I	II	III	IV			
<i>Coffea arabica</i> 2 %	32/1	31/0	30/0	28/0	121/1	99.2	-
<i>Coffea arabica</i> 4 %	27/0	25/0	35/0	33/0	120/0	100	-
<i>Coffea arabica</i> 6 %	28/1	30/0	28/0	32/0	118/1	99.1	-
<i>Coleus blumei</i> 2 %	27/3	26/1	31/0	38/0	122/4	96.8	-
<i>Euphorbia dentata</i> 2 %	26/2	27/1	23/1	26/5	102/9	91.9	-
<i>Euphorbia dentata</i> 4 %	28/2	21/5	5/21	22/11	76/39	66.1	-
<i>Euphorbia dentata</i> 6 %	36/0	32/0	25/0	20/2	113/2	98.2	-
<i>Euphorbia pulcherrima</i> 2 %	26/0	29/0	32/0	31/0	118/0	100	-
<i>Euphorbia pulcherrima</i> 4 %	29/0	25/0	23/0	32/0	109/0	100	-
<i>Euphorbia pulcherrima</i> 6 %	33/0	31/0	28/0	27/0	119/0	100	-
<i>Larrea tridentata</i> 2 %	28/0	27/0	25/0	29/0	109/0	100	-
<i>Larrea tridentata</i> 4 %	26/0	33/0	27/2	31/0	117/2	98.3	-
<i>Larrea tridentata</i> 6 %	29/0	16/6	32/0	27/0	104/6	86.6	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> 2 %	30/5	28/0	27/0	28/0	113/5	95.7	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> 4 %	28/0	30/0	32/0	29/2	119/2	98.3	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> 6 %	22/0	27/0	35/2	31/1	115/3	97.4	-
<i>Tridax coronopifolia</i> 2 %	26/5	27/0	28/4	30/0	111/9	92.5	-
<i>Tridax coronopifolia</i> 4 %	26/7	20/0	23/11	33/5	102/23	81.6	-
<i>Tridax coronopifolia</i> 6 %	18/0	28/0	31/0	40/0	117/0	100	-
Testigo	16/13	14/10	5/25	2/23	37/71	34.2	-

¹ % de Cont. = Porcentaje de granos contaminados. ² % de Red. = Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo.

**Apéndice 7. Determinación de dosis optima de protección en maíz con aceites esenciales.
Relación de granos contaminados/granos sanos por repetición.**

Especie vegetal	Repeticiones				Totales	% de Cont.	% de Red.
	I	II	III	IV			
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 0.1 %	17/7	25/4	29/4	34/0	105/15	87.5	12.5
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 0.5 %	29/0	33/0	22/3	33/0	117/3	97.5	2.5
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 1.0 %	26/4	21/10	30/0	28/1	105/15	87.5	12.5
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 1.5 %	29/1	21/9	30/0	26/1	106/10	91.6	8.4
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 2.0 %	29/1	21/9	30/0	26/1	106/11	90.6	9.4
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 3 %	3/25	14/18	29/0	32/1	78/44	63.9	2.9
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 4 %	25/3	28/8	27/0	3/29	83/40	67.5	-
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 5 %	0/27	1/27	0/31	11/23	12/108	10.0	84.8
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 6 %	3/30	2/30	2/27	0/28	7/115	5.7	93.6
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 7 %	0/31	0/30	0/31	0/28	0/120	0	100
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 8 %	0/29	0/33	0/30	0/28	0/120	0	100
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 9 %	1/30	0/34	0/28	0/28	1/120	0.8	99.2
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> 10 %	0/35	0/27	0/33	1/25	1/120	0.8	98.7
<i>Mentha piperita</i> 0.1 %	7/21	30/0	33/0	29/0	99/21	82.5	17.5
<i>Mentha piperita</i> 0.5 %	29/2	28/1	33/0	29/0	119/3	97.5	2.5
<i>Mentha piperita</i> 1.0 %	33/0	30/0	29/0	26/2	118/2	98.3	1.7
<i>Mentha piperita</i> 1.5 %	27/0	33/0	27/0	31/0	118/0	100	-
<i>Mentha piperita</i> 2.0 %	7/23	33/0	28/0	29/0	87/23	79.1	20.9
<i>Mentha piperita</i> 2.5 %	30/0	29/0	32/0	29/0	120/0	100	-
<i>Mentha piperita</i> 3 %	14/17	20/6	10/19	26/6	70/48	59.3	9.8
<i>Mentha piperita</i> 4 %	10/27	22/0	0/28	31/0	63/55	53.4	18.8
<i>Mentha piperita</i> 5 %	0/27	23/6	33/0	0/30	56/57	49.5	24.7
<i>Mentha piperita</i> 6 %	0/33	0/31	0/28	0/26	0/118	0	100
<i>Mentha piperita</i> 7 %	9/28	0/24	0/32	0/30	9/114	7.2	92.0
<i>Mentha piperita</i> 8 %	3/27	1/37	6/15	1/31	11/110	9.1	90.9
<i>Mentha piperita</i> 9 %	11/13	19/11	3/28	4/30	37/82	31.1	65.2
<i>Mentha piperita</i> 10 %	0/37	0/26	0/25	0/31	0/119	0.0	100
<i>Ocimum basilicum</i> 0.1 %	31/0	29/0	30/0	30/0	120/0	100	-
<i>Ocimum basilicum</i> 0.5 %	29/0	29/0	31/0	32/0	121/0	100	-
<i>Ocimum basilicum</i> 1.0 %	31/0	23/0	24/0	31/0	119/0	100	-
<i>Ocimum basilicum</i> 1.5 %	30/0	25/0	29/1	36/0	120/0	100	-
<i>Ocimum basilicum</i> 2.0 %	30/0	26/0	33/0	31/0	120/0	100	-
<i>Ocimum basilicum</i> 2.5 %	24/0	31/0	29/0	36/0	120/0	100	-
<i>Ocimum basilicum</i> 3 %	0/33	9/16	16/12	11/21	35/82	29.9	45.4
<i>Ocimum basilicum</i> 4 %	0/28	5/17	0/33	0/36	5/114	4.4	93.3
<i>Ocimum basilicum</i> 5 %	0/31	1/23	0/33	0/32	1/119	0.8	98.7

Apéndice 7. (Continuación).

Especie vegetal	Repeticiones				Totales	% de Cont.	% de Red.
	I	II	III	IV			
<i>Ocimum basilicum</i> 10 %	0/33	0/30	0/28	0/33	0/124	0.0	100
<i>Origanum vulgare</i> 0.5 %	30/0	28/3	27/2	29/0	114/5	95.7	4.3
<i>Origanum vulgare</i> 1.0 %	33/0	24/0	35/0	28/0	120/0	100	-
<i>Origanum vulgare</i> 1.5 %	25/0	33/0	31/0	29/1	118/1	99.1	0.9
<i>Origanum vulgare</i> 2.0 %	28/0	34/0	31/0	26/0	119/0	100	-
<i>Origanum vulgare</i> 2.5 %	23/5	16/15	24/5	25/5	88/30	74.5	25.5
<i>Origanum vulgare</i> 3 %	4/27	0/25	1/26	0/38	5/116	4.1	93.7
<i>Origanum vulgare</i> 4 %	13/20	28/1	7/20	3/29	51/70	42.2	35.8
<i>Origanum vulgare</i> 5 %	14/16	8/23	0/0/33	7/27	29/99	22.6	65.6
<i>Origanum vulgare</i> 10 %	8/18	0/31	0/34	0/29	8/112	7.1	89.2
<i>Origanum vulgare</i> 11 %	28/748	0/28	24/4	30/10	82/38	68.2	23.7
<i>Origanum vulgare</i> 12 %	31/3	18/8	25/6	3/26	77/43	64.1	28.4
<i>Origanum vulgare</i> 13 %	27/2	29/0	30/5	25/7	111/14	88.8	0.9
<i>Syzygium aromaticum</i> 0.1 %	33/0	31/0	28/0	29/0	121/0	100	-
<i>Syzygium aromaticum</i> 0.5 %	0/32	26/2	32/0	20/0	78/34	69.6	30.4
<i>Syzygium aromaticum</i> 1.0 %	0/28	29/0	24/5	4/24	57/57	50.0	50.0
<i>Syzygium aromaticum</i> 1.5 %	25/1	10/17	26/3	5/29	66/50	56.8	43.2
<i>Syzygium aromaticum</i> 2.0 %	24/7	27/0	25/8	24/5	100/20	83.3	16.7
<i>Syzygium aromaticum</i> 2.5 %	0/34	16/9	22/10	22/6	60/59	50.4	49.6
<i>Syzygium aromaticum</i> 3 %	3/27	0/30	0/31	0/29	3/117	2.6	96.0
<i>Syzygium aromaticum</i> 4 %	0/28	0/31	0/31	0/29	0/119	0.0	100
<i>Syzygium aromaticum</i> 5 %	15/10	0/34	3/27	0/31	18/102	15.0	77.2
<i>Syzygium aromaticum</i> 10 %	0/35	0/31	0/26	0/27	0/119	0.0	100
<i>Teloxys ambrosioides</i> 0.5 %	33/0	30/5	25/0	27/0	115/5	95.8	4.2
<i>Teloxys ambrosioides</i> 1.0 %	18/9	30/2	27/3	23/7	98/21	82.3	17.7
<i>Teloxys ambrosioides</i> 1.5 %	30/0	33/0	28/0	28/1	119/1	91.4	8.6
<i>Teloxys ambrosioides</i> 2.0 %	29/6	0/31	22/9	31/0	82/40	67.2	32.8
<i>Teloxys ambrosioides</i> 2.5 %	21/6	25/2	2/29	5/29	53/66	44.5	55.5
<i>Teloxys ambrosioides</i> 3 %	0/35	0/26	0/31	0/28	0/120	0.0	100
<i>Teloxys ambrosioides</i> 4 %	0/33	0/30	10/20	0/24	0/107	0.0	100
<i>Teloxys ambrosioides</i> 5 %	12/18	0/30	0/32	0/28	12/108	10.0	84.8
<i>Teloxys ambrosioides</i> 10 %	0/27	0/32	0/28	0/30	0/117	0.0	100
<i>Thymus vulgaris</i> 0.1 %	8/19	23/6	20/15	31/0	82/40	67.2	32.8
<i>Thymus vulgaris</i> 0.5 %	28/0	33/0	35/0	24/0	120/0	100	-
<i>Thymus vulgaris</i> 1.0 %	22/0	28/2	20/71	21/8	91/21	81.2	18.8
<i>Thymus vulgaris</i> 1.5 %	30/0	33/0	28/0	28/1	119/1	91.4	8.6
<i>Thymus vulgaris</i> 2.0 %	30/0	23/7	21/9	26/4	100/20	83.3	16.7
<i>Thymus vulgaris</i> 2.5 %	30/0	31/0	27/0	33/0	121/0	100	-
<i>Thymus vulgaris</i> 3 %	3/28	3/35	9/28	5/24	20/115	14.8	77.5

% de Red. = Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo

Apéndice 8. Efecto de diferentes combinaciones de fitoextractos seleccionados en la protección de granos de maíz. Relación de granos contaminados/granos sanos por repetición.

Especie vegetal	Repeticiones				Totales	% de Cont. ¹	% de Red. ²
	I	II	III	IV			
<i>Thymus vulgaris</i> 4 %	16/12	0/33	0/27	0/32	16/104	13.3	79.7
<i>Thymus vulgaris</i> 5 %	0/32	0/31	0/30	0/27	0/120	0.0	100
<i>Thymus vulgaris</i> 10 %	0/28	1/29	2/31	0/29	3/117	2.5	96.2
<i>T. ambrosioides</i> + <i>S. aromaticum</i>	9/22	18/11	19/4	15/22	61/59	50.8	
<i>M. piperita</i> + <i>O. basilicum</i>	10/21	26/8	22/6	23/7	81/42	65.8	
<i>M. piperita</i> + <i>C. zeylanicum</i>	0/26	8/22	0/34	0/31	8/113	6.6	
<i>M. piperita</i> + <i>S. aromaticum</i>	24/4	11/19	0/33	22/9	57/65	46.7	
<i>M. piperita</i> + <i>T. ambrosioides</i>	15/16	15/14	1/28	2/30	33/88	27.2	
<i>M. piperita</i> + <i>T. vulgaris</i>	27/6	0/27	0/26	24/4	51/63	44.7	
<i>C. zeylanicum</i> + <i>O. basilicum</i>	8/24	6/28	3/24	2/28	19/104	15.4	
<i>C. zeylanicum</i> + <i>S. aromaticum</i>	1/31	0/28	0/32	0/33	1/124	0.8	
<i>C. zeylanicum</i> + <i>T. vulgaris</i>	3/28	3/26	0/27	1/30	7/111	5.9	
<i>C. zeylanicum</i> + <i>T. ambrosioides</i>	0/24	0/28	0/38	0/29	0/119	0.0	100
Testigo	30/0	33/0	35/0	23/0	121/0	100	-
<i>O. basilicum</i> + <i>S. aromaticum</i>	22/6	30/3	26/2	27/3	105/14	88.2	0.6
<i>T. ambrosioides</i> + <i>T. vulgaris</i>	6/24	8/24	16/10	13/18	43/76	36.1	59.7
<i>O. basilicum</i> + <i>T. ambrosioides</i>	7/23	20/9	23/7	18/10	68/49	58.1	35.1
<i>O. basilicum</i> + <i>T. vulgaris</i>	20/13	9/16	13/15	15/16	57/60	48.7	54.3
<i>S. aromaticum</i> + <i>T. vulgaris</i>	28/4	24/6	21/9	17/13	90/32	73.7	17.7
Testigo	27/3	22/7	26/4	29/1	104/12	89.6	-

¹ % de Cont. = Porcentaje de granos contaminados. ² % de Red. = Porcentaje de reducción de la contaminación con relación al testigo

Apéndice 9. Efecto residual de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Mentha piperita* en dos concentraciones. Promedio del porcentaje de granos sanos por tratamiento.

Aceite esencial y concentración	Días después del tratamiento					
	0	7	14	21	28	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (10 %)	100	98.1	100	98	96	78.3
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (7 %)	97.6	96	92.4	97	18.5	7.8
<i>Mentha piperita</i> (10 %)	100	100	94.2	100	40	31.7
<i>Mentha piperita</i> (6 %)	100	97.5	95	57.6	17.4	11.2