



Artículo / Article

Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hoja de *Guazuma ulmifolia* Lam. contra fitopatógenos

Antimicrobial activity *in vitro* of extracts leaf *Guazuma ulmifolia* Lam. over phytopathogens

Hilda Elisa Ramírez Salcedo¹, Gil Virgen-Calleros², José de Jesús Vargas-Radillo¹,
Eduardo Salcedo- Pérez¹ y Lucía Barrientos-Ramírez¹

Resumen

Ante el interés actual por el control natural de microorganismos fitopatógenos con sustancias derivadas de plantas, se evaluó el rendimiento, la actividad antifúngica y antibacteriana de péptidos y metabolitos de las hojas de guácima (*Guazuma ulmifolia*), a partir de sus propiedades curativas y plaguicidas. Los péptidos fueron extraídos con los buffers: B₁ (pH 7.0) KCl, EDTA; B₂ (pH 5.2) KCl, CH₃COONa, β-mercaptoetanol; B₃ (pH 7.0) KCl, EDTA, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), polivinilpirrolidona, tiourea, mientras que los metabolitos fueron extraídos con hexano, metanol y diclorometano. La concentración de péptidos se realizó mediante el método de Bradford y su peso molecular se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se aplicó cromatografía de capa fina (TLC)-columna empacada para separar los compuestos y analizarlos. Paralelamente se aislaron los hongos *Sclerotium cepivorum*, de cebolla. *Fusarium oxysporum*, de melón, así como las bacterias *Xanthomonas campestris*, de jitomate, y se incubó *Pseudomonas aeruginosa* (cepario registro 0693-P). La actividad antifúngica se midió por inhibición del desarrollo micelial *in vitro*, mientras que la antibacteriana fue evaluada por la formación de colonias (UFC mL⁻¹). Buffer 2 (B2) mostró el mayor valor (15.7 %) en los rendimientos de extractos, en tanto que, los de hexano (3.9 %), metanol (3.0 %) y diclorometano (2.2 %) fueron inferiores en este parámetro. El peso molecular aproximado de los péptidos fue de 24.9 kDa. Asimismo, el extracto con diclorometano fue el de mayor inhibición sobre *Sclerotium* (88.4 %), B₂ sobre *Xantomonas* (86.5 %), y los extractos en hexano sobre *Xantomonas* (84.0 %).

Palabras clave: Bioactividad, extractos, *Guazuma ulmifolia* Lam., metabolitos, microorganismos patógenos, péptidos bioactivos.

Abstract

Currently it is looking for a biological control of pathogens microorganisms, with plant-derived substances. The (*Guazuma ulmifolia*) is a tree with pesticide properties and healing effects. Yield, antifungal and antibacterial activity of extracts obtained with buffering solutions (peptides) and organic solvents (metabolites) from guacima leaves were evaluated. The peptides were extracted with buffers: B₁ (pH 7.0) KCl, EDTA; B₂ (pH 5.2) KCl, CH₃COONa, β-mercaptoethanol; and B₃ (pH 7.0) KCl, EDTA, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), polyvinylpyrrolidone, thiourea, while metabolites were extracted with hexane, methanol and dichloromethane. Protein concentration was made by the Bradford method and the molecular weight by polyacrylamide gel electrophoresis. Thin layer chromatography (TLC)-Packed column, were sequentially applied to separate the compounds and bio-testing them later. In parallel fungus *Sclerotium cepivorum* of onion and *Fusarium oxysporum* of melon, as well as the bacteria *Xanthomonas campestris* of tomato were isolated, and *Pseudomonas aeruginosa* was inoculated (registry number 0693-P). Antifungal activity was measured by inhibition of *in vitro* mycelial growth of microorganisms while the antibacterial activity was evaluated by inhibition of colony formation (CFU mL⁻¹). Relative to extracts yields, buffer 2 (B2) showed the highest value (15.7 %), while extracts in hexane (3.9 %), methanol (3.0 %) and dichloromethane (2.2 %) were lower in this parameter. Furthermore the approximate molecular protein weight was of 24.9 kDa. Also, dichloromethane extract showed the greatest inhibition over *Sclerotium* (88.4 %), B₂ over *Fusarium* (86.5 %) and hexane extracts also on *Xantomonas* (84.0 %).

Key words: Bioactivity, extracts, *Guazuma ulmifolia* Lam., metabolites, pathogens, bioactive peptides.

Fecha de recepción/date of receipt: 14 de mayo de 2014; Fecha de aceptación/date of acceptance: 23 de junio de 2014.

¹ Departamento de Madera, Celulosa y Papel, CUCEI, Universidad de Guadalajara. Correo e: lbarrien@dmcp.cucei.udg.mx

² Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara

Introducción

La guácima (*Guazuma ulmifolia* Lam.), de la familia Sterculiaceae, es un árbol que alcanza hasta 15 m de altura y 70 cm de diámetro, con hojas rasposas en el haz y sedosas en el envés, flores amarillas y fruto de color café oscuro (Conabio, 2014). Es nativa de América Tropical y posee un alto potencial forrajero; es común en áreas de pastizales de zonas tropicales y subtropicales (Weaver, 1990) y en bosques disturbados. Se le atribuyen propiedades medicinales para padecimientos como la tos y la bronquitis, y tiene acción antioxidante, antifúngica y antibacteriana (Conabio, 2014). En México crece a lo largo de la costa del océano Pacífico desde los 27° de latitud hacia el sur, hasta el Istmo de Tehuantepec y a lo largo de la costa del Golfo de México, incluida la Península de Yucatán. Se le ha consignado también en América Central y América del Sur (Pennington y Sarukhán, 2005).

Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar péptidos y metabolitos secundarios. En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa frente a la depredación por microorganismos, insectos o herbívoros (Jamil *et al.*, 2007). Existen diversos microorganismos fitopatógenos que las atacan como virus, hongos, bacterias, fitoplasmas y viroides, que causan alteraciones en el ciclo de vida de los vegetales (Celis *et al.*, 2008) y pérdidas económicas cuantiosas, del orden de 5-25 % en países desarrollados y de 20-50 % en aquéllos que están en proceso de estarlo (Juárez *et al.*, 2010); destacan los hongos por su gran número (8 000 especies) y potencial reproductivo, como vectores etiológicos de diversas enfermedades (Juárez *et al.*, 2010).

En estudios previos se ha señalado el uso de extractos vegetales para inhibir la actividad de microorganismos fitopatógenos. Por ejemplo, Ramírez *et al.* (2000) utilizaron dos cepas silvestres de *Sclerotium cepivorum* Berk. y *Sclerotium rolfsii* Sacc., para evaluar la actividad antifúngica de la afinina (alkamida) obtenida a partir de la purificación del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake. Observaron una actividad inhibitoria del crecimiento del micelio. Los resultados mostraron que no había diferencia significativa en cuanto a la afinina purificada y el extracto crudo con respecto a las cepas. Jabeen *et al.* (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *Moringa oleifera* Lam., para ello usaron dos bacterias (*Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872 y *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884), además de un hongo (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.); este extracto tuvo una fuerte actividad antibacteriana, pero mínima en el caso del hongo.

No existen registros bibliográficos de los efectos de guácima sobre microorganismos fitopatógenos, aunque sí sobre patógenos causantes de enfermedades infecciosas y otros problemas relacionadas con la salud humana. Al respecto, Camporese *et al.* (2003) describen la actividad de

Introduction

Guácima (*Guazuma ulmifolia* Lam.), of the Sterculiaceae family, is a tree up to 15 m in height and 70 cm in diameter, with scratchy leaves in the phase, silky on the underside, yellow flowers and dark brown fruits (Conabio, 2014). It is native to tropical America and has a high forage potential; it is common in grassland areas of tropical and subtropical areas (Weaver, 1990) and in disturbed forests. Medicinal properties for ailments such as coughs and bronchitis are attributed to it, and has antioxidant, antifungal and antibacterial action (Conabio, 2014). In Mexico it grows along the coast of the Pacific Ocean from latitude 27° south to the Isthmus of Tehuantepec and along the coast of the Gulf of Mexico to the Yucatan Peninsula. It has also entered him in Central America and South America (Pennington and Sarukhan, 2005).

Plants have an almost limitless ability to synthesize peptides and secondary metabolites. In many cases, these substances serve as defense mechanisms against predation by microorganisms, insects and herbivores (Jamil *et al.*, 2007). There are several phytopathogenic microorganisms that attack them such as viruses, fungi, bacteria, phytoplasmas and viroids, which cause changes in the phases of development of plants (Celis *et al.*, 2008) and economic losses in the order of 5-25 % by developed countries and 20-50 % in developing countries (Juárez *et al.*, 2010); include fungi for its large number (8 000 species) and reproductive potential, as etiologic vectors of various diseases (Juárez *et al.*, 2010).

Previous studies have reported the use of plant extracts to inhibit the activity of different plant pathogenic microorganisms. For example, Ramírez *et al.* (2000) used two wild strains of *Sclerotium cepivorum* Berk. and *Sclerotium rolfsii* Sacc., to evaluate the antifungal activity of afinin (alkamide) obtained from purification of crude extract of roots of *Heliopsis longipes* Blake A. Gray. They observed a growth inhibitory activity of the produced mycelium. Results showed no significant difference in the purified and crude extract afinin regarding strains. Jabeen *et al.* (2008) evaluated the antimicrobial activity of the extract from the seeds of *Moringa oleifera* Lam. and used two bacteria (*Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872, and *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884) and a fungus (*Fusarium solani* (Mart) Sacc.); this extract showed a strong antibacterial activity and a minimum inhibitory to the fungus.

There are no bibliographic records of the effects of guácima on phytopathogenic microorganisms, although they exist on pathogens of infectious diseases and other problems related to human health. For example, Camporese *et al.* (2003) describe the activity of the extracts in hexane and methanol guácima bark against *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani and Calmers, 1919 (ATCC25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, 1900 (ATCC 27853), respectively. Violante

los extractos en hexano y metanol de la corteza de guácima contra *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani and Calmers, 1919 (ATCC25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, 1900 (ATCC 27853), respectivamente. Violante *et al.* (2012) refieren que extractos crudos en etanol (125 ppm) de guácima inhibieron el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*, mientras que las fracciones hidrometanólicas (1 000 ppm) y en acetato de etilo (250 ppm) fueron activas contra *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder, 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984.

Los productos naturales (extractos de plantas), inocuos, gozan de amplia aceptación como una alternativa al uso indiscriminado de los plaguicidas, los cuales son peligrosos para el medio ambiente y para el hombre (Juárez *et al.*, 2010), aunque todavía hace falta mayor investigación sobre el particular. Es por ello que el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana de péptidos bioactivos y metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos acuosos y orgánicos de las hojas de guácima sobre algunos microorganismos fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen, *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939 y *Pseudomonas aeruginosa*.

Materiales y Métodos

Recolección y preparación del material vegetal

La recolección del material vegetal (hojas) libre de plagas y enfermedades se realizó en el mes de junio de 2012, en el bosque escuela de la Universidad de Guadalajara, municipio Tala, Jalisco, ubicado al centro poniente del estado. La identificación botánica se llevó a cabo en el herbario del Instituto de Botánica del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (IBUG).

Las hojas fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente durante una semana. Se pulverizó finamente el material en un molino de cuchillas, Restsch-GNBH modelo 5657, para obtener mayor área de contacto con los sistemas de extracción utilizados, y con ello hacer el proceso más eficiente. Posteriormente, se tamizó por una malla de Núm. 60. La muestra molida fue deslipidizada para evitar posibles interferencias de las grasas con los extractos; para lo cual, 400 g de muestra se trataron con hexano (1:3 w/v), en un baño María a 4 °C, con agitación durante dos horas. Se centrifugó por 20 minutos a 1 000 rpm y la muestra libre de lípidos fue secada a temperatura ambiente. Se guardó en refrigeración para su posterior uso.

et al. (2012) reported that crude extracts in ethanol (125 ppm) of guácima, inhibited *in vitro* growth of *S. aureus*, while fractions hidrometanólicas (1000 ppm) and ethyl acetate (250 ppm) were active against *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder, 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984.

Natural products (plant extracts), safe, are widely accepted as an alternative to the indiscriminate use of pesticides which are hazardous to the environment and to humans (Juarez *et al.*, 2010), although more investigation is necessary. That is why the main objective of this work was to evaluate the antifungal and antibacterial activity of bioactive peptides and secondary metabolites obtained from aqueous and organic extracts of the guácima leaf on some phytopathogenic microorganisms as *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen, *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939 and *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods

Collection and preparation of plant material

The collection of plant material (leaves) free of pests and diseases was conducted in June 2012, in the forest school of the University of Guadalajara, in Tala municipality, Jalisco, located at the west center of the state. The botanical identification took place at the herbarium of the Instituto de Botánica of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) Universidad de Guadalajara (IBUG).

The leaves were rinsed with distilled water and dried at room temperature for one week. The material was finely pulverized in a Brand Restsch-GNBH model 5657 blender for more contact area extraction systems used to make the process more efficient. Subsequently passed through a sieve of No. 60. The ground sample was delipidized to prevent disturbance of fat with the extracts. For this, 400 g of sample was treated with hexane (1: 3 w / v), in a water bath at 4 °C with stirring for two hours. It was centrifuged for 20 minutes at 1 000 rpm and a lipid free sample was dried at room temperature and refrigerated stored for later use.

Extraction of secondary metabolites (raw extracts)

The ground material and deslipidized of guácima (500 g) was treated for 5 days at 130 rpm using an orbital shaker (Hinotek brand WSZ series), by successive extractions, each time with 1 000 mL of solvent differently hexane polarity, dichloromethane and methanol. This was done in order to obtain more active extracts and yield depending on the polarity of the solvent used (Domínguez, 1973). After each extraction, filtering followed. At each stage the solid fraction (plant material) was dried at room temperature, while the liquid fraction (filtrate)



Extracción de metabolitos secundarios (Extractos crudos)

El material molido y deslipidizado de guácima (500 g) fue colocado durante 5 días a 130 rpm en un agitador orbital (*Hinotek* serie *wsz*) y sometido a extracciones sucesivas con 1 000 mL de los solventes de diferente polaridad: hexano, diclorometano y metanol. Esto con el propósito de obtener los extractos de mayor actividad y rendimiento en función de la polaridad del solvente utilizado (Domínguez, 1973). Después de cada extracción, se procedió a filtrar y a secar la fracción sólida (material vegetal) a temperatura ambiente, mientras que la fracción líquida (filtrado) se concentró y secó en un rotaevaporador a temperatura menor de 50 °C. La fracción líquida seca obtenida corresponde el material extraído (ME) y contiene los metabolitos bioactivos. El rendimiento por extracción se calculó por medio de la fórmula:

$$\%R = (ME / M_i) \times 100$$

Donde:

ME = Extracto

M_i = Material inicial tratado

Extracción de péptidos bioactivos

Se tomaron 100 g del material vegetal previamente deslipidizado, al que se le agregó 600 mL de tres sistemas de extracción, o buffers, señalados como Buffer 1 (B₁), Buffer 2 (B₂) y Buffer 3 (B₃) (Jamil *et al.*, 2007): B₁ (pH 7) es una mezcla de 10 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl y 2 mM EDTA (Turrini *et al.*, 2004). B₂ (pH 5.2) es una solución de 100 mM CH₃COONa, 100 mM KCl, 0.1 % β-mercaptoetanol (Regente *et al.*, 1997); B₃ (pH 7) es una solución de 10 mM Na₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 1.5 % polivinilpirrolidona (PVPP), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 2 mM tiourea (Terras *et al.*, 1992). Los tres buffers se agitaron durante dos horas a 4 °C y después se centrifugaron por 20 min a 10 000 rpm. El rendimiento de los extractos se calculó de la forma descrita para los metabolitos secundarios.

Concentración y peso molecular de los péptidos extraídos

La concentración de los extractos bufferizados se hizo por medio del método de Bradford (1976). Para ello se preparó una curva de calibración por triplicado, con diferentes concentraciones del estándar albúmina suero bovina (BSA) y lecturas en espectrofotómetro UV-vis, a una absorbencia de 595 nm (A₅₉₅), para obtener líneas cercanas a una recta (r² = 1). La muestra problema se procesó bajo las mismas condiciones que la curva de calibración; se añadió muestra problema en lugar de BSA, para evaluar su concentración. A continuación se determinó el peso molecular de péptidos, mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970), bajo

was concentrated and dried in a rotary evaporator at a temperature below 50 °C. The dried liquid fraction obtained is the extracted material (ME) and contains bioactive metabolites. The yield of each extraction is calculated by the formula:

$$\%R = (ME / M_i) \times 100$$

Where:

ME = Extract

M_i = Treated initial material

Extraction of bioactive peptides

100 g of previously deslipidized plant materials were taken, to which were added 600 mL of three different extraction systems, or buffers, identified as Buffer 1 (B₁), Buffer 2 (B₂) and Buffer 3 (B₃) (Jamil *et al.*, 2007): B₁ (pH 7) is a mixture of 10 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl and 2 mM EDTA (Turrini *et al.*, 2004). B₂ (pH 5.2) is a solution of 100 mM CH₃COONa, 100 mM KCl, 0.1 % β-mercaptoethanol (Regent *et al.*, 1997); B₃ (pH 7) is a solution of 10 mM Na₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 1.5 % polyvinylpyrrolidone (PVPP), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 2 mM thiourea (Terras *et al.*, 1992). All three buffers were stirred for two hours at 4 °C and then centrifuged for 20 min at 10 000 rpm. The yield of the extracts was calculated as described for secondary metabolites.

Concentration and molecular weight of the extracted peptides

The concentration of the bufferized extracts was by the method of Bradford (1976). To this end a calibration curve in triplicate was prepared with different concentrations of albumin standard bovine serum (BSA) and readings in a spectrophotometer UV-vis, to an absorbance of 595 nm (A₅₉₅) to obtain close lines to a straight line (r² = 1). The sample is processed under the same conditions as the calibration curve; test sample was added instead of BSA, to evaluate its concentration. Subsequently the peptide molecular weight was determined by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970), under run conditions of 100 volts and two hours. 10mL of the extracts to be evaluated were injected and 10mL marker of known molecular weight from 57 kDa to 170 as reference (Bio-Rad, 2014). After electrophoresis, the obtained gel was stained with R-250 Coomassie brilliant blue, which was washed with deionized water and the bands were observed.

Antifungal and antibacterial bioassays Isolation of fungi and bacteria

Two species of wild strains of fungi, *Sclerotium cepivorum* and *Fusarium oxysporum*, and two bacteria, *Xanthomonas*

condiciones de corrida de 100 volts y dos h. Se inyectaron 10 mL de los extractos por evaluar y 10 mL de marcador de peso molecular conocido de 170 a 5.7 kDa como referencia (Bio-Rad, 2014). Después de la electroforesis, el gel obtenido se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250, que se lavó con agua desionizada y se observaron las bandas.

Bioensayos antifúngicos y antibacteriales

Aislamiento de hongos y bacterias

Se utilizaron cepas silvestres de dos especies de hongos: *Sclerotium cepivorum* y *Fusarium oxysporum*, además de dos bacterias: *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se eligieron estos microorganismos porque son fitopatógenos de las plantas, problema que aborda esta investigación. *Sclerotium cepivorum* se aisló de cebolla infectada. Se depositaron los esclerocios en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) e incubaron durante 10 días a una temperatura de 18-20 °C. *Fusarium oxysporum* se obtuvo a partir de pequeños trozos del tejido infectado de melón. Dicho material fue sembrado en PDA, incubado 6 días a 28 °C. Para el aislamiento de *Xanthomonas campestris*, se cortaron pequeños trozos del tejido infectado de jitomate y se sembró en cajas Petri con agar nutritivo (AN) y se mantuvieron a 28 °C por 24 h. *Pseudomonas aeruginosa*, proveniente de cepario (número de registro 0693-P), se inoculó por 24 h a 60 °C, en tubos de ensaye (previamente esterilizados a 15 Lb durante 20 min) que contenían 10 mL del medio de cultivo Mueller Hinton agar. En todos los casos, previo a la inoculación, el material se lavó con agua-hipoclorito de sodio (1:1) por 30 s; enseguida se lavó tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio y se dejó secar a temperatura ambiente.

Actividad antifúngica de los extractos crudos

Se evaluó por la capacidad de inhibición del desarrollo micelial en condiciones *in vitro*, por medio de la medición del crecimiento micelial. Se probaron cinco concentraciones del extracto crudo: 10 000, 1 000, 100, 10, y 1 ppm (mg L⁻¹) contra cepas de *Sclerotium cepivorum* y *Fusarium oxysporum*. Se hicieron cuatro repeticiones para cada concentración, y dos testigos, el primero sin extracto crudo, y el segundo consistió en una emulsión de dimetil sulfóxido (DMSO) al 1 % y monooleato de polioxietileno sorbitol (comercialmente Tween 20, un surfactante), ya que para el bioensayo de los extractos de hexano y diclorometano fue necesario preparar una emulsión con estos dos compuestos químicos.

En el caso de los péptidos bioactivos, previamente purificados por filtración a través de una membrana amicon ultra 0.5 mL, se probaron seis concentraciones: 200, 50, 12.5, 3.12, 0.78 y 0.195 ppm contra los dos organismos citados, dos testigos,

campestris and *Pseudomonas aeruginosa* were used. These organisms were chosen because they are pathogens of plants, a problem addressed by this research. *Sclerotium cepivorum* was isolated from an infected onion. Sclerotia were placed on potato dextrose agar medium culture (PDA) and incubated for 10 days at a temperature of 18-20 °C. *Fusarium oxysporum* was isolated from small pieces of infected cantaloupe tissue. This material was sown in PDA, with incubation at 28 °C for 6 days. For isolation of *Xanthomonas campestris*, small pieces of infected tomato tissue and sawn in Petri dishes with nutrient agar (NA), were incubated at 28 °C as well for 24 h. *Pseudomonas aeruginosa*, from the strain collection (registration number 0693-P) was inoculated for 24 h at 60 °C in test tubes (previously sterilized at 15 Lb for 20 min) containing 10 mL of Mueller Hinton agar culture medium. In all cases, prior to inoculation, the material was water-washed with sodium hypochlorite (1: 1) for 30 s; then washed three times with distilled water to remove excess sodium hypochlorite and allowed to dry at room temperature.

Antifungal activity of the crude extracts

This ability was assessed by the mycelial growth inhibition under *in vitro* conditions, by measuring the mycelial growth. Five concentrations of crude extract were tested: 10 000, 1 000, 100, 10 and 1 ppm (mg L⁻¹) against strains of *Fusarium oxysporum* and *Sclerotium cepivorum*. Four replications were made for each concentration, and two controls, the first without crude extract, and the second consisted of an emulsion of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1 % polyoxyethylene sorbitol monooleate (commercially Tween 20, a surfactant), and bioassay that hexane extracts and dichloromethane was necessary to prepare an emulsion with these two chemicals.

In the case of bioactive peptides, previously purified by ultra amicon 0.5 mL membrane filtration, six concentrations were tested: 200, 50, 12.5, 3.12, 0.78 and 0.195 ppm against those two organisms, two controls, the first without raw extract, and the second with contripsina (antibiotic that inhibits mycelial growth).

Different aliquots of the raw extracts were added to PDA medium, previously pasteurized and sterilized in Petri dishes. Then, a mycelial 0.3 mm- in-diameter disc of the fungus to assess was deposited and incubated in the dark at 18 °C ± 2 °C to *S. cepivorum* and at 28 °C ± 2 °C to *F. oxysporum* up until the first control was completely covered with mycelia.

Antibacterial activity of raw extracts

It was determined by the dilution method in cultivation media in tubes with trypticase soy (Mueller and Hinton, 1941), which consists in calculating the inhibition of microorganism by counting colony forming units per milliliter (CFU mL⁻¹). For secondary metabolites, eight concentrations of extract were tested: 5 000, 2 500, 625, 156.25, 39.06, 9.76, 2.44 ppm and

el primero sin extracto crudo, y el segundo con contriopsisina (antibiótico que inhibe el crecimiento micelial).

Las diferentes alícuotas de los extractos crudos se incorporaron al medio PDA, previamente pasteurizado y esterilizado, en cajas Petri. A continuación se depositó un disco de micelio de 0.3 mm de diámetro del hongo por evaluar, y se incubaron en la oscuridad a $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, para *S. cepivorum* y a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *F. oxysporum*, hasta que el primer testigo se cubrió totalmente con micelios.

Actividad antibacteriana de los extractos crudos

Se determinó mediante el método de dilución en caldo de cultivo, en tubos con medio de cultivo tripticasa de soya (Mueller y Hinton, 1941), que consiste en calcular la inhibición del microorganismo por medio del conteo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC mL⁻¹). Para los metabolitos secundarios se probaron ocho concentraciones de extracto: 5 000, 2 500, 625, 156.25, 39.06, 9.76, 2.44 ppm y 0.61 ppm, con dos testigos: sin extracto, y con una emulsión de DMSO al 1 % y Tween 20. Los tratamientos se hicieron por duplicado. En el caso de los péptidos bioactivos, previamente purificados por filtración a través de membrana amicon ultra 0.5 mL, se valoraron seis concentraciones: 200, 50, 12.5, 3.12, 0.78 y 0.195 ppm, más un testigo sin extracto. Además, las bacterias utilizadas se ajustaron a la concentración equivalente a la escala 0.5 de McFarland (1907) que corresponde a 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC mL⁻¹). A partir de aquí, se diluyó nuevamente a concentración de 1×10^4 UFC mL⁻¹. Para ejecutar la prueba, se adicionó 1 mL de suspensión del microorganismo en las diferentes concentraciones del extracto y se incubaron por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *Pseudomonas aeruginosa* y $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *Xanthomonas campestris*. Posteriormente, las muestras se diluyeron a un volumen final de 10 mL con agua destilada esterilizada; se hizo una segunda dilución a partir de 10 mL de esta, llevados a un aforo de 10 mL. De aquí se tomaron 10 mL que se inocularon en cajas Petri con agar nutritivo, que se incubaron por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *Pseudomonas aeruginosa*, y a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *Xanthomonas campestris*. Finalmente se realizó el recuento de colonias (UFC mL⁻¹).

Fraccionamiento y separación de los extractos

Se aplicó la técnica recomendada por Alltech Associates Inc. (1998). Se corrió el extracto crudo obtenido con hexano y diclorometano en placas cromatográficas de vidrio de 5 X 10 cm con gel de sílice 60 F₂₅₄, tamaño de partícula 2-2.5 µm, con diferentes sistemas eluyentes para encontrar un sistema óptimo y utilizarlo como fase móvil en la cromatografía de columna. Con el sistema eluyente óptimo se fraccionaron las muestras por columna empacada (vidrio, 60 cm de longitud, 20 mmφ, gel de sílice tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). Se eluyeron dos gramos de extracto crudo de hexano y

0.61 ppm, with two controls, one without extract, and two as an emulsion of 1 % DMSO and Tween 20. The treatments were made in duplicate. For bioactive peptides, previously purified by filtration through Amicon ultra 0.5 mL, six concentrations were evaluated: 200, 50, 12.5, 3.12, 0.78 and 0.195 ppm, and a control without extract. Furthermore, the bacteria used were adjusted to the equivalent of 0.5 McFarland (1907) scale, corresponding to 1×10^8 colony forming units / mL (CFU mL⁻¹) concentration. From here, it was again diluted to a concentration of 1×10^4 CFU mL⁻¹. To run the test, 1 mL of the microorganism suspension at different concentrations of the extract was added and incubated for 24 hours at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *Pseudomonas aeruginosa* and $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *Xanthomonas campestris*. Subsequently, samples were diluted to a final volume of 10 mL with sterile distilled water. A second dilution was performed to take 10 mL to 10 mL. From here were taken 10 mL were inoculated in Petri dishes with nutrient agar for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *Pseudomonas aeruginosa* and $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *Xanthomonas campestris*. Finally colony counts (CFU mL⁻¹) were performed.

Fragmentation and separation of the extracts

The recommended technique by Alltech Associates Inc. (1998) was used. The raw extract obtained with hexane and dichloromethane in chromatographic glass plates of 5 X 10 cm silica gel 60 F254, 2-2.5 µm particle size, was run with different eluent systems to find an optimum system and use it as the mobile phase in column chromatography. With the optimum eluent system samples were fragmented by packed column (glass, 60 cm long, 20 mmφ, silica gel particle size 0063-0200 mm, 70-230 mesh ASTM). Two grams of hexane and dichloromethane raw extract were eluted, which was handled as toluene-ethyl acetate (80:20) mobile phase from which 21 fractions were collected to extract hexane and 18 fractions were collected dichloromethane. With the fractions obtained a thin layer chromatography was made, in which the mobile phase was with toluene-ethyl acetate (85:25). Fluorescence of the plates with UV light at a wavelength of 254 nm and 365 nm was observed. Fractions that showed similarity in stains were mixed for bioassays.

Results and Discussion

Extract yield

The organic extract (with hexane, dichloromethane and methanol) revealed a 2.2 % to 3.9 % yield, the best of which was dichloromethane. The best yield of the peptidic extracts was obtained with Buffer 2 (15.7 %) (Table 1).



diclorometano, en lo que se trabajó como fase móvil, tolueno-acetato de etilo (80:20), a partir de lo cual se colectaron 21 fracciones para el extracto de hexano y 18 fracciones para diclorometano. Con ellas se hizo una cromatografía de capa fina, en la que la fase móvil fue con tolueno-acetato de etilo (85:25). Se observó la fluorescencia de las placas con luz UV a una longitud de onda de 254 nm y 365 nm. Las fracciones que mostraron similitud en manchas se mezclaron para los bioensayos.

Resultados y Discusión

Rendimiento de los extractos

Los extractos orgánicos (con hexano, diclorometano y metanol) revelaron un rendimiento de 2.2 % a 3.9 %, el mejor de los cuales corresponde al diclorometano. Respecto a los extractos peptídicos, el de mayor rendimiento fue el obtenido con el Buffer 2 (15.7 %) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimiento de extractos orgánicos y bufferizados.
Table 1. Organic and bufferized extract yield.

Extractos orgánicos (metabolitos secundarios)	% Rendimiento	Extractos bufferizados (péptidos bioactivos)	% Rendimiento
Hexano	2.2	Buffer 1	14.6
Diclorometano	3.9	Buffer 2	15.7
Metanol	3.0	Buffer 3	11.0

Concentración y peso molecular de los péptidos extraídos

El buffer 1 presentó la mayor concentración con 1.17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppm), el buffer 2, 0.94 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y el buffer 3, 0.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con el marcador utilizado se observaron 10 bandas que van de 170 kDa a 5.7 kDa, lo que hizo posible determinar el peso molecular de los péptidos, que fue de aproximadamente 24.9 kDa.

Actividad antifúngica y antibacterial de los extractos y péptidos

En la Figura 1 se muestra el crecimiento micelial durante los tratamientos antifúngicos.



Concentration and molecular weight of the extracted peptides

Buffer 1 showed the greatest concentration with 1.17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppm), buffer 2, 0.94 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and buffer 3, 0.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$. With the used marker ten bands were observed, from 170 kDa to 5.7 kDa, which made it possible to determine the molecular weight of the peptides, that was around 24.9 kDa.

Antifungal and antibacterial activity of extracts and peptides

In Figure 1 is shown the micelial growth during the antifungal treatments.

For *Sclerotium cepivorum*, the inhibition percentage of the micelial grown of the bufferized extracts was from 8.6 to 30.8 with a statistical significant difference in regard to the control, while the organic extracts provoked 54.5 % to 88.4 %, except the methanol

extract. For *Fusarium oxysporum* as well, the referred extracts, except for metanol, inhibited the growth from 10.0 to 22.0 % and the bufferized, not buffer 3, had the same effect from 2.0 % a 60.0 %.

In regard to the antibacterial activity, the bufferized extract produced an inhibition from 18.9 % to 86.5 % for *Xanthomonas campestris*, while for *Pseudomonas aeruginosa*, it was 4.4 % to 42.2 %. In Table 2 are summarized the most important percentages of inhibition.

In Table 2 it can be observed that the bufferized extract with the highest inhibition is buffer 2, with 86.5 % over *Xanthomonas campestris* when applied at 78 ppm, while the organic extract with the same behaviour came from dichloromethane, with 88.4 % upon *Sclerotium* at 10 000 ppm, followed by the hexane extracts, with 84.0 % over the same fungi with the same concentration. These results are coincidental with the published data for the genus. For example, the peptides derived from pepper and concentrations from 70 and 150 ppm inhibited the activity of the phytopatogenic fungi *Cylindrocarpon musae* C. Booth &



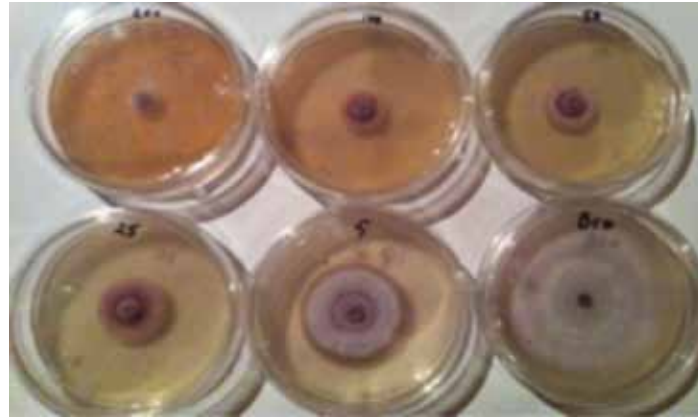


Figura 1. Crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen.

Figure 1. Radial growth of *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen.

Para el *Sclerotium cepivorum*, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los extractos bufferizados fue de 8.6 a 30.8, con diferencia estadística significativa respecto al testigo, mientras que en los extractos orgánicos fue de 54.5 % a 88.4 %, excepto el extracto con metanol. Para *Fusarium oxysporum*, igualmente, los extractos referidos, a excepción del metanol, inhibieron el crecimiento de 10.0 a 22.0 % y los bufferizados, menos el del buffer 3, tuvieron el mismo efecto, de 2.0 % a 60.0 %.

Respecto a la actividad antibacteriana, los extractos bufferizados mostraron inhibición de 18.9 % a 86.5 % para *Xanthomonas campestris*, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa*, de 4.4 % a 42.2 %. En el Cuadro 2 se resumen los principales porcentajes de inhibición.

En el Cuadro 2 se aprecia que el extracto bufferizado que presenta mayor inhibición es el buffer 2, con 86.5 % de *Xanthomonas campestris* cuando se aplica a una concentración de 78 ppm, mientras que el extracto orgánico, la misma reacción se obtuvo con diclorometano, con 88.4 % sobre *Sclerotium* a 10 000 ppm, seguido de los extractos en hexano, con 84.0 % para *Sclerotium* a igual concentración. Asimismo, el agregar tripsina a los extractos bufferizados no ocasiona respuesta significativa, puesto que el comportamiento fue muy similar y los porcentajes de inhibición variaron de 3 a 4 %, lo que se puede atribuir al tipo de péptidos extraídos. Estos resultados coinciden con los datos publicados para otros géneros. Por ejemplo, péptidos derivados de pimienta a concentraciones de 70 y 150 ppm inhibieron la actividad de los hongos fitopatógenos *Cylindrocarpon musae* C. Booth & R. H. Stover, 1974 y *F. oxysporum* de 70 a 100 % y actuaron contra las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen, 1838, *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, 1893 y *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout, 1923 (Diz *et al.*, 2006).

R. H. Stover, 1974 and *F. oxysporum* from 70 a 100 % and act upon the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen, 1838, *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, 1893 and *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout, 1923 (Diz *et al.*, 2006).

Partial purification of the hexane and dichloromethane extracts

The hexane and dichloromethane extracts with the best results for the microbe growth inhibition of the most important organic type extracts were fragmented, first through fine layer chromatography, which revealed that the toluene-ethyl acetate (85:35) produced the best separation (Figure 2). The fractions that showed similitude in the stains were mixed for bioassays.

Then, these mixed fragments were eluted in packed column with silica gel. The hexane fractions 7 and 8; 9 and 10 became together as well as those from 11 a la 15; from 16 to 18; 19 and 20, while numbers 7, 8 and 9; from 10 to 15; from 16 to 18 of dichloromethane did the same, and numbers 11, 12, 13, 14, 15, 16 formed a unit. This was done with the aim to prepare an assay and elucidate them by means of a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), in a later study.



Cuadro 2. Condiciones y efecto antifúngico y antibacterial de los extractos crudos probados.
 Table 2. Conditions and antifungal and antibacterial effect of the tested raw extracts.

Extractos	ppm	Inhibición (%)			
		<i>Sclerotium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Xantomona</i>	<i>Pseudomona</i>
Buffer 1	10 000	30.8			
	1000		15.0		
	2500			77.0	
	19.5				13.3
Buffer 2	10 000	19.4			
	10 000		60.0		
	78			86.5	
	78				31.0
Buffer 3	10 000	15.0			
	1.2				42.0
Hexano	10 000	84.0			
	1		22.0		
	5000			80.0	
	625				70.0
Diclorometano	10 000	88.4			
	10 000		15.5		
	5000			65.5	
	5000				65.2
Metanol	2500			67.3	
	52.2				48.0

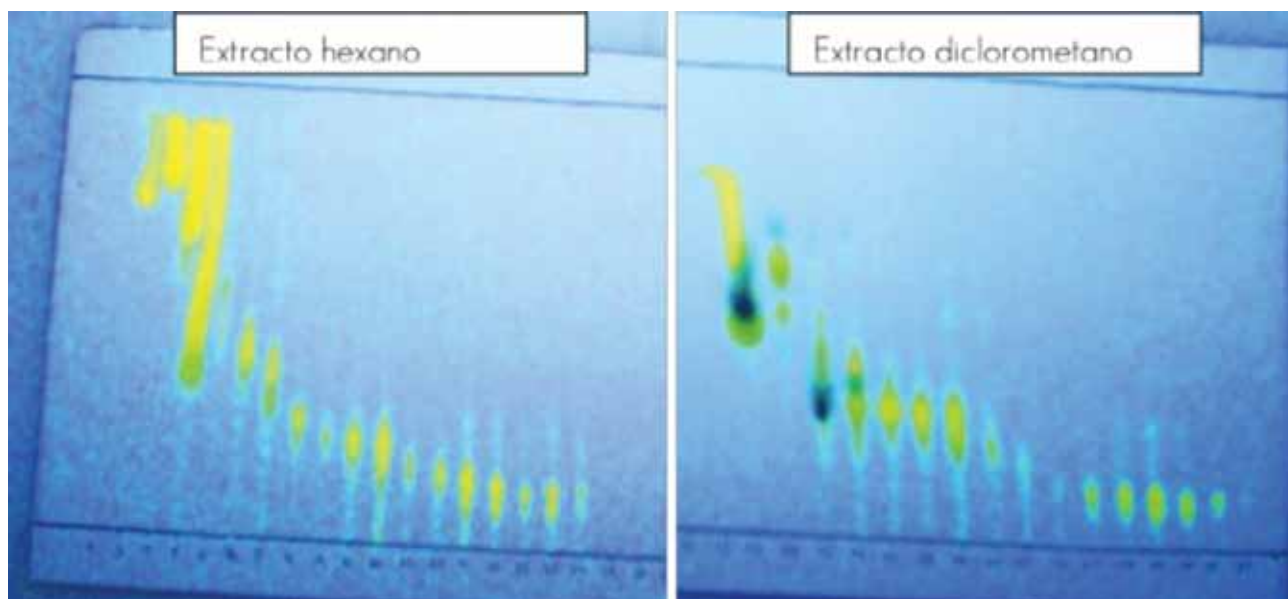


Figura 2. Cromatografía de capa fina para extractos crudos de hexano y diclorometano.
 Figure 2. Fine layer chromatography for raw hexane and dichloromethane extracts.

Purificación parcial del extracto hexano y diclorometano

Los extractos de hexano y diclorometano que arrojaron los resultados de inhibición del crecimiento microbiano de los extractos de tipo orgánico más importantes fueron fraccionados, primero mediante cromatografía de capa fina, lo que reveló que el sistema tolueno-acetato de etilo (85:35) provoca la mejor separación (Figura 2). Las fracciones que mostraron similitud en manchas se mezclaron para los bioensayos.

A continuación, estas fracciones mezcladas fueron eluidas en columna empacada con gel de sílice. Las fracciones en hexano 7 y 8; 9 y 10 se juntaron; así como de la 11 a la 15; de la 16 a la 18; 19 y 20, mientras que en diclorometano se unieron la 7, 8 y 9; de la 10 a la 15; de la 16 a la 18; y quedaron unitarias las 11, 12, 13, 14, 15, 16. Esto se hizo con el propósito de ensayarlas y elucidarlas por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), en un estudio posterior.

Conclusiones

Los extractos bufferizados de la hoja de *Guazuma ulmifolia* presentaron mayor rendimiento de material extraíble, de los cuales el buffer 2 registró el valor más alto. En relación al efecto inhibitorio, los extractos con los mayores porcentajes de inhibición antifúngica fueron, en forma decreciente, diclorometano, hexano y buffer 2, mientras que los de mayor actividad antibacteriana fueron buffer 2, hexano y metanol.

El peso molecular de los péptidos fue de aproximadamente 24.9 kDa. De los extractos crudos se obtuvo un total de 21 fracciones para el extracto de hexano y 18 para el diclorometano. Los extractos de productos naturales son una importante fuente alternativa para sustituir los agroquímicos sintéticos para un control de las plagas. 🍃

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por Autor

Sergio Rosales Mata: establecimiento de ensayo en vivero, muestreo de planta, toma de base de datos, captura y análisis estadístico de bases de datos, estructuración del manuscrito; José Ángel Prieto Ruíz: diseño y establecimiento del experimento, consecución de recursos, estructuración y revisión del manuscrito; José Leonardo García Rodríguez: revisión de literatura, análisis bases de datos, estructuración y revisión del manuscrito; Rosa Elvira Madrid Aispuro: muestreo de planta, captura de datos, revisión de literatura, mantenimiento del ensayo; José Angel Sigala Rodríguez: análisis estadístico, concentrado de base de datos, revisión de manuscrito.

Conclusions

The bufferized extracts of the *Guazuma ulmifolia* leaf showed a higher yield of extractable material, from which buffer 2 recorded the greatest value. In regard to the inhibitory effect, the extracts with greatest antifungal inhibition were, in a decreasing way, dichloromethane, hexane and buffer 2, while those of greatest antibacterial activity were buffer 2, hexane and methanol.

The molecular weight of peptides was around 24.9 kDa. From the raw extracts, a total of 21 fragments for the hexane extract and 18 for dichloromethane were obtained. The extracts from natural products are an important alternative source to substitute synthetic agrochemicals for plague control. 🍃

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Contributions by Author

Sergio Rosales Mata: Establishment of the assay at the nursery, plant sampling, data base taking, capture and statistical analysis of data bases, structure of the document; José Ángel Prieto Ruíz: Design of the experiment, resource negotiation, establishment of the assay, structuring and review of the document; José Leonardo García Rodríguez: Review of literature, statistical analysis of data bases, structuring and review of the document; José Angel Sigala Rodríguez: Statistical analysis of data bases, data base concentration, review of the document

End of the English version



Referencias

- Alltech Associates Inc. 1998. TLC Plate Preparation and Adsorbent Powders. Data sheet D16030. Newark, DE, USA. pp.1-2
- Bio-Rad. 2014. Standards for electrophoresis and blotting, a wide range for all applications. <http://www.docstoc.com/docs/159440772/Standards-for-Electrophoresis-and-Blotting-Bio-Rad>. (15 de febrero de 2014)
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.
- Camporese, A., M. J. Balick, R. Arvigo, R. G. Espósito, N. Morsellino, F. de Simone and A. Tubaro. 2003. Screening for anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology* 87: 103-107.
- Celis, Á., C. Mendoza, M. Pachón, J. Cardona, W. Delgado and L. E. Cuca. 2008. Plant extracts used as biocontrol with emphasis on *Piperaceae* family. A review. *Agronomía Colombiana* 26(1):97-106.
- Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (Conabio). 2014. *Guazuma ulmifolia* Lam. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/66-sterclm.pdf. (15 de enero de 2014).
- Diz, M. S., A. O. Carvalho, R. Rodrigues, A. G. Neves-Ferreira, M. Da Cunha, E. W. Alves, A. L. Okorokova-Façanha, M. A. Oliveira, J. Perales, O. L. Machado, and V. M. Gomes. 2006. Antimicrobial peptides from chili pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760(9): 1323-1332.
- Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fotoquímica*. Limusa. México, D.F., México. 281 p.
- Jabeen, R., M. Shahid, A. Jamil and M. Ashraf. 2008. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. *Pakistan Journal of Botany* 40(4): 1349-58.
- Jamil A., M. Shahid, K. M. Masud-Ul-Haq and M. Ashraf. 2007. Screening of some medicinal plants for isolation of antifungal proteins and peptides. *Pakistan Journal of Botany* 39(1):211-221.
- Juárez B., G. P., M. E. Sosa M. y A. López M. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(2): 14-23.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 49: 1176-1178.
- Mueller, H. J. and J. Hinton. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 48: 330-333.
- Pennington T. D. y J. Sarukhán. 2005. *Árboles tropicales de México*. Manual para la identificación de las principales especies. 3a. ed. Universidad Nacional Autónoma de México Fondo de Cultura Económica. México, D.F., México. 523 p.
- Ramírez-Chávez, E., L. L. Valdez, G. V. Calleros y J. M. Torres. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliothis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* 34(2):207-215.
- Regente, M. C., C. R. Oliva, M. Feldman, A. Castagnaro and L. De la Canal. 1997. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytologia Plantarum* 100: 178-182.
- Terras, F. R. G., H. M. Schoofs, M. F. De Bolle, F. V. Leuven, S. B. Rees, J. Vanderleyden, B. P. Cammue and W. F. Broekaert. 1992. Analysis of two novel classes of plants antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus*) seeds. *Journal of Biological Chemistry* 265: 15301-15309.
- Turrini, A., C. Sbrana, L. Pitto, C. M. Ruffini, L. Giorgetti, R. Briganti, T. Bracci, M. P. Nuti and M. Giovannetti. 2004. The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia Merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New phytologist* 163:393-403.
- Violante, I. M. P., L. Hamerski, W. Silva G., A. L. Batista, M. Rodrigues C., V. J. Pott and F. Rodrigues G. 2012. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(4): 1302-1308.
- Weaver, P. L. 1990. Tree diameter growth rates in Cinnamon Bay Watershed, St. John, U.S. Virgin Islands. *Caribbean Journal of Science* 26(1-2):1-6.



