

Potencial fungicida del árbol de neem contra el hongo *Hemileia vastatrix*

*Fungicidal potential of the neem tree against the fungus
Hemileia vastatrix*

Omar Bravo-Ruiz ^a | Lázaro Rafael Sánchez Velásquez ^b |
Enrique Alarcón-Gutiérrez ^c | Francisco Cen Pacheco ^d |

Recibido: 6 de febrero de 2022
Aceptado: 22 de marzo de 2022

^a Universidad Veracruzana, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Xalapa, México. Contacto: omarui6@gmail.com | ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2739-8832>

^b Universidad Veracruzana, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Xalapa, México. Contacto: lasanchez@uv.mx | ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6014-8731>

^c Universidad Veracruzana, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Xalapa, México. Contacto: enalarcon@uv.mx | ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3686-820X>

^d Universidad Veracruzana, Facultad de Bioanálisis, Veracruz, México. Contacto: fcen@uv.mx | ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8506-2435> *Autor para correspondencia.

Resumen: El café es uno de los productos más comercializados en México y el mundo. En los últimos años, el mercado del café ha sufrido grandes mermas económicas debido a la presencia de la roya del cafeto, cuyo agente causal es el hongo *Hemileia vastatrix*. El uso de fungicidas es el método de control más utilizado. Sin embargo, todos estos contribuyen a la contaminación del medio ambiente y generan efectos adversos para el ser humano. Por lo anterior, es necesario encontrar alternativas para erradicar o paliar la incidencia de la roya del cafeto. Las semillas, hojas y corteza de *Azadirachta indica* se extrajeron con metanol y estos extractos fueron ensayados contra esporas de *H. vastatrix*, usando el ensayo de inhibición de la germinación. Para la purificación del extracto de la corteza se utilizaron diversas técnicas cromatográficas. Los resultados indicaron que los extractos de semilla y corteza muestran una inhibición de la germinación por encima del 90%. Adicionalmente, se aislaron cuatro compuestos de *A. indica*, triricinoleína, estigmasterol, glucósido de estigmasterol y azadiractina A, que no se pudieron evaluar por la poca cantidad obtenida.

Palabras clave: *Azadirachta indica*; control de plagas; agroecología; urediniosporas; metabolitos puros.

Abstract: Coffee is one of the most commercialized products in Mexico and the world. In recent years, the coffee market has suffered great economic losses due to the presence of coffee tree rust, whose causal agent is the fungus *Hemileia vastatrix*. The use of fungicides is the most widely used control method. However, all these contribute to environmental pollution and generate adverse effects on humans. Therefore, it is necessary to find alternatives to eradicate or mitigate the incidence of coffee tree rust. The seeds, leaves and bark of *Azadirachta indica* were extracted with methanol and these extracts were tested against *H. vastatrix* spores, using the germination inhibition assay. Various chromatographic techniques were used for the purification of the bark extract. The results indicated that the seed and bark extracts show inhibition of germination above 90%. Additionally, four compounds of *A. indica* were isolated, triricinolein, stigmaterol, stigmaterol glycoside and azadirachtin A, which could not be evaluated due to the small amount obtained.

Keywords: *Azadirachta indica*; pest control; agroecology; urediniospores; pure metabolites.

Introducción

El género *Coffea* comprende principalmente dos especies de gran importancia comercial a nivel mundial, *Coffea arabica* Linn (arábica) y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (robusta) (Clarke y Macrae 1985; Davis et al., 2019). La especie *C. arabica* representa aproximadamente un 60% de la producción mundial, que incluye dos variedades botánicas distintas conocidas como: *C. arabica* var. *arabica* (normalmente llamada *C. arabica* var. *typica* Cramer) y *C. arabica* var. *bourbon* (B. Rodr.) (Krug et al., 1939; Davis et al., 2019). La especie *C. canephora* representa casi el 40% de la producción mundial; incluye principalmente tres variedades: *C. canephora* var. *kouilouensis*, *C. canephora* var. *nganda* y *C. canephora* var. *niaouli* (Lim 2013). Existen otras dos especies de café, que representan menos del 1% de la producción mundial, *Coffea liberica* Bull ex Hiern (ibérica) y *Coffea dewevrei* (Lim 2013).

La enfermedad más importante para el cultivo del cafeto es la roya, la cual es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk & Br (Temis et al., 2011; Halpay et al., 2020). *H. vastatrix* es un fitoparásito

obligado de la planta de café, que incluye a 49 razas, siendo la raza II, la más agresiva debido al factor de virulencia vs^1 (Avelino y Rivas, 2013; Quispe-Apaza et al., 2017). La enfermedad se caracteriza por presentar pequeñas manchas redondeadas y polvorientas, de color amarillo-naranja en el envés de las hojas del cafeto (**Figura 1**), provocando una defoliación en la planta que disminuye sensiblemente la producción del grano y, dependiendo del grado de infección, puede conducir a la muerte de la planta (CESVVER, 2018). La rapidez con la que se propaga el hongo de la roya del cafeto hace de ella una enfermedad sumamente peligrosa (Rayner, 1961; Li et al., 2022).

Figura 1

Hoja de Coffea arabica infectada por la roya del cafeto



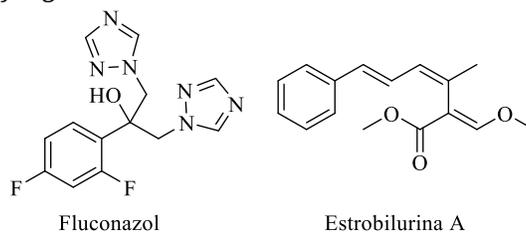
Fuente: Elaboración propia.

Entre las estrategias de control de la roya, la aplicación de productos químicos de contacto y de acción sistémica es el método más utilizado, ya que ofrece una supresión rápida y rentable del hongo *H. vastatrix*. Los principales fungicidas de contacto son sales de cobre como el oxiclورو de cobre y los hidróxidos de cobre (Dos Santos *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso indiscriminado de estas sales de cobre ocasiona la acumulación de cobre en aguas subterráneas, afectando procesos biogeoquímicos (Salam y Helmke, 1998; Salam *et al.*, 2021). La NOM-127-SSA1-1994 establece que los límites permisibles de cobre en el agua para uso y consumo humano deben ser de 2 mg/L, valor que también es referenciado por la OMS (2006).

El consumo de cantidades mayores de cobre en el humano ya sea por agua o alimentos, puede causar enfermedades y pérdida de función a nivel celular y molecular, afectando a diversos tejidos y el metabolismo (Kabata y Mukherjee, 2007; Rodríguez Heredia, 2021). Entre los fungicidas sistémicos más estudiados se encuentran los triazoles como el fluconazol y las estrobilurinas (**Figura 2**), los primeros actúan inhibiendo la biosíntesis del ergosterol en hongos, mientras que las estrobilurinas inhiben la respiración mitocondrial (Bartlett et al 2002). Se ha observado que el efecto de los fungicidas sistémicos en el suelo tiene una persistencia de 80 días, eliminando hongos importantes de la biota del suelo (Abdel *et al.*, 1982; Ratna-Kumar *et al.*, 2017) (**Figura 2**).

¹ Gen asociado a la capacidad que tiene el microorganismo para producir enfermedad.

Figura 2
 Ejemplos de las estructuras químicas de
 fungicidas sistémicos



Fuente: Elaboración propia.

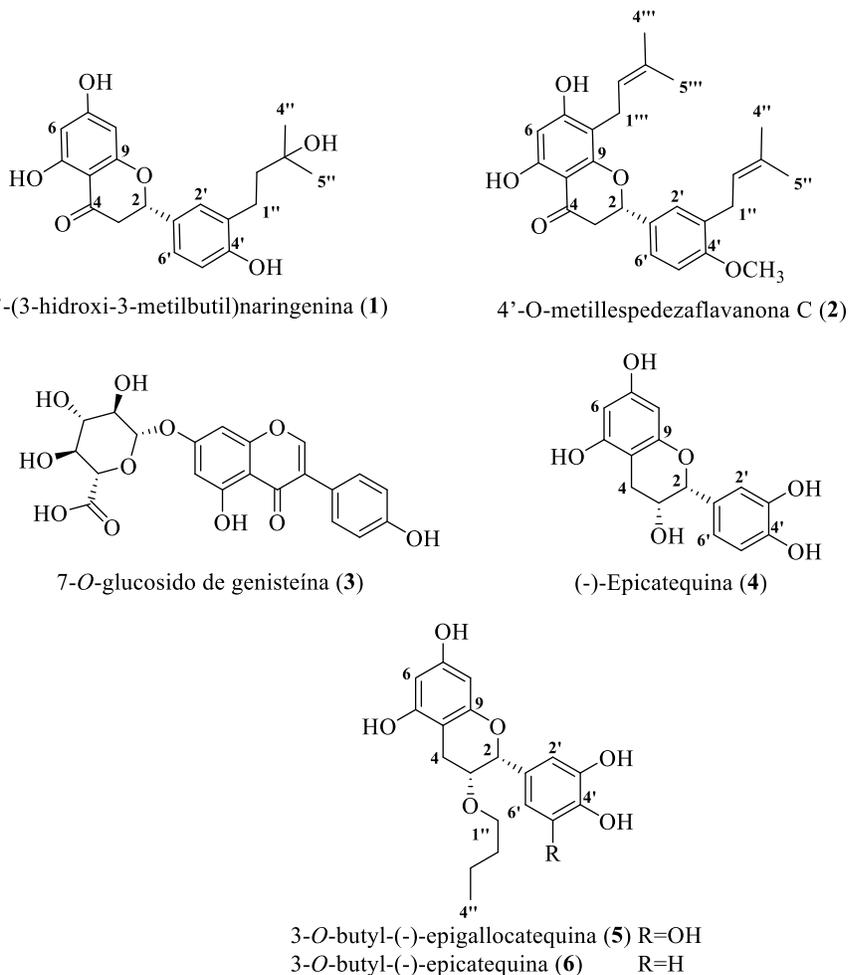
Ante este panorama, es evidente la necesidad de buscar nuevas alternativas de control que sean eficaces (menos tóxicas y/o más activas) y más amigables con el medio ambiente. Una de ellas es el desarrollo de fungicidas naturales que posean nuevos mecanismos de acción con alta selectividad. Además, la demanda actual de productos libres de pesticidas y fertilizantes procesados (agricultura orgánica) es una tendencia mundial que tiene la finalidad de promover las prácticas agrícolas sostenibles (Migliorini & Wezel, 2017). En este sentido, investigaciones realizadas en todo el mundo han demostrado la gran cantidad de compuestos secundarios presentes en plantas capaces de activar el sistema de defensa de las plantas o inhibir la infección por microorganismos patógenos (Borges Pereira *et al.*, 2012). Muchos de estos compuestos son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y síntesis de compuestos (Ringuelet y Viña, 2013).

Así, por ejemplo, aproximadamente la mitad de los fármacos que se comercializan en la actualidad, tienen su origen directa o indirectamente de fuentes naturales, principalmente terrestres (Newman y Cragg, 2020). Estos compuestos naturales han mostrado atributos bactericidas, fungicidas o fungistáticas en diversos patógenos (Ćirić *et al.* 2011; Takhi *et al.* 2011; Alkhulaifi *et al.* 2019). Un ejemplo de lo anterior es el árbol neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (*A. Indica*) que es bien conocido por su amplio espectro de propiedades biológicas y propiedades beneficiosas para la salud (Atawodi & Atawodi, 2009).

Una gran variedad de compuestos con una gran diversidad estructural se han aislado del árbol neem, algunos de los cuales han mostrado bioactividades importantes, como la actividad antioxidante de la gran variedad de compuestos fenólicos que posee (Sultana *et al.*, 2007), el efecto citotóxico del 3'-(3-hidroxi-3-metilbutil)naringenina (**1**) y del 4'-*O*-metilspedezaflavanona C (**2**) (Kitdamrongtham *et al.*, 2014), la actividad antifúngica de 7-*O*-glucosido de genisteína (**3**) and (-)-epicatequina (**4**), (Kanwal *et al.*, 2011) o efectos larvicidas como los que poseen el 3-*O*-butyl(-)-epigallocatequina (**5**) y 3-*O*-butyl(-)-epicatequina (**6**) (**Figura 3**) (Cen-Pacheco *et al.*, 2019).

En el presente trabajo, se evaluó la actividad fungicida de los extractos de la corteza, las hojas y los frutos de *A. indica*, contra el hongo *H. vastatrix* para la búsqueda de una alternativa de control de la enfermedad de la roya del café.

Figura 3
Compuestos aislados de A. indica



Fuente: Elaboración propia.

2. Materiales y Métodos

2.1. Recolección del material vegetal

La recolección de los frutos de *A. indica* (árbol de neem) se realizó en el mes de agosto de 2017, mientras que las hojas y la corteza se obtuvieron en la etapa de crecimiento vegetativo (después de la fructificación). Todo el material vegetal se recolectó de una plantación de neem, con antigüedad de 26 años, del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz (19° 6' 36" N, 96° 12' 0" O) (**Figura 4**). Posteriormente, el material vegetal se secó en una estufa microbiológica (BINDER, Serie FED) a 50 °C hasta obtener un peso constante (hojas: 503.2 g, semillas: 1806 g y corteza: 1152 g) y luego se trituró y se almacenó hasta su uso.

Figura 4

Recolecta de las semillas, las hojas y la corteza del árbol de neem



Fuente: Elaboración propia.

2.2. Extracción

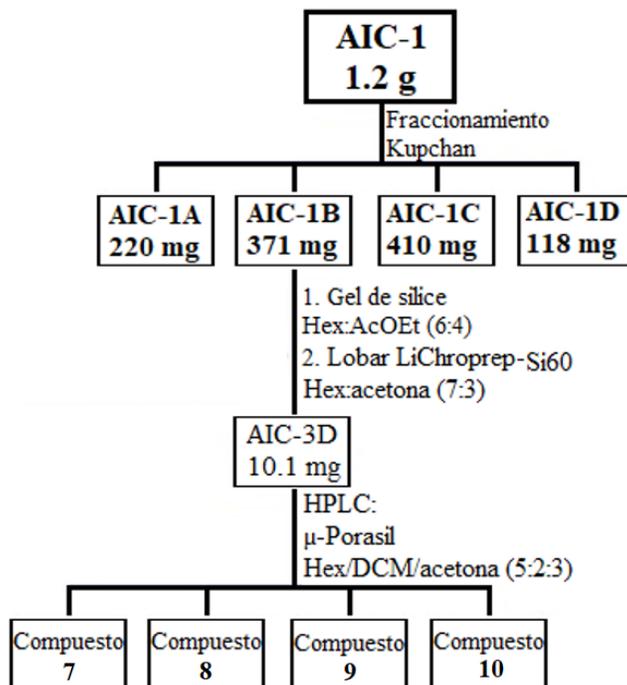
El material vegetal (semillas, hojas y corteza) se extrajo cuatro veces por maceración a temperatura ambiente durante 3 h, usando cada vez 500 mL de metanol grado técnico (99%) para 250 g de material vegetal. Posteriormente, el disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio (Rotavapor R3, Büchi, Latinoamérica S. de R.L. de C.V).

2.3. Purificación de la corteza de neem

El extracto de la corteza de *A. indica* se re-disolvió en una disolución 1:1 de los disolventes metanol y agua (MeOH:H₂O [1:1], 500 mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo., USA) y seguidamente se agregó 500 mL de hexano; la mezcla obtenida se colocó en agitación constante por dos horas, a una temperatura de 25 °C, posteriormente la mezcla fue colocada un embudo de separación para retirar la fracción de hexano, la cual es inmisible en la mezcla de MeOH:H₂O, este procedimiento se realizó tres veces para los disolventes hexano (Hex), diclorometano (DCM) y acetato de etilo (AcOEt) (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo., USA), obteniéndose así cuatro nuevas fracciones de polaridad creciente: AIC-1A (Hex, 220 mg), AIC-1B (DCM, 371 mg), AIC-1C (AcOEt, 410 mg) y AIC-1D (MeOH:H₂O, 118 mg) (Kupchan *et al.*, 1973).

La fracción de diclorometano (371 mg) se purificó en columna de vidrio (3 cm de diámetro interno y 20 cm de longitud de la columna) empacada con gel de sílice-60 (Merck, Darmstadt, Germany), utilizando como eluyente la mezcla de hexano:acetato de etilo (6:4), y, seguidamente, se utilizó una columna pre-empaquetada de media presión Lobar LiChroprep-Si60 (Merck, Darmstadt, Germany), usando hexano:acetona (7:3) como eluyente. La fracción 3D, se purificó en un HPLC-UV (Breeze 2; Waters, Wexford, Ireland) con una columna μ -Porasil (Waters, Wexford, Ireland) y hexano/diclorometano/acetona (5:2:3) como eluyente; así se obtuvieron los compuestos triricinoleína (**7**) (0.9 mg), estigmasterol (**8**) (1.1 mg), glucósido de estigmasterol (**9**) (0.7 mg) y azadiractina A (**10**) (0.9 mg) (Figura 5).

Figura 5
 Marcha cromatográfica de los compuestos aislados



Fuente: Elaboración propia.

2.4. Inhibición de la germinación de esporas de *Hemileia vastatrix*

Para determinar la actividad fungicida de *A. indica* sobre *H. vastatrix* se utilizó el ensayo de inhibición de la germinación de esporas. Las esporas de la roya del café (*H. vastatrix*) se obtuvieron de cafetales ubicados en la localidad de San Marcos de León, municipio de Xico, Veracruz. Estas se preservaron a 4 °C en oscuridad hasta el momento en que se utilizaron en el ensayo. Los ensayos se realizaron por microdilución en placas con 96 pocillos, usando ocho réplicas por cada concentración de extracto (0.1, 1.0 y 10.0 mg/mL), disuelto en agua destilada estéril con Tween-80 al 4%. Como control positivo se utilizó el fungicida sistémico carbendazima a una concentración de 0.25 mg/mL y agua destilada con Tween-80 al 4% como control negativo. Por otro lado, se preparó una solución de 5 mg de esporas en 0.5 mL (6.5×10^4 esporas por 0.5 mL) de agua destilada con Tween-80 al 4%. Así a 0.1 mL de cada una de las disoluciones de los extractos y de los controles, se le agregó 0.1 mL de la solución de esporas (1.3×10^4 esporas por 0.1 mL). Posteriormente, la microplaca se incubó a 28 °C en oscuridad durante 24 h y, seguidamente, se realizó el conteo de esporas germinadas y no germinadas (Rayner, 1961; Avelino y Rivas, 2013), utilizando un microscopio de contraste de fases (Motic, modelo BA310) (Figura 6). A partir del análisis de ocho réplicas para cada concentración, se obtuvo el porcentaje de inhibición de esporas con la siguiente fórmula (López-Muñoz *et al.*, 2019):

$$\% \text{ de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Promedio de esporas germinadas por tratamiento}}{\text{Promedio de esporas germinadas en el control negativo}} \right) \times 100$$

2.5. Análisis estadísticos

Inicialmente se estableció si los datos tienen una distribución normal o asimétrica, para ello se utilizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk. En aquellos casos en donde la prueba Shapiro-Wilk indicó una distribución normal de los datos, se realizó la prueba Anova para analizar la varianza de los datos y determinar si existía diferencia estadística significativa. Seguidamente si los datos presentaban diferencia significativa, se realizó el análisis Post Hoc mediante la prueba de Tukey para establecer que grupo o grupos de datos muestran la diferencia significativa en sus medias aritméticas.

Por otro lado, si la prueba Shapiro-Wilk indicó una distribución asimétrica, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar si hay diferencias estadísticas significativas entre las varianzas de los datos y la prueba Wilcoxon para establecer en que grupo o grupos se encuentra la diferencia significativa entre las medias aritméticas, si la hubiese.

3. Resultados

Los extractos de corteza, hoja y semillas de *A. indica* obtenidas por extracción metanólica a temperatura ambiente fueron evaluadas para determinar su potencial fungicida contra esporas de *H. vastatrix*, usando el ensayo de inhibición de germinación.

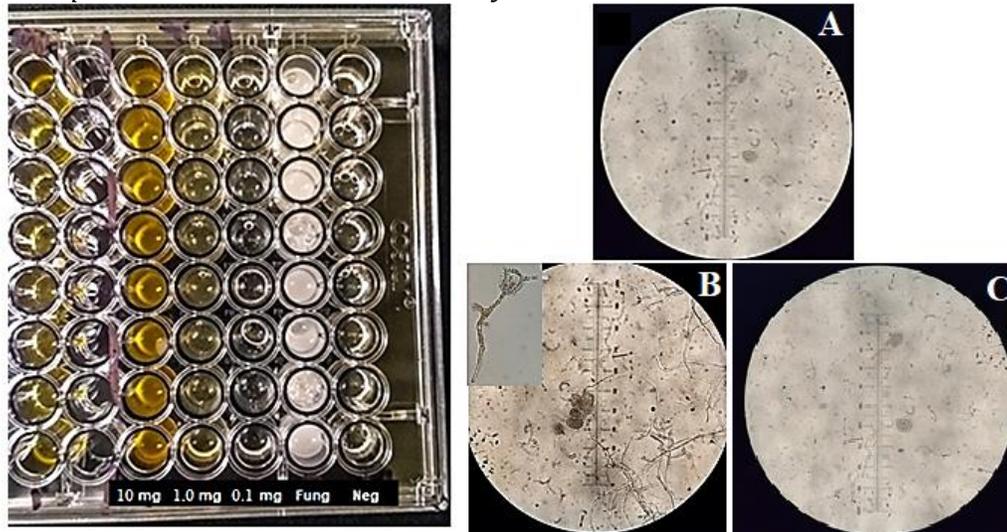
La inhibición de la germinación de los extractos fue evaluada a las concentraciones de 10.0, 1.0 y 0.1 mg/mL. Los resultados revelaron que los extractos de corteza y semilla muestran las mejores actividades, particularmente a la concentración de 10.0 mg/mL, en donde se observó una inhibición de la germinación por encima del 90%.

Por otro lado, en el caso de las hojas, se observaron valores entre el 34 y 53% de inhibición; es importante destacar que, aunque parezca que, al aumentar la concentración, la inhibición de la germinación disminuye, esto no es del todo cierto, ya que los porcentajes de inhibición de las diferentes concentraciones no muestran diferencias significativas entre las diferentes concentraciones, es decir que los resultados de inhibición se consideran similares.

En el caso del control positivo, carbendazima, se observó un 100% de inhibición a la concentración discriminatoria ensayada (0.25 mg/mL), indicando que esta población de *H. vastatrix* posee alta sensibilidad a la carbendazima (**Figura 6 y Tabla 1**).

Figura 6

Ensayo de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix*. Izquierda. Microplaca con las concentraciones ensayadas



Nota: A. Inhibición de la germinación inducida por las semillas de *A. indica* a la concentración de 10 mg/mL (objetivo 40×, tamaño regleta 250 μm). B. Germinación en el control negativo (objetivo 40×, tamaño regleta 250 μm). C. Germinación con el control positivo (carbendazima) (objetivo 40×, tamaño regleta 250 μm).

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1

Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix*

	Concentración (mg/mL)	Inhibición germinación (% ± DE)
Corteza ¹	0.1	18.91 ± 10.2
	1.0	15.54 ± 13.7
	10.0	92.22 ± 1.66
Hojas ²	0.1	48.31 ± 10.12
	1.0	53.05 ± 8.78
	10.0	34.25 ± 9.83
Semillas ³	0.1	34.78 ± 6.84
	1.0	74.22 ± 3.11
	10.0	91.61 ± 1.92
Carbendazima*	0.25	0
Control negativo**	---	100

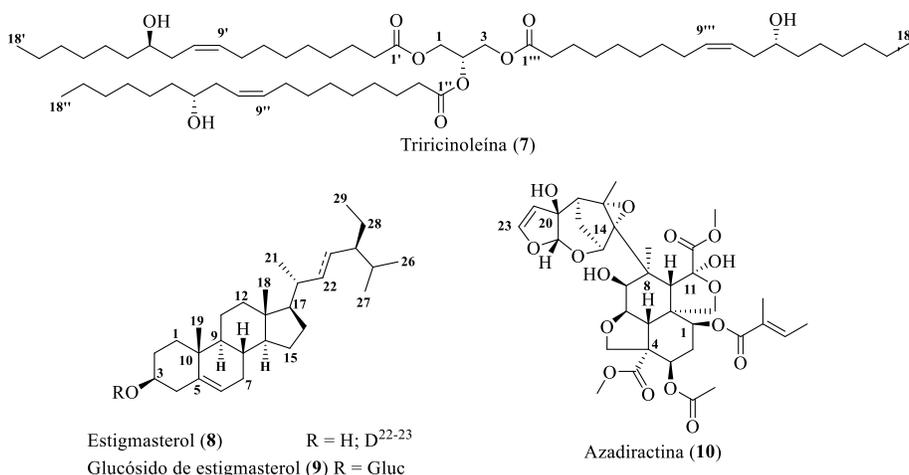
Nota: ± DE: Desviación estándar. *Control positivo. **Control negativo. ¹ La prueba de Wilcoxon muestra diferencias significativas entre la concentración de 10 mg/mL y las otras dos concentraciones. ² La prueba de Anova no muestra diferencias significativas entre las concentraciones. ³ La prueba de Wilcoxon muestra diferencias significativas entre

todas las concentraciones ensayadas. Las pruebas que se utilizaron dependen de si los datos son normales o asimétricas, según la prueba Shapiro-Wilk. Fuente: Elaboración propia.

La investigación fitoquímica sobre la corteza de *A. indica* condujo al aislamiento de cuatro compuestos ya conocidos, la triricinoleína (**7**) (Ghosh et al., 2002), el estigmasterol (**8**) (Jiang et al., 2013), el glucósido de estigmasterol (**9**) (Amina et al., 2018) y la azadiractina A (**10**) (Jarvis et al., 1997). Las estructuras de los cuatro compuestos aislados fueron determinadas mediante detallado análisis de sus datos espectroscópicos (RMN 1D y 2D) y espectrométricos (ESI-HRMS), así como la comparación de los datos espectroscópicos de **1-4** con los reportados previamente en la literatura científica (**Figura 7 y 8**).

Figura 7

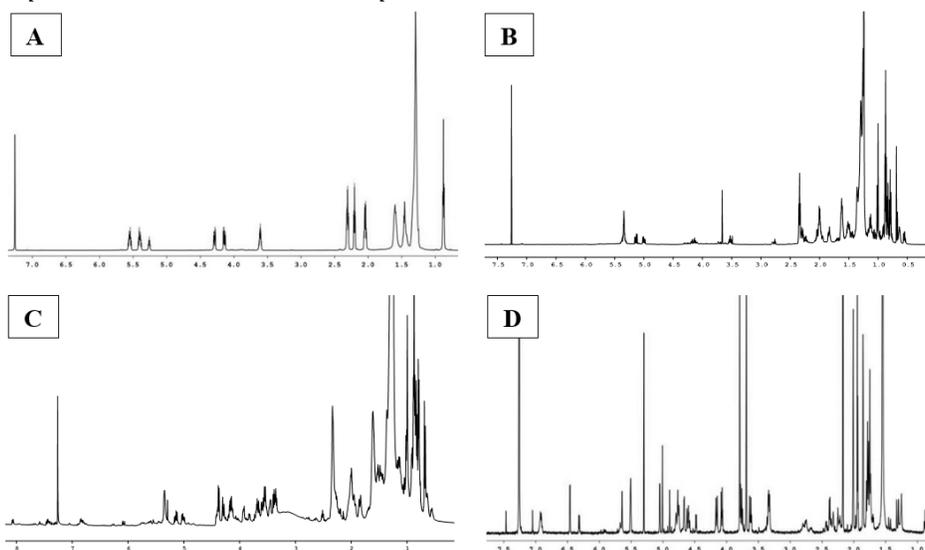
Estructuras químicas de los compuestos aislados de la corteza de A. indica



Fuente: Elaboración propia.

Figura 8

Espectros de RMN-1H de los compuestos aislados de la corteza de A. indica



Nota: A: triricinoleína (**7**). B: estigmasterol (**8**). C: glucósido de estigmasterol (**9**) D: azadiractina A (**10**). Fuente: Elaboración propia.

4. Discusión

El extracto metanólico de la corteza del árbol del neem mostró una importante inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* (92.22%) a la concentración de 10 mg/mL, mientras que las concentraciones de 1 mg/mL y 0.1 mg/mL mostraron una inhibición de 15.54 y 18.91%, respectivamente. Las observaciones microscópicas sugieren que el efecto inhibitorio a la concentración de 10 mg/mL podría ser físico, ya que las esporas se aglutinaron al sedimento del extracto (**Figura 9**).

Por otro lado, el extracto metanólico de las hojas del árbol del neem presentó inhibición de la germinación de esporas a las tres dosis evaluadas (entre 34 y 48%). Sin embargo, los resultados no muestran correlación entre la concentración y la actividad, de hecho, la prueba de Tukey indicó que no hay diferencias significativas en las actividades observadas para las tres concentraciones evaluadas. Esta falta de correlación entre la inhibición de germinación y la concentración podría deberse a que el o los compuestos activos podrían tener su máxima solubilidad en el medio de ensayo (agua destilada estéril con Tween-80 al 4%) a una concentración cercana al 0.1 mg/mL; por tanto, aunque se agregara más extracto, la concentración del compuesto activo no aumentaría.

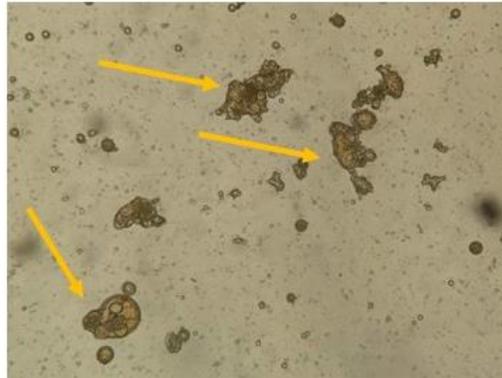
En efecto, uno de los fundamentos más importantes en el descubrimiento y desarrollo de fármacos es la solubilidad, ya que es un factor de gran relevancia en la farmacodinámica, farmacocinética y toxicidad de muchos compuestos (Kadela-Tomanek *et al.*, 2021). Los resultados del extracto metanólico de las hojas mostraron concordancia con la investigación que realizó Chandrashekara *et al.* (2012), en la cual fue posible reducir la incidencia de la roya de la morera (*Cerotelium fici*), entre un 33 y un 73% utilizando extractos acuosos de neem (*A. indica*).

El extracto metanólico de las semillas del árbol del neem fue el que mostró mejor actividad, ya que las concentraciones de 1.0 y 10.0 mg/mL inhiben significativamente la germinación de esporas; más del 90%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Borges Pereira y Alves (2012), quienes demostraron que el aceite de las semillas de neem inhibe totalmente la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix* a una concentración volumen/volumen de 2000 μ L L⁻¹, con una DL₅₀ estimada en 845 μ L L⁻¹.

Del estudio cromatográfico de *A. indica*, se logró el aislamiento de cuatro compuestos previamente reportados en la literatura. La triricinoleína (**7**) fue reportada por Ghosh (2002) y se caracteriza por inhibir la agregación plaquetaria inducida por epinefrina; el estigmasterol (**8**) fue aislado del pericarpio del fruto de *litchi chinensis* y se le determinó una “pobre” capacidad de captación de radicales libres (Jiang *et al.*, 2013), el glucósido de estigmasterol (**9**), es un esteroil aislado de *Plectranthus urinaria* que posee una importante actividad antioxidante y antiinflamatoria (Amina *et al.*, 2018) y la azadiractina A (**10**), que es tal vez el compuesto más conocido de *A. indica*, por su amplio espectro de propiedades biológicas, entre las que destaca su notable actividad pesticida (Jarvis *et al.*, 1997).

Figura 9.

Aglutinación de esporas de H. vastatrix al sedimento del extracto metanólico de la corteza del árbol del neem (10 mg/mL; 40x)



Fuente: Elaboración propia.

5. Conclusiones

De acuerdo con los resultados de los extractos de diferentes partes de la planta *A. indica* contra la germinación de esporas de *H. vastatrix*, se observó que la corteza y semillas poseen una evidente actividad fungicida y/o fungistática, especialmente a las concentraciones más altas, es particularmente destacable la actividad de las semillas, en donde se observó un 74.22% de inhibición de la germinación a la concentración de 1 mg/mL y un 91.61% a la concentración de 10 mg/mL, mientras que el extracto de la corteza solamente mostró una importante inhibición a la concentración de 10 mg/mL, 92.22%. Por tanto, es evidente que los extractos de la corteza y de las semillas de *A. indica* tienen un gran potencial para ser utilizados como alternativa en el control de *H. vastatrix*. Para el futuro, se pretende recolectar una mayor cantidad de *A. indica* y así poder aislar mayores cantidades de los compuestos, triricinoleína (7), estigmasterol (8), glucósido de estigmasterol (9) y azadiractina A (10), así como de otros compuestos para determinar su actividad fungicida sobre *H. vastatrix*.

Referencias

- Abdel**, H.M., Abdel, M.I.A., Hamida, S. (1982). Selective effects of two systemic fungicides on soil fungi. *Mycopathologia*, 79(2), 93-99. <https://doi.org/10.1007/BF00468085>
- Alkhulaifi**, M.M., Awaad, A.S., AL-Mudhayyif H.A., Alothman M.R., Alqasoumi S.I., Zain S.M. (2019). Evaluation of antimicrobial activity of secondary metabolites of fungi isolated from Sultanate Oman soil. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(3), 401-405. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.12.009>
- Amina**, M., Alarfaj, N.A., El-Tohamy, M.F., Al Musayeib N.M., Oraby H.F. (2018) Sequential injection-chemiluminescence evaluation of stigmasterol glucoside and luteolin via green synthesis of silver nanoparticles using biomass of *plectranthus asirensis*, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 11(4), 523-533. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1543457>

- Atawodi, S.E., Atawodi, J.C.** (2009). *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochemistry Reviews*, 8, 601-620. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9144-6>
- Avelino, J. y Rivas, G.** (2013). La roya anaranjada del café. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/document>
- Borges, R., Ciavarelli, G., Perina, F. y Alves, E.** (2012) Essential oils for rust control on coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia*, 36, 16-24. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000100002>
- Cen-Pacheco, F., Ortiz-Celiseo, A., Peniche-Cardena, A., Bravo-Ruiz, O., López-Fentanes, F.C., Valerio-Alfaro, G., Fernández, J.J.** (2019). Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Azadirachta indica*. *Natural Product Research*, 5, 1-9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1579808>
- Chandrashekara, K.T., Prakash, B.M., Mahesha, K.S., Rajashekar N.** (2012). Antifungal activity of plant extracts against leaf rust disease of mulberry, 3(1), 60-63. <https://bit.ly/3JgHdde>
- Ćirić, A., Karioti, A., Glamočlija, J., Soković, M., Skaltsa, H.** (2011) Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *The Journal of the Serbian Chemical Society*, 76 (1), 27-34. <https://doi.org/10.2298/JSC100127008C>
- Clarke, R.J. y Macrae, R.** (1985). *Coffee*. Volume 1: Chemistry, ELSEVIER.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Veracruz (CESVVER).** (2018). Roya del café (*Hemileia vastatrix*). <http://cesvver.org.mx/roya-del-cafe-hemileia-vastatrix/>
- Davis, A.P., Chadburn, H., Moat, J., O'Sullivan, R., Hargreaves, S., Lughadha, E.N.** (2019). High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Science Advances*, 5(1), eaav3473. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3473>
- Dos Santos, J.M.F., De Oliveira, S.H.F., Domingues, R.J., Guzzo, S.D.** (2002). Avaliação da eficácia de fungicidas sistêmicos no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix* L.) do cafeeiro, sob chuva simulada. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69(1), 45-49. http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_1/santos.pdf
- Ghosh, P., Hoque, M., Karmakar, G.** (2018). Castor oil as potential multifunctional additive in the formulation of eco-friendly lubricant. *Polymer Bulletin*, 75(2), 501-514. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2047-6>
- Halpay, M., Silverio, L., Mateo, A., Pimentel, Á., Cueto, J.** (2020). Evaluación *in vitro* de micoparásitos con potencial de control sobre la enfermedad Roya del café (*Hemileia vastatrix*) en la provincia San Juan, República Dominicana. *Revista Agropecuaria y Forestal*, 9(2), 17-24. <http://sodiaf.org.do/apf/index.php/apf/article/view/120/104>
- Hernández, C., López, L., Sánchez, L.** (2021). Agentes de control biológico de la roya del café ¿Cómo funcionan y qué tan efectivos son? *BioTecnología*, 25(1), 21-30. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/05/Hernandez-et-al.-2021.pdf>
- Jiang, G., Lin, S., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, M., Chen, F., Prasad, K.N., Duan, X. Yang, B.** (2013). Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation. *Food Chemistry*, 136(2), 563-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.089>
- Kabata, A. y Mukherjee, A.B.** (2007). *Trace elements from soil to human*. Nueva York: Springer Berlin Heidelberg New York.
- Kadela-Tomanek, M., Jastrzębska, M., Chrobak, E., Bębenek, E., Boryczka, S.** (2021). Chromatographic and computational screening of lipophilicity and pharmacokinetics of newly synthesized betulin-1,4-quinone hybrids. *Processes* 9(2), 376. <https://doi.org/10.3390/pr9020376>

- Kanwal, Q., Hussain, I., Siddiqui, H.L., Javaid, A.** (2011). Antimicrobial activity screening of isolated flavonoids from *Azadirachta indica* leaves. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(3), 375-384. <https://doi.org/10.2298/JSC100406027K>
- Kitdamrongtham, W., Ishii, K., Ebinab, K., Zhang, J., Ukiya, M., Koike, K., Akazawaa, H., Manosroia, A., Manosroi, J., Akihisa, T.** (2014). Limonoids and flavonoids from the flowers of *Azadirachta indica* var. *siamensis*, and their melanogenesis-inhibitory and cytotoxic activities. *Chemistry & Biodiversity*, 11, 73-84. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300266>
- Krug, C.A., Mendes, J.E.T. Carvalho, A.** (1939) Taxonomia de *Coffea arabica* L. Bol Tec no 62. Instituto Agronomico de Estado, Campinas, Brazil.
- Kupchan, S.M., Tsou, G. Sigel, C.W.** (1973). Datiscacin, a novel cytotoxic cucurbitacin 20-acetate from *Datisca glomerata*. *Journal of Organic Chemistry* 38(7), 1420-1421. <http://dx.doi.org/pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00947a041>
- Li, K., Hajian-Forooshani, Z., Su, C., Perfecto, I., Vandermeer, J.** (2022). Reduced rainfall and resistant varieties mediate a critical transition in the coffee rust disease. *Scientific Reports*, 12(1), 1564. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05362-0>
- Lim, T.K.** (2013). *Coffea canephora*. In Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants (pp. 680-709). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5653-3_33
- López-Muñoz, N.R., Romero-Bastidas, M., Arce-Amézquita, P.M., Hernández-Rubio, J. S.** (2019). Actividad antifúngica de antioxidantes derivados de cuatro cultivares de *Capsicum* spp. contra hongos fitopatógenos. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(18), 487-498. <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.2174>
- Migliorini, P., Wezel, A.** (2017). Converging and diverging principles and practices of agriculture regulations and agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0472-4>
- Newman, D.J., Cragg, G.M.** (2020) Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Organización Mundial de la Salud [OMS].** (2006). Guías para la calidad del agua potable (3^{ra} Edición). Suiza: Ediciones de la Organización Mundial de la Salud. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_fulll_lowsres.pdf
- Quispe-Apaza, C.S., Mansilla-Samaniego, R.C., López-Bonilla, C.F., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., Monzón, C.** (2017). Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 418-436. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1612-7>
- Ratna-Kumar, P.K., Shiny Niharika, P., Hemanth, G.** (2017). Impact of fungicides on the growth and distribution of soil mycoflora in agriculture fields at Narasannapeta. *International Journal of Science and Research*, 6(1), 2337-2347. <https://bit.ly/3x6Anov>
- Rayner, R.W.** (1961). Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). *Annals of Applied Biology*, 49(3), 497-505. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1961.tb03641.x>
- Ringuelet, J., Viña, S.** (2013). *Productos naturales vegetales*, Editorial de la Universidad de La Plata.
- Rodríguez Heredia, D.** (2021). Metales pesados y salud. *Correo Científico Médico*, 25(4). <http://www.revcoemed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/3702>
- Salam, A.K., Helmke, P.A.** (1998). The pH dependence of free ionic activities and total dissolved concentrations of copper and cadmium in soil solution. *Geoderma*, 83(1), 281-291. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(98\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(98)00004-4)

- Salam**, A.K., Milanti, M., Silva, G., Rachman, F., Santa, I.M.T.D., Rizki, D.O., Novpriansyah, H., Sarno, S. (2021). The use of N HNO₃ to determine copper and zinc levels in heavy-metal polluted tropical soils. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 905(1), 012001. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/905/1/012001>
- Sultana**, B., Anwar, F., Przybylsky R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104, 1106-1114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.019>
- Takhi**, D., Ouinten, M., Yousfi, M. (2011) Study of antimicrobial activity of secondary metabolites extracted from spontaneous plants from the area of Laghouat, Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 469-77. <https://bit.ly/3xpDB6P>
- Temis** A., López A., Sosa M. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(2), 54-74. <https://bit.ly/3JhTTkh>