

# EVALUACIÓN BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE DOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer)

Blanca Estela Serrato Barajas<sup>1</sup>, José Cirilo Calderón Mugica<sup>2</sup>, Rafael Salgado-Garciglia<sup>2</sup>, Carlos Leonardo Céspedes Acuña<sup>3</sup> y Miguel Bravo Espinosa<sup>1</sup>

## RESUMEN

La tradición del hombre de utilizar a las plantas como alimento y medicina, se ha transmitido a través de generaciones; sin embargo de pocas especies se tienen identificados sus principios activos, dosis efectivas y letales. *Lippia berlandieri*, denominada orégano de cerro, cimarrón o silvestre y Xaak che en lengua maya, es una de ellas. En el presente estudio se evaluó el efecto de los extractos de etanol y acetato de etilo contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*, así como el extracto acetato de etilo sobre *Artemia franciscana*. En sistema Soxhlet se obtuvieron los extractos en los solventes de etanol y acetato de etilo; se determinaron los efectos de los dos tipos de extractos en enterobacterias. Se aislaron, purificaron e identificaron los principios activos y la respuesta de *A. franciscana* a los principios activos aislados sobre nauplios. Los resultados indican que los extractos acetato de etilo y el etanólico tuvieron rendimientos de 270 mg/g y para el etanólico de 117 mg/g. La mayor actividad antimicrobiana la presentó el extracto acetato de etilo sobre *Salmonella* sp. con una inhibición de crecimiento de 60%, seguida de *S. aureus* con 44%, *S. flexneri* y *E. coli* con 40%. El extracto etanólico inhibió a *S. aureus* en 43%, *E. coli* en 40%, *S. flexneri* en 30% y *Salmonella* sp. en 20%. Se aislaron, purificaron e identificaron los monoterpenos timol y carvacrol en proporción 1:1. Su concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) fue de 3.67 µg/mL sobre nauplios de *A. franciscana*.

**Palabras clave:** *Artemia franciscana*, carvacrol, enterobacterias, *Lippia berlandieri*, principio activo, timol.

Fecha de recepción: 19 de enero de 2005.

Fecha de aceptación: 22 de marzo de 2006.

<sup>1</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Producción Sostenible (CENAPROS), INIFAP. Correo-e: serrato.blanca@inifap.gob.mx

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<sup>3</sup> Instituto de Química, UNAM.

## ABSTRACT

Man has used plants empirically as food and medicine to cure diseases, a knowledge that has been transmitted through generations. However, very few species have been studied in order to identify their active compounds, effective and lethal doses. One of this is marjoram (*Lippia berlandieri*), as "oregano" known in Mexico either as hill or wild marjoram or "Haak che" in Mayan language. In this study the effect of both types of extract ethanol and ethyl acetate on *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella flexneri* and *Staphylococcus aureus* was assessed and evaluate the effect of the isolated active principle on *Artemia franciscana* Kellogg larva. Ethanol and ethyl acetate extracts were obtained using the Soxhlet system. Both types of extract effects on enterobacteria were evaluated. Active principles were isolated, purified, and identified. Finally, the effects of isolated active principles on *A. franciscana* nauplios were assessed. The extract yield obtained with ethyl acetate was 270 mg/g of dry plant, and that obtained with ethanol was 117 mg/g. The ethyl acetate inhibited the *Salmonella* sp. growth in 60 per cent, that of *S. aureus* in 44 per cent, and that of *E. coli* in 40 per cent. The ethanol extract inhibited the *S. aureus* growth in 43 per cent, *E. coli* in 40 per cent, *S. flexneri* in 30 per cent, and *Salmonella* sp. in 20 per cent. Thymol and carvacrol monoterpenes were isolated, purified, and identified in 1:1 proportion. These active principles showed a 50 lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of 3.67 µg/mL on *A. franciscana* larva.

**Key words:** *Artemia franciscana*, carvacrol, enterobacterias, *Lippia berlandieri*, active principles, thymol.

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado las plantas de forma empírica, principalmente para su alimentación y en curar sus enfermedades, tradición que se ha transmitido a través de generaciones, en muchos casos influidos por toda una mitología; sin embargo, desde el punto de vista farmacológico, pocas especies han sido estudiadas con la intención de identificar sus principios activos, dosis efectivas y letales, los tiempos y vías idóneas de efectividad, mecanismos de acción, efectos secundarios y muchos aspectos encaminados hacia el uso adecuado de las plantas para la conservación de la salud (Dodds y Roberts, 1982; Salgado-Garciglia, 1995).

En la actualidad, se estima que México posee aproximadamente 22,000 especies de plantas vasculares, que representan una flora más basta que la de Estados Unidos de América y Canadá juntos, y del mismo orden que la de la ex Unión Soviética (Rzedowski, 1991). Para el estado de Michoacán no se conoce con exactitud el número de taxa que constituyen su flora, pero de manera

conservadora se considera que existen alrededor de 5,000 y muchas de éstas tienen gran variedad de formas en su uso (Rodríguez y Espinoza, 1995).

Con el nombre de orégano se conocen 20 especies pertenecientes a las familias Verbenaceae, Lammiaceae, Asteraceae y Leguminosae (Martínez, 1959; Martínez, 1979), aunque la más importante, desde el punto de vista comercial, es *Lippia berlandieri* Schauer, ya que 90% de la producción nacional de orégano corresponde a dicho taxón de origen mexicano (Dirección Nacional de Normatividad Forestal, 1986 citado por Martínez, 1996).

Quintero y Gutiérrez (1991) establecen a *Lippia graveolens* HBK. como sinonimia de *L. berlandieri*; Martínez (1959, 1996) registra los siguientes nombres comunes para la especie: orégano de cerro, cimarrón o silvestre y Xaak che en lengua maya.

*L. berlandieri* es un arbusto caducifolio, muy ramificado, que llega a alcanzar hasta 2.50 m de altura y 1.20 m de diámetro de cobertura foliar; sin embargo en la mayoría de los casos, las poblaciones silvestres de orégano bajo aprovechamiento miden de 0.70 a 1.20 m de altura y de 0.30 a 0.80 m de diámetro de cobertura, en función de las condiciones específicas de desarrollo y de la edad de la planta (Martínez, 1996). Crece en las zonas áridas de México y forma parte de sus recursos forestales no maderables.

El orégano presenta un sistema radicular ramificado. Los tallos sostienen una gran cantidad de hojas opuestas, alternas, de forma ovalada, ápice romo, de bordes dentados, textura rugosa y con pubescencia corta en ambos lados. Tienen un aroma penetrante, de sabor astringente y picante, su tamaño varía de 1 a 3 cm de largo por 0.5 a 1.5 cm de ancho (Martínez, 1996; Cavazos, 1991 y Maldonado, 1991).

El aceite del orégano (*Lippia graveolens*) es muy codiciado como condimento y en la industria farmacéutica, por lo que su extracción constituye un valor agregado para el aprovechamiento e incide en un mayor beneficio económico para los productores. En estudios realizados con el aceite esencial proveniente de ejemplares recolectados en las regiones semidesérticas del sur de Chihuahua y del norte de Durango, se ha determinado que su elemento principal es un poderoso fungicida y bactericida natural; por ello durante su cultivo se reducen costos en el uso de agroquímicos, hay disminución en el impacto ambiental y mejores ganancias económicas a los productores marginados de la región norte del país (Huerta, 2000).

Costa y colaboradores (2001) citaron que a partir de un extracto etanólico de *Lippia sidoides* Cham. se aislaron dos compuestos que mostraron actividad sobre líneas celulares de leucemia humana.

*Artemia salina* (Linnaeus, 1758) es un pequeño organismo que vive en las aguas salobres e hipersalinas de todo el mundo. Es un crustáceo de la subclase de los anostráceos y conforma el plancton de las aguas continentales saladas (Larry y Denton, 1990; Bertek, 1997). En la actualidad se comercializan quistes de *A. franciscana* Kellog procedentes del Gran Lago Salado de Estados Unidos (Thriantaphylidis *et al.*, 1998). Recientemente han sido utilizados como una prueba estándar en los Métodos de Prueba de Toxicidad Aguda de la Calidad de Agua en la Legislación Ambiental del Programa de Normas Oficiales Mexicanas 1996, del Comité Consultivo Nacional para la Protección del Ambiente (UNAM, 1996). Así mismo, son incorporados a investigaciones sobre la evaluación preliminar de extractos de plantas terrestres y acuáticas tendientes a extraer nuevos compuestos bioactivos, tanto de origen natural, como sintético (Arencibia y Tizol, 1996; González y Aportela, 2001).

Este trabajo tuvo como objetivos evaluar el efecto antibacteriano de dos extractos de *Lippia berlandieri* sobre *Artemia franciscana* y tres especies de enterobacterias e identificar sus principios activos a partir de los extractos en etanol y acetato de etilo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de extractos de acetato de etilo y etanólico en Soxhlet

La parte aérea de planta proveniente del Campo Experimental Palma de la Cruz, San Luis Potosí (Figura 1) fue secada a la sombra y triturada mecánicamente. Se tomaron 10 g del material pulverizado, a los que se les agregó 70 mL de acetato de etilo con un equipo Soxhlet por 2 h, manteniendo a un rango de temperatura entre 60 y 80°C. Enseguida, se efectuó una segunda operación de extracción de la misma muestra con 70 mL de etanol durante 2 h. Ambos extractos concentrados se obtuvieron por remoción al vacío del solvente en un rotavapor marca LABCONCO a 45°C y se disolvieron en 5 mL de etanol absoluto, para su posterior almacenamiento en frascos ámbar bajo condiciones de refrigeración.

El rendimiento se calculó con base en el peso del extracto concentrado expresado en miligramos y producido por cada 10 g de planta seca.

### Evaluación bactericida

Cultivo de las bacterias en medio sólido.- Las bacterias gram negativas *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Shigella flexneri*, así como *Staphylococcus aureus* (gram positiva) se sembraron en medio de cultivo sólido de extracto de carne y levadura (YEB); para los bioensayos se resembraron en matraces Erlenmeyer con 10 mL de medio YEB líquido, e incubaron 24 h a 37°C y con agitación continua.



Figura 1. Orégano, *Lippia berlandieri* Schauer.

Bioensayos.- Se realizaron por el método de "discos de papel" (Bauer *et al.*, 1966) de un centímetro de diámetro impregnados con los extractos crudos. Estos se colocaron en cajas de Petri con los medios de cultivo previamente inoculados con cada una de las especies bacterianas (100  $\mu$ l). Se incubaron en una incubadora marca RIOSSA Modelo EC, por 72 h a 37°C y se identificaron las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los discos; el registro de éstas se hizo en milímetros (incluyendo el disco de papel). A partir del área total de la caja se determinó el porcentaje de inhibición; todos los bioensayos se hicieron por triplicado.

Método de macrodilución en caldo.- Esta prueba en medio líquido se emplea para estimar la concentración a la que un agente activo produce la inhibición de un cultivo bacteriano (Mullenger, 1982; Tamashiro, 1998; NCCLS, 1997 y 1999); consistió en adicionar una solución estándar del extracto a tubos de ensaye que contenían caldo Luria (Luria y Burrows, 1957), de tal manera que quedaran concentraciones crecientes; se inocularon con una solución estandarizada de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se incubaron hasta turbidez visible para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria, definida como la concentración

más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de la bacteria probada.

**Aislamiento y purificación de principio(s) activo(s).**- El extracto acetato de etilo fue fraccionado por medio de cromatografía en columna y en placa fina preparativa y eluido con el solvente de partición de hexa-*o*-acetato de etilo en proporción 2:1. De estas eluciones (fracciones), aquella que mostró la actividad óptima, fue sometida varias veces a la cromatografía en columna y en placa fina con la posterior evaluación biológica, hasta que se obtuvo en forma pura un compuesto aislado y purificado al cual se le realizaron análisis espectroscópicos para su identificación.

Del extracto de acetato de etilo y de la bacteria *Staphylococcus aureus*, se hizo una fragmentación biodirigida por cromatografía en columna, se usó como fase fija la Sílica gel de malla 70 - 230 y como fase móvil los solventes hexano-acetato de etilo en proporción 2:1. Después por cromatografía en capa fina, corrida en la misma composición de solventes, se logró el aislamiento de un compuesto de consistencia líquida aceitosa, incoloro, de olor mentolado y con Frente de Referencia de 0.75, determinado como el responsable del efecto bioactivo (Figura 2 A), el cual fue analizado espectroscópicamente.

**Identificación de principio(s) activo(s).**- Los compuestos con actividad antibacteriana fueron aislados y una vez purificados se identificaron por diferentes análisis espectroscópicos, tales como: Infrarrojo (Espectrofotómetro IR-408 SHIMADZU), Ultravioleta (Espectrómetro UV-160M SHIMATZU), Espectrometría de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Espectrómetro Hewlet Packard) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN AM-400 BRUKER), esta fase del estudio se llevó a cabo en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Bioensayo con larvas de *Artemia franciscana*.**- Los quistes de *Artemia franciscana* se hicieron eclosionar en solución salina (40 g de sal/litro de agua) a 24-29°C durante 48 h. En una placa para prueba de Elisa con 96 micropozos de 300 µl, se adicionaron a cada uno de ellos 100 µl de solución salina, 10 nauplios y 100 µl del principio activo puro con dimetil sulfóxido al 10%, en las siguientes concentraciones: 15.6, 7.8, 3.9, 1.95 y 0 µg/mL; todos los tratamientos se hicieron por triplicado; 24 h después se determinó el porcentaje de mortalidad de los nauplios y se calculó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) mediante el programa Probit.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Rendimiento

El rendimiento de extracto crudo por cada gramo de planta seca (parte aérea) para el extracto etanólico fue de 117 mg y para el acetato de etilo fue de 270 mg; estos valores difieren de los citados por Martínez y González (2000) quienes registran entre 20 y 40 mg de aceite esencial por gramo de hoja seca de orégano.

### Efecto bactericida

El extracto de acetato de etilo produjo el mayor halo de inhibición del crecimiento sobre *Salmonella* sp., mientras que en las otras tres bacterias, el efecto fue muy similar. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mostraron más susceptibilidad al extracto etanólico, seguidas de *Shigella flexneri* y *Salmonella* sp. (Cuadro 1).

La concentración mínima inhibitoria del principio activo para *E. coli* y *S. aureus* fue de 10 mg/mL, con un efecto bacteriostático en el primer caso y bactericida para el segundo.

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento de diferentes bacterias producido por los extractos de *Lippia berlandieri* Schauer.

Bacteria/extracto	Acetato de etilo (%)	Etanólico (%)
<i>Salmonella</i> sp.	60	20
<i>Escherichia coli</i>	40	40
<i>Shigella flexneri</i>	40	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	43

### Aislamiento, purificación e identificación del principio activo

Se determinó que el principio activo respondió a una mezcla en proporción 1:1 de los monoterpenos fenólicos *3-isopropil-6-metilfenol* conocido como timol y *5-isopropil-2-metilfenol* con nombre común de "carvacrol" (Figura 2 B), con fórmula  $C_{10}H_{14}O$ , peso molecular de 150 (Figura 3), los cuales son componentes activos de plantas aromáticas como *Thymus vulgaris* L. y *Monarda punctata* L., ambas pertenecientes a la familia Labiatae, cuya principal propiedad terapéutica es la actividad antitusiva expectorante (Harborne y Baxter, 1993).

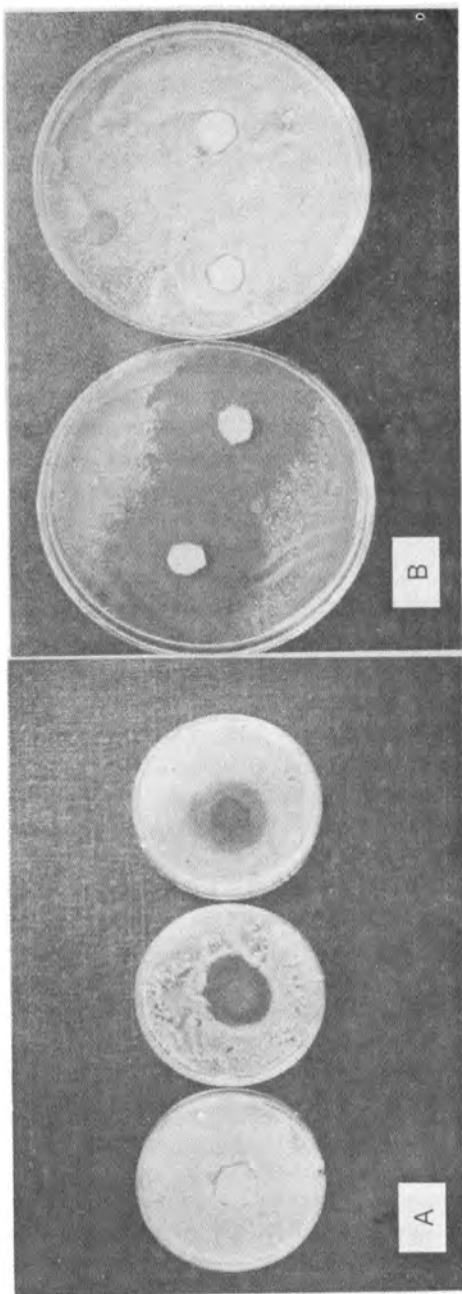
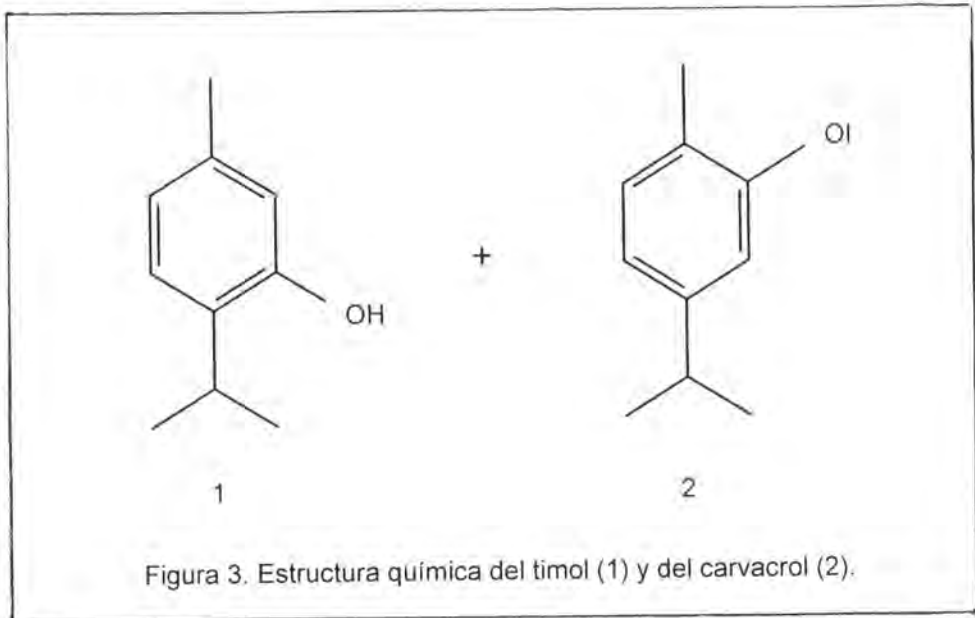


Figura 2. Efecto de inhibición del crecimiento de los extractos etanólico y acetato de etilo de *L. berlandieri* sobre *Staphylococcus aureus* (A) y Efecto del principio activo puro comparado con etanol (B).





El "carvacrol" y el timol tienen acciones analgésicas, antifebriles y antiinflamatorias; por otra parte, el aceite esencial es un efectivo antihelmíntico (timol), en especial frente a ancilostomas, áscaris y oxiuros (Arnason *et al.*, 1989; Harborne y Baxter, 1993).

### Bioensayo con larvas de *Artemia franciscana*

El principio activo aislado en las concentraciones de 15.62  $\mu\text{g/mL}$  provocó una mortalidad del 100%, 7.8  $\mu\text{g/mL}$  del 68.8%, 3.9  $\mu\text{g/mL}$  de 60% y 1.95  $\mu\text{g/mL}$  de 42% en nauplios de *A. franciscana*. La concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) determinada fue de 3.67  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4).

### CONCLUSIONES

El mayor rendimiento se obtuvo en el extracto Soxhlet usando como solvente el acetato de etilo, con 270 mg/g de peso seco.

El extracto con más efecto antimicrobiano fue el de acetato de etilo, con inhibiciones de crecimiento de hasta 60% sobre la bacteria *Salmonella*, seguido de 44% en *Staphylococcus aureus*, y de 40% en *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

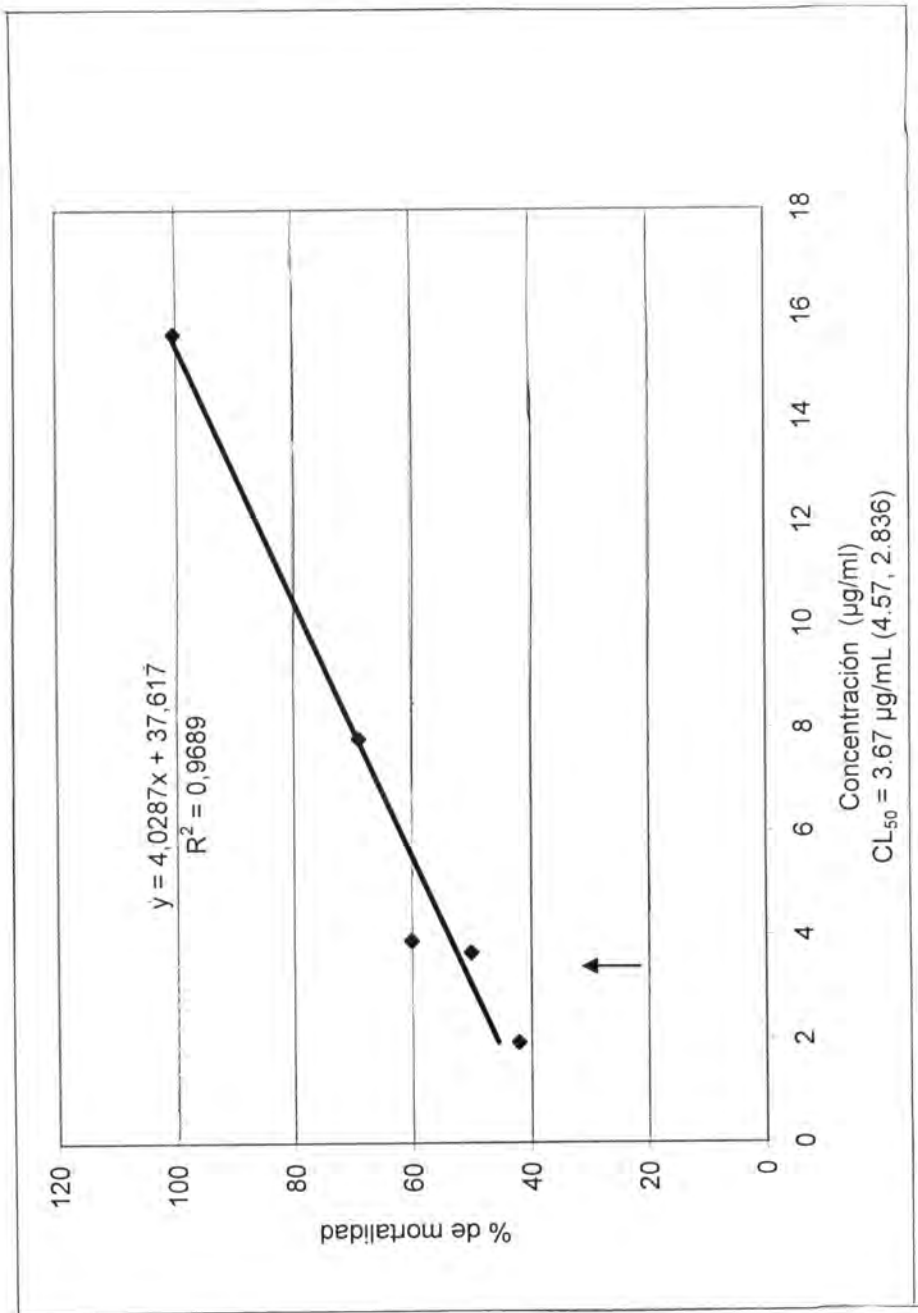


Figura 4. Efecto del principio activo de *Lippia berlandieri* (timol – carvacrol 1:1) sobre *Artemia franciscana*.

Los principios activos identificados en *Lippia berlandieri* fueron el timol y el carvacrol en una proporción de 1:1.

El principio activo puro mostró una  $CL_{50}$  de 3.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre larvas de *Artemia franciscana*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su reconocimiento al M. en C. José Rafael Cavazos Doria del Campo Experimental Palma de la Cruz, SLP por haber proporcionado la planta de orégano deshidratada que se utilizó en el presente estudio.

Al Departamento de Acuicultura de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por facilitar los quistes de *Artemia franciscana*.

## REFERENCIAS

- Arencibia, G. y R. Tizol. 1996. Determinación de metales pesados en *Artemia*. Revista Cubana de Investigación Pesquera. pp. 69-72.
- Arnason, J. T., B. J. R. Philogene and P. Morand. 1989. Insecticides of plant origin. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 141-143.
- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. 1966 Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J. Clin. Pathol. 45:493-496.
- Bertek, Ján. 1997. Lista de comprobación de los nombres válidos e inválidos de los "branchiopods grandes" (Anostraca, Notostraca, Spinicaudata y Laevicaudata), con un examen de la taxonomía de todo el Branchiopoda. Zborník Slovenského Národného Múzea, Prírodné Vedy. Vol. 43:1-66.
- Cavazos, D. J. R. 1991. Características ecológicas y producción de orégano, *Lippia berlandieri* Schauer en poblaciones naturales. Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. In: Memoria de la Primera Reunión Nacional Sobre Orégano. Bermejillo, Durango, México. pp. 56-66.
- Costa S., M., T. L. Lemus, O. D. Pessoa, C. Pessoa, R. C. Montenegro and R. Braz-Filho. 2001. Chemical constituents from *Lippia siloides* and Cytotoxic activity. J. Nat. Prod. 64:792-795.
- Dodds, J. H. and W. L. Roberts. 1982. Biotransformations of codeinone to codeina by immobilized cell of *Papaver somniferum*. Phytochem. 23(4):999-1001.
- Douglas, L. J. and J. F. Freer. 1982. The bacteriostatic and bactericidal activity of antibiotics. Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology. Academic Press, Inc. New York, NY, USA. pp. 313-316.

- Gallegos-Infante J., R. Rocha, G. Gonzalez-Laredo, R. Vargas, R. 2004. Las características antioxidantes de extractos acuosos del orégano (<http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.aocs.org> (15 de diciembre del 2004).
- González P., Y. y G. P. Aportela. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Centro de Toxicología y Biomedicina. Anuario Toxicología 1(1):104-108.
- Harborne, J. B. and H. Baxter. 1993. *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor & Francis. London, UK. pp. 558-568.
- Huerta, C. 2000. Orégano mexicano: oro vegetal. 7 p. <http://www.maph49.galeon.com/biopdiv2/oregano.html>. (6 de marzo de 2006).
- Instituto Nacional de Ecología. 1996. 8.32 NMX-AA-110-1995-SCFI Análisis de agua.- evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* kellogs (crustácea-anostraca). Método de prueba. In: Programas de Normas Oficiales Mexicanas. 1996. del Comité Consultivo Nacional para la Protección Ambiental. SEMARNAT. México, D. F. Folio 3978 ([http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/consultaListaPub.html?id\\_tema=10&dir=Temas](http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/consultaListaPub.html?id_tema=10&dir=Temas)) (6 de marzo de 2006).
- Knapp, C. and A. J. Moody. 1998. Test to asses bactericidal activity. *Clinical Microbiology procedures Handbook Vol. 1:1-10*.
- Larry, L., D. Belk y C. H. Eriksen. 1990. Anostraca Californiano: distribución, hábitat, y estado. *Diario de la Biología Crustácea*, Vol. 10 (2):247-277.
- Luria, S. E. and J. W. Burrows. 1957. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol* 74:461-476.
- Maldonado A., L. J. 1991. Descripción botánica, distribución y usos del orégano en México. Estado actual del orégano en México. In: Memoria de la Primera Reunión Nacional Sobre Orégano. Bermejillo, Dgo. México. pp. 91-102.
- Martínez D., M. 1996. Caracterización y evaluación del orégano *Lippia berlandieri* Schauer para su aprovechamiento en el norte de Jalisco. INIFAP. CIRPAC Guadalajara, Jal. México. Folleto para Productores Núm. 2, pp. 2-6.
- Martínez D., M. y C. González S. 2000. Guía para el manejo del orégano en Jalisco. INIFAP. CIRPAC. Guadalajara, Jal. México. Folleto para productores Núm. 1. pp. 3-7.
- Martínez, M. 1959. *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas. México. 339 p.
- Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de las plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. 1220 p.

- Mullenger, L. 1982. The evaluation of bacterial grow in liquid media. Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology. Academic Press, Inc. New York, NY, USA. pp. 147-159.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Normativa para la propuesta en práctica de la susceptibilidad antimicrobiana mediante discos. Sexta Edición; Norma aprobada. NCCLS. Wayne, PA. USA Documento M2-A6. Vol. 17 No. 1. pp. 1-15.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Ninth Informational supplement. NCCLS. Document M100. Wayne, PA. USA. S9 Vol. 19. No. 1. pp. 1-20.
- Quintero A., R. y G. M. Gutiérrez. 1991. Manual para la identificación de los oréganos mexicanos. Algunas consideraciones sobre un sistema de inventario para el orégano. Estado actual del orégano en México *In: Memoria de la Primera Reunión Nacional Sobre Orégano*. Bermejillo, Dgo, México. pp. 91-102.
- Rodríguez J., S. y J. Espinoza G. 1995. Listado florístico del Estado de Michoacán. Sección I Flora del Bajío y Regiones Adyacentes, Fasc. Complementario VI, Instituto de Ecología, UNAM. 210 p.
- Rzedowski, J. 1991. El endemismo en la flora mexicana: una apreciación analítica preliminar. *Acta. Bot. Mex.* 15:47-64.
- Salgado-Garciglia, R. 1995. Productos vegetales utilizados como agroquímicos. Publicación de la Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. "Boletín Quetzal" 3:28-30.
- Tamashiro, L. 1998. Broth Microdilution MIC Testing. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 1 pp. 52.
- Triantaphyllidis G., V., T. J. Abatzopoloa and P. Sorgeloos. 1998. A review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography* 25:213-226.