

Evaluación *in vitro* de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos

In vitro evaluation of active ingredients of botanical origin for the control of phytopathogenic fungi

Ernesto Cerna-Chávez¹, Gibran Alejandro-Rojas², Yisa María Ochoa-Fuentes¹, Luis Aguirre-Uribe¹, Jerónimo Landeros-Flores¹, Omegar Hernández-Bautista³

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México C.P. 25315.

² Postgrado de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315.

³ Cultra S.A. de C.V. Blvd. Luis Echeverría Álvarez No. 1700, Col. Altavista, CP. 89880, CD. Mante, Tamaulipas, México.

RESUMEN

Antecedentes: Los productos naturales presentan un alto potencial para remplazar a los fungicidas sintéticos, sin embargo, estos compuestos varían dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta y condiciones climáticas de colecta, así como de la mezcla de compuestos presentes en el material vegetal. La separación de estos principios activos y la evaluación de su eficacia sobre diversos hongos fitopatógenos, podrían incrementar su uso bajo un esquema biorracional y de acuerdo con los principios de la química verde.

Objetivo: Evaluar *in vitro* el efecto de los principios activos botánicos (PAB) de 1-8 cineol (Eucaliptol), β -citronelol, D-limoneno y alil isotiocianato, sobre el crecimiento micelial de los hongos *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

Métodos: Se determinó la concentración inhibitoria (CI_{50}) de los PAB para cada especie de fitopatógeno, mediante bioensayos en medio de cultivo PDA envenenado. Se prepararon placas de cultivo con ocho concentraciones más un testigo por cada compuesto, que fluctuaron entre 20-160 ppm para β -citronelol, 500 a 4000 ppm para alil isotiocianato y entre 1000 a 4500 ppm para eucaliptol y D-limoneno, con intervalos de 20 y 500 ppm, respectivamente. Se tomaron lecturas diarias del crecimiento micelial hasta el cubrimiento de la caja de Petri (9 cm \varnothing). A los resultados se les aplicó un análisis Probit por el método de máxima verosimilitud para determinar la CI_{50} y sus límites fiduciales.

Resultados y conclusión: β -citronelol presentó las CI_{50} más bajas, seguido de alil isotiocianato, D-limoneno y eucaliptol. Las CI_{50} de β -citronelol fueron de 5.44, 6.25 y 6.89 ppm para *F. oxysporum*, *R. solani* y *A. solani* respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda el uso de estos PAB's para el control de los fitopatógenos estudiados.

Palabras clave: *Alternaria solani*, compuestos antifúngicos, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*

ABSTRACT

Background: Natural products have a high potential to replace synthetic fungicides, however, these compounds vary depending on the growth stage of the plant and climatic conditions of collection, as well as the mixture of compounds present in the plant material. The separation of these active principles and the evaluation of their efficacy on various phytopathogenic fungi, could increase their use under a biorational scheme and according to the principles of green chemistry.

Objective: To evaluate *in vitro* the effect of the active ingredients of botanical origin (PAB): 1-8 cineol (Eucalyptol), β -citronelol, D-limonene and allyl isothiocyanate, on the mycelial growth of the fungi *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*.

Methods: The inhibitory concentration (IC_{50}) of the PAB was determined for each species of phytopathogen, by means of bioassays in a poisoned PDA culture medium. Cultures were prepared with eight concentrations plus one control for each compound: 20-160 ppm for β -citronelol, 500-4000 ppm for allyl isothiocyanate and 1000-4500 ppm for eucalyptol and D-limonene, with intervals of 20 and 500 ppm. Daily mycelial growth readings were taken until the petri dish cover (9 cm \varnothing). Maximum likelihood estimation of the multivariate probit regression model was applied to the results for the determination of the IC_{50} s and their fiducial limits.

Results and conclusion: β -citronellol presented the lowest IC_{50} , followed by allyl isotocyanate, D-limonene and eucalyptol. The IC_{50} s of β -citronellol were 5.44, 6.25 and 6.89 ppm for *F. oxysporum*, *R. solani* and *A. solani* respectively. According to the results obtained, the use of these PABs is recommended for the control of the phytopathogens studied.

Keywords: *Alternaria solani*, antifungal compounds, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*

ARTICLE HISTORY

Received 15 February 2018 / Accepted 11 December 2018

Published on line: 20 March 2019

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Omegar Hernández Bautista, omegarhbautista@gmail.com

ORCID: 0000-0003-0845-5678

Los extractos vegetales son una fuente para el descubrimiento de nuevas moléculas o principios activos con un amplio rango de aplicaciones, desde la protección de los cultivos, la industria de la comida como antimicrobiano y antifúngico, hasta su uso en medicamentos tradicionales (Zhou *et al.*, 2010; Negi, 2012). La utilización de principios activos botánicos (PAB) en la agricultura surge de la necesidad de desarrollar medidas alternas para el control y protección de cultivos y productos almacenados (Letessier *et al.*, 2001), ya que la aplicación de fungicidas químicos ha generado problemas de desequilibrio ambiental y salud humana, favoreciendo el surgimiento de enfermedades fitopatógenas más agresivas y resistentes (Yengle *et al.*, 2008), además de incrementar los costos de producción (Céspedes y Alarcón, 2011). Los extractos vegetales están compuestos por metabolitos secundarios que presentan diversos mecanismos de defensa eficientes para el control de enfermedades fitopatógenas y son menos tóxicos para el medio ambiente (Guédez *et al.*, 2014). Poseen un amplio espectro de acción para el control de organismos de interés comercial (Bakkali *et al.*, 2008), ya que son usados como antimicrobianos y antifúngicos (Monsálvez *et al.*, 2010), aunque su eficacia es altamente dependiente de la presencia y concentración de los componentes presentes, ya sea como extracto o aceite esencial (Mejía-Garibay *et al.*, 2011); por lo que una separación de los principios activos de los extractos y la evaluación de su eficacia sobre los organismos fitopatógenos podría incrementar las opciones de control bajo un esquema biorracional y de acuerdo con los principios de la química verde (Anastas *et al.*, 2000).

Actualmente existen en el mercado PABs que se han purificado de manera aislada y se desconoce su eficacia contra agentes fitopatógenos de importancia, debido a que son aceites esenciales muy volátiles y que generalmente se utilizan como repelentes; sin embargo, se están preparando nuevas formulaciones para ser utilizadas como productos de contacto contra insectos y enfermedades (Deshpande *et al.*, 2006). Así mismo, varios autores mencionan la eficacia de monoterpenos (Banihashemi y Abivardi, 2011) y productos organosulfurados (Cázar *et al.*, 2015) como inhibidores de crecimiento de hongos y bacterias entomopatógenos. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los PABs: 1-8 cineol (eucaliptol), β -citronelol, D-limoneno y alil iso-

tiocianato, sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* (Agonomycetaceae), *Fusarium oxysporum* (Nectriaceae) y *Alternaria solani* (Pleosporaceae).

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). El eucaliptol (CAS-4708206) 99 %, β -citronelol (CAS-106229) 95 % y D-limoneno (CAS-5989275) 96 % fueron obtenidos de Sigma Aldrich® y el alil isotiocianato (CAS-570607) 98 % de Thermo Fisher®. Primeramente, se realizaron ventanas biológicas mediante bioensayos en medio de cultivo PDA envenenado (Ochoa Fuentes *et al.*, 2012), con la finalidad de establecer el intervalo de concentraciones a evaluar de cada uno los principios activos botánicos. Se evaluaron ocho concentraciones más un testigo por cada PAB: de 1000 a 4500 ppm con intervalos de 500 ppm para eucaliptol y D-limoneno, de 20 a 160 ppm con intervalos de 20 ppm para β -citronelol y de 500 a 4000 ppm con intervalos de 500 ppm para el alil isotiocianato. Cada concentración fue evaluada por quintuplicado. Los cultivos de los agentes fitopatógenos *R. solani*, *F. oxysporum* y *A. solani* fueron proporcionados por el cepario del Departamento de Parasitología de la UAAAN. Para la obtención de las concentraciones requeridas en el ensayo, se tomó el PAB a la concentración marcada en el envase y se realizaron diluciones con el medio de cultivo estéril, elaborado previamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con las que se prepararon placas en cajas de Petri de 9 cm \varnothing . Posteriormente se colocaron explantes de 0.5 cm \varnothing de cada una de las cepas fitopatógenas, previamente cultivadas en PDA, sobre las placas de medio cultivo. Las muestras se incubaron a 25 °C \pm 2 en la oscuridad, midiendo diariamente el crecimiento micelial con un vernier, tomando dos valores en forma de cruz y sacando un promedio del diámetro micelial desarrollado. Las mediciones se realizaron hasta que los cultivos testigo (PDA sin PAB), cubrieron el diámetro total de las cajas de Petri. El porcentaje de inhibición de crecimiento se determinó de la siguiente manera: % inhibición = [(crecimiento micelial del testigo - crecimiento del tratamiento) / crecimiento del testigo] x 100. Una vez determinado el rango de concentraciones de la ventana biológica, se realizaron los bioensayos para determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) con el mismo método. A los resultados de inhibición se les realizó

una regresión Probit, mediante el método de máxima verosimilitud para determinar la CI_{50} y sus límites fiduciales usando el programa SAS ver. 9.0 (SAS, 2002).

De los cuatro PABs evaluados, β -citronelol fue el que presentó la mayor inhibición (93.2 a 98.8 %) sobre los agentes fitopatológicos, a una menor concentración. Con relación a la CI_{50} , el patógeno más susceptible a la acción de β -citronelol fue *F. oxysporum* con 5.44 ppm, seguido de *R. solani* con 6.25 ppm (Tabla 1). β -citronelol es un monoterpeno acíclico identificado en *Cymbopogon citratus* "zacate limón", *Cymbopogon winterianus* (Poaceae) "citronela de Java", *Lippia alba* (Verbenaceae) "hierba negra" y *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) "malva silvestre" (Brito et al., 2012; Elsharif y Buettner, 2017). Este PAB se utilizó inicialmente como atrayente para el control de ácaros (Vanhaelen et al., 1978) y repelente contra mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus* y *A. albimanus*) (Taylor y Schreck, 1985). Posteriormente se usó para controlar estadios inmaduros de la garrapata de ganado *Amblyomma americanum* (Tabanca et al., 2013) y para tratar enfermedades causadas por basidiomicetos, ascomi-

cetos, zigomicetos y oomicetos (Banihashemi y Abivardi, 2011). Vaillant Flores et al. (2009) reportaron que el β -citronelol inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. Por su parte, Banihashemi y Abivardi (2011) encontraron que este PAB inhibió el 100 % del crecimiento de oomicetos como *Pythium* y *Phytophthora*, en dosis de 1 a 10 ppm; mientras que Morcia et al. (2017) detectaron inhibición o disminución del crecimiento micelial de tres especies del género *Fusarium*, a CI_{50} de 110 a 320 ppm.

Respecto al limoneno (Tabla 1), *F. oxysporum* requirió la concentración más alta (4040 ppm) en su CI_{50} , en contraste con *A. solani* que presentó la CI_{50} más baja, de 1435 ppm. A pesar de que estas concentraciones pueden considerar altas para su uso agrícola, este PAB puede ser una alternativa de manejo para dichos agentes patógenos y ser incluido como fungicida para producción de cultivos orgánicos, ya que presenta nula toxicidad (Elson et al., 1988), y es ampliamente utilizado en la preservación de alimentos por su actividad antibacteriana (Espina et al., 2013). Al respecto, Marei et al. (2012) mencionaron que el monoterpeno D-limoneno-

TABLA 1. Concentraciones inhibitorias (ppm) de los compuestos bioactivos contra el crecimiento micelial de los diferentes fitopatógenos evaluados

PATÓGENO	$^1CI_{50}$	LFI	LFS	CI_{05}	CI_{95}	EC. PRED.	P-VALOR
β -Citronelol							
<i>R. solani</i>							
² A	6.25	1.25	11.38	0.61	63.51	$y = -1.301 + 1.634$	<.0001
B	5.44	0.17	13.34	0.34	85.45	$y = -1.013 + 1.376$	0.001
C	6.89	0.13	15.4	0.62	75.77	$y = -1.325 + 1.580$	0.0036
D-limoneno							
A	2336	2079	2736	632.54	8626	$y = -9.765 + 2.899$	<.0001
B	4040	3826	4347	1994	8187	$y = -19.33 + 5.362$	<.0001
C	1435	1268	1633	250.36	8222	$y = -6.84 + 1.670$	<.0001
1-8 Cineol							
A	3168	3008	3313	1687	5950	$y = -21.034 + 6.998$	<.0001
B	3565	3238	3552	1886	6739	$y = -21.125 + 5.947$	<.0001
C	1173	1025	1371	165.28	8324	$y = -5.932 + 1.932$	<.0001
Alil isotiocianato							
A	1632	883.8	3580	128.52	20715	$y = -4.78 + 1.49$	<.0001
B	1384	899.32	1712	497.93	3847	$y = -11.63 + 3.70$	<.0001
C	1022	704.93	1341	273.59	3817	$y = -8.649 + 2.87$	<.0001

¹CI: Concentración inhibitoria, LFI y LFS: límite fiducial inferior y superior, respectivamente.

²A: *Rhizoctonia solani*, B: *Fusarium oxysporum*, C: *Alternaria solani*.

no posee propiedades antifúngicas para *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum*, aunque anteriormente, Alzate et al. (2009) no habían encontrado efecto inhibitorio del extracto de cáscara de cítricos, rico en contenido de limoneno sobre *F. oxysporum*, esto probablemente debido a la combinación del D-limoneno con otros metabolitos aprovechables metabólicamente por el hongo, lo que podría interferir en su capacidad de inhibición. A la fecha, aún se desconocen los sitios de acción de este monoterpene en hongos y Oomicetes, aunque se ha reportado su actividad antibacteriana debido a que sus componentes tienen la capacidad de incorporarse en ciertas estructuras de las membranas celulares, pudiendo ser absorbidos por la interfase de la membrana y alterar su sistema lipídico, debido a la penetración en la monocapa lipídica (Wydro et al., 2017).

En las evaluaciones con el 1-8 cineol (Tabla 1), las CI_{50} variaron entre 1173 y 3565 ppm, correspondiendo las concentraciones mínima y máxima a los hongos *A. solani* y *F. oxysporum*, respectivamente. Cazar et al. (2015) encontraron que el extracto de *Eucalyptus globulus* inhibe el crecimiento micelial de *Alternaria* sp. a concentraciones de 300 ppm, valores inferiores a los encontrados en este estudio. El mecanismo de acción del eucaliptol, tanto en bacterias como en hongos de importancia clínica, está mediado por la pérdida de integridad de la membrana y la inhibición de la respiración celular, reduciendo la capacidad para mantener la homeostasis (Carson et al., 2006), por lo que este PAB ha sido incluido en la agricultura como pesticida verde, debido a que está considerado como antimicrobiano de amplio espectro que puede inhibir completamente el desarrollo de hongos fitopatógenos como *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* y *Pyrenophora graminea*, a concentraciones de 2 % (Terzi et al., 2007).

Respecto al compuesto alil isotiocianato (Tabla 1), *A. solani* fue el patógeno más susceptible a este compuesto a concentraciones de 1022 ppm, mientras que *R. solani* fue el que presentó la mayor tolerancia, ya que su CI_{50} fue de 1632 ppm. El alil isotiocianato es un compuesto que se encuentra presente en las crucíferas y presenta eficacia antibacteriana contra patógenos de alimentos (Park et al., 2012), además de tener efectos sobre la calidad de la fruta, suprimiendo los contenidos fenólicos y antocianinas en la mora, *Morus alba* (Chen et al., 2015). Sin embargo, debido a su fuerte olor irritante, no ha sido conveniente utilizarlo en la conservación de frutas y hortalizas, siendo microencapsulado en

goma arábica para la industria alimentaria (Wu et al., 2015). En este estudio, para el caso en *F. oxysporum*, se requirieron concentraciones menores a 4000 ppm para tener una buena acción de control. Este PAB puede ser incluido en el manejo integrado de enfermedades, debido a que reduce el contenido de aflatoxinas, fumonisinas, zerolenonas y tricotecenos producidos en grano de maíz por *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium tricinatum*, *F. verticillioides*, *Alternaria alternata* y *Gibberella zeae* (Tracz et al., 2017), así como la reducción de beauberquinas, compuesto bioactivo producido por el metabolismo secundario de varias cepas de *Fusarium* (Meca et al., 2012). Dhingra et al. (2004) reportaron que el aceite esencial de mostaza fue efectivo en el control del mal del talluelo o marchitamiento fúngico (*damping-off*) en frijol causado por *Rhizoctonia solani*. Otros estudios reportan el uso de este PAB en el control de malezas, ya que redujo significativamente la viabilidad de los tubérculos de *Cyperus rotundus* (Bangarwa y Norsworthy, 2016). Por otro lado, Daferrera et al. (2000) reportaron que las propiedades antifúngicas del alil isotiocianato se deben a la formación de puentes de hidrógeno entre sus hidroxilos y sitios activos de ciertas enzimas de los hongos; mientras que Omidbeygi et al. (2017) encontraron que actúan sobre la membrana celular, provocando cambios celulares, enzimáticos y proteicos en los patógenos.

Los PAB evaluados en este estudio presentaron resultados promisorios como agentes de control inocuos y amigables con el humano y medio ambiente, siendo factible su uso en el control de algunos hongos fitopatógenos. El β -citronelol, en dosis bajas, fue el que presentó los mejores resultados de inhibición, por lo se recomienda su uso para el control de los fitopatógenos estudiados, así como para la rotación en el manejo de la resistencia a fungicidas sintéticos.

LITERATURA CITADA

- Alzate, N.A.G., K. López, A. Marín, W. Murillo, 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. *Tumbaga* 1(4): 59-71.
- Anastas, P.T., L.B. Bartlett, M.M. Kirchoff, T.C. Williamson, 2000. The role of catalysis in the design, development and implementation of green chemistry, *Catalysis Today* 55 (1-2): 11-22.
- Bakkali, F.A., D. Averbeck, M. Idaomar, 2008. Biological effects of essential oils: A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446-475.

- Bangarwa, S.K., J.K. Norsworthy, 2016. Effect of phenyl, allyl, and methyl isothiocyanate on *Cyperus rotundus* tubers under LDPE and VIF mulch. *Crop Protection* 84: 121-124.
- Banihashemi, Z., C. Abivardi, 2011. Evaluation of fungicidal and fungistatic activity of plant essential oils towards plant pathogenic and saprophytic fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 245-256.
- Brito, R.G., A.G. Guimarães, J.S.S. Quintans, M.R.V. Santos, D.P. Sousa, D. BadauePassos, L.J. Quintans, 2012. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. *Journal of Natural Medicines* 66(4): 637-644.
- Carson, C.F., K.A. Hammer, T.V. Riley, 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiological Reviews* 19: 50-62.
- Cázar, M.E., P. Villena, J. Parra, V. Espinoza, G. Larriva, A. Caldas, 2015. Eficacia de extracto etanólico de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en el control de *Alternaria* sp. en cultivos de col y patata. *Maskana* 5(1): 33-41.
- Céspedes, C.L., J. Alarcón, 2011. Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (3): 175-181.
- Chen, H., H. Gao, X. Fang, L. Ye, Y. Zhou, H. Yang, 2015. Effects of allyl isothiocyanate treatment on postharvest quality and the activities of antioxidant enzymes of mulberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 108: 61-67.
- Daferera D., B. Ziogag, M. Polissiou, 2000. Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 2576-2581.
- Deshpande, R.S., N.T. Neelakanta, Naveen Hegde, 2006. Cultivation of medicinal crops and aromatic crops as a means of diversification in agriculture. *Agricultural development and rural transformation*. Centre Institute for Social and Economic Change. Bangalore.
- Dhingra, O.D., M.L.N. Costa, G.J. Silva; E.S.G. Mizubuti, 2004. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping-off and seedling blight in nursery. *Fitopatologia Brasileira* 29(6): 683-686.
- Elsharif, S.A., A. Buettner, 2017. Influence of the chemical structure on the odor characters of β -citronellol and its oxygenated derivatives. *Food Chemistry* 232: 704-711.
- Elson, C.E., H.T. Maltzman, L.J. Boston, A.M. Tanner, N.M. Gould, 1988. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 9(2): 331-332.
- Espina, L., T. K. de Gelaw, S. Lamo-Castellvi, F. Pagan, D. García-Gonzalo, 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PLoS One* 8(2): e56769.
- Guédez, C., L. Cañizalez, L. Avendaño, J. Scorza, C. Castillo, R. Olivarc, L. Sánchez, 2014. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 34: 81-85.
- Letessier, M.P., K.P. Svoboda, D.R. Walters, 2001. Antifungal activity of the essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Journal of Phytopathology* 149: 673-678.
- Marei, G., M.A. Rasoul, S.A. Abdelgaleil, 2012. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103 (1): 56-61.
- Meca, G.L., F.B. Zhou, F.B. Tsao, J. Mañes, 2012. Chemical reduction of the mycotoxin beauvericin using allyl isothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1755-1762.
- Mejía-Garibay, B., A. López-Malo, J.A. Guerrero-Beltrán, 2011. Mostaza: características químicas, botánicas y sus aplicaciones en el área de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 5(1): 32-40.
- Monsálvez, M., N. Zapata, M. Vargas, M. Berti, M. Bittnerb, V. Hernández, 2010. Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *Drimys winteri* bark against Take-All disease. *Industrial Crops and Products* 31: 239-244.
- Morcía, C., G. Tumino, R. Ghizzoni, A. Bara, N. Salhi, V. Terzi, 2017. *In vitro* evaluation of sub-lethal concentrations of plant-derived antifungal compounds on fusaria growth and mycotoxin production. *Molecules* 22 (8): 1-11.
- Negi, P.S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* 156: 7-17.
- Ochoa Fuentes Y.M., E. Cerna Chávez, J. Landeros Flores, S. Hernández Camacho, J.C. Delgado Ortiz, 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton* 81(1): 69-73.
- Omidbeygi, M., M. Barzegar, Z. Hamidi, H. Nafhdibadi, 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18: 1518-1523.
- Park, S.Y., M. Barton, P. Pendleton, 2012. Controlled release of allyl isothiocyanate for bacteria growth management. *Food Control* 23: 478-484.
- Tabanca, N., M. Wang, C. Avonto, A.G. Chittiboyina, J. F. Parcher, J.F. Carroll, I.A. Khan, 2013. Bioactivity-guided investigation of geranium essential oils as natural tick repellents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(17): 4101-4107.
- Taylor W.G., C.E. Schreck, 1985. Chiral-phase capillary gas chromatography and mosquito repellent activity of some oxazolidine derivatives of (+)- and (-)-citronellol. *Journal of Pharmaceutical Science* 74 (5): 534-539.
- Terzi, V., C. Morcia, P. Faccioli, G. Valè, G. Tacconi, M. Malnati, 2007. *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 44: 613-618.
- Tracz, B.L., K. Bordin, T. Nazareth, L.B. Costa, R. Macedo, G. Meca, F. Luciano, 2017. Assessment of allyl isothiocyanate as a fumigant to avoid mycotoxin production during corn storage. *LWT Food Science and Technology* 75: 692-696.
- SAS, 2002. Guide for personal computers. SAS Institute Inc., Cary.

- Vaillant Flores, D., C. Romeu Carballo, E. Ramos Ramos, M. González García, R. Ramírez Ochoa, J. González Pentón, 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad 13(3): 197-200.
- Vanhaelen, M., R. Vanhaelen-Fastre, J. Geeraerts. 1978. Volatile constituents of *Trichothecium roseum*. Sabouraudia 16: 141-150.
- Wydro, K., M. Flasiński, C. Romańczuk, 2017. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. Food Chemistry 235: 127-135.
- Wu, H., N. Xue, C. Hou, J. Feng, X. Zhang, 2015. Microcapsule preparation of allyl isothiocyanate and its application on mature green tomato preservation. Food Chemistry 175 : 344-349.
- Yengle, M., R. Palhua, P. Lescano, E. Villanueva, E. Chachi, E. Yana, C. Gutiérrez, 2008. Prácticas de utilización de plaguicidas en agricultores en el distrito de Huaral-Perú. Revista Peruana de Epidemiología 12(1): 2.
- Zhou, X., Y. Li, X. Chen, 2010. Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship. Journal of Molecular Graphics and Modelling 29(1): 38-45.