

Evaluación del efecto parasiticida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleja cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp)

Blanca Rosa Díaz Sánchez *

Manuel Jiménez-Estrada *

Ana Auró de Ocampo **

Abstract

To evaluate the parasiticide effect of "Tepozan" (*Buddleja cordata*), two compounds were extracted: the first one with hexane (aqueous extract) and the second one with methanol (methanol extract). Afterwards, they were tested against *Costia necatrix*. Two treatments (24 hours among them) were carried out with four different doses (100 mg/l, 50 mg/l and 10 mg/l for the aqueous extract and 100 mg/l, 50 mg/l and 25 mg/l for the methanol one), and were dissolved in fish tank water (one parasitized fish per tank). Results showed no effect of the aqueous extract and a parasite killer efficacy of the methanol extract to 25mg/l, 50 mg/l and 100 mg/l doses, which killed 83.34%, 97.92% y 100% of the protozoan, respectively. Active compound extractions and identification of the methanol extract with chromatographic plate of silica gel were followed, and three fractions (F1, F2, F3) were obtained. Only the F2 fraction showed efficacy to kill *C. necatrix*, when tested at 50 mg/l dose killing 81.49% of the protozoan. This fraction is a phenylpropanoid glycoside called verbascoside.

Key words: *BUDDLEJA CORDATA*, PHENYLPROPANOID GLYCOSIDES, COSTICIDE EFFECT.

Resumen

Con el propósito de probar el efecto parasiticida del "Tepozán" (*Buddleja cordata*), se extrajeron dos de sus compuestos; el primero con hexano (extracto acuoso) y el segundo con metanol (extracto metanólico), y se probaron contra *Costia necatrix*. Se llevaron a cabo dos tratamientos con 24 horas de diferencia entre ellos; se utilizaron cuatro dosis (100 mg/l, 50 mg/l y 10 mg/l del extracto acuoso, y 100 mg/l, 50 mg/l y 25 mg/l del extracto metanólico) disueltas en el agua del acuario (con un pez parasitado por acuario). Los resultados no mostraron efecto alguno del extracto acuoso, mientras que el extracto metanólico a dosis de 25 mg/l, 50 mg/l y 100 mg/l mata al 83.34%, 97.92% y 100% de los parásitos, respectivamente. Se hizo la extracción e identificación del compuesto activo del extracto metanólico con cromatografía en placa de sílica gel y se obtuvieron tres fracciones (F1, F2 y F3). Sólo la fracción F2 mostró efecto parasiticida contra *C. necatrix* cuando se probó a dosis de 50 mg/l. Esta fracción representa un glucósido fenilpropanoide llamado verbascósido.

Palabras clave: *BUDDLEJA CORDATA*, GLUCÓSIDOS FENILPROPANOIDES, EFECTO COSTICIDA.

Recibido el 12 de febrero de 1999 y aceptado el 6 de febrero de 2000.

* Laboratorio de Fitoquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

** Departamento de Especies Productivas no Tradicionales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introducción

Algunas plantas se han utilizado en la terapia de enfermedades tanto de humanos como de animales en diferentes partes del mundo.¹ Los antiguos habitantes de la República mexicana usaban la herbolaria medicinal con resultados muy satisfactorios; actualmente muchos indígenas continúan con esta práctica ancestral.¹ La Norma Oficial Mexicana 021-Pesc 94, emitida por la Dirección de Sanidad Acuicola, de la Dirección General de Acuicultura, de la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, permite un número muy reducido de fármacos utilizables en piscicultura, en mezcla con el alimento. Como consecuencia, los investigadores en esta área deben buscar alternativas apropiadas para el tratamiento de las enfermedades más frecuentes, tanto para evitar la contaminación del agua con fármacos, como para proponer tratamientos económicos para las especies ícticas comestibles de consumo popular. Herwig² registra algunos de los tratamientos más comunes para enfermedades de los peces, con herbolaria medicinal. Por ejemplo, el tratamiento contra *Costia necatrix* con hojas de Lila; los estudios fitoquímicos de esta planta muestran la presencia de verbascósidos semejantes a la *Buddleja cordata*, lo cual representó un estímulo para llevar a cabo este ensayo. *Costia necatrix* es un protozoario muy importante de la mayoría de los peces. Se trata de un flagelado que mide 10 a 14 μ , perfora la piel del pez cuando requiere un sustrato de adhesión. Se reproduce por división binaria y aunque no es un parásito estricto, porque no consume nada del pez, le produce una dermatitis pruriginosa que provoca infecciones bacterianas y micóticas oportunistas.³ Este protozoario causa grandes pérdidas en los alevíes.⁴

Se ha utilizado el azul de metileno, verde de malaquita, ácido acético y dicromato de potasio en el tratamiento de esta parasitosis, pero esos productos tienen un mínimo margen de seguridad, su dosificación no es sencilla y sus efectos colaterales son bien conocidos.⁴ *Buddleja cordata* es un árbol de 1 a 10 m de alto, sus hojas miden 10 a 15 cm, tienen un soporte largo y son anchas en su base y delgadas en la punta. Las hojas son de color verde claro por arriba y blancas o grisáceas por abajo, debido a la presencia de numerosos vellos finos. Sus flores son amarillas y aromáticas, se encuentra en México y Guatemala, en lugares secos entre los 2 050 y 3 100 msnm, crece en lugares altamente perturbados y puede convertirse en plaga.¹

Su clasificación botánica es Orden: Gentianales; Familia: Loganiaceae; Subclase: Asterales; Género: *Buddleja*, Especie: *cordata* HBK.^{5,6}

Buddleja cordata se utiliza en algunos estados del centro de México para madurar abscesos, mezclado con manteca de cerdo sobre heridas o magullones, también como antipirético; las hojas picadas y mezcladas con carbonato y manteca se usan para infecciones de estómago; en afecciones renales, como diurético y otros muchos usos.¹

Entre los componentes aislados de *Buddleja cordata* están los flavonoides como la linarina, con efecto diurético; iridoides como la aucubina que es antiséptica; sesquiterpenos con efectos piscicidas;⁷ fenilpropanoides como los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico.⁸

El verbascósido es un fenilpropanoide conjugado con dos azúcares. Fue aislado de *Buddleja globosa*,⁷ *B. davidii*⁹ y *B. americana*.¹

El acteósido tiene una acción agonista de la acción antitemblor de la DOPA, es analgésico, hipotensor¹⁰ y citotóxico.¹¹ Forma parte de la defensa química de las plantas contra los patógenos.¹²

Material y métodos

Obtención del extracto acuoso

La obtención se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente diagrama de flujo:

Hojas frescas de *Buddleja cordata* HBK

⊗ Evaporación
Hexano ⊗ Metanol ⊗ Acetona ⊗ Agua ⊗ ⊗ ⊗ Extracto acuoso

Se prueba su efecto costicida

Se colectaron 350 gramos del material vegetal de los jardines de la Ciudad Universitaria (el registro de los especímenes está depositado en el herbario del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México: *Buddleja cordata* 829169 MEXU) y se empacaron en una columna de vidrio. Se usó hexano para disolver, a temperatura ambiente, todo el material soluble en éste. Posteriormente se eliminó el hexano por evaporación y se obtuvo 3.01 g de un extracto amarillo verdoso, éste se colocó en acetona y posteriormente en metanol; por último, se disolvió en agua y esta última se eliminó por evaporación.⁸

Obtención del extracto metanólico

La obtención se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente diagrama de flujo:

Hojas frescas de *Buddleja cordata* HBK

⊗	Liofilización	
Agua destilada	⊗ ⊗ ⊗	Extracto acuoso Liofilizado
		⊗ a) Extracción con metanol ⊗ b) Destilación al vacío
	⊗ ⊗ ⊗ ⊗	
	⊗	
Extracto acuoso metanólico	⊗	Separación en placa preparativa
Se prueba efecto costicida		Se prueba efecto costicida

Quinientos sesenta gramos de *Buddleja cordata* se empacaron en una columna de vidrio con agua destilada y se dejaron durante la noche a temperatura ambiente. El producto obtenido se liofilizó y disolvió en metanol. El metanol se eliminó de la parte soluble por destilación al vacío para tener 7.1 g de un sólido de color ocre identificado como extracto metanólico.⁸

Con propósito de encontrar el principio activo del extracto metanólico, se realizó una separación por medio de placa preparativa cromatográfica de sílica gel y se obtuvieron tres fracciones bien definidas: F-1, F-2 y F-3.

La fracción F-2 (un sólido ocre) se disolvió en 2 ml de piridina y 2 ml de anhídrido acético y se dejó durante la noche a temperatura ambiente, después se vertió en agua con hielo. Se solubilizó con etil-acetato y se lavó con una solución acuosa de ácido clorhídrico hasta tener un pH neutro. El producto obtenido fue un aceite de color ocre que se purificó por medio de una placa preparativa cromatográfica de sílica gel con una mezcla de solventes de hexano etil-acetato (4:6) Se obtuvieron 11 mg de un material acetilado (sólido ocre).¹³

Para determinar la pureza de los productos y sus derivados, se usó una placa cromatográfica de sílica gel SILV-UV 254,* placa preparativa sílica gel CCM SIL G-200 UV254.**

El espectro de resonancia magnética se hizo en un Varian Gemini-200 a 200 MHz, y el espectro IR (infrarrojo) se determinó en un espectrómetro PE 283.***

Posteriormente se hizo una separación fina de F-2 en CCP (cromatografía en capa preparativa) y el resultado espectroscópico se comparó con el obtenido por Miyase *et al.*¹⁴ Los resultados espectroscópicos de la fracción F-2 y su acetilado revelaron que el principal

compuesto es un glucósido fenilpropanoide llamado acteósido o verbascósido, constituido por una glucosa y una ramnosa, además de un éster cinámico y un éter fenilpropiónico

Efecto parasiticida contra *Costia necatrix*

Se utilizaron 34 acuarios de 1 l de capacidad, con agua de clorada (tiosulfato de sodio al 30%) y aerada para tener 5 ppm de oxígeno.

Una tilapia (*Sarotherodon* sp) parasitada (se hicieron frotis del moco de la piel para probar la presencia del parásito) se introdujo en cada acuario. Se usaron nueve acuarios con el fin de probar el efecto del extracto acuoso sobre *C. necatrix*, de la siguiente manera: tres acuarios para la dosis de 100 mg/l; tres para la de 50 mg/l y tres para la de 10 mg/l.

Para la prueba del extracto metanólico se usaron 14 acuarios: seis para la dosis de 100 mg/l; cinco para 50 mg/l y tres para 25 mg/l.

Se utilizaron tres acuarios para el grupo testigo no tratado. Para probar las fracciones F-1, F-2 y F-3 se usaron ocho acuarios y se utilizó la dosis de 50 mg/l, que se seleccionó empíricamente, por ser la dosis intermedia, de la siguiente manera: tres acuarios para la F-1; tres acuarios para la F-2 y dos acuarios para la F-3.

Los peces se dejaron tres días antes del tratamiento, alimentados con una dieta balanceada. El agua de los acuarios se homogeneizó y se tomó 1 ml que se colocó en un tubo de ensayo con una gota de azul de metileno. Se permitió la sedimentación durante un minuto y entonces se tomó una alícuota de 0.1 ml del sedimento que se colocó en una cámara de Neubauer por capilaridad. Se observaron bajo el microscopio y se contaron el número de costias de las dos cuadrículas con objetivo 40X. El agua se trató con las diferentes concentraciones de los extractos y se hicieron dos tratamientos con 24 horas de diferencia entre ambos, al cabo de los cuales se volvió a contar el número de parásitos siguiendo la misma metodología. Los resultados se convirtieron a porcentaje (la cuenta basal fue de 100%) y se analizaron por medio de una prueba estadística de Kruskal-Wallis.¹⁵

Resultados

Las fracciones del extracto metanólico acuoso fueron: F-1 (Rf 0.25), F-2 (Rf 0.52) y F-3 (Rf 0.67) el acetilado de la F-2 (Rf 0.74) (Rf es la constante característica de capa sobre componentes en cromatografía de capa fina, usando el mismo disolvente o mezcla). El espectro IR de la fracción F-2 mostró una amplia banda en 3 365 cm⁻¹ que corresponde a OH y se observó un signo en 2 939 cm⁻¹, correspondiente a C-H. A 1 702 cm⁻¹ el signo del grupo éster; a 1 164 cm⁻¹ la vibración del puente C-O-C

* Merck, México, Naucalpan (Estado de México).

** Macherey-Nagel, River Vale (Nueva Jersey).

*** Perkin Elmer, Walleley (Massachusetts).

(etéreo) del grupo éter; a 1 606 y 1 521 cm^{-1} , los aromáticos. En HRMN (resonancia magnética de protón) D_2O (agua deuterada), hubo dos dobletes en 6.28 y 7.60 ppm ($J = 15.9$ Hz) correspondientes a las dobles ligaduras conjugadas (Ar-CH=CH-) que indican la presencia de un éster cinámico. A 5.15 ppm hubo una pequeña constante de acoplamiento ($J = 1.6$ Hz) proveniente del protón anomérico de la ramnosa y en 1.07 ppm está el doblete correspondiente a los metil protones de la ramnosa.

Los resultados observados en las tres réplicas del grupo testigo (al que no se le trató con ninguno de los extractos) mostraron un aumento significativo en el número de protozoarios, a las 24 y 48 horas (Cuadro 1). El análisis estadístico reveló diferencias estadísticamente significativas cuando se contrastó con los grupos tratados con el extracto metanólico, (100 mg/l & testigo: $P = 0.00003$; 50 mg/l & testigo: 0.00030; 25 mg/l & testigo: $P = 0.0048$, después del primer tratamiento y 100 mg/l & testigo: =0.00000; 50 mg/l & testigo: $P = 0.00001$,; 25 mg/l & testigo: 0.00003, después del segundo tratamiento) y no

hubo diferencias cuando se contrastó con los resultados del grupo tratado con extracto acuoso, excepto cuando se contrastó 50 mg/l contra testigo después del segundo tratamiento: $P = 0.0032$

El extracto acuoso (100 mg/l) no tuvo efecto parasitocida contra *Costia necatrix* ($P = 0.7248$). La dosis de 50 mg/l no presentó efecto parasitocida tampoco ($P = 0.06547$) y la dosis de 10 mg/l ($P = 0.8542$) resultó inefectiva contra el protozoario (Cuadro 2). Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para el extracto metanólico se observan en el Cuadro 3, donde se comprueba que hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el número de protozoarios antes y después de los dos tratamientos. (100 mg/l: $P = 0.0023$; 50 mg/l: $P = 0.0432$; 25mg/l: $P = 0.0035$).

Asimismo, al contrastar los resultados de este grupo con el testigo se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las dosis, después del primero y segundo tratamientos.

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para las tres fracciones del extracto metanólico se observan en el Cuadro 4, donde se comprueba que hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el número de parásitos antes y después de los dos tratamientos únicamente para la fracción F-2.

Cuando se contrastó el porcentaje de *C. necatrix* de los diferentes grupos tratados con el extracto acuoso de *B. cordata* contra los del grupo testigo, así como aquel de los diferentes grupos tratados con el extracto metanólico de *B. cordata* contra los del grupo testigo, se encontró que solamente hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre el grupo testigo y el grupo tratado con 50 mg/l del extracto acuoso (día 2), y en cambio hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) tanto el día uno como el día dos, entre el grupo testigo y los grupos tratados con 100, 50 y 25 mg/l del extracto metanólico.

Cuadro 1

PORCENTAJE DE *C. necatrix* EN LOS ACUARIOS DEL GRUPO TESTIGO NO TRATADO, LOS DÍAS CORRESPONDIENTES A PRETRATAMIENTO, PRIMER TRATAMIENTO Y SEGUNDO TRATAMIENTO EN LOS GRUPOS TRATADOS

	El día cero (pretratamiento)	El día 1 (primer tratamiento)	El día 2 (segundo tratamiento)
Acuario 1	100	218	180
Acuario 2	100	145	189
Acuario 3	100	160	200

Cuadro 2

PORCENTAJE DE *C. necatrix* EN LOS ACUARIOS DE LOS GRUPOS TRATADOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE *B. cordata*, EN DOSIS DE 100 mg/l, 50 mg/l y 10 mg/l

	El día 1 (primer tratamiento)			El día 2 (segundo tratamiento)			
	El día cero (pretratamiento)	El día 1 (primer tratamiento)			El día 2 (segundo tratamiento)		
		100	50	10	100	50	10
		(mg/l)			(mg/l)		
Acuario 1	100	100	100	0	110	50	0
Acuario 2	100	100	100	0	76.87	38.1	28.58
Acuario 3	100	100	100	37.5	7.7	0	56.3

Cuadro 3
 PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE *C. Necatrix* EN LOS ACUARIOS DE LOS GRUPOS TRATADOS CON EL EXTRACTO METANÓLICO DE *B. cordata* EN DOSIS DE 100 mg/l, 50 mg/l y 25 mg/l

	<i>El día cero</i> (pretratamiento)			<i>El día 1</i> (primer tratamiento)			<i>El día 2</i> (segundo tratamiento)		
				100	50 (mg/l)	10	100	50 (mg/l)	10
Acuario 1	100	100	100	66.22	48.69	56.87	71.63	89.48	88.24
Acuario 2	100	100	100	67.65	78.17	50	82.36	93.11	69.05
Acuario 3	100	100	100	84.08	70.74	50	88.74	89.03	83.34
Acuario 4	100	100	100	95.04	83.10		100	47.89	
Acuario 5	100	100	100	97.5	83.34		97.5	97.92	
Acuario 6	100	100	100	100			100		

Cuadro 4
 PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE *C. necatrix* EN LOS ACUARIOS TRATADOS CON LAS FRACCIONES F-1, F-2 Y F-3 DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *B. cordata* EN DOSIS DE 50 mg/l

	<i>El día cero</i> (pretratamiento)			<i>El día 1</i> (primer tratamiento)			<i>El día 2</i> (segundo tratamiento)		
				F-1	F-2 50 mg/l	F-3	F-1	F-2 50 mg/l	F-3
Acuario 1	100	100	100	0	45.46	0	0	72.73	60.47
Acuario 2	100	100	100	0	29.27	0	5	92.69	0
Acuario 3	100	100	100	36.37	37.04		13.24	81.49	

Discusión

Los resultados muestran que el efecto parasiticida (ya probado en otro trabajo)⁴ se debe al verbascósido, aunque en el bioensayo de referencia no extrajeron los principios activos sino que únicamente se utilizaron las hojas frescas y molidas y su infusión. Herwig² registró que las hojas de Lila (*Syringa vulgaris*) son efectivas contra *Costia necatrix* y se probó que éstas contienen un verbascósido semejante al de *Buddleja cordata*.¹⁶

El principal compuesto de F-2 del extracto metanólico se identificó como un glucósido fenilpropanoide llamado verbascósido o acteósido. Debido al gran número de plantas que contienen el verbascósido, es posible su uso en casi cualquier parte del mundo como parasiticida (protozoarios parásitos) en las granjas piscícolas. Ejemplo de tales usos son: *Orobancherapumgenistae*,¹⁰ las especies *Aguja* de Japón,¹⁷ *Penstemon*

rosseus,¹⁸ *Calceolaria hypericina*,¹⁹ *Eremophila*,²⁰ *Pedicularis condensata*,²¹ *Marrubium alysson*,²² *Pedicularis longiflora*,²³ *Avicennia germinans*,²⁴ *Plantago depressa*,²⁵ *Premna corymboda* var *obtusifolia*,²⁶ *Premna odorata*²⁷ y muchas otras. Avila *et al.*²⁸ demostraron que los verbascósidos de *Buddleja cordata* matan *Staphylococcus aureus* al afectar la síntesis proteínica e inhibir la incorporación de leucina; asimismo, Pardo *et al.*²⁹ comprobaron también el efecto antimicrobiano de los verbascósidos de *Buddleja globosa*. Sin embargo, en el caso de protozoarios se requiere investigación posterior para comprobar el porqué de su efecto. Al hacer la revisión de la literatura, no se encontraron trabajos científicos sobre el modo de acción de los verbascósidos de *Buddleja* spp sobre *Costia necatrix* o sobre otros protozoarios.

Es importante enfatizar que está demostrado el efecto piscicida de los sesquiterpenos (Buddledinas) con estructura cariofilénicas de las raíces de *Buddleja davidii* y *Buddleja japonica*.⁷ Es muy posible que las raíces de

Buddleja cordata contengan estas Buddlejinas, aunque no hubo mortalidad entre los peces en este bioensayo, ya que sólo se utilizaron las hojas de la planta.

Los investigadores se hallan estimulados a utilizar la herbolaria medicinal contra algunas enfermedades ya que se aprovechan recursos florísticos, algunos de los cuales se encuentran en gran cantidad en regiones específicas, lo que para los piscicultores sería de ayuda, ya que se evitaría el uso de fármacos que son contaminantes o de alto precio. En este trabajo, uno de los objetivos fue conocer los principios activos del Tepozán para posteriormente estudiar su modo de acción, aunque en la práctica acuícola, el uso de la *Buddleja cordata* cruda y molida o en infusión acuosa, constituye una herramienta terapéutica económica y sencilla para tratar a los peces contra la costiasis.⁴ El efecto contra *Costia necatrix* se logró a dosis de 25, 50 y 100 mg/l en dos tratamientos (cada 24 h), aunque en este ensayo se utilizó la dosis intermedia de 50 mg/l, puede utilizarse sin problema la dosis de 100 mg/l ya que la planta se encuentra difundida en muchos lugares y su obtención no es económicamente gravosa. Dados los resultados obtenidos, se recomiendan también dos tratamientos con 24 horas de diferencia entre ambos.

Referencias

- Gallardo-Vázquez AC. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III. México (DF): Instituto Nacional Indigenista, 1994.
- Herwig N. Handbook of drugs and chemical used in the treatment of fish diseases. A manual of fish pharmacology and materia medica. Chicago (Ill): Charles C. Thomas Publisher, 1979.
- Francis-Floyd R, Noga EJ. Compendium on continuing education for the practicing veterinarian. Gainesville (Fl): University of Florida Press, 1994.
- Ocampo CL, Auró OA. Terapia de las enfermedades de los peces. México (DF): Universidad Abierta, Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
- Sanchez OS. Flora del valle de México. México (DF): Herrero, 1969.
- Rzedowski J. Flora fanerogámica del valle de México. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 1985;2:340-341,358-360,458-460.
- Houghton PJ. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. J Ethnopharmacol 1986;11:293-308.
- Harborne JB. Ethnopharmacology. London (UK): Chapman and Hall Publisher, 1990.
- Yamamoto A, Nitta L, Miyase T. Phenylpropanoid and lignaniridoid complex glycosides from roots of *Buddleja davidii*. Phytochemistry 1993;32:421-425.
- Andary C, Wylde R, Laffite G. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis condensata*. Phytochemistry 1982;10:2401-2402.
- Petit GR, Numata A, Takemura T. Antineoplastic agents 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. J Nat Prod 1990;53:456-458.
- Lira-Rocha A, Diaz R. Iridoids and a phenylpropanoid glycoside from *Penstemon rosseus*. J Nat Prod 1987;50:331-333
- Ibrahim R. Phenylpropanoids. In: Day PM, Harborne JB, editors. Methods plant biochemistry. Vol 1. London (UK): Chapman and Hall Publishers, 1989:75-80.
- Miyase T, Kiozumi A, Ueno A. Studies on the acyl glycosides from *Leucocephalum japonicum*. Chem Pharmacol Bull 1982;30:2 732-2 737.
- Sidney S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. México (DF): Trillas, 1978.
- Ellis BE. Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. Phytochemistry 1983;22:1 941-1 943.
- Shimomura F, Sashida Y, Ogawa K. Iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in *Aguja* species of Japan. Phytochemistry 1987;26:1 981-1 983.
- Nicoletti M, Galeffi C, Messana I. Phenylpropanoid glycosides from *Calceolaria hypericina*. Phytochemistry 1988;27:639-641.
- Dell D, Elsegood CL. Production of verbascoside in callus tissue of *Eremophila* sp. Phytochemistry 1989;28: 1 871-1 872.
- Akdemir Z, Calis I, Junior P. Structures of verbascoside and orobancoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapum-genistae*. Phytochemistry 1991;29:1 123-1 127.
- Calis I, Hosny M, Khalifa T, Rüedi P. Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. Phytochemistry 1992;31:3 624-3 626.
- Jia Z, Liu Z. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis longiflora*. Phytochemistry 1992;31:3 125-3 127.
- Fauvel MT, Taoubi F, Gleye J, Fourasté Y. Phenylpropanoid glycosides from *Avicennia marina* *Planta medica* 1993;59:387-388.
- Nishibe SI, Sasahara M, Ying J. Phenylpropanoid glycosides from *Plantago depressa*. Phytochemistry 1993;32:975-977.
- Otsuka H, Watanabe E. A verbascoside iridoid glucoside conjugate from *Premna corymboda* var *obtusifolia*. Phytochemistry 1993;32:983-986.
- Budzianowski J, Skrzypczak L. Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. Phytochemistry 1995;38:997-1 001.
- Otsuka H, Kashima N, Hayashi T, Kubo N. Premnaodorosides A, B and C, iridoid glucoside diesters of an acyclicmonoterpenediol from leaves of *Premna odorata*. Phytochemistry 1992;31:3 129-3 133.
- Avila JG, de Liverant JG, Martinez A, Martinez G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol 1999;66:75-78.
- Pardo F, Perich F, Villarreal L, Torres R. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. J Ethnopharmacol 1993;39:221-223.