

CHEMICAL EDUCATION: STRUCTURAL ELUCIDATION PLICATIN A AND B FROM *WERNERIA DACTYLOPHYLLA*¹

José A. Bravo^{1,2}, Vladimiro Camacho¹, Willy J. Rendón P.^{1,2},

¹Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Carrera de Ciencias Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, (UMSA) Casilla 303, La Paz- Bolivia. ²Instituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN, UMSA), Casilla 303, La Paz- Bolivia.

Keywords: Chemical Education, structural elucidation, NMR, EIMS, spectral analyses, High altitude plant, Pupusa, *Werneria dactylophylla*, Huayna Potosi, Bolivia, Plicatin A and B, toxicity assays, *Artemia salina*, gram (-), gram (+) bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Neurospora crassa*

ABSTRACT

Structural elucidation of natural products through spectrometric tools require practice to acquire ability enough for increasing the research production in tasks such as the quest of new natural origin or derived medical drugs or with chemosystematics or chemotaxonomic labors. Introducing the techniques to the newcomer would impose the presentation of problems in an explicit manner and with real examples. We present the detailed structural elucidation of plicatin B (**1**) known as methyl 3-(4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl)-2-propenoate and we report the identification of plicatin A (**2**) known as methyl 4-hydroxy-3-(2'-hydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)-phenyl-*trans*- α -propenoate, two phenolic compounds reported here for the first time from the species *Werneria dactylophylla*. This paper includes an introduction with the bibliographic research and the description of the isolation and purification procedures, as well indeed a complete step-by-step structural elucidation proposal for **1**. Also, an evaluation of the biological activities of the compounds is reported / *La elucidación estructural de productos naturales a través de herramientas espectrométricas requiere practicas para adquirir habilidad suficiente para lograr un incremento en la producción de investigación en tareas tales como la búsqueda de nuevas drogas de origen natural o sus derivados o con labores de quimiosistemática o quimiotaenonomia. La introducción de las técnicas al novato requeriría la presentación de problemas en una manera explícita y con ejemplos reales. Aquí presentamos la elucidación estructural detallada de plicatín B (1) llamado methyl 3-(4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl)-2-propenoate y reportamos la identificación de plicatín A (2) llamado methyl 4-hydroxy-3-(2'-hydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)-phenyl-trans- α -propenoate, dos compuestos fenólicos reportados aquí por primera vez en la especie *Werneria dactylophylla*. El artículo incluye una introducción con la investigación bibliográfica y por supuesto la propuesta de elucidación estructural completa paso a paso para el compuesto 1. También una evaluación de las actividades biológicas de los compuestos es dada.*

Corresponding author: jbravo@umsa.bo

INTRODUCCION

The genus *Werneria* (Asteraceae, tribe Senecionae) is conformed by 40 species distributed in Argentina, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Perú and Venezuela [1]. They are pygmy perennial herbal species [2,3]. The ancestral use of these species has been reported [4]. In such treatise *Werneria poposa* is mentioned as remedy for sore throat and tonsil inflammation, also it is used in decoction against asthma and expectorant in bronchial affections. *Werneria digitata* is reported against bronchial affections tonsil inflammation and for infected injuries [5]. An important report on ethnomedical treatments is the use of *Werneria incisa* for the soroche, pneumonia and rheumatism, as well as *Werneria dactylophylla* which is referenced for the soroche and as a substituent of coca mate for the altitude hypoxia [6]. The chemical variety in components from species *Werneria* has been published in a review about the genus [1] which regroups diverse studies on *Werneria ciliolata*, *W. dactylophylla*, *W. cf. decora* Blake, *W. digitata*, *W. nubigena* HBK, *W. pygmaea*, *W. poposa*, *W. sattfordiae*, and *W. stuebelli*. The structural nature of the isolated compounds in these species correspond to the classes: Alkaloids, Benzofurans, Benzopyrans or chromens, Coumarins, Diterpens, Flavonoids, Hydroxyacetophenones and derivatives, Monoterpens, Sesquiterpens, Triterpens and/or steroids, Aliphatic linear hydrocarbons.

¹ From the thesis dissertation by V. Camacho: "Isolation, purification and identification of the major secondary metabolites from *Werneria dactylophylla*", Department of Chemistry, Universidad Mayor de San Andrés, 1995, La Paz, Bolivia

Werneria dactylophylla (Schultz Bipontinus) V.A. Funk [7] vernacularly called as “Pupusa” is also named as *Xenophyllum dactylophyllum*. According to the literature [1], the genus “*Werneria*” was divided in two genus: *Werneria* and *Xenophyllum*. Today both generic names are used, some times indistinctly. The species *Werneria dactylophylla* has been phytochemically studied to present. See the review published by Lock to have a screening view [1]. This review reports three glycoside flavonoids, one coumarin and four *ent*-13-*epi*-manoyl oxide derivatives or *ent*-kaurenes diterpens as components of the aerial parts of the plant. These results come from two published works [8,9]. The described compounds to present in *Werneria dactylophylla* are: quercetin-3-O-rhamnoglucoside (rutine), quercetin-7-O-rhamnoside, hesperetin-O-rhamnoglucoside (hesperidin), 7-hydroxy-6-methoxy-coumarin (scopoletin) [8] and *ent*-13-*epi*-manoyl oxide, *ent*-16-hydroxy-13-*epi*-manoyl oxide, *ent*-14 ξ ,15 ξ -epoxy-13-*epi*-manoyl oxide and *ent*-16-hydroxy-14 ξ ,15 ξ -epoxy-13-*epi*-manoyl oxide [9]. In the present paper we contribute to the phytochemical description of *Werneria dactylophylla* with the presence in the aerial parts of the plant of plicatin A and plicatin B. *Werneria dactylophylla* was tested for an anti-hypertensive biological activity that according to the authors was due to scopoletin (7-hydroxy-6-methoxy-coumarin), and also for an anti-microbial activity [8].

El género *Werneria* (familia Asteraceae, tribu Senecionae) está conformado por 40 especies distribuidas geográficamente en los países de Argentina, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Perú y Venezuela [1]. Son hierbas pigmeas perennes [2,3]. El uso ancestral de especies del género ha sido reportado por diferentes autores [4]. En dicho tratado se menciona a *Werneria poposa* como remedio para la inflamación de las amígdalas o también en decocción contra el asma y pectoral contra bronquitis agudas. *Werneria digitata* es reportada contra enfermedades bronquiales amigdalitis y contra heridas infectadas [5]. Un importante reporte de etnomedicina es el uso de *Werneria incisa* para el soroche, la neumonía y el reuma, así como también *Werneria dactylophylla* que es reportada para el soroche y como sustituto de la coca para la hipoxia de altura [6]. La variedad química de los componentes de las especies *Werneria* ha sido publicada en la revisión sobre el género [1] que reagrupa diversos estudios sobre *Werneria ciliolata*, *W. dactylophylla*, *W. cf. decora* Blake, *W. digitata*, *W. nubigena* HBK, *W. pygmaea*, *W. poposa*, *W. satffordiae*, y *W. stuebelli*. La naturaleza estructural de los compuestos aislados en dichas especies corresponde a las clases: Alcaloides, Benzofuranos, Benzopiranos o cromenos, Cumarinas, Diterpenos, Flavonoides, Hidroxiacetofenonas y derivados, Monoterpenos, Sesquiterpenos, Triterpenos y/o esteroides, Hidrocarburos alifáticos lineales.

Werneria dactylophylla (Schultz Bipontinus) V.A. Funk [7], de nombre vernáculo “Pupusa” es nombrada también como *Xenophyllum dactylophyllum*. Según la literatura [1], el género “*Werneria*” fue dividido en dos géneros: *Werneria* y *Xenophyllum*. De manera que hoy se usan ambos nombres genéricos, a veces, indistintamente. La especie *Werneria dactylophylla* fue objeto de estudios fitoquímicos previos al presente (ver el trabajo de revisión de Olga Lock, [1]). Este trabajo reporta 3 flavonoides glicosilados una coumarina y 4 diterpenos de tipo *ent*-13-*epi*-manoyl oxide derivados o *ent*-kaurenos como constituyentes de las partes aéreas de la planta. Estos resultados provienen de dos trabajos publicados [8,9]. Los compuestos descritos hasta el presente para *Werneria dactylophylla* son: quercetin-3-O-ramnoglucósido (rutina), quercetin-7-O-ramnósido, hesperetin-O-ramnoglucósido (hesperidina), 7-hidroxi-6-metoxi-cumarina (escopoletin) [8] y óxido de *ent*-13-*epi*-manoilo, óxido de *ent*-16-hidroxi-13-*epi*-manoilo, *ent*-14 ξ ,15 ξ -epoxi-13-*epi*-manoilo, óxido de *ent*-16-hidroxi-14 ξ ,15 ξ -epoxi-13-*epi*-manoilo [9]. En la presente publicación contribuimos a la descripción fitoquímica de *Werneria dactylophylla* con la presencia en las partes aéreas de la planta de plicatina A y plicatina B. *Werneria dactylophylla* fue probada por su actividad biológica antihipertensiva atribuida según los autores a escopoletin (7-hidroxi-6-metoxi-cumarina), y antimicrobiana [8].

RESULTADOS, DISCUSION

Werneria dactylophylla was collected and its aerial parts dried at room temperature, pulverized and extracted successively under petrol ether 20-60 and ethanol. The dry ethanol extract was dissolved in ethyl acetate. The ethyl acetate soluble fraction was decanted and concentrated at reduced pressure to give rise to the AcOEt extract. This extract was submitted to a chromatographic separation process in normal phase in various steps and under diverse mobile phase mixtures of CHCl₃/AcOEt/C₆H₆ to afford compounds **1** and **2**. Compounds **1** and **2** exhibited the more remarkable signals in the IR spectra as follows: (ν , cm⁻¹) 3270 (**2**, OH associated), 3500 (**1**, OH free), 1685 (**2**, carbonyl), 1705 (**1**, carbonyl), 1640 (**2**, C=C trisubstituted), 1650 (**1**, C=C, *trans*), 985 (**2**, C=C *trans*), 985 (**1**, C=C, *trans*).

Werneria dactylophylla fue recolectada y las partes aéreas secadas a temperatura ambiente, pulverizadas y extraídas sucesivamente con éter de petróleo 20-60 y con etanol. El extracto alcohólico seco fue disuelto en acetato de etilo. La fracción soluble en acetato de etilo fue decantada y concentrada a sequedad a presión reducida dando lugar al

extracto AcOEt. Dicho extracto fue sometido a un proceso de separación cromatográfica en fase normal en varias etapas y con diversas mezclas de fase móvil de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{C}_6\text{H}_6$ para dar lugar a la purificación de los compuestos **1** y **2**. Los compuestos **1** y **2** dieron espectros de IR cuyas señales principales muestran alargamientos de enlaces correspondientes a grupos funcionales característicos: (ν , cm^{-1}) 3270 (**2**, OH asociado) y 3500 (**1**, OH libre), 1685 (**2**, carbonilo), 1705 (**1**, carbonilo), 1640 (**2**, C=C trisustituido), 1650 (**1**, C=C, *trans*), 985 (**2**, C=C *trans*), 985 (**1**, C=C, *trans*).

The proton spectrum of **1**

Compound **1** shows a recorded ^1H NMR spectrum (Fig. 1) with discrete signals at both high and low field. In the aliphatic zone we find an apparent doublet or two close singlet signals. Since the integration shows at least 6 protons for this (these) signal(s), we can assume the presence of two methyl groups almost chemically equivalent. Anyway a 6H-doublet can also be attributed to the 2 equivalent methyl groups signal of an isopropyl group, where the 6-equivalent-H-singlet appears after coupling with the isopropyl methine as a doublet. However the Hz difference of the two peaks is too small and doesn't fit with a $^3J_{\text{HH}}$ coupling value ($\sim 6\text{-}9$ Hz) a fact letting discard such possibility. The chemical shift for each is δ 1.65 and δ 1.67. These proton chemical shift values correspond to methyl groups attached to vinyl carbons [10]. The $^1J_{\text{XH}}\text{-XHCORR}$ spectrum (Fig. 2) clearly shows that the proton singlets correlate in the 2D spectrum to two well separated carbon signals permitting thus to identify the corresponding methyl carbons at δ 17.7 and δ 25.7. These peaks can be clearly defined as methyl groups after examining the DEPT 135 spectrum (Fig. 3) which permits to discriminate between CH_3/CH (in phase) and CH_2 (anti-phase) groups, with quaternary carbons showing no peaks at all.

El espectro del protón de **1**

El compuesto **1** muestra un espectro de RMN^1H (Fig. 1) con señales discretas a campos altos y bajos. En la zona alifática encontramos un aparente doblete o dos singletes próximos. Como la integración muestra al menos 6 protones para esta(s) señal(es), podemos asumir la presencia de dos grupos metilo casi químicamente equivalentes. También, un doblete para 6 protones puede ser atribuido a los dos grupos metilo equivalentes de un grupo isopropilo. Sin embargo, la diferencia en Hz de los dos picos es muy pequeña y no encaja con los valores aceptados para valores de acoplamiento $^3J_{\text{HH}}$ hecho que nos lleva a descartar tal posibilidad. El corrimiento químico para cada uno es δ 1.65 y δ 1.67. Estos valores de desplazamiento químico corresponden a grupos metilos unidos a carbonos vinílicos [10]. El espectro $^1J_{\text{XH}}\text{-XHCORR}$ (Fig. 2) permite identificar los correspondientes carbonos metilo a δ 17.7 y δ 25.7. Estos picos pueden ser claramente definidos como grupos metilo después de examinar el espectro DEPT 135 (Fig. 3) que permite discriminar entre grupos CH_3/CH (en fase) y CH_2 (anti-fase) con los carbonos cuaternarios sin pico alguno.

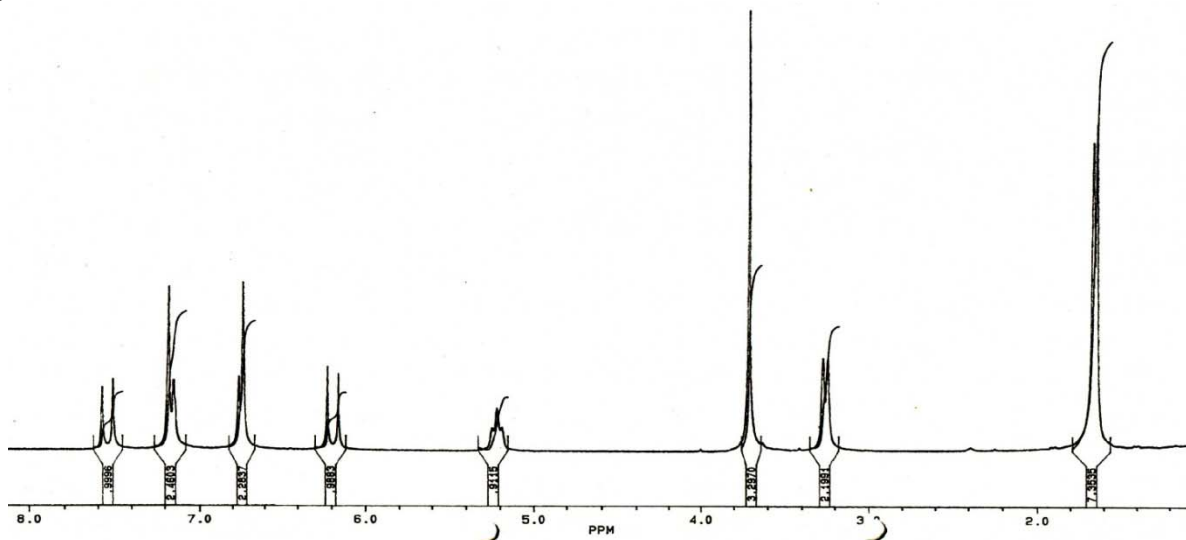


Fig. 1 Compound **1**, ^1H NMR spectrum, 250 MHz, CDCl_3 , chemical shifts from TMS

Toward lower field we find a doublet integrating for 2 protons centered at δ 3.25 (Fig. 1) attached to a methylene carbon resonating at δ 28.9 (Fig. 2 and 3). This signal can also be attributed to two doublets where the external peaks

interpreted from their direct relationship to the proton signals according to Fig. 1 to 3, there are only those carbons called quaternary carbons missing for an attempt to assign them at this stage of the structural elucidation demarche. By comparing Fig. 2, 3 and 4, we establish the presence of the following (from right to left) signals with no crosspeak available (Fig. 2): δ 126.6, 128.0, 134.4, 156.7 and 168.6. From 126.6 to 156.7 ppm we have four aromatic/ethylene-type carbons and that at 168.6 could correspond to a carbonyl carbon.

El espectro del carbono de **1**

Después del rápido análisis del espectro del protón, completaremos la ya comenzada descripción analítica del espectro del carbono de **1**. Ya que todos los carbonos hidrogenados han sido previamente descritos e interpretados *a priori* a partir de su relación directa a las señales de los protones de acuerdo a las Fig. 1 a 3, quedan solamente aquellos carbonos llamados cuaternarios para una atribución tentativa en el presente estadio del trabajo de elucidación estructural. Comparando las Fig. 2, 3 y 4, establecemos la presencia de las siguientes señales (de derecha a izquierda) que carecen de pico de correlación directa en el espectro de la Fig. 2: δ 126.6, 128.0, 134.4, 156.7 y 168.6. Desde δ 126.6 a 156.7 ppm tenemos cuatro carbonos aromáticos/tipo-etileno y aquel a 168.6 podría corresponder a un carbono carbonílico.

The establishment of the intramolecular connectivity for **1**

The hydrocarbon skeleton of **1** can be figured out of the analysis of the establishment of the intramolecular connectivity given by the HHCOSY (Fig. 5) and the $^{2,3}J_{\text{XH-XHCORR}}$ spectra (Fig. 6).

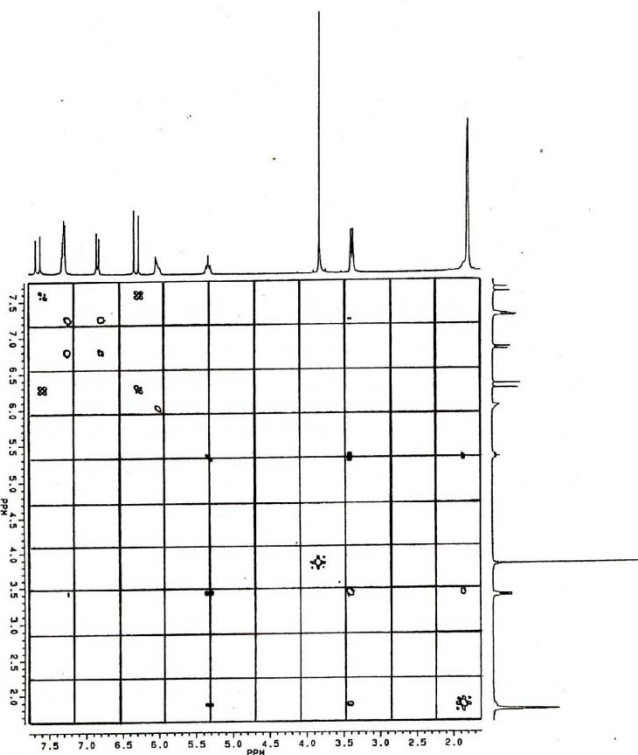


Fig. 5. The HHCOSY spectrum of **1**, 250 MHz, CDCl_3

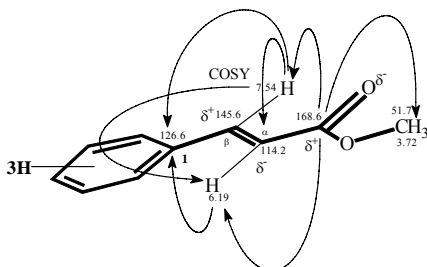


Fig. 7 XHLR correlations methyl acrylate moiety

Before to start with the establishment of the connectivity, we recapitulate the structural elements derived from the 1D spectra of **1**. Two methyl groups (δ 1.65, *s*; 1.67, *s*), possibly geminal, attached to a carbon double bond, a methylene linked to oxygen or to a carbon double bond (δ 3.25), a methoxyl group (δ 3.72, *s*) attached to an aromatic ring or to a carbonyl, one proton in an aromatic or ethylene-type position (δ 5.22), a couple of *trans*-coupled ethylene-type protons (δ 6.19, *d*, 16 Hz; δ 7.54, *d*, 16 Hz) and three aromatic methine groups (δ 6.75 and 7.16). Our first connectivity approach starts from the carbon signal for carbonyl (δ 168.6) according to Fig. 6. In this $^{2,3}J_{\text{XH-XHCORR}}$ spectrum we distinguish three crosspeaks for the carbonyl carbon which is thus distantly coupled to proton signals at δ 3.72, MeO, and to each ethylene proton of the AX spin coupling system appearing at δ 6.19 and 7.54. The only way to dispose these three elements is according to Fig. 7. In the same spectrum we consider that the ethylene proton at δ 7.54 (β) presents four more crosspeaks. The second crosspeak correlating this proton to carbon at δ 145.6, is a $^1J_{\text{XH}}$ coupling to the more deshielded ethylene carbon of the AX system (direct coupling, according to Fig. 2). The third crosspeak toward higher field establishes a coupling between our ethylene proton (δ 7.54) and a methine aromatic carbon at δ 130.0. A fourth crosspeak relates it to another aromatic methine carbon at δ 127.6. The fifth crosspeak correlates our proton to the other carbon atom of the π system to which this belongs, the ethylene carbon at δ 114.2. This last correlation is represented in Fig. 7.

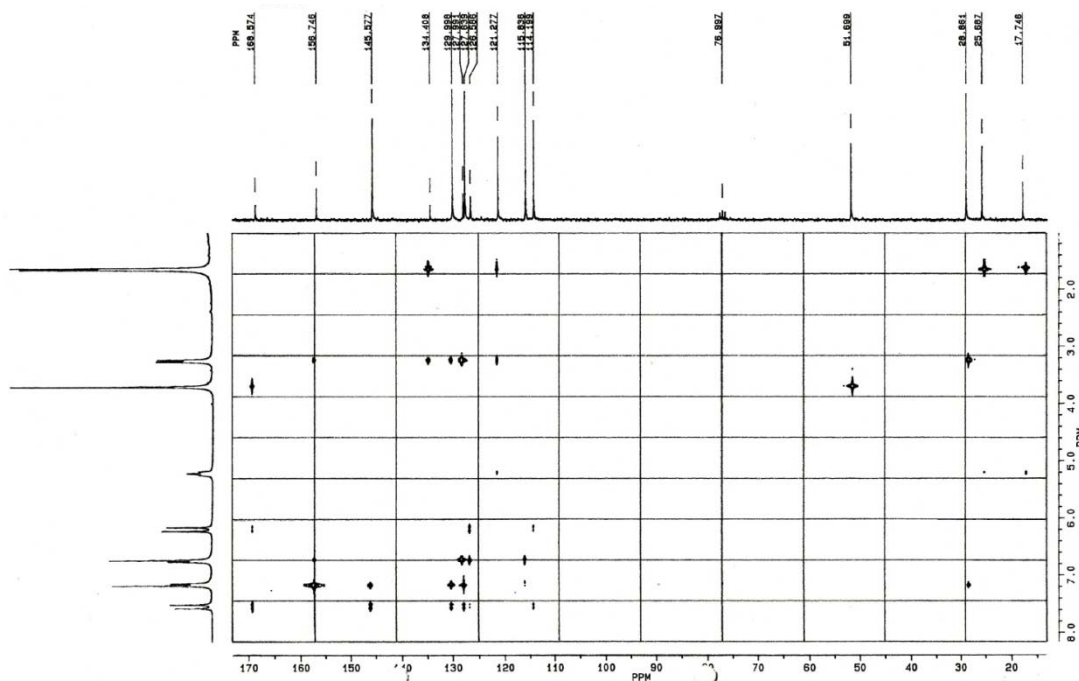


Fig. 6 The $^{2,3}J_{XH-XHCORR}$ spectrum of **1**, 250 MHz, 62.9 MHz, $CDCl_3$

El establecimiento de la conectividad intramolecular para **1**.

El esqueleto hidrocarbonado de **1**, puede ser concebido a partir del análisis del establecimiento de la conectividad intramolecular dada por el espectro H-H COSY (Fig. 5) y el espectro $^{2,3}J_{XH-XHCORR}$ (Fig. 6). Antes de empezar con el establecimiento de la conectividad, recapitularemos los elementos estructurales derivados de los espectros 1D de **1**. Dos grupos metilo (δ 1.65, *s*; 1.67, *s*) posiblemente geminalmente dispuestos y unidos a un átomo de carbono de doble enlace (δ 3.25), un grupo metoxilo (δ 3.72, *s*), unido a un anillo aromático o a un carbonilo, un protón en una posición aromática o etilénica (δ 5.22), una pareja de protones tipo etileno acoplados en *trans* (δ 6.19, *d*, 16 Hz; δ 7.54, *d*, 16 Hz) y tres grupos metinos aromáticos. Nuestra primera aproximación de conectividad comienza desde la señal del carbono del carbonilo (δ 168.6) de acuerdo a Fig. 6. En este espectro $^{2,3}J_{XH-XHCORR}$ se distingue tres picos de correlación para el carbono carbonilo el cual se halla así acoplado a distancia a los protones a δ 3.72, MeO, y a cada protón etileno del sistema de acoplamiento de spin AX que aparece a δ 6.19 y 7.54. La única manera de ubicar estos tres elementos es de acuerdo a la Fig. 7. En el mismo espectro consideramos que el protón de etileno a δ 7.54 presenta cuatro picos de correlación más. El segundo pico correlacionando a este protón al carbono a δ 145.6, es un acoplamiento $^1J_{XH}$ con el carbono etilénico mas desapantallado del sistema AX (acoplamiento directo según Fig. 2). El tercer pico hacia campos altos establece un acoplamiento entre nuestro protón etilénico (δ 7.54) y un carbono metino aromático a δ 130.0. Un cuarto pico correlaciona nuestro protón a otro carbono metino aromático a δ 127.6. El quinto pico de correlación correlaciona nuestro protón con el otro carbono etilénico a δ 114.2 del sistema π al cual pertenece. Esta última correlación se representa en la Fig. 7.

The HHCOSY spectrum (Fig. 5) shows a $^3J_{HH}$ between the doublets at δ 6.19, *d*, 16 Hz and δ 7.54, *d*, 16 Hz, as already mentioned this AX system presents a *trans* stereochemistry after their identical coupling constant value. The other ethylene proton (δ 6.19, α) is, in addition of coupling to the carbonyl carbon, coupling to an aromatic quaternary carbon (δ 126.6) after the corresponding crosspeak on Fig. 2. The third crosspeak for this second ethylene proton is the direct correlation to its carbon ($^1J_{XH}$). Note also (Fig. 2) a weak crosspeak to correlate H- β to the same quaternary (δ 126.6, numbered from now on as C-1). We assigned C- α as the more shielded one between both ethylene carbons according to electronic densities from the carbonyl oxygen (Fig. 7). Counting off the aromatic carbons (CH or C) we sum a total of six carbons: the already mentioned three aromatic methines at δ 130.0, 127.7 and 115.8, the already described C-1 (δ 126.6) as the anchor point for the methyl acrylate side chain, and the two remaining aromatic quaternary carbons at δ 128.0 and 134.4. The HHCOSY spectrum (Fig. 5) also shows

crosspeaks correlating both aromatic signals (δ 6.75 y 7.16). Thence we affirm with no fear the presence of a tri-substituted benzene ring in **1** (Fig. 7). The next step in this pathway is to find other XH correlations into our benzene in order to define the substitution pattern of the ring.

El espectro HHCOSY (Fig.5) muestra un $^3J_{HH}$ entre los dobletes a δ 6.19, *d*, 16 Hz y δ 7.54, *d*, 16 Hz, tal cual se mencionó este sistema AX presenta una estereoquímica *trans* según su idéntico valor de constante de acoplamiento. El otro protón etilénico (δ 6.19, α) además de acoplarse al carbono carbonílico, se acopla a un carbono cuaternario aromático (δ 126.6) según su pico de correlación correspondiente (Fig. 2) El tercer pico de correlación para este segundo protón etilénico es la correlación directa a su carbono ($^1J_{XH}$). Nótese también (Fig. 2) una débil correlación para conectar H- β al mismo carbono cuaternario (δ 126.6, llamado desde ahora en adelante como C-1). Asignamos como C- α al carbono más apantallado entre ambos carbonos etilénicos de acuerdo a las densidades electrónicas derivadas del oxígeno carbónico (Fig. 7). Contando los carbonos aromáticos (CH o C) sumamos los ya mencionados metinos aromáticos a δ 130.0, 127.7 and 115.8, el ya descrito C-1 (δ 126.6) como el punto de anclaje para la cadena lateral acrilato de metilo, y los dos carbonos cuaternarios aromáticos que restan a δ 128.0 y 134.4. El espectro HHCOSY (Fig. 5) muestra correlaciones para ambas señales aromáticas (δ 6.75 y 7.16) probando también la presencia de un anillo bencénico. De este modo afirmamos sin temor al error la presencia de un anillo bencénico trisustituido en **1** (Fig. 7). El próximo paso en esta ruta es hallar otras correlaciones XH al interior de nuestro benceno para definir el patrón de sustitución del anillo.

The only correlation of C-1 (δ 126.6) to any aromatic proton is a crosspeak for δ 6.75. This proton is correlated to the quaternaries at δ 128.0 and 156.7. This late carbon can be readily attributed to an oxygenated aromatic quaternary carbon [10]. The proton signal (δ 6.75) represents the resonance for an only proton. The crosspeak for signal at δ 7.16 with C- β (δ 145.6) in the methyl acrylate side chain means that one or both of the protons imbedded in signal at δ 7.16 are correlating to that carbon, and since proton in δ 6.75 doesn't couple to C- β (no crosspeak) we assume that protons at δ 7.16 are placed in an *ortho* position with respect to C-1 and that the proton at δ 6.75 is in a *meta* position regarding this same carbon. There are two crosspeaks relating H- β (δ 7.54) with the *ortho* carbons assuring these positions for the two protons at δ 7.16. These positions are named as H/C -2 and H/C -6 and hence the signals δ 6.75 and its 1J -coupled carbon 114.2 are named as H/C -5. This is the assignment for the three aromatic methines in **1**. However let us remark that the *ortho* protons are almost but not equally equivalent, and the *ortho* carbons are certainly not equivalent. Also let us say that at this stage of the analysis we are not able yet to assign positions 2 and 6 with no ambiguity. Aiding information is found in Fig. 6 where no crosspeak is found correlating positions 5 and 2 meaning by this they are placed in a mutual *para* disposition. The two remaining ring's substituent must be placed. One will undoubtedly be an OH and the other will comport certainly a carbon sequence including both methyl groups a high field. The remaining question is where these groups will be placed in the cycle with respect to the methyl acrylate side chain (anchored over C-1). Is the OH group in a *para* and the other substituent in a *meta* positions with respect to C-1? Or vice versa? Since the OH group shows no remote heteronuclear couplings, we look for them from the side chain comporting the carbon sequence (R). Before going to higher field looking for the R side chain correlations we establish a remote XH coupling between the aromatic H-5 (δ 6.75) and an aromatic non oxygenated quaternary at δ 127.6. Let us remark here that this proton (δ 6.75) also couples to the oxygenated quaternary carbon at δ 156.7. However these two correlations don't permit yet to define the substitution pattern for the aromatic ring. Thus we will try to establish from Fig. 6 the structure of the carbon sequence (R) substituting on the ring. The just evoked assignments can be visualized in Fig. 8.

La única correlación de C-1 (δ 126.6) a cualquier protón aromático es un pico cruzado para δ 6.75. Este protón está correlacionado a los cuaternarios a δ 128.0 y 156.7. Este último carbono puede ser prontamente atribuido a un carbono cuaternario aromático oxigenado [10]. La señal de protón (δ 6.75) representa la resonancia para un solo protón. El pico cruzado para la señal a δ 7.16 con C- β (δ 145.6) en la cadena lateral acrilato de metilo significa que uno o ambos protones sobrepuestos en la señal a δ 7.16 están correlacionados con ese carbono, y ya que el protón en δ 6.75, no acopla a C- β (sin pico-2D), asumimos que los protones a δ 7.16 están ubicados en una posición *ortho* respecto al C-1 y que el protón a δ 6.75 está en una posición *meta* en relación al mismo carbono. Hay dos picos-2D relacionando H- β (δ 7.54) con los carbonos *ortho* asegurando esas posiciones para los dos protones a δ 7.16. Estas posiciones se denominan como H/C -2 y H/C -6 y por lo tanto las señales δ 6.75 y su carbono 1J -acoplado 114.2 son se denominan como H/C -5. Esta es la atribución para los metinos aromáticos en **1**. Sin embargo hay que remarcar que los protones *ortho* son casi pero no igualmente equivalentes, y los carbonos *ortho* son ciertamente no

equivalentes. También hay que decir en este estadio del análisis que aun no es posible asignar las posiciones 2 y 6 sin ambigüedad. Información útil se puede encontrar en la Fig. 6. Donde no existe un pico-2D que pueda correlacionar las posiciones 5 y 2 significando esto que estos están ubicados en una disposición *para* mutua. Los dos sustituyentes que quedan para asignar en el anillo deben ser ubicados. Uno de ellos será sin duda un OH y el otro comporta una secuencia carbonada que incluye ambos metilos a campos altos. La pregunta flotante es dónde estos grupos se ubicarían en el ciclo con respecto a la cadena lateral acrilato de metilo (anclada sobre C-1). ¿Está el grupo OH en *para* y el otro sustituyente en *meta* respecto a C-1, o viceversa? Ya que el OH no muestra acoplamiento remoto heteronuclear, debemos buscar estos a partir de la cadena lateral que involucra la secuencia carbonada (R). Antes de desplazarnos a campos altos buscando las correlaciones de R, establecemos un acoplamiento XH remoto entre el aromático H-5 (δ 6.75) y un cuaternario aromático no oxigenado a δ 127.6. Hay que remarcar aquí que este protón (δ 6.75) también acopla al cuaternario oxigenado a δ 156.7. Sin embargo estas dos correlaciones no permiten aun definir el patrón de sustitución del anillo aromático. Luego trataremos de establecer a partir de la Fig. 6 la estructura de la secuencia carbonada en el anillo. Las asignaciones evocadas pueden visualizarse en Fig. 8.

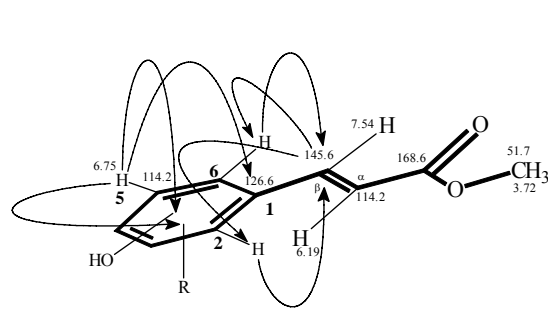


Fig. 8 XHLR correlations for the benzene-acrylate link

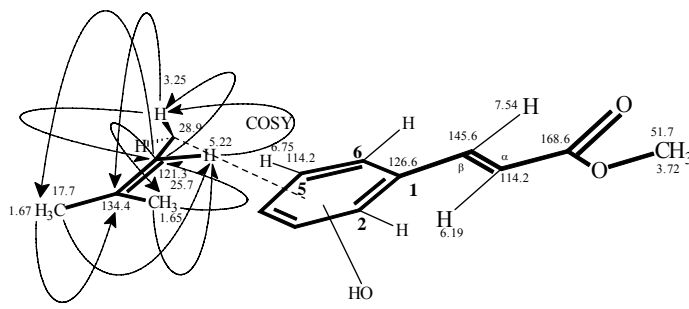


Fig. 9 XHLR correlations for the establishment of the isoprene moiety

Let us establish now the connectivities for the two methyl groups defined after their chemical shift values as being linked to a C-C double bond (δ 1.65 and δ 1.67). Their carbons (δ 17.7 and δ 25.7, respectively, Fig. 2), are remotely coupled (3J) to the vinyl proton triplet at δ 5.22. Its respective methine carbon resonates at δ 121.3. This one at its turn couples to the methyl protons and also to the methylene protons at δ 3.25. Conversely we observe a crosspeak correlating proton at δ 3.25 to the ethylene methine at δ 121.3. The methylene protons also correlate with the ethylene quaternary carbon at δ 134.4. The final crosspeaks to describe the carbon sequence (R) in **1** are those connecting the two methyl group protons to the ethylene quaternary (δ 134.4) and the ethylene methine (δ 121.3). The HHCOSY spectrum (Fig. 5) shows crosspeaks connecting the methylene and the ethylene methine as well as a 4J -crosspeak, “W” long range coupling, connecting the methyl protons to the ethylene methine proton. This information guides us to establish that this ethylene comports an only ethylene proton (δ 5.22) with two geminal methyl groups, or the existence of an isoprene unit in the structure of **1**. Figure 9 illustrates the preceding structural analysis.

Establezcamos ahora las conectividades para los dos grupos metilo definidos según sus valores de desplazamiento químico como posicionados sobre un doble enlace C-C (δ 1.65 y δ 1.67). Sus carbonos (δ 17.7 y δ 25.7, respectivamente, Fig. 2), están remotamente acoplados (3J) al triplete del protón vinílico a δ 5.22. Su respectivo carbón metino resuena a δ 121.3. Este a su vez acopla con los protones de metilo y también a los protones de metileno a δ 3.25. Inversamente observamos un pico-2D correlacionando el protón a δ 3.25 con el metino etilénico a δ 121.3. Los protones del metileno también, correlacionan con el carbono cuaternario etilénico a δ 134.4. El pico-2D final para la descripción de la secuencia carbonada (R) en **1** son aquellos que conectan los dos grupos metilos al cuaternario etilénico (δ 134.4) y al metino etilénico (δ 121.3). El espectro HHCOSY (Fig. 5) muestra picos-2D conectando al metileno y al etileno como también un pico 4J o acoplamiento a larga distancia tipo “W” hacia el protón metino etilénico. Esta información nos guía a establecer que este etileno comporta un único protón etilénico (δ 5.22) con dos grupos metilos geminales, o sea la existencia de una unidad isoprénica en la estructura de **1**. La figura 9 ilustra el precedente análisis estructural.

Now corresponds to find the anchoring point for this isoprene moiety into the benzene ring of molecule **1**. This comes out from establishing heteronuclear long range couplings between the benzene ring and the isoprene atoms. It is obvious that the isoprene unit connects its methylene to an aromatic quaternary carbon. Hence the establishment to

be defined corresponds to H-C or C-H connectivities for the methylene or methine group and the quaternary carbon in the benzene ring besides eventual correlations with neighboring atoms in the benzene ring. Thence we observe a first coupling of the methylene protons (δ 3.25) and the oxygenated aromatic carbon at δ 156.7, this later belonging to the benzene ring. This carbon has already been defined as bearing a hydroxyl substituent. We do also find a coupling to the aromatic quaternary at δ 127.6 bearing the isoprene moiety. The determining correlation appears as a crosspeak correlating the isoprene methylene protons to an aromatic methine carbon at δ 130.0. This methine was one of the *ortho* protons regarding the carbon bearing the methyl acrylate moiety. Since when analyzing above the connectivity for these two structural portions (the benzene ring and the methyl acrylate, Fig. 8 and 9) we couldn't assign with certainty which proton was who. Now thanks to the mentioned correlation for the methylene of the isoprene, we can attribute to H-2 / C-2, the signals at δ 7.16 / 130.0. Let us notice the absence of crosspeak for an eventual XHLR coupling between the methylene protons and the carbon of what we named position 6. Consequently the *meta* position with respect to C-1 is thus occupied by the isoprene side chain and consequently the OH group substitutes in the *para* position. Placing these substituents in the opposite positions (OH-*meta*, and C₅H₉-*para*) gives no crosspeaks to connect the methylene protons to any position: 6 or 2. These structural features definitions complete de structural elucidation of **1**. These connectivities are graphed in Fig. 10, which also depicts the already mentioned correlations of H-6 and carbons δ 156.7 and 127.6. Compound **1** is known as plicatin B or 3-[4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-methyl ester, also known as methyl 3-(4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl)-2-propenoate [12]. This structure corresponds to a molecular formula C₁₅O₃H₁₈, with its corresponding molecular weight of 246 amu.

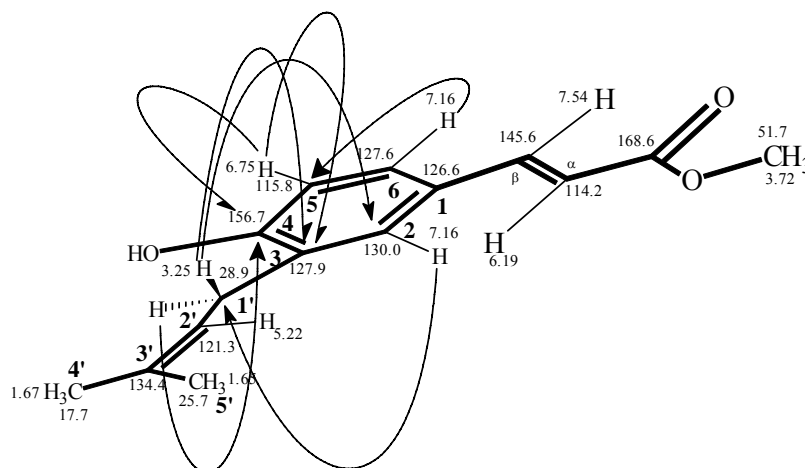


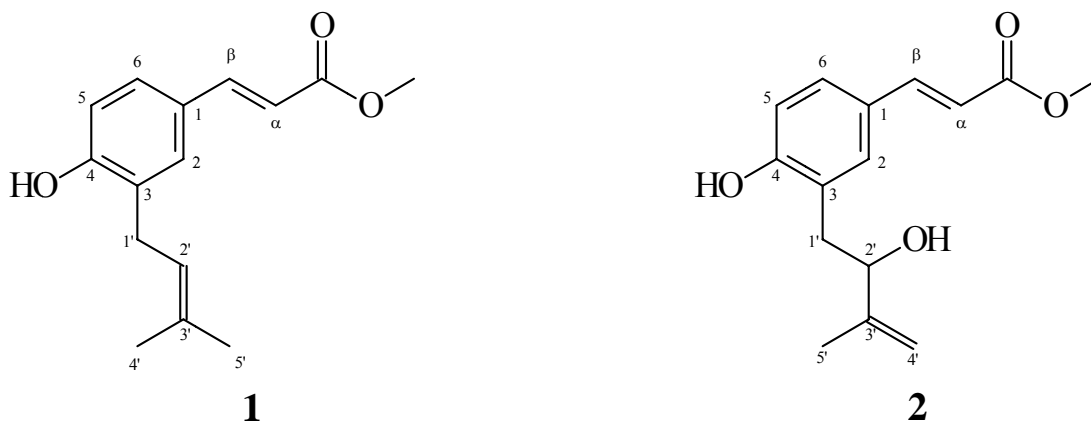
Fig. 10 XHLR correlations for the establishment of the isoprene-benzene link

Corresponde ahora encontrar el punto de anclaje para la unidad isoprenica en el anillo benceno de la molécula **1**. Esto proviene del establecimiento de acoplamiento de larga distancia heteronucleares entre el anillo bencénico y los átomos del isopreno. Es obvio que la unidad isopreno conecta su metileno con un carbono cuaternario aromático. Luego el establecimiento a ser definido corresponde a conectividades H-C o C-H para los grupos metileno o metino y el cuaternario del anillo bencénico, además de eventuales correlaciones para el metileno o metino y átomos vecinos en el anillo bencénico. Por lo tanto observamos un primer acoplamiento de los protones de metileno (δ 3.25) y el carbono cuaternario aromático a 156.7, este último del anillo bencénico. Este carbono ya ha sido definido como soportando un grupo oxidrilo como sustituyente. También encontramos un acoplamiento del cuaternario aromático a δ 127.6 soportando la porción isopreno. La correlación determinante aparece como un pico cruzado correlacionando los protones del metileno de isopreno a un carbono metino at δ 130.0. Este metino fue uno de los protones *ortho* en relación al carbono soportando la cadena lateral acrilato de metilo. Cuando se analizó arriba la conectividad para estas dos porciones estructurales (el anillo benceno y el acrilato de metilo, Fig. 8 y Fig. 9) no pudimos asignar con certitud cual protón era cual. Ahora gracias a la mencionada correlación para el metileno del isopreno, podemos atribuir a H-2 / C-2, las señales δ 7.16 / 130.0. Notemos la ausencia de un pico-2D para un eventual acoplamiento XHLR entre los protones de metileno y el carbono de lo que llamamos posición 6. Consecuentemente la posición *meta* respecto a C-1 es así ocupada por la cadena lateral isoprenica y en consecuencia el grupo OH substituye en la posición *para*. Ubicando los sustituyentes en las otras posiciones (OH-*meta*, y C₅H₉-

para) da lugar a no encontrar picos cruzados para conectar los protones metileno a cualquier posición : 6 o 2. Estas definiciones estructurales completan la elucidación estructural de **1**. Estas conectividades se muestran en la Fig. 10, que además grafica las ya mencionadas correlaciones de H-6 y los carbonos δ 156.7 y 127.6. El compuesto **1** es conocido como plicatin B or 3-[4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-methyl ester, conocido también como methyl 3-(4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl)-2-propenoate [12]. Esta estructura corresponde a una fórmula molecular $C_{15}O_3H_{18}$, con su correspondiente peso molecular 246 uma.

Compound **2** was identified as plicatin A or methyl 4-hydroxy-3-(2'-hydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)-phenyl-*trans*- α -propenoate [13] after recording and analyzing the proton and carbon 13 spectra as well as the DEPT 135, HHCOSY, HMQC, HMBC, EIMS and IR spectra. An explicit and detailed structural study of plicatin A will be offered in a separate paper by the authors in the future.

El compuesto **2** fue identificado como plicatin A o methyl 4-hydroxy-3-(2'-hydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)-phenyl-*trans*- α -propenoate [13] después de realizar y analizar los espectros de proton carbono 13 además de DEPT 135, HHCOSY, HMQC, HMBC, EIMS e IR. Un explícito y detallado estudio estructural de plicatin A sera ofrecido en otro artículo por los autores en el futuro.



The structural difference between both compounds is the OH group placed in an allylic position in the isoprene moiety, which is present in **2** and absent in **1**. This feature conducted to the isolation of **1** prior to **2** in the normal phase chromatography processes.

La diferencia estructural entre ambos compuestos es el sustituyente OH en posición alílica en el grupo isopreníco presente en **2** y ausente en **1**. Esta característica hizo que el primer compuesto separado por cromatografía de fase normal fuera el **1**.

Biological activities results

The following biological activities results have been extracted from V. Camacho's thesis dissertation [14]

Tabla N° 17: Resultados Obtenidos en el ensayo de *Artemia salina* aplicados a los compuestos VC-WD-1 y VC-WD-3

COMPUESTO	Mortalidad a las 24 hrs por concentración				DL ₅₀ ppm
	55 ppm	27,5 ppm	11 ppm	1,1 ppm	
VC-WD-1	30/30	29/30	27/30	16/30	0,96 +/- 0,17
VC-WD-3	30/30	29/30	27/30	16/30	0,96 +/- 0,17

Tabla N° 18: Pruebas Biológicas de los compuestos VC-WD-1 y VC-WD-3 respecto a su actividad antibacteriana gram positiva

compuesto	tipo de bacteria							
	<i>Staphylococo aureus</i> ATCC N° 25923			<i>Staphy lococo epider midis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC N° 6633			<i>Strepto cocos viridans</i>
	3,0 mg	1,0 mg	0,5 mg	3,0 mg	3,0 mg	1,0 mg	0,5 mg	3,0 mg
VC-WD-1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
VC-WD-3	*	(+)	*	*	*	(+)	*	*

*Prueba no realizada

Tabla N° 19: Pruebas Biológicas de los compuestos VC-WD-1 y VC-WD-3 respecto a su actividad antibacteriana gram negativa y contra el hongo *Neurospora crassa*

compuest o	tipo de bacteria			Hongo
	<i>Escherichia coli</i> ATCC N° 8739			<i>Neurospora crassa</i>
	3,0 mg	1,0 mg	0,5 mg	0,5 mg
VC-WD-1	(-)	(-)	(-)	(+)
VC-WD-3	*	(-)	*	(+)

*Prueba no realizada

Tabla N° 20: Actividad de la Gentamicina en el análisis de difusión contra las bacterias gram positivas *Staphylococo aureus* y *Bacillus subtilis*

masa de Gentamicina (µg)	halo de inhibición del crecimiento de bacterias (mm)	
	<i>Staphylococo aureus</i> ATCC N° 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC N° 6633
20	24	26

Tabla N° 21: Actividad del compuesto VC-WD-1 a distintas concentraciones contra las bacterias gram positivas *Staphylococo aureus* y *Bacillus subtilis*

masa del compuesto VC-WD-1 (µg)	halo de inhibición del crecimiento de bacterias (mm)	
	<i>Staphylococo aureus</i> ATCC N° 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC N° 6633
500	19	20
400	18	20
300	19	20
200	15	17
100	15	17
50	14	16
40	13	17
30	12	16
20	(-)	14
10	(-)	(-)

SECCION EXPERIMENTAL

General

Melting points measured in a Electrothermal IA6301 fusiometer. NMR spectra in Bruker 250 and 500 MHz, and 62.9 and 75.4 MHz. 2DNMR experiments run with microprograms Bruker. IR spectra in Beckman IR 10 (KCl)

Plant Material

Five kg of fresh plant were collected at the Huayna Potosí piedmont, Milluni region La Paz department at 4960 meters over sea level. A voucher specimen is deposited a Herbario Nacional de Bolivia under the code VCM-1.

Extraction and isolation of compounds

Five L of petrol ether (fr 20-60°) was applied twice in maceration at room temp. to 1 kg of dried and pulverized plant. Two times subsequently an ethanolic extraction over the defatted vegetal material gave rise to the dry ethanol extract (130 g) that was dissolved in ethyl acetate (5X100 mL). The ethyl acetate soluble fraction was decanted and concentrated at reduced pressure to give rise to the AcOEt extract (88 g). This extract was submitted to a chromatographic separation process in silica gel normal phase. A first normal phase silica gel LC column in CHCl₃/AcOEt/C₆H₆ (5/3/3) afforded 4 major fractions F1 (1 g), F2 (24 g), F3 (28 g) and F4 (20 g). F1 was discarded. F2 was submitted to a silica gel LC column with CHCl₃/AcOEt (9/1) giving rise to fraction F2(2), F2(7) and F2(12). Fraction F2(2), 21 g, was applied to a silica gel LC column in AcOEt/C₆H₆ (1/10) being the fractions F2(2(1 3 23 31)) obtained. Fraction F2(2(3)), 16 g, was chromatographed in a LC column, CHCl₃/AcOEt (10/3) affording fractions F2(2(3(1 2 4 5 9 11 13))). Fraction F2(2(3(4))), 9 g was separated in LCC with CHCl₃ and F2(2(3(4(1 2 4 8 13))) being obtained. Out from fraction F2(2(3(4(4))) white needle crystals appeared which recrystallized in petrol ether (20-40°) furnished compound **1**. F3 after a LCC under CH₂Cl₂/Petrol ether (1/1) gave rise to fractions F3(1 12 32 42 68). Fraction F3(12) was submitted to a VLC under petrol ether and AcOEt in increasing amounts of 10% each giving rise to F3(12(1 7 14 E)). F3(12(E)) is the last fraction eluted with ethanol. Fraction F3(12(7)) concentrated under reduced pressure gave rise to appearing crystals that after an IR spectrum demonstrated to be compound **1** that added to those previously isolated weighed 1,2 g. Fraction F3(12(14)) was applied to a VLC

system and treated under petrol ether and AcOEt in increasing amounts of 10% each giving rise to F3(12(14(1 8 11 13 16). Fraction F3(12(14(11) after concentration exhibited a crystals component. These were applied over a preparative TLC under AcOEt/Petrol ether/MeOH (5/10/1) from which the fringe at Rf 0.5 after crystallization was Compound 2 (30 mg).

Compound 1, plicatin B

White needle crystals; m.p. uncorr. 88-89 °C; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KCl}} \text{ cm}^{-1}$: 3270, 3070, 3050, 2985, 2970, 2940, 1685, 1640, 1600, 1510, 1445, 1375, 1245, 1215, 985, 825; $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 1.65 (3H, s, H-5'), δ 1.67 (3H, s, H-4'), δ 3.25 (2H, d, H-1'), δ 3.72 (3H, s, OCH_3), δ 5.22 (1H, m, H-2'), δ 6.19 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- α), δ 6.75 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-5), δ 7.16 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6), δ 7.16 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-2), δ 7.54 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- β); $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): δ 17.7 (q, C-4'), δ 25.7 (q, C-5'), δ 28.9 (t, C-1'), δ 51.7 (q, OCH_3), δ 114.2 (d, C- α), δ 115.8 (d, C-5), δ 121.3 (d, C-2'), δ 126.6 (s, C-1), δ 127.6 (d, C-6), δ 127.9 (s, C-1), δ 130.0 (d, C-2), δ 134.4 (s, C-3'), δ 145.6 (d, C- β), δ 156.7 (s, C-4), δ 168.6 (s, C=O).

Compound 2, plicatin A

Small flat colorless crystals; m.p. uncorr. 131-133 °C; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KCl}} \text{ cm}^{-1}$: 3500, 3210, 3030, 3015, 2990, 2975, 1705, 1650, 1615, 1450, 1380, 1260, 1190, 1125, 985, 905, 835; EIMS m/z (rel. int.): 262 ($[\text{M}]^+$, 20), 229 (35), 213 (9), 192 (70), 160 (100), 132 (40), 151 (3), 103 (15), 77 (30), 71 (40). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 1.88 (3H, s, H-5'), δ 2.77 (1H, dd, $J = 14$ and 8 Hz, H-1'a), δ 2.90 (1H, d, $J = 14$ and 5 Hz H-1'b), δ 3.74 (3H, s, OCH_3), δ 4.34 (1H, dd, $J = 8$ and 5 Hz, H-2'), δ 4.76 (1H, d, $J = 18$ Hz, H-4'a), δ 4.86 (1H, d, $J = 18$ Hz, H-4'b), δ 6.30 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- α), δ 6.78 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-5), δ 7.30 (1H, d, $J = 8$ and 2 Hz, H-6), δ 7.34 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-2), δ 7.58 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- β); $^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 19.0 (q, C-5'), δ 39.0 (t, C-1'), δ 52.9 (q, OCH_3), δ 77.3 (d, C-2'), δ 112.1 (t, C-4'), δ 115.6 (d, C- α), δ 117.6 (d, C-5), δ 127.9 (s, C-3), δ 128.5 (s, C-1), δ 130.1 (d, C-6), δ 133.8 (d, C-2), δ 147.7 (d, C- β), δ 149.6 (s, C-3'), δ 160.5 (s, C-4), δ 170.7 (s, C=O).

In vitro antibacterial assay

The culture of microorganisms was performed in tubes with 3 mL of tryptic soy broth medium (30 g/L) at 37 °C for 18 h. Compounds were dissolved in a mixture of DMSO and water (1:1) to obtain final concentrations of 30 and 10 $\mu\text{g/mL}$. Petri dishes were prepared with 20 mL of tryptic soy broth medium (40 g/L) inoculated with 0.1 mL of test organisms (1 500 000 bacteria/mL). In all test plates, holes ($\varnothing = 8$ mm) were made and filled with 0.1 mL of solution of compound. Plates were incubated at 37 °C for 18 h. Diameters of inhibition were measured.

In vitro toxicity assay [15]

Artemia salina cultures were incubated in salted water (38g/L of sea salt) during 48 hours at 20-22 °C. Once incubation was over, one proceeds to the addition of 10 nauplii in a 5 mL cube each with 55, 27.5, 11 and 1.1 ppm of analytes. Final solutions are diluted in sea water as prepared above, each was done three times fulfilling a 30 shrimps total. For each concentration of each compound to analyze. Shrimps stayed in contact for 24 hours. At the end the all dead shrimps were counted off.

RECONOCIMIENTOS

The Following people and institutions are acknowledged for their contribution to the present work: Prof Esther Valenzuela from Herbario Nacional de Bolivia for botanical taxonomic work. Profs. Jaume Bastida and Carles Codina from Universitat de Barcelona for NMR 500 MHz spectra. Tec. Patricia Velasco from Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas UMSA for biological assays. Dr. Michel Sauvain from IRD and French government for the donation of the 250 MHz NMR spectrometer at UMSA. / *Se agradece a las siguientes personas e instituciones por su contribución al presente trabajo: Prof Esther Valenzuela del Herbario Nacional de Bolivia por el trabajo de identificación taxonómico. Profs. Jaume Bastida y Carles Codina de la Universitat de Barcelona por los espectros de RMN de 500 MHz. Tec. Patricia Velasco del Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas UMSA por los ensayos biológicos. Dr. Michel Sauvain del IRD y el gobierno Francés, por la donación del espectrómetro de RMN 250 MHz a la UMSA.*

REFERENCIAS

1. LOCK SING, O., R.,
Diversidad Química del Género Werneria, Rev. Soc. Quím. Perú v.72 n.1 Lima ene./mar. 2006
2. CABRERA, A., L.
Las Especies Argentinas del Género Werneria (Compositae), In: Notas del Museo de La Plata, Tomo XIII, Botánica, N°60, Instituto del Museo de la Universidad Nacional de La Plata, República Argentina, 27 de julio 1948. pp 49-61.
3. CABRERA, A., L.
Flora de la Provincia de Jujuy (República Argentina), In: Angel L. Cabrera Editor, parte X, Compositae, Colección Científica INTA, Tomo XIII, Buenos Aires, Argentina, 1978, 725 pag.
4. GIRAULT, L.
Kallawaya. Guérisseurs itinérants des Andes, Recherche sur les pratiques médicinales et magiques, Paris: IRD Editions; 1984; 670 pag.
5. BASTIEN, J.
Las especies medicinales de los Kallawayas, Edición del Proyecto Concern/Bolivia, 1973, 150 pag.
6. ZARDINI, E., M.
Etnobotánica de Compuestas Argentinas con Especial Referencia a su Uso Farmacológico, Parte II, Acta Farmacéutica Bonaerense, Vol. 3, N°2, Julio Diciembre 1984, 169.
7. ROCKHAUSEN, M.
Verwandschaft und gliederung der compositen-Gattung Werneria, Bot. Jahrb., Vol. 70, 1940, 248-342.
8. BONILLA *et al.*
Contribución al estudio químico biológico de la Werneria dactylophylla, Rev. Soc. Quím. Perú, 57, 182-188, 1991
9. DE TOMMASI, N., AQUINO, R., DE SIMONE, F., PIACENTE, S., PIZZA, C.
Diterpenes from Werneria dactylophylla, Phytochemistry, Vol. 31, 1042-1043, 1992
10. PRETSCH, E., SIMON, W., SEIBL, J., CLERC, T.
Tables of Spectral Data for Structural Determination of Organic Compounds, 13C-NMR, 1H-NMR, IR, MS, UV/VIS, 2nd Edition, Chemical Laboratory Practice. Edited by Fresenius, W., Huber, J., F., K., Pungor, E., Rechnitz, G.A., Simon, W., West, T., H. Springer-Verlag, Berlin, Heilderberg, 1989
11. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C.
Spectrometric Identification of Organic Compounds, Fifth edition, 1990, John Wiley and Sons Inc. New York, 177-178.
12. SCHMITT, A., TELIKEPALLI, H., MITSCHER, L.
Plicatin B, the antimicrobial principle of Psoralea juncea, Phytochemistry, Vol. 30, 1991, 3569-3570
13. RASOOL, N., HHAN, A., MALIK, A.
Plicatin A and B two phenolic cinnamates from Psoralea plicata, Phytochemistry, Vol. 29, 1990, 3979-3981.
14. CAMACHO, V.
Aislamiento, Purificación e Identificación de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios de Werneria dactylophylla Sch. Bip., Tesis para optar al Título de Licenciado en Ciencias Químicas, Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia 1995, 65-70.
15. ANDERSON, J. E., GOETZ, C. M., MCLAUGHLIN, J. L., SUFFNESS, M.
A Blind Comparison of Simple Benchtop Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens, Phytochemical Analysis, Vol. 2, 1991, 107-111, John Wiley & Sons.