

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Metabolômica e *screening* de interações ecoquímicas de plantas da subtribo *Lychnophorinae* (*Asteraceae*)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto

Orientando: Maria Elvira Poleti Martucci

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica em 01/02/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

RESUMO

Martucci, M. E. P. **Metabolômica e *screening* de interações ecoquímicas de plantas da subtribo Lychnophorinae (Asteraceae)**. 2016. 155f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A subtribo Lychnophorinae ocorre na região do Cerrado do Brasil e contém cerca de 120 espécies. Recentemente, a filogenia da subtribo Lychnophorinae, baseada em sequências de DNA e dados morfológicos foi capaz de fornecer novas informações sobre a subtribo e seus gêneros. Além disso, o Cerrado brasileiro possivelmente abriga uma parcela considerável da entomofauna neotropical. Os objetivos gerais deste projeto de pesquisa são obter perfis metabólicos de plantas da subtribo Lychnophorinae e utilizá-los como ferramenta quimiotaxonômica para auxiliar na resolução da classificação taxonômica dessa subtribo e ainda, obter perfis metabólicos de insetos que se alimentem dessas plantas, visando a identificação de possíveis interações inseto-planta. Foram analisadas 78 espécies de plantas por GC-MS e UHPLC-UV(DAD)-MS(ESI-Orbitrap) nos modos positivo e negativo de ionização. As coletas de insetos foram feitas em intervalos trimestrais e, em seguida, esses insetos foram analisados utilizando a mesma metodologia analítica das plantas. As “impressões digitais” metabólicas das plantas e dos insetos foram processadas no *MetAlign*TM e no MSClust, e as matrizes geradas foram submetidas a análises multivariadas no SIMCA. As plantas foram submetidas a análise de componentes principais (PCA), análise de cluster hierárquico (HCA) e análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA), entretanto os insetos, juntamente com suas plantas hospedeiras, foram analisados por PCA com o intuito de determinar a correlação entre seus metabólitos secundários. Os resultados das análises metabolômicas apresentaram proximidade com a filogenia principalmente para os dois maiores gêneros, *Eremanthus* e *Lychnophora*, analisados separadamente. Portanto, os resultados sugerem que os dados gerados a partir das análises metabolômicas podem ser utilizados em estudos quimiotaxonômicos da subtribo Lychnophorinae, sobretudo como dados primários para a reconstrução filogenética de gêneros. No que diz respeito às análises de possíveis interações inseto-planta, foi possível observar que alguns espécimens apresentaram correlação significativa com as plantas hospedeiras, evidenciando que a abordagem metabolômica pode ser utilizada como ferramenta na investigação de interações inseto-planta. Nestas amostras, pôde-se observar a presença de triterpenos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas adquiridas nas plantas por meio da herbivoria.

Palavras-chave: Asteraceae, Lychnophorinae, metabolômica, LC-MS, GC-MS, espectrometria de massas, interações inseto-planta.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Asteraceae

A família Asteraceae possui cerca de 1700 gêneros e mais de 24.000 espécies (BREMER, 1994; MAGENTA, 2006), representando cerca de 10% da flora mundial. Atualmente, são reconhecidas 22 subfamílias e 43 tribos (FUNK et al., 2009). Esta família também apresenta plantas de hábito extremamente variado, distribuídas em quase todos os continentes, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (BREMER, 1994). Diversas espécies da família Asteraceae se destacam pelo uso popular devido às propriedades anti-inflamatórias, como a arnica (espécies do gênero *Lychnophora*) (SEMIR et al., 2011) e também devido ao uso alimentício, como o girassol (*Helianthus annuus* L.) (BOSCOLO e VALLE, 2008) e o alface (*Lactuca sativa* L.) (ARARUNA e CARLOS, 2010).

Diversos estudos têm mostrado que plantas da família Asteraceae constituem um recurso alimentar importante para uma fauna de inseto extremamente diversificada em muitos biomas (ALMEIDA-NETO et al., 2011). Do ponto de vista fitoquímico, esta família caracteriza-se pela elevada capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, principalmente poliacetilenos, flavonoides, cumarinas e terpenoides (ZDERO; BOHLMANN, 1990).

Como o objeto de estudo do presente trabalho é a subtribo Lychnophorinae, pertencente à tribo Vernonieae, algumas considerações a respeito desta tribo são necessárias.

1.2. Tribo Vernonieae

A tribo Vernonieae, pertencente à família Asteraceae, apresenta possíveis correlações entre dados químicos e classificação ou geografia relatados por Jones (1977), Harborne e Williams (1977) e Robinson et al. (1980a). Além disso, um extenso estudo sobre metabólitos secundários foi realizado por Bohlmann e Jakupovic (1990).

Atualmente, a tribo Vernonieae apresenta cerca de 1100 espécies e 129 gêneros e ainda, é pouco compreendida do ponto de vista taxonômico (FUNK et al., 2005). Diversos caracteres tradicionais, tais como folhas alternadas e lóbulos longos da corola; o número de cromossomos, determinado por Jones (1974, 1979) e Keeley (1978) e, por fim, os metabólitos secundários identificados por Bohlmann e Jakupovic (1990) foram utilizados na classificação proposta por Robinson (1999).

As diferenças em lactonas sesquiterpênicas e flavonoides entre as espécies americanas e paleotropicals foram mencionadas por Jones (1977) e Harborne e Williams (1977). As flavonas e flavonóis têm sido descritos em quase todas as espécies estudadas (HARBORNE; WILLIAMS, 1977; BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990).

As lactonas sesquiterpênicas também são amplamente distribuídas nesta tribo, com destaque para os germacranolidos e também outros tipos altamente oxigenados e elemanolidos, assim como guaianolidos simples (BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990; SEAMAN, 1982). Os furanoeliangolidos apresentam distribuição significativa nas subtibos Lychnophorinae, Centratherinae e Sipolisiinae. No entanto, são ausentes em Vernoniinae e

Piptocarphinae. Por outro lado, as subtribos Vernoniinae, Piptocarphinae, Rolandrinae apresentam glaucólidos e lactonas sesquiterpênicas relacionadas, tais como hirsutinólidos (ROBINSON, 1999).

1.3. Subtribo Lychnophorinae

De acordo com Robinson (1999), a subtribo Lychnophorinae é praticamente restrita ao Brasil e os gêneros reconhecidos nesta subtribo são *Chronopappus*, *Eremanthus* (*Sphaerophora*, *Paralychnophora* MacLeish, *Vanillosmopsis*), *Lychnophora* (*Haplostephium* Mart. ex DC.), *Lychnophoropsis* (*Episcothamnus* H. Rob.), *Prestelia*, *Anteremanthus*, *Minasia*, *Piptolepis*, *Proteopsis*.

Lychnophora foi o primeiro gênero endêmico do Cerrado publicado por Martius (1822) (COILE; JONES, 1981), seguido dos gêneros *Eremanthus* (LESSING, 1829), *Chronopappus*, *Haplostephium* (CANDOLLE, 1836), *Lychnophoriopsis*, *Piptolepis*, *Prestelia* e *Vanillosmopsis* (SCHULTZ-BIPONTINUS, 1861, 1863, 1864), relacionados à *Lychnophora*.

A maior parte destes gêneros foi colocada na subtribo Lychnophorinae (BENTHAM, 1873), caracterizada pela presença de sincefalia. Esta caracterização foi alterada por Robinson et al. (1980b) pela inclusão de gêneros com capítulos separados na subtribo e exclusão dos gêneros *Elephantopus*, *Rolandra*, *Spiracantha* e *Telmatophila* com sincefalia. A circunscrição da subtribo Lychnophorinae foi subsequentemente alterada novamente por Robinson (1992, 1999, 2007) por meio da transferência de

espécies herbáceas para a subtribo Chrestinae e por meio da descrição dos gêneros *Anteremanthus* e *Minasia*.

Recentemente, a filogenia da subtribo Lychnophorinae, baseada em sequências de DNA e dados morfológicos, foi capaz de fornecer novas informações a respeito da subtribo principalmente por sugerir que os gêneros *Albertinia*, *Blanchetia*, *Centratherum* e *Gorceixia*, pertencentes à subtribo Sipolisiinae, são bastante próximos de outros membros da subtribo Lychnophorinae e, portanto, melhor localizados nesta subtribo (LOEUILLE et al., 2015a; LOEUILLE et al., 2015b).

Atualmente, a subtribo Lychnophorinae apresenta 18 gêneros e aproximadamente 100 espécies restritos ao domínio do Cerrado, ocorrendo principalmente nos campos rupestres. É importante observar que a alta proporção de gêneros monotípicos (42%) reflete o baixo conhecimento das relações entre as espécies da subtribo (LOEUILLE et al., 2015b).

Além disso, os limites dos gêneros *Eremanthus* e *Lychnophora* são controversos, sobretudo devido ao fato de espécies, previamente incluídas em *Eremanthus* e *Lychnophora* terem sido reconhecidas como gênero, como é o caso dos gêneros *Haplostephium* (COILE; JONES, 1983), *Lychnophoriopsis* (ROBINSON, 1982) e *Paralychnophora* (MACLEISH, 1984, LOEUILLE et al., 2012). As espécies *Anteremanthus hatschbachii*, *Eremanthus leucodendron*, *E. mollis*, *E. pabstii*, *E. veadeiroensis* e *Lychnophora crispa* foram classificadas na subtribo Vernoniinae por MacLeish (1984), mas mantidas em Lychnophorinae por Robinson (1999). Ademais, muitas espécies de *Eremanthus*, *Lychnophora* e *Piptolepis* apresentam posições incertas nos seus respectivos gêneros (COILE; JONES, 1981).

Os gêneros *Eremanthus* e *Lychnophora*, os maiores da subtribo, foram atribuídos por Fiaschi e Pirani (2009) como essenciais para a melhor compreensão da flora endêmica do Cerrado, o qual apresenta altos níveis de endemismo e diversidade (JOLY, 1970). De acordo com Almeida-Neto et al. (2011), este bioma pode abrigar parcela considerável da entomofauna neotropical, deixando evidente a necessidade de novos estudos com intuito de avaliar as prováveis interações inseto-plantas presentes no Cerrado.

Do ponto de vista fitoquímicos, as espécies pertencentes à subtribo Lychnophorinae apresentam LSTs do tipo guaianolido e germacranolido. Este último é subdividido em germacrolidos, heliangolidos, furanoheliangolidos e eremantolidos, além de outros subgrupos menos representados (Figura 1) (ROBINSON, 1980; BOHLMANN et al. 1980a; BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990). Enquanto que germacranolidos do tipo glaucolidos, comuns em outros membros da tribo Vernonieae, são ausentes na subtribo (ROBINSON, 1999).

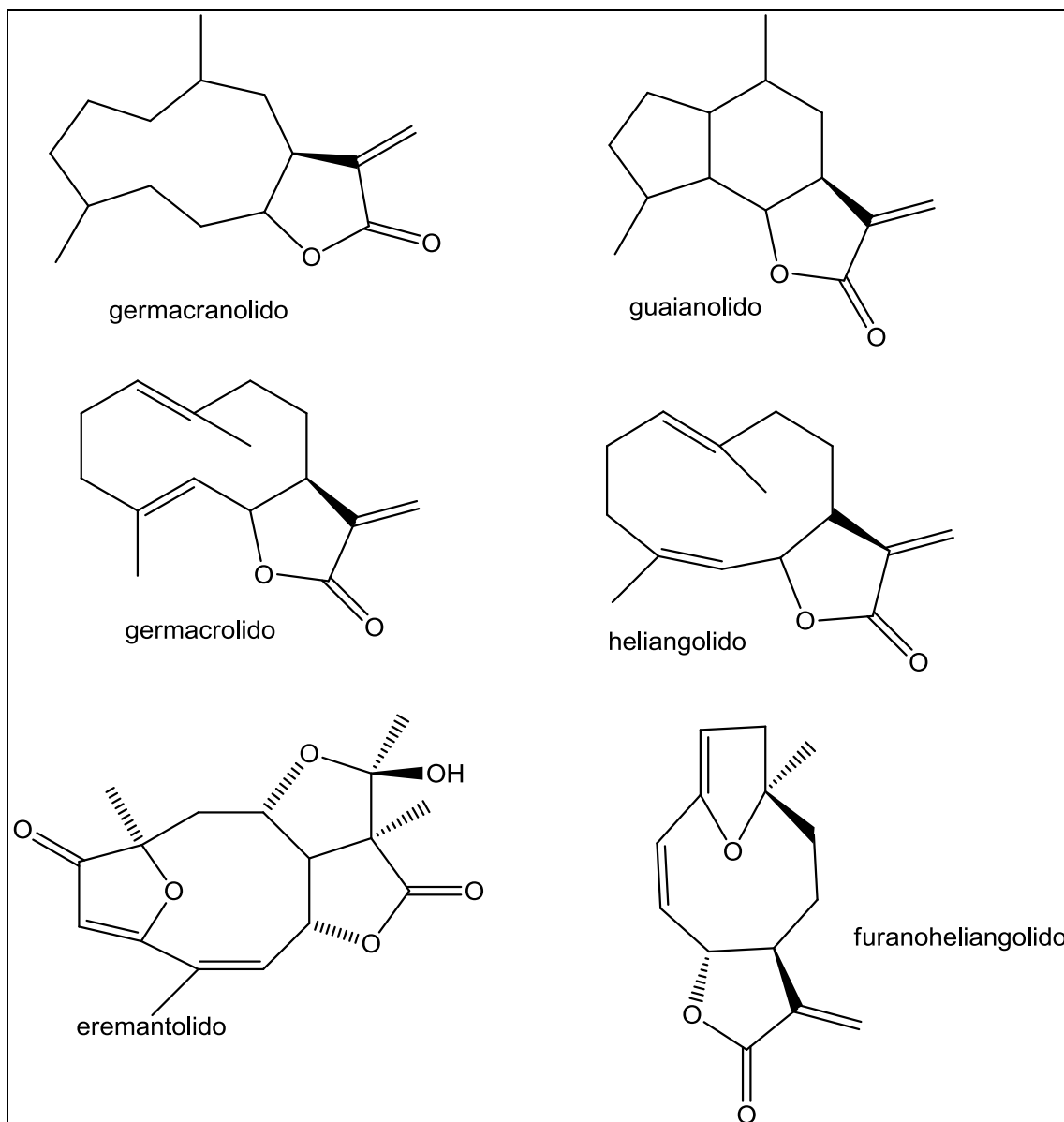


Figura 1 – Estruturas químicas dos esqueletos carbônicos básicos dos tipos de lactonas sesquiterpênicas presentes na subtribo Lychnophorinae

Segundo Loeuille et al., (2015a), os heliangolidos ocorrem na subtribo Lychnophorinae como sinapomorfia. Porém, poucas espécies desta subtribo foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico, como pode ser observado no levantamento feito a partir de relatos presentes na literatura (Apêndice I). Assim, é importante ressaltar, que estudos quimiotaxonômicos com base nas

análises metabolômicas obtidas a partir dos perfis metabólicos de plantas da subtribo Lychnophorinae podem ser promissores para o esclarecimento taxonômico das espécies pertencentes a esta subtribo.

1.4. Interações inseto-planta

O consumo de plantas pelos herbívoros representa uma das principais interações ecológicas existentes e, provavelmente, desempenha um papel importante na diversificação das espécies de plantas e de suas características (AGRAWAL et al., 2015). A coevolução entre insetos e plantas foi primeiramente descrita por Erlich e Raven (1964), mostrando que os fenótipos e interações conhecidos atualmente são reflexos de uma longa história evolutiva entre organismos e suas adaptações recíprocas (BRUCE et al., 2015).

A evolução das interações inseto-planta, em parte, é regida pela natureza recíproca dessas relações e também pela complexidade destas comunidades. Ou seja, os herbívoros impõem uma seleção natural capaz de favorecer genótipos de plantas resistentes e direcionam a diversificação das espécies de plantas (HARE, 2015).

De acordo com Agrawal et al. (2015), a dinâmica evolutiva das espécies de plantas podem ser influenciadas pela seleção direta das características capazes de causar resistência aos herbívoros, ou pela seleção indireta de características capazes de influenciar a habilidade competitiva. Enquanto insetos fitófagos têm desenvolvido mecanismos para explorar suas plantas

hospedeiras, simultaneamente, as plantas têm desenvolvido mecanismos de defesa para sobreviver aos ataques dos herbívoros (BRUCE et al., 2015).

Portanto, grande parte da diversidade dos metabólitos secundários encontrados nas plantas é atribuída à interação destas com herbívoros (BANCHIO et al., 2005). Esses metabólitos podem apresentar diversos mecanismos de defesa contra herbívoros, tais como rompimento de membrana, inibição de transporte ou sinal de transdução, alterações metabólicas e até rompimento do controle hormonal de processos de desenvolvimento (GATEHOUSE, 2002). Essas defesas podem ser diretas, tornando a planta mais resistente à herbivoria, por meio da alteração da palatabilidade e aumento da toxicidade, ou indireta, facilitando o controle das populações de herbívoros com o auxílio de patógenos, predadores ou parasitas (BAKKALI et al., 2008).

As defesas químicas podem ser constitutivas ou induzidas após o ataque. Na maioria das vezes, a via do ácido salicílico encontra-se associada à defesa contra patógenos, enquanto que a via do ácido jasmônico encontra-se associada à defesa contra herbívoros (BRUCE et al., 2015). No entanto, alguns estudos têm mostrado que ambas as vias podem estar envolvidas em diferentes interações com patógenos e predadores, dependendo das espécies envolvidas (DIEZEL et al., 2009).

Por outro lado, alguns herbívoros têm desenvolvido mecanismos para sobreviver às defesas das plantas. Tais herbívoros podem (1) evitar as defesas da planta, alimentando-se apenas das partes da planta que contêm quantidades mínimas dos metabólitos; (2) desenvolver mecanismos para estes aleloquímicos e permitir uma excreção mais rápida das toxinas; (3) destoxificar

os metabólitos vegetais com a ajuda de microrganismos endossimbióticos ou por meio de adaptações nas vias metabólicas, tais como no citocromo P450 que se tornam capazes de metabolizar as defesas das plantas; (4) tolerar os metabólitos; (5) e, ainda, insetos especialistas podem acumular, concentrar ou modificar esses metabólitos para o seu próprio benefício, na defesa contra seus predadores no terceiro nível trófico (BRUCE et al., 2015; OPITZ; MÜLLER, 2009). Neste último caso, os metabólitos secundários são captados e armazenados em partes específicas do corpo dos herbívoros (OPITZ; MÜLLER, 2009). A captação, o depósito e a concentração desses metabólitos em tecidos ou células especializadas pelos insetos têm sido chamados de sequestro (DUFFEY, 1980).

Os insetos generalistas são capazes de se alimentar de várias espécies de plantas. Apesar disso, a maioria dos insetos fitófagos é altamente especializada em poucas, ou até mesmo, em uma única espécie de planta hospedeira (WAHLBERG, 2001), por isso, estes insetos especialistas são adaptados às defesas químicas das plantas hospedeiras. Esta adaptação às defesas químicas não exclui a possibilidade destes insetos de apresentarem crescimento reduzido na presença de dietas contendo altos níveis de substâncias de defesa (AGRAWAL e KURASHIGE, 2003).

De acordo com Widarto et al. (2006), as plantas podem responder especificamente a herbívoros da mesma espécie que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento. Entretanto, as interações entre herbívoros especialistas e os metabólitos secundários das plantas hospedeiras ainda são pouco compreendidas (KIRK et al., 2012). Portanto, fica evidente a necessidade de estudos de ecologia química envolvendo plantas e seus

insetos herbívoros associados. Nesses estudos, a baixa biomassa final de insetos e a baixa concentração de metabólitos ativos dificultam o isolamento de metabólitos, assim é importante a identificação diretamente no extrato por uma técnica analítica sensível, tal qual na abordagem metabolômica (JANSEN et al., 2009).

Na entomologia, as técnicas utilizadas em metabolômica têm sido usadas para revelar informações bioquímicas com o intuito de compreender a fisiologia e o comportamento de insetos, avaliar o desenvolvimento, doenças infecciosas, o efeito de pesticidas, entre outros (SNART et al., 2015). Simultaneamente, as análises metabolômicas têm sido usadas para estudar interações entre dois ou mais níveis tróficos, ou para avaliar a combinação entre fatores abióticos e interações intra e interespecíficas (JONES et al., 2013; SNART et al., 2015).

A metabolômica também pode ser usada em estudos sobre as substâncias químicas envolvidas nas interações de cada indivíduo. Tais substâncias são de suma importância para a comunicação entre insetos e plantas, as quais produzem substâncias específicas quando expostas a herbívoros ou patógenos (JONES et al., 2013). Assim, a abordagem metabolômica tem permitido novas descobertas a respeito do mecanismo de resposta de plantas a herbívoros (JONES et al., 2013).

1.5. Metabolômica

A análise metabolômica constitui uma importante ferramenta para a compreensão da relação entre fenótipo e genótipo (FIEHN, 2002; TIKUNOV et al., 2005), uma vez que o “metaboloma” é o conjunto de metabólitos produzidos pelas células, portanto, consiste no produto final da expressão gênica, capaz de definir o fenótipo químico da célula ou tecido em resposta a mudanças ambientais ou genéticas (SUMNER et al., 2003; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Apesar disso, atualmente, não existe um método capaz de analisar o metaboloma completo, principalmente o metaboloma vegetal, formado por uma grande variedade de substâncias químicas e produtos naturais complexos (NIELSEN; OLIVER, 2005; VILLAS-BÔAS et al., 2005)

Por outro lado, estudos abrangendo partes específicas do metaboloma de plantas têm sido realizados por meio de preparo de amostras e extrações eficientes, em conjunto com técnicas analíticas, e compreendendo diversas etapas; entre as quais podemos citar: (1) obtenção das impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*), que visa determinar diferenças metabólicas entre as amostras, por meio de ferramentas estatísticas que estabelecem as diferenças existentes entre as amostras; e, (2) obtenção de perfis metabólicos (*metabolite profiling*), que tem como objetivo a identificação e em alguns casos, a quantificação dos metabólitos responsáveis pelas diferenças entre as amostras (ALLWOOD et al., 2009; BAMBIA; FUKUSAKI, 2006; JANSEN et al., 2009; MORITZ; JOHANSSON, 2008; NORDSTRÖM, 2008). Na abordagem metabolômica, a identificação dos metabólitos é realizada, preferencialmente, por meio da desreplicação, a qual constitui a

rápida caracterização dos constituintes de uma amostra, sem a necessidade de seu isolamento (CROTTI et al., 2006; GOBBO-NETO e LOPES 2008).

As impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*) não podem ser diretamente submetidas a análises metabolômicas comparativas utilizando estratégias convencionais, uma vez que a complexidade do metaboloma das plantas pode causar a coeluição de determinados compostos, provocando uma sobreposição de padrões de fragmentação (BAMBA; FUKUSAKI, 2006; TIKUNOV et al., 2005). Assim, o pré-processamento dos dados tem sido usado para a desconvolução dos cromatogramas, normalização e correção da linha de base, com o intuito de tornar o conjunto de dados obtidos para as amostras passíveis de análise e comparação (LILAND et al., 2011).

As análises metabolômicas comparativas, realizadas com a premissa de analisar eficientemente e extrair informações úteis com relativa rapidez, têm usado a estratégia de *untargeted analysis* e o alinhamento dos perfis metabólicos, baseado nos fragmentos moleculares individuais e sem a necessidade da identificação estrutural (BAMBA; FUKUSAKI, 2006; DE VOS et al., 2007; KOH et al., 2010; LOMMEN, 2009; TIKUNOV et al., 2005; TIKUNOV et al., 2010). Esta abordagem é realizada por diversos softwares, como o *MetAlignTM*.

As matrizes de dados resultantes do alinhamento dos sinais de massas das amostras analisadas podem ser submetidas diretamente às análises comparativas por meio de diversas ferramentas estatísticas. Entretanto, este procedimento, embora usual em análises metabolômicas, apresenta determinadas desvantagens (TIKUNOV et al., 2012). Dentre elas, o fato de que as matrizes, em geral, apresentam razão variável/amostra desproporcional,

uma vez que o número de variáveis é muito grande e a maioria pode ser redundante, devido ao fato de que cada metabólito é representado por diferentes sinais de massas, incluindo fragmentos e adutos (TIKUNOV et al., 2012).

O *MSClustTM* é uma ferramenta computacional que pode ser usada após o alinhamento dos sinais. *MSClustTM* agrupa os sinais correspondentes a íons presentes no espectro de massas em metabólitos reconstruídos, portanto, é capaz de reduzir a redundância das variáveis para cada metabólito, tornando-as representativas e também é capaz de reconstruir o espectro de massas original fornecendo informação estrutural do metabólito (TIKUNOV et al., 2012).

As análises metabolômicas geram uma grande quantidade de dados que devem ser tratados por meio de análises estatísticas. Os espectros de massas apresentam um grande número de variáveis, tais como moléculas protonadas e desprotonadas e fragmentos moleculares. Portanto, é essencial o uso de métodos estatísticos multivariados para a análise destes dados (TRIVEDI; ILES, 2012). Como em dados multivariados, geralmente, o número de variáveis excede o número de observações, os modelos de fatores bilineares são delineados com o intuito de sobrepor problemas dimensionais e obter vantagem a partir da colinearidade dos dados, combinando componentes únicos e pseudo-variáveis na forma de combinação linear dos dados originais (LILAND et al., 2011).

O modelo de fator bilinear mais conhecido é a análise de componentes principais (PCA). O PCA decompõe os dados em vetores de pontuação (*score vectors*) e vetores de carga (*loading vectors*), os quais recriam os dados

originais e mostram informações a respeito da relação entre as variáveis (LILAND et al., 2011; TRIVEDI; ILES, 2012).

Nas análises de componentes principais (PCA), as variáveis são correlacionadas por 2 novas variáveis t1 e t2, as quais explicam a variação representada por cada componente principal, e o gráfico t1 vs. t2 mostra como as observações estão situadas com relação a cada componente e também mostra a possível presença de dados discrepantes (*outliers*), grupos similares e outros padrões nos dados (TRIVEDI; ILES, 2012).

Assim, PCA é uma análise multivariada não supervisionada, baseada apenas nas variáveis explicativas e sem intervenção do usuário, a qual é capaz de identificar grupos de variáveis inter-relacionadas (TRIVEDI; ILES, 2012; TSUGAWA et al., 2011). A correlação observada apresenta variáveis com o objetivo de destacar os componentes principais. O primeiro componente principal (PC1) mostra o fator capaz de explicar a variação máxima no conjunto de dados, criando uma linha por meio das variáveis, enquanto que o PC2 mostra a variação máxima não explicada apenas pelo PC1 e é formado por uma linha perpendicular à primeira linha, no ponto em que se encontra o máximo de variáveis (TRIVEDI; ILES, 2012).

O HCA também é um método não supervisionado, capaz de agrupar as amostras por meio das similaridades entre elas, envolvendo um agrupamento progressivo de acordo com a distância. O resultado do cluster hierárquico pode ser visualizado como um dendograma ou árvore, no qual os comprimentos dos galhos são proporcionais à distância entre os grupos (SUMNER et al., 2003).

Quando existe informação específica da amostra, a análise por mínimos quadrados parciais (PLS) fornece uma decomposição dos dados mais eficiente

e de melhor interpretação. O PLS maximiza a covariância entre as variáveis explicativas (x) e a variável resposta (y) e, assim como no PCA, forma vetores de pontuação (*score vectors*) e vetores de carga (*loading vectors*) (LILAND et al., 2011; TRIVEDI; ILES, 2012).

Além disso, quando o PLS é usado para análises discriminatórias (PLS-DA), a maximização é feita com o intuito de estimar a matriz de covariância entre as classes. O OPLS-DA (análise discriminatória por mínimos quadrados parciais ortogonais) é um método supervisionado introduzido como uma melhoria do método PLS-DA (análises discriminantes por mínimos quadrados parciais) e usado para discriminar duas ou mais classes com o objetivo de determinar como as variáveis afetam a separação entre as classes (WESTERHUIS et al., 2010). A partir desse método de análise, é possível obter o gráfico de importância das variáveis (VIP), capaz de informar a relação entre as variáveis Y e X. O VIP é usado na determinação dos íons capazes de diferenciar as classes nas análises metabolômicas, uma vez que quanto maior o VIP, mais significativo é determinado íon na comparação entre duas ou mais classes (TRIVEDI; ILES, 2012).

A análise por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS) e análise discriminatória por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) são versões do PLS e PLS-DA, respectivamente, que separam as variáveis respostas ortogonais em componentes (x) por meio de rotações no PLS e PLS-DA originais (INDAHL et al., 2007; LILAND et al., 2011). Ambas as versões têm como vantagens a facilidade de interpretação, uma vez que as rotações são benéficas para o gráfico de componentes e suas direções. Assim, estes têm se

tornado popular em análises metabolômicas (LILAND et al., 2011; TRYGG et al., 2002).

5. CONCLUSÕES

A separação das 78 espécies analisadas da subtribo Lychnophorinae com base no PCA (Figura 5) e no HCA (Figura 6) obtida nesse estudo foi semelhante à filogenia baseada em análises de DNA, proposta por Loeuille et al. (2015a). Esta similaridade foi mais evidente ao considerarmos os dois gêneros mais numerosos, *Eremanthus* e *Lychnophora*.

Os resultados obtidos nas análises metabolômicas baseadas em “*untargeted* metabolomics” mostraram que esta abordagem pode ser uma ferramenta promissora para os estudos de quimiotaxonomia, portanto nossos resultados utilizando os dados obtidos nas análises por LC-MS e GC-MS em conjunto podem ser usados na quimiotaxonomia visando à taxonomia da subtribo Lychnophorinae. Utilizando esta metodologia, foi possível identificar os marcadores quimiotaxonômicos responsáveis pelo agrupamento e também pela separação das espécies estudadas, dentre os quais destacam-se flavonoides dos tipo flavona e flavonol e LST dos tipos guaianolido, goyazensolido e eremantolido.

Algumas das espécies estudadas apresentaram correlação com os insetos nelas presentes quando analisadas por GC-MS e LC-MS. As espécies *E. incanus*, *E. erythropappus* e *Lychnophora pinaster* apresentaram correlação com os insetos devido à presença de lupeol e acetato de lupeol identificados por GC-MS e devido à presença de flavonoides e LST, identificados por LC-MS.

Além disso, as plantas que apresentaram correlação significativa com os insetos apresentaram ácido *p*-cumárico (ácido di-*O-p*-cumaroilquínico e ácido

5-*O-p*-cumaroilquínico), o qual pode estar relacionado à presença de flavonoides, provavelmente com ação antioxidante nestes insetos, uma vez que ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) é precursor da síntese de flavonoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. G. C; TAKAHASHI, J. A; DUARTE, L. P. et al. 2011. Evaluation of bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 21: 615-621.

AGRAWAL, A.A.; HASTINGS, A.P.; JOHNSON, M.T.J. et al. 2015. Insect herbivores drive real-time ecological and evolutionary change in plant populations. **Science** 338: 113-116.

AGRAWAL, A. A; KURASHIGE, N. S. 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. **Journal of Chemical Ecology** 29: 1403–1415

ALLWOOD, J.W; GOODACRE, R. 2010. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis** 21: 33-47.

ALMEIDA, V.L.; OLIVEIRA, A.B.; CHIARI, E. et al. 2006. Constituents of *Hololepis pedunculata* leaves and their trypanocidal activity. **Chemistry of Natural Products** 42: 734-735.

ALMEIDA-NETO, M; PRADO, P.I; LEWINSOHN, T.M. 2011. Phytophagous insect fauna tracks host plant responses to exotic grass invasion. **Oecologia** 165: 1051-1062.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C. et al. 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**. 22: 711–728.

ARARUNA, K; CARLOS, B. 2010. Anti-inflammatory activities of triterpene lactones from *Lactuca sativa*. **Phytopharmacology**. 1: 1–6.

ASAKAWA, Y.; TAIRA, Z.; TOYOTA, M. 1981. Sesquiterpene lactones of *Eremanthus incanus* and *Porella japonica*. Crystal structure and stereochemistry of eregoyazidin. **Journal of Organical Chemistry** 46: 4602-4604.

BAKER, P.M.; FORTES, C.C.; FORTES, E.G. et al. 1972. Chemoprophylactic agents in shistosomiasis: eremanthine, custonolide, α -cyclocostunolide and bisabolol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 25: 853-857.

- BAKKALI, F.; AYERBECK, S.; AYERBECK, D; IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 446-475.
- BANCHIO, E.; ZYGADLO, J; VALLADARES, G.R. 2005. Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 6903-6909.
- BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. 2006. Technical problems and practical operations in plant metabolomics. **Journal of Pesticide Science** 31: 300-304.
- BARROS, D.A.D.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W. et al. 1985. Sesquiterpene lactones in the molluscidal extract of *Eremanthus glomerulatus*. **Planta Medica** 38-39.
- BECERRA, J.X. 2007. The impact of plant–herbivore coevolution on plant community structure. **Proceedings of National Academy Sciences**. 104: 7483–7488
- BENTHAM, G. 1873. Compositae. Pp. 163–533 588 in *Genera plantarum*, 2(1), eds G. Bentham e J. D. Hooker, Reeve & Co., London and Williams and Norgate, London.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M et al. 1980a. Sesquiterpene lactones from *Eremanthus* species. **Phytochemistry** 19: 2663-2668.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H. et al 1980b. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry** 19: 2381-2385.
- BOHLMANN, F.; GUPTA, R.K.; JAKUPOVIC, J. et al. 1981a. Three germacranolides and other constituents from *Eremanthus* species. **Phytochemistry** 20: 1609-1612.
- BOHLMANN, F.; MÜLLER, L.; KING, R.M. et al. 1981b. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora* species. **Phytochemistry** 20: 1449-1451.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H. et al 1981c. Germacranolides from *Piptolepis ericoides* and *Vanillosmopsis* species. **Phytochemistry** 20: 731-734.
- BOHLMANN, F.; SINGH, P.; ZDERO, C. et al. 1982a. Furanoheliangolides from two *Eremanthus* species and from *Chresta sphaerocephala*. **Phytochemistry** 21: 1669-1673.

BOHLMANN, F.; WALLMEYER, M.; KING, R.M. et al. 1982b. Germacranolides from *Piptolepis leptospermoides*. **Phytochemistry** 21: 1439-1441.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H. et al. 1982c. Germacranolides from *Lychnophora* species. **Phytochemistry** 21: 1087-1091.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. 1990. Progress in the chemistry of the Vernoniae (Compositae). **Plant Systematics and Ecology** 4(suppl.): 3-43.

BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W. et al. 1998. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 26: 671-676.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. D. S. 2008. **Plantas de uso medicinal em Quissamã , Rio de Janeiro , Brasil**. Iheringia - Série Botânica 63: 263–277.

BREITER, T.; LAUE, C.; KRESSEL, G. et al. 2011. Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. **Food Chemistry**. 128: 338-347.

BREMER, K. 1994. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 752p.

BRUCE, T.J.A. 2015. Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. **Journal of Experimental Botany**. 66: 455-465.

CANDOLLE, A. P. de. 1836. Vernoniaceae. Pp. 9–103 in *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, v. 5, Ed. A. P. de Candolle, Treutel et Würtz, Paris. Masson, Paris.

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J. L.C.; LOPES, N. P. 2004. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV – protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**. 32: 239-243.

COILE, N. C., e S. B. JONES JR. 1981. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus endemic to the Brazilian Planalto. **Brittonia**. 33: 528–542.

COILE, N. C., e S. B. Jones Jr. 1983. *Haplostephium* (Compositae: Vernonieae). **Castanea**. 48: 232–236.

CROTTI, A.E.M.; CUNHA, W.R.; LOPES, N.P.L. et al. 2005. Sesquiterpene lactones from *Minasia alpestris*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 16: 677-680.

CROTTI, A.E.M.; CAROLLO, C.A.; GOBBO-NETO, L. et al. 2006. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. In: TAFT, C.A. (Ed.), **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Research Signpost: Kerala, India, pp. 99-141.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**. 39: 1-15.

CURADO, M.A.; DE OLIVEIRA, C.B.A.; JESUS, J.G. et al. 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry** 67: 2363-2369.

DAVALIAN, D.; GARRAT, P.J. 1975. Eremantholide A, a novel tumor inhibiting compound from *Eremanthus elaeagnus* Schultz-Bip. (Compositae). **Journal of the American Chemical Society**. 97: 6884-6886.

DA COSTA, F.B.; DIAS, D.A.; LOPES, J.L.C. et al. 1993. Flavonoids and heliangolides from *Lychnophora diamantinana*. **Phytochemistry**. 34: 26-263.

DENG, X.; GAO, G.; ZHENG, S. et al. 2008. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigatica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**. 48: 562-567.

DE OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P. et al. 1996. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research** 10: 292-295.

DE SOUZA, A.T.; BENAZZI, T.L.; GRINGS, M.B. et al. 2008. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids** 47: 182-187.

DE VOS, R.C.H.; MOCO, S.; LOMMEN, A. et al. 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature protocols** 2: 778-791.

DEWICK, P.M. 2009. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 3.ed. UK: University of Nottingham. Wiley.

- DIEZEL, C.; VON DAHL, C.C.; GAQUEREL, E.; BALDWIN, I.T. 2009. Different Lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. **Plant Physiology**. 150: 1576-1586.
- DOS SANTOS, P.A.; AMARANTE, M.F.C.; PEREIRA, A.M.S. et al. 2004a. Production of antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 42: 1433-1435.
- DOS SANTOS, P.A.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P.L. 2004b. Triterpenoids and flavonoids from *Lychnophoriopsis candelabrum* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 32: 509-512.
- DUFFEY, S.S. 1980. Sequestration of plant natural products by insects. **Annual Reviews in Entomology** 25: 447-477.
- EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution** 586-608.
- FARAG, M.A.; PARÉ, P.W. 2002. C₆ - green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emission in tomato. **Phytochemistry** 61: 545-554.
- FEENY, P.; SACHDEV, K.; ROSENBERRY, L.; CARTER, M. 1988. Luteolon 7-O(6'-O-malonyl)- β -D-glucoside and trans-chlorogenic acid: oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly. **Phytochemistry**. 27: 3439-3448.
- FERREIRA, A.A.; AZEVEDO, O.; SILVEIRA, D. et al. 2005. Constituents of *Lychnophora pinaster* hydroalcoholic extract. **Chemistry of Natural Products** 41: 466.
- FERRERES, F.; FERNANDES, F.; PEREIRA, D. M. et al. 2009. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae*-*Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57: 9035-9043.
- FIASCHI, P., e PIRANI, J. R. 2009. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **Journal of Systematics and Evolution**. 47: 477-496.
- FIEHN, O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology** 48: 155-171.
- FRANCESCATO, L.N.; DEBENEDETTI, S.L.; SCHWANZ, T.G. et al. 2013. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**. 105: 192-203.
- FRANKFATER, C.; SCHÜHLY, W.; FRONCZEK, F.R.; SLATTERY, M. 2005. Processing of a sesquiterpene lactone by *Papilio glaucus* caterpillars. **Journal of Chemical Ecology**. 31: 2541-2550.

FROST, C.J.; APPEL, H.M.; CARLSON, J.E. et al. 2007. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signaling and primes responses against herbivores. **Ecology Letters** 10: 490–498.

FUNK, V.A.; BAYER, R.J.; KEELEY, S. et al. 2005. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: Friis, I.; Balslev, H. (Ed.). Plant diversity and complexity patterns - local, regional and global dimensions. Proceedings of an International Symposium. **Biologiske Skrifter** 55: 343-373.

FUNK, V.A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. 2009. **Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae**. Viena, Austria: International Association for Plant Taxonomy, pp. 335-342.

GARCIA, M.; DA SILVA, A.J.R.; BAKER, P.M. 1976. Absolute stereochemistry of eremanthine. A schistosomicidal sesquiterpene lactone from *Eremanthus elaeagnus*. **Phytochemistry** 15: 331-332.

GATEHOUSE, J.A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Physiology**. 156: 145-169.

GIRÓN-CALVA, P.S.; LI, T.; KOSKI, T. et al. 2014. A role for volatile in intra- and inter-plant interactions in birch. **Journal of Chemical Ecology**. 40: 1203-1211.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A. et al 2005. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Planta Medica** 71: 3-6.

GOBBO-NETO, L.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. 2008a. Negative ion “chip-based” nanospray tandem mass spectrometry of flavonoids in glandular trichomes of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 22: 3802-3808.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; ALBARELLA, L. et al 2008b. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves from *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 46: 473-475.

GOBBO-NETO, L e LOPES, N.P. 2008. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56: 1193-1204.

GOBBO-NETO, L.; GUARATINI, T.; PESSOA, C. et al. 2010. Differential metabolic and biological profiles of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) from different localities in the Brazilian "campos rupestres". **Journal of Brazilian Chemical Society** 21: 750-759.

GOUVEA, D.R.; MELONI, F.; RIBEIRO, A.B.B. et al. 2012. A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. **Analytica Chimica Acta** 748: 28-36.

GRAEL, C.F.F.; VICHNEWSKI, W.; DE SOUZA, G.E.P. et al. 2000. A study of trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytoterapy Research** 14: 203-206.

GRAEL, C.F.F.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M. et al. 2010. *In vitro* study of antioxidant and scavenger properties of phenolic compounds from *Lychnophora* species. **Química Nova** 33: 867-870.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. 1977. Vernoniaeae-Chemical Review. *In* V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Turner, editors, **The Biology and Chemistry of the Compositae**, 523-537. London, New York Academic Press.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. 1994. Flavonoids and Insects. London, UK: Chapman & Hall. 589-618.

HARE, J. D. 2015. How insect herbivores drive the evolution of plants. **Science**. 338: 50-51.

HERZ, W.; KUMAR, N. 1980 Cytotoxic sesquiterpene lactones of *Eremanthus incanus* and *Heterocoma albida*. Crystal structures and stereochemistry of eregoyazin. **Journal of Organical Chemistry**. 45: 2503-2506.

INDAHL, U. G.; MARTENS, H.; NAES, T. 2007. From dummy regression to prior probabilities in PLS-DA. **Journal of Chemometrics**. 21: 529-536.

ISWALDI, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; RODRÍGUEZ-MEDINA, I. et al. 2011. Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (*Aspalathus linearis*) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 400: 3643 – 3654.

IZAGUIRRE, M. M.; MAZZA, C.A.; SVATOS, A.;BALDWIN, I.T.; Ballare, C.L. 2007. Solar ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger partially overlapping phenolic responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflora*. **Annals of Botany**. 99: 103-108.

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 87: 1-7.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; POLIZELLO, A.C.M. et al. 2004. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytoterapy Research** 18: 61-65.

JANSEN, J.J.; SMIT, S.; HOEFSLOOT, H.C.J. et al. 2009. The photographer and the greenhouse: how to analyse plant metabolomics data. **Phytochemical Analysis** 21: 48-60.

JOLY, A. B. 1970. *Conheça a vegetação brasileira*. EDUSP e Polígono. São Paulo.

JONES, S. B. 1974. Vernonieae (Compositae) Chromosome Numbers of. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. 101: 31-34.

JONES, S. B. 1977. **Vernonieae-Systematic Review**. In *The Biology and Chemistry of the Compositae*, 503-521. London: Academic Press.

JONES, S. B. 1979. Chromosome Numbers of Vernonieae (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 106:79-84.

JONES, O. A. H.; MAGUIRE, M. L.; GRIFFIN, D. A. D. et al. 2013. Metabolomics and its use in ecology. **Austral Ecology**. 38: 713-720.

JOHNSON, K.S.; FELTON, G.W. 2001. Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. **Journal of Chemical Ecology**. 27: 2579-2597.

KEELEY, S. 1978. A Revision of the West Indian *Vernonias* (Compositae). **Journal of the Arnold Arboretum**. 59:360-413.

KIRK, HEATHER; VRIELLING, K; PELSNER, P.B. et al. 2012. Can plant resistance to specialist herbivores be explained by plant chemistry or resource use strategy? **Oecologia**. 168: 1043-1055.

KOH, Y.; PASIKANTI, Y.Y.; YAP, C.W. 2010. Comparative evaluation of software for retention time alignment of gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabolomic data. **Journal of Chromatography A** 1217: 8308-8316.

LESSING, C. F. 1829. De synanthereis herbarii regii berolinensis dissertatio prima. **Linnaea**. 4: 240–356.

- LI, J.; JIANG, H.; SHI, R. 2009. A new acylated quercetin glycoside from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Natural Products Research**. **23**: 1378-138.
- LILAND, K. H. 2011. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimensions reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. **30**: 827-841.
- LINDROTH, R. L.; PETERSON, S. S. 1988. Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larvae. **Oecologia**. **75**:185–189.
- LOBO, J.F.R.; CASTRO, E.S.; GOUEVA, D.R. 2012. Antiproliferative activity of *Eremanthus crotonoides* extracts and centratherin demonstrated in brain tumor cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **22**: 1295-1300.
- LOMMEN, L. 2009. Metalign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical Chemistry** **81**: 3079-3086.
- LOMMEN, L.; VAN DER KAMP, H. J.; KOOLS, H. J. et al. 2012. MetAlignID: A high-throughput software tool set for automated detection of trace level contaminants in comprehensive LECO two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A*. **1263**: 169-178.
- LOEUILLE, B.; SEMIR, J.; PIRANI, J. R. 2012a. A new species of *Paralychnophora* (Asteraceae: Vernonieae), and comments on the identity of *Paralychnophora bicolor*. **Brittonia**. **64**: 289–295.
- LOEUILLE, B.; SEMIR, J.; LOHMANN, L. G.; PIRANI, J. R. 2015a. A phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. **Systematic Botany**. **40**, doi 10.1600/036364415X686585.
- LOEUILLE, B.; KEELEY, S. C.; PIRANI, J. R. 2015b. Systematics and Evolution of syncephaly in American Vernonieae (Asteraceae) with emphasis on the Brazilian subtribe Lychnophorinae. **Systematic Botany**. **40**, doi 10.1600/036364415X686576.
- LYRA, C.C.G.V.; VIEIRA, R.F.; DE OLIVEIRA, C.B.A. et al. 2008. Intra-specific variability in the essential oil composition of *Lychnophora ericoides*. **Journal of Brazilian Chemical Society** **19**: 842-848.
- MACLEISH, N. F. F. 1984. Eight new combinations in *Vernonia* (Compositae: Vernonieae). **Systematic Botany**. **9**: 133–136.

MAGENTA, M.A.G. 2006. **Viguiera Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil**. 353p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARKHAM K. R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Press.

MARTIUS, C. F. P. VON. 1822. 686 Novum plantarum genus *Lychnophora*. *Denkschriften der Koniglich-Baierischen Botanischen Gesellschaft in Regensburg*. 2: 148–159, tab. 4–10.

MARTUCCI, M. E. P; DE VOS, R. C. H; CAROLLO, C. A; GOBBO-NETO, L. 2014. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb. **Plos One** 9: 1-8.

MIGUEL, O. G; LIMA, E. O; MORAIS, V. M. F; GOMES, S. T. A; MONACHE, F. D. et al. 1996. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* **Phytotherapy Research** 10: 694-696.

MORGAN, E. D. 2004. **Biosynthesis in insects**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 199p.

MORITZ, T.; JOHANSSON, A.I. 2008. Plant metabolomics. In: Griffiths, W.J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, Reino Unido. 2008, 303p.

NAWROT, J.; HARMATHA, J. 1994. Natural products as antifeedants against stored products pests. **Postharvest News Inf.** 5:17-21.

NAWROT, J.; HARMATHA, J. 2012. Phytochemical feeding deterrents for stored product insect pests. **Phytochemistry Reviews**. 11:543–566.

NIELSEN, J; OLIVER, S. 2005. The next wave in metaboloma analysis. **Trends in Biotechnology** 23: 544-546.

NORDSTRÖM, A. 2008. Data mining for metabolomics. In: Griffiths, .J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, Reino Unido. 2008, 303p.

OPTIZ, S.E.W; MÜLLER, C. 2009. Plant chemistry and insect sequestration. **Chemoecology** 19: 117-154.

PAVARINI, D.P.; NOGUEIRA, E.F.; CALLEJON, D.R. et al. 2013. Novel bisabolene derivative from “arnica-da-serra” (*Vernoniaeae*: Asteraceae) reduces pro-nociceptive cytokines levels in LPS-stimulated rat macrophages. **Journal of Ethnopharmacology** 148: 993-998.

PIESIK, D.; PÁNKA, D.; JESKE, M. 2013. Volatile induction of infected and neighbouring uninfected plants potentially influence attraction/repellence of a cereal herbivore. **Journal of Applied Entomology** 137: 296-309.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. et al. 2010. Seasonal variation in essential oils of *Lychnophora pinaster* Mart. **Journal of Essential Oil Research**. 22: 147-149.

ROBARDS, K.; HADDAD, P. R.; JACKSON P. E. 1994. **Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods**. Academic Press: New York.

ROBINSON, H.; BOHLMANN, F.; KING, R.M. 1980a. Chemosystematic notes on the Asteraceae, III: Natural Subdivisions of the Vernonieae. **Phytologia** 46: 421-436.

ROBINSON, H. 1980b. Notes on the Lychnophorine genera *Chresta* and *Eremanthus* (Vernonieae : Asteraceae). **Phytologia** 45: 89-100.

ROBINSON, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contributions to Botany** 89: 1-116.

ROBINSON, H. 1992. Notes on Lychnophorinae from Minas Gerais, Brazil, a synopsis of *Lychnophoriopsis* Schultz-Bip., and the new genera *Anteremanthus* and *Minasia* (Vernonieae: Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**. 105: 640–652.

ROBINSON, H. 2007. VI. Tribe Vernonieae Cass. In: Kadereit, J.W.; Jeffrey, C. (Ed.) **The families and genera of vascular plants, vol 8. Flowering plants-eudicot, Asterales**. Berlin: Springer, 149-174.

SACILOTO, A.C.B.C.; SARTORI, F.T.; VICHNEWSKI, W. 2002. Chemical constituents of *Eremanthus veadeiroensis* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 30: 897-900.

SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E. E. et al. 2003. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products** 66: 693-695.

SAKAMOTO, H.T.; LAUDARES, E.P.; CROTTI, A.E.M. et al. 2010. Sesquiterpenes lactones and flavonoids from *Eremanthus argenteus* (Asteraceae). **Natural Products Communication** 5:681-684.

SARGENTI, S.R.; VICHNEWSKI, W. 2000. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. **Phytochemical Analysis** 11: 69-73

SARTORI, F.T.; BARRACHI, A.C.; SACILOTTO, C. et al. 2002. Phytochemical study of *Lychnophora markgravii*. **Biochemical Systematics and Ecology** 30: 609-612.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. et al. 2003. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1008: 57-72.

SANTOS, S.A.O.; FREIRE, C.S.A.; DOMINGUES, M.R.M. et al. 2011. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globules* Labill.Bark by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **59**: 9386-9393.

SCHMIDT, T.J. 1999. Toxic activities of sesquiterpenes lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry** 3: 577-608.

SCHULTZ-BIPONTINUS, C. H. 1861. Cassiniaceae uniflorae, oder Verzeichniss der Cassiniaceen mit 1-blüthigen Köpfchen. **Jahresbericht der Pollichia**. 18/19: 157–190.

SCHULTZ-BIPONTINUS, C. H. 1863 [1864]. *Lychnophora* Martius! und einige benachbarte Gattungen. **Jahresbericht der Pollichia**. 20/21: 321–439.

SCHULTZ-BIPONTINUS, C. H. 1864. *Prestelia* C. H. Schultz-Bipontinus. Hor. Vernoniacearum genus. *Festschrift zum 50.-jährigen Jubiläum der Naturforschenden Gesellschaft zu Emden von 181-4 73*.

SEAMAN, F.C. 1982. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **Botanical Review**. 48: 121-595.

SEMIR, J. et al. **As arnicas endêmicas das Serras do Brasil**. Ouro Preto, MG. Editora UFOP, 2011. ISBN 978-85-288-0276-4.

SILFVER, T.; PAASO, U.; RASEHORN, M. et al. 2015. Genotype X herbivore effect on leaf litter decomposition in *Betula pendula* saplings: ecological and evolutionary consequences on the role of secondary metabolites. **Plos One**. 1-15.

SILVEIRA, D.; WAGNER, H.; CHIARI, E. et al. 2005. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 15: 294-297.

- SIMMONDS, M. S. J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*. 56: 245-252.
- SNART, C. J. P.; HARDY, I. C. W.; BARRET, D. A. 2015. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 155: 1-17.
- SPOLADOR, J.; SANCHES, L.; COSTA, M. H. 2006. Radiação fotossinteticamente ativa em uma floresta de transição Cerrado-Amazônia. **Revista Brasileira de Meteorologia**. 21: 301-307.
- SUMNER, L.W; MENDES, P; DIXON, R.A. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics area. **Phytochemistry** 62: 817-836.
- TIKUNOV, Y.; LOMMEN, A.; DE VOS, C.H.R.; VERHOEVEN, H.A. et al. 2005. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. **Plant Physiology** 139: 1125-1137.
- TIKUNOV, Y.M.; DE VOS, R.C.H.; PARAMAS, A.M.G. et al. 2010. A role for differential glycoconjugation in the emission of phenylpropanoid volatiles from tomato fruit discovered using a metabolic data fusion approach. **Plant Physiology** 152: 55-70.
- TIKUNOV, Y.M.; LAPTENOK, S.; HALL, R.D. et al. 2012. MSClust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics** 8: 714-718.
- TRIPLEHORN, A.A e JONHSON, N.F. 2011. Estudo dos Insetos. Tradução da 7° ed de Borror and Delongs Introduction to the study of insects. Cengage.
- TRIVEDI, D.K e ILES, R.K. 2012. The application of SIMCA P+ in shotgun metabolomics analysis of ZIC®HILIC-MS spectra of human urine – experience with the Shimadzu IT-TOF and profiling solutions data extraction software. **Journal of Chromatography Separation Techniques** 3: 1-5.
- TRYGG, J.; WOLD, S. 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**. 16: 119-128.
- TSUGAWA, H.; TSUJIMOTO, Y.; ARITA, M. et al. 2011. GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). **BMC Bioinformatics** 12: 1-13.
- VICHNEWSKI, M.; GILBERT, R. 1972. Schistosomicidal sesquiterpene lactone from *Eremanthus elaeagnus*. **Phytochemistry** 11: 2563-2566.

VICHNEWSKI, M.; SARTI, S.J.; GILBERT, B. et al. 1976. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. **Phytochemistry** 15: 191-193.

VICHNEWSKI, M.; WELBANEIDE, F.; MACHADO, L. et al. 1977. Eregoyazin and Eregoyazidin, two new guaianolides from *Eremanthus goyazensis*. **Journal of Organic Chemistry** 42: 3910-3913.

VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI, A.M.; TUCCITURCO, A.M. et al. 1989. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelii*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa* **Phytochemistry** 28: 1441-1451.

VICHNEWSKI, W.; SKROCHY, C.A.; NASI, A.M.T.T. et al. 1999. 15-hydroxyeremantholide B and derivatives from *Eremanthus arboreus*. **Phytochemistry** 50: 317-320.

VILLAS-BÔAS, S.; MAS, S.; ÅKESSON, J.S. et al. 2005. Mass spectrometry in metaboloma analysis. **Mass Spectrometry Reviews** 24: 613-646.

WAHLBERG, N. 2001. The Phylogenetics and Biochemistry of Host-Plant Specialization in Melitaeine Butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). **Evolution** 55: 522-537.

WESTERHUIS, J. A.; VAN VELZEN, E. J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J. et al. 2010. Multivariate paired analysis: multilevel PLS-DA versus OPLS-DA. **Metabolomics** 6: 119-128.

WIDARTO, H. T.; VAN DER MEIJDEN, E.; LEFEBER, A. W. M et al. 2006. Metabolomic differentiation of *Brassica rapa* following herbivory by different insect instars using twodimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chemical Ecology**. 32: 2417–2428.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; ROBINSON, H. et al 1981. Germacranolides from *Proteopsis argentea*. **Phytochemistry** 20: 739-741.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. 1990. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution** 171: 1-14.