Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão
(*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae)**

Dayana Rubio Gouvea

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão
(*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae)

Dayana Rubio Gouvea

RIBEIRÃO PRETO
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão
(*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae)

Dissertação de Mestrado, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientada: Dayana Rubio Gouvea

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

RIBEIRÃO PRETO
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gouvea, Dayana Rubio
Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae). Ribeirão Preto, 2010.
105 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. *Lychnophora salicifolia*.
2. Variação populacional.
3. CLAE-DAD-EM.
4. Asteraceae.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dayana Rubio Gouvea

Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão
(*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae).

Dissertação de Mestrado, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Alfredo e Dolores, vocês são não só os responsáveis por tudo como também minha motivação para buscar ser uma pessoa melhor a cada dia. Eu nunca poderei agradecer o suficiente para que saibam o quanto os amo, o quanto são essenciais na minha vida e o quanto a dedicação e amor de vocês são meu maior tesouro.

À toda minha família, minhas irmãs e principalmente minha Tia Ofélia, afinal, eu tenho a sorte de ter uma segunda mãe... um segundo porto seguro, essas mães das quais eu me orgulho tanto, pelas quais tenho tanta admiração pelos exemplos de mulheres que foram e são.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, por me dar a honra de sua amizade, meu exemplo de profissional e pessoa Betão, pela orientação não só acadêmica, mas em todos os sentidos da minha vida, pelo apoio incondicional e principalmente pela confiança e liberdade que me foram dadas desde o início.

Em especial ao grande amigo Leandro De Santis Ferreira, nosso querido Ganso e aos meninos Daniel P. Pavarini (Cabeça... dura!) e Eduardo F. Fernandes (Pomps), que apesar do trabalho que me dão, são os verdadeiros companheiros de dia a dia, que me ajudaram nos mínimos detalhes que no fim fazem toda a diferença.

Ao Fernando Meloni, pela imensa colaboração com as análises estatísticas, correções de biólogo e discussões enriquecedoras.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto, pela disposição para tirar minhas eternas dúvidas sobre tudo... e de alguma forma também me orientar, desorientar e estar sempre presente.

Ao Prof. Dr. João Semir pela identificação botânica e ao Marcelo Monge Egea pela imensa disposição em colaborar com novas referências.

À todos os companheiros de laboratório, funcionários, técnicos, alunos e professores, que de forma direta ou indireta são co-responsáveis pela realização deste trabalho e minha formação.

Em especial, agradeço ao nosso queridíssimo *pop star* José Carlos Tomaz por sua boa vontade em colaborar em qualquer situação, sempre com alegria e uma boa música na ponta da língua.

Também agradeço a não menos querida Izabel Cristina Casanova Turatti, também sempre disposta a colaborar e pela ajuda essencial para o encerramento deste trabalho.

Aos ex-alunos e alunos de iniciação científica Priscila Terumi, Leandro Bozzini (Ceará) e Arthur Ribeiro (Candango) pela compreensão e colaboração no isolamento dos padrões.

Aos companheiros de laboratório Lucas Sartori e Alex R. Rezende pelas ajudas com figuras e afins, por serem sempre solícitos e pela alegre convivência.

Ao Ricardo Vessecchi pelos trabalhos em conjunto e pela diversão com seus monólogos infinitos.

Ao pesquisador Adrian Pohlit também pelos trabalhos em conjunto e correções de inglês.

Ao Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki, pela orientação na realização dos estágios PAE e pelo bom exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior e alunos, especialmente ao Felipe Augusto Dörr pelas análises de massas, explicações tão esclarecedoras além das conversas divertidas. Também agradeço aos meninos Ênio (Três Pontas) e Erechim pela animada e amigável acolhida.

Ao Antônio Eduardo Miller Crotti, primeiramente por ter me ensinado tanto no início de tudo, sendo um exemplo de professor para mim e pela colaboração e sugestões no encerramento deste trabalho.

Às menininhas da QO, Fernandinha, Denise e Ana Lígia além do Rafael e todos os alunos do laboratório, pela amigável convivência de anos.

Agradeço às minhas amigas, esses seres especiais que a vida colocou em meu caminho: Thaís Fiorellini, Viviane Bronzati, Ana Paula Fais, Larissa Audi, Ariana Carramaschi, Martha Funabashi, Mirela Gianeti e Mariza Abreu, sem vocês essa jornada não seria tão divertida nem tão enriquecedora.

À Fapesp pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

“Mas, a despeito da pedra, as plantas continuam a nascer, crescer, florescer...”

Rubem Alves

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Variações no metabolismo secundário de plantas.</i>	1
1.2. <i>Aplicação de técnicas acopladas no estudo de metabólitos secundários.</i>	3
1.3. <i>O Cerrado.</i>	6
1.4. <i>A espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> Mart. (Vernonieae, Asteraceae).</i>	7
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. <i>Coleta das diferentes populações de <i>L. salicifolia</i> e seu armazenamento.</i>	13
3.2. <i>Análises por CLAE-DAD.</i>	17
3.3. <i>Desenvolvimento da metodologia analítica em CLAE-DAD.</i>	17
3.4. <i>Metodologia analítica final para análise por CLAE-DAD.</i>	18
3.5. <i>Isolamento dos padrões.</i>	19
4. <i>Validação da metodologia analítica por CLAE-DAD.</i>	20
5. <i>Avaliação estatística das variações populacionais.</i>	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. <i>Desenvolvimento da metodologia analítica.</i>	23
4.1.1. <i>Extração.</i>	23
4.1.2. <i>Análises por CLAE-DAD.</i>	24
4.1.3. <i>Escolha do padrão interno.</i>	26

<i>4.2. Identificação dos sinais cromatográficos.</i>	27
<i>4.3. Isolamento dos padrões.</i>	41
<i>4.4. Validação da metodologia analítica por CLAE-DAD.</i>	42
<i>4.5. Análise das variações populacionais.</i>	48
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE 1	77
APÊNDICE 2	82
APÊNDICE 3	102
APÊNDICE 4	103
ANEXO 1	104

RESUMO

GOUVEA, D. R. **Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae).** 2010. 105f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Cerca de 10% da flora mundial é representada pela família Asteraceae, uma das maiores famílias de Angiospermae, caracterizada não só pela diversidade morfológica e taxonômica, como também pela riqueza de metabólitos secundários apresentada pelas espécies estudadas dessa família. *Lychnophora salicifolia* Mart. é a espécie de maior distribuição geográfica do gênero (ocorrendo na Serra do Espinhaço na Bahia, em Minas Gerais e no sudeste de Goiás) e a mais polimórfica também. Entre seus usos etnobotânicos, destaca-se a ação anti-inflamatória e analgésica. Neste trabalho, realizamos o estudo da variação dos metabólitos polares dessa espécie, sendo que para isso foi utilizada a desreplicação do extrato bruto (metanol/água obtido a partir da folhas) através da análise por CLAE-DAD-EM, a qual permitiu a caracterização dos constituintes dessa mistura através da análise dos espectros de UV e dados de EM. Assim foi possível identificar 20 substâncias: ácido protocatecuico; ácido 3-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 4-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 4-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 5-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 5-*O*-feruloilquínico; vicienina-2 (6,8-di-*C-β*-glcosilapigenina); ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3-*O*-cumaroil 5-*O-p*-cafeoilquínico; ácido 3-*O*-cafeoil, 5-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 4-feruloil-5-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3,4 di-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 3,5 di-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 4,5 di-*O-p*-cumaroilquínico; ácido lychnofólico e o ácido 2-*O*-acetil lychnofólico. Para a validação da metodologia analítica foi utilizada uma substância pertencente a cada classe de compostos: ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico, vicienina-2 e o ácido 2-*O*-acetil lychnofólico. Quanto à validação da metodologia analítica, esta garantiu a confiabilidade dos resultados e a credibilidade do método para os propósitos deste estudo, abrangendo a faixa de concentração necessária para as análises de variação populacional, além apresentar valores de limites de detecção e limites de quantificação, precisão e recuperação adequados. Na análise intrapopulacional, verificou-se uma variabilidade quantitativa entre indivíduos da mesma população, porém, em média os indivíduos pertencentes à mesma população são parecidos quimicamente. Já em relação ao estudo da variação populacional, pudemos verificar diferenças tanto quanti como qualitativas entre populações coletadas em regiões distintas do Brasil, sendo que a partir da análise estatística, verificamos que há uma correlação entre isolamento geográfico e diminuição da semelhança do perfil de metabólitos polares entre as plantas de populações diferentes indicando que o padrão encontrado para concentração dos metabólitos é influenciado pela distribuição geográfica das amostras. Todavia, não é possível determinar a localização das amostras unicamente pelas variáveis metabólicas estudadas. Assim, a concentração e presença dos metabólitos são influenciadas pela distribuição geográfica das amostras.

Palavras-chave: *Lychnophora salicifolia*, variação populacional, CLAE-DAD-EM, Asteraceae.

ABSTRACT

GOUVEA, D. R. **Interpopulational variation of secondary metabolites of arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae)**. 2010. 105f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

About 10% of the world flora is represented by the Asteraceae family, which has been extensively studied since it is one of the largest families of Angiospermae, characterized not only by morphological and taxonomic diversity but also the wealth of secondary metabolites produced by the species studied of this family. *Lychnophora salicifolia* Mart. is the most widely distributed species of the genus (occurring in the Serra do Espinhaço in Bahia, Minas Gerais and in the southeast of Goiás) and also is the most polymorphic. Its popular use is due to the anti-inflammatory and analgesic activity. In this work, we studied the variation of polar metabolites of this species using the dereplication of the crude extract (methanol/water obtained from the leaves) by the HPLC-DAD-MS analysis, which led us to identify the constituents of this mixture by analyzing the UV spectra and MS data. Thus it was possible to identify 20 substances: protocatechuic acid; 3-*O-E*-caffeoylquinic acid; 3-*O-p*-coumaroylquinic acid; 4-*O-E*-caffeoylquinic acid; 5-*O-E*-caffeoylquinic acid; 4-*O-p*-coumaroylquinic acid; 5-*O-p*-coumaroylquinic acid; 5-*O*-feruloylquinic acid; vicienin-2 (6,8-di-*C-β*-glucosylapigenin); 3,4-di-*O-E*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O-E*-caffeoylquinic acid; 3-*O*-coumaroyl-5-*O-p*-caffeoylquinic acid; 3-*O*-caffeoyl acid, 5-*O-p*-coumaroylquinic acid; 4,5-di-*O-E*-caffeoylquinic acid, 4-feruloyl-5-*O-E*-caffeoylquinic acid; 3,4-di-*O-p*-coumaroylquinic acid; 3,5-di-*O-p*-coumaroylquinic acid; 4,5-di-*O-p*-coumaroylquinic acid; lychnofolic acid and 2-*O*-acetyl lychnofolic acid. To the validation of analytical methodology were used one substance belonging to each class of compounds: 5-*O-E*-caffeoylquinic acid, vicienin-2 and 2-*O*-acetyl lychnofolic acid. So, the validation of analytical method ensured the reliability and credibility of the results of the method for purposes of this study, covering the concentration range required for analysis of population variation and presents appropriate values of detection and quantification limits, precision and recovery. For intrapopulation analysis, there was a quantitative variability between individuals of the same population, but on average the individuals of the same population are similar chemically. In relation to the study of interpopulation variation, we could see quantitative and qualitative differences between populations collected from different regions of Brazil, and from the statistical analysis, we found that there is a correlation between geographic isolation and decrease of the similarity of the polar metabolites profile between plants of different populations. This indicated that the pattern found for the concentration of metabolites is influenced by the geographical distribution of samples. However, it is not possible to determine the location of the samples only by the metabolic variables studied. Thus, the presence and concentration of metabolites are influenced by the geographical distribution of samples.

Keywords: *Lychnophora salicifolia*, populational variation, HPLC-DAD-MS, Asteraceae.

LISTA DE FIGURAS

		página
Figura 1	GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova . v.30, n.2, p.374-381, 2007.	2
Figura 2	Adaptado de Machado et al., 2004; mapas do Brasil ilustrando a localização do Cerrado (em laranja) e as áreas restantes de vegetação nativa (em verde no detalhe aproximado).	7
Figura 3	Fotos de indivíduos da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> em seu habitat natural. (fotos: Norberto Pepporine Lopes e Leonardo Gobbo Neto).	9
Figura 4	Mapas indicando as localizações das populações de <i>Lychnophora salicifolia</i> coletadas nos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás (fonte: <i>Google Earth</i>). Os números indicados referem-se à codificação de depósito no herbário UEC para cada população.	14
Figura 5	Esquema ilustrando o método final de preparo das amostras de folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i> para análise por CLAE-DAD.	18
Figura 6	Cromatograma obtido na análise por CLAE-DAD do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> em 254 nm, utilizando acetonitrila, água e ácido acético na fase móvel.	24
Figura 7	Cromatograma obtido na análise por CLAE-DAD do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> em 254 nm, utilizando metanol, água e ácido acético na fase móvel.	25
Figura 8	Cromatograma obtido na análise por CLAE-DAD do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> com a adição de cafeína (p.i.), obtido em 254 nm.	27
Figura 9	Cromatogramas obtidos na análise por CLAE-DAD-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> em 254 e 300 nm e os respectivos sinais cromatográficos identificados.	28
Figura 10	Estruturas químicas básicas para formação dos ácidos clorogênicos.	29
Figura 11	Isômeros mono-cafeoilquínicos na análise por espectrometria de massas em modo negativo de ionização utilizando como fonte <i>electrospray</i> .	31

Figura 12	Cromatograma obtido na análise por CLAE-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> a partir da extração dos íons m/z 515 (ácidos di-cafeoilquínicos) no modo de ionização negativo.	33
Figura 13	Cromatograma obtido na análise por CLAE-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> a partir da extração dos íons m/z 353 (ácidos mono-cafeoilquínicos) no modo de ionização negativo.	34
Figura 14	Cromatograma obtido na análise por CLAE-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> a partir da extração dos íons m/z 483 (ácidos di-cumaroilquínicos) no modo de ionização negativo.	35
Figura 15	Cromatograma obtido na análise por CLAE-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> a partir da extração dos íons m/z 337 (ácidos mono-cumaroilquínicos) no modo de ionização negativo.	35
Figura 16	Cromatogramas sobrepostos obtidos na análise por CLAE-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> a partir da extração dos íons m/z 515 (ácidos di-cafeoilquínicos, em vermelho) e dos íons 483 (ácidos di-cumaroilquínicos, em azul) no modo de ionização negativo.	36
Figura 17	Cromatogramas sobrepostos obtidos na análise por CLAE-EM do extrato bruto (metanol:água) das folhas da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> a partir da extração dos íons m/z 353 (ácidos mono-cafeoilquínicos, em vermelho) e dos íons m/z 337 (ácidos mono-cumaroilquínicos, em azul).	36
Figura 18	Cromatograma obtido para a fase metanol/água em 254nm.	41
Figura 19	Cromatograma obtido em 254nm para a fase acetato de etila.	41
Figura 20	Cromatograma obtido em 300 nm para a substância isolada vicianina-2 após reunião das frações da Sephadex.	42
Figura 21	Curvas de calibração obtidas para os padrões de ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico, vicianina-2 e para o ácido 2- <i>O</i> -acetil lychnofólico, as respectivas equações da reta e coeficientes de correlação ao quadrado.	43
Figura 22	Gráficos das variações intrapopulacionais no conteúdo de metabólitos secundários polares majoritários identificados no extrato metanol/água das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i> . Os números em algarismos romanos se referem aos diferentes indivíduos da mesma população. Valores obtidos na análise por CLAE-DAD referentes às áreas corrigidas dos sinais majoritários dos metabólitos secundários	50

(área da substância/área do padrão interno).

Figura 23	Gráficos das somatórias das áreas dos sinais majoritários dos metabólitos secundários polares majoritários identificados no extrato metanol/água das folhas de diferentes populações de <i>Lychnophora salicifolia</i> . Valores obtidos na análise por CLAE-DAD referentes às somas das áreas corrigidas (área da substância /área do padrão interno).	56
Figura 24	Plotagem bidimensional de variáveis metabólicas e geográficas de <i>Lychnophora salicifolia</i> , segundo análise por componentes principais (PCA ₂).	64
Figura 25	Cromatogramas obtidos para a população 321 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	77
Figura 26	Cromatogramas obtidos para a população 325 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	77
Figura 27	Cromatogramas obtidos para a população 327 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	78
Figura 28	Cromatogramas obtidos para a população 338 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	78
Figura 29	Cromatogramas obtidos para a população 343 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	79
Figura 30	Cromatogramas obtidos para a população 344 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	79
Figura 31	Cromatogramas obtidos para a população 347 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	80
Figura 32	Cromatogramas obtidos para a população 348 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	80
Figura 33	Cromatogramas obtidos para a população 362 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	81
Figura 34	Cromatogramas obtidos para a população 363 de <i>Lychnophora salicifolia</i> (254 e 300nm).	81
Figura 35	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 1.	82
Figura 36	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 2.	83
Figura 37	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 3.	84

Figura 38	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 4.	85
Figura 39	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 5.	86
Figura 40	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 6.	87
Figura 41	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 7.	88
Figura 42	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 8.	89
Figura 43	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modos positivo e negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 9.	90
Figura 44	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 10.	91
Figura 45	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 11.	92
Figura 46	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 12.	93
Figura 47	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 13.	94
Figura 48	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 14.	95
Figura 49	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 15.	96
Figura 50	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 16.	97
Figura 51	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 17.	98
Figura 52	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 18.	99
Figura 53	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 19.	100
Figura 54	Identificação, estrutura, espectro de UV e de massas (modo negativo de ionização) para o sinal cromatográfico 20.	101
Figura 55	Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 254 nm para o padrão	102

de ácido 2-*O*-acetil lychnofólico.

- Figura 56** Espectro de RMN H^1 obtido em 300 MHz para o padrão de ácido 2-*O*-acetil lychnofólico. Solvente: $CDCl_3$ 102
- Figura 57** Espectros de massas obtidos para o padrão utilizado na validação da metodologia analítica: vicenina-2. 103

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Substâncias já relatadas na espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> e suas respectivas referências.
	10
Tabela 2	Informações gerais sobre as dez diferentes populações de <i>Lychnophora salicifolia</i> coletadas em três regiões distintas do Brasil (Bahia, Minas Gerais e Goiás).
	15
Tabela 3	Teste de extração utilizando diferentes proporções de metanol/água e diferentes massas de material vegetal: áreas obtidas para os sinais majoritários do extrato das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i> na análise por CLAE-DAD.
	23
Tabela 4	Gradiente de fase móvel utilizado no método final.
	25
Tabela 5	Massas acuradas obtidas experimentalmente para os sinais majoritários observados na análise por CLAE-DAD-EM do extrato bruto (metanol/água) das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i> .
	40
Tabela 6	Valores de limite de detecção mínimos (LD mín.) e máximos (LD máx.) e limites de quantificação mínimos (LQ mín.) e máximos (LQ máx.) obtidos para as substâncias padrões.
	44
Tabela 7	Repetibilidade (precisão intracorridas): valores de coeficientes de variação obtidos para as substâncias padrões em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta).
	45
Tabela 8	Precisão intermediária (precisão intercorridas): valores de coeficientes de variação obtidos para as substâncias padrões em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta).
	45
Tabela 9	Recuperação: valores expressos em % de extração, para as substâncias padrões em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta).
	46
Tabela 10	Estabilidade da amostra 321. Valores obtidos na análise por CLAE-DAD referentes às áreas corrigidas (área da substância/área do padrão interno) após diferentes tempos de preparo da amostra.
	46
Tabela 11	Estudo da estabilidade das soluções padrões. Valores obtidos na análise por CLAE-DAD referentes ao cálculo da porcentagem das concentrações calculadas para cada
	47

padrão após o período de 24 horas.

Tabela 12	Estabilidade da solução de preparo contendo cafeína. Valores obtidos na análise por CLAE-DAD das áreas do sinal cromatográfico após diferentes tempos de armazenamento no injetor automático.	48
Tabela 13	Valores das somatórias, médias e desvio padrão das áreas dos sinais majoritários dos metabólitos secundários polares majoritários identificados no extrato metanol/água das folhas de diferentes populações de <i>Lychnophora salicifolia</i> . Valores obtidos na análise por CLAE-DAD referentes às áreas corrigidas (área da substância/área do padrão interno).	52
Tabela 14	Valores das concentrações estimadas dos metabólitos secundários polares majoritários identificados no extrato metanol/água das folhas de diferentes populações de <i>Lychnophora salicifolia</i> .	55
Tabela 15	Tabela indicando a detecção por CLAE-DAD dos metabólitos polares majoritários presentes no extrato metanol/água obtido a partir das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i> . O sinal + indica a detecção do sinal cromatográfico referente ao metabólito secundário.	59
Tabela 16	Agrupamento de amostras de <i>Lychnophora salicifolia</i> , provenientes de 10 diferentes locais de coleta, segundo análise de agrupamento por método não hierárquico (K-means), considerando a distribuição maximizada em 4 grupos, de acordo com variáveis geográficas (K1) e metabólicas (K2).	61
Tabela 17	Correlação entre concentração de metabólitos e variáveis geográficas com os 5 fatores calculados pela análise de fatores, métodos de máxima rotação pela disposição das amostras, calculada para amostras de <i>Lychnophora salicifolia</i> coletadas em dez diferentes locais.	63
Tabela 18	Resultados da análise de correlações canônicas construídas para variáveis metabólicas representativas e variáveis geográficas de diferentes populações de <i>Lychnophora salicifolia</i> .	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE-UV	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de luz ultravioleta
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos
EM	espectrômetro de massas
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas
CLAE-DAD-RMN	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos e a um espectrômetro de ressonância magnética nuclear
UV	ultravioleta
RMN	ressonância magnética nuclear
EM/EM e EM ⁿ	espectrometrometria de massas em sequência
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
CID	<i>collision induced dissociation</i> (dissociação induzida por colisão)
Ar	argônio
N ₂	nitrogênio
He	hélio
CO ₂	gás carbônico
S	sul
W	oeste
<i>L. salicifolia</i>	<i>Lychnophora salicifolia</i> Mart.
GPS	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de Posicionamento Global)
ODS	octadecilsilano
MeOH	metanol
ACN	acetonitrila
Hex	hexano
HAc	ácido acético
H ₂ O	água
AcOET	acetato de etila
min	minutos
rpm	rotações por minuto
v:v	volume:volume

CCD	cromatografia em camada delgada
mg	miligrama
mL	mililitros
µg	microgramas
Km	quilômetros
nm	nanômetros
t.r.	tempo de retenção
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RE	Resolução
ACP	análise de componentes principais
ACC	análise de correlações canônicas
p.i.	padrão interno
<i>m/z</i>	massa/carga
eV	eletron Volt
QqTOF	analisador de massas tipo quadrupolo e tempo de voo em sequencia
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
K	análise K-means
MHz	Mega Hertz

1. INTRODUÇÃO

1.1. Variações no metabolismo secundário de plantas.

Os metabólitos secundários são componentes especiais do metabolismo vegetal frequentemente relacionados a aspectos ecológicos e evolutivos das espécies vegetais, uma vez que desempenham importante papel quanto à interação planta-ambiente, podendo proteger as plantas contra uma ampla variedade de microrganismos (vírus, bactérias, fungos) e herbívoros (artrópodes, vertebrados) além de outras funções que garantem a sobrevivência das espécies no ecossistema (WINK, 1988).

A presença e a quantidade desses compostos são influenciadas pela carga e expressão genética, pelos processos bioquímicos e fisiológicos da planta além de também sofrerem influência das variáveis ambientais. As flutuações na concentração e nas proporções relativas desses metabólitos podem ocorrer temporalmente e espacialmente, ocorrendo em diferentes níveis: sazonais e diárias; intraplanta, interplantas e interespecies (JAMIESON & BOWERS, 2010; DARROW & BOWERS, 1997; BOWERS & STAMP, 1993; LINDROTH et al., 1987).

Dentre os principais fatores que influenciam a dinâmica dos metabólitos estão os ciclos sazonais, circadianos e fenológicos, latitude, altitude, disponibilidade hídrica e de nutrientes, nível de radiação, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos, herbivoria e ataques por patógenos. Há um grande número de estudos sobre a influência destes fatores na produção de metabólitos secundários, ficando evidente que esses fatores não atuam isoladamente, porém estes estudos normalmente abrangem espécies predominantemente ocorrentes em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes e, portanto, podem ter sofrido fortes pressões seletivas visando certas características desejadas pelo homem. Assim, essas informações podem nem sempre ser representativas para plantas selvagens ou de outros tipos de habitat (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Figura 1. GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova.** v.30, n.2, p.374-381, 2007.

Sabe-se que diferentes populações de muitas espécies de plantas podem apresentar variação em uma ou mais classes de constituintes químicos, assim, estudos sobre os ritmos na produção de metabólitos secundários podem revelar quais substâncias são úteis como marcadores químicos. Ainda podemos considerar que essas informações podem servir como um conjunto adicional de caracteres taxonômicos e muitas vezes permitem a determinação de quimiotipos, uma vez que evidenciam as diferenças entre indivíduos em qualquer nível hierárquico (LAITINEN, et al., 2000; WILT et al., 1992; MABRY, 1973).

Populações quimicamente diferentes são consideradas raças químicas ou quimiotipos, pois apesar de apresentarem fenótipos semelhantes, possuem diferentes genótipos e assim sendo, são idênticas na aparência externa, mas diferem em seus constituintes químicos (EVANS, 1996).

Os termos "genótipo" e "fenótipo" foram introduzidos em 1909 pelo botânico dinamarquês Wilhelm Johannsen, que definiu genótipo como a constituição genética do organismo e o fenótipo, as características que resultam da interação de genótipo

e ambiente. O termo "quimiotipo" entrou em uso mais tarde na literatura química, genética e microbiológica no início da década de 1960. A relação entre genótipo e quimiotipo é complexa, sendo que a presença de determinado gene de uma via biossintética não garante a presença do metabólito secundário produzido por essa, nem prediz a quantidade produzida do mesmo (DESJARDINS, 2008).

Espécies estreitamente relacionadas e *taxa* infraespecíficas podem exibir padrões de metabólitos secundários similares e às vezes idênticos. Assim, estudos quimiosistemáticos quantitativos podem fornecer parâmetros adicionais, colaborando na discriminação entre *taxa* particulares. Nesse caso, os pré-requisitos conhecidos para o uso de dados de estudos fitoquímicos para essa distinção são: o grau de variação química entre diferentes populações de um táxon; a variação existente entre indivíduos de uma mesma população; diferenças no conteúdo de uma dada substância durante o período de crescimento, além de variações entre populações crescendo em diferentes ambientes como, por exemplo, em diferentes altitudes (ZIDORN & STUPPNER, 2001).

Em estudos quimiotaxonômicos pode-se utilizar a análise da similaridade química baseada em *fingerprint* a qual pode ser empregada para avaliação dos perfis metabólicos obtidos por CLAE-UV (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de luz ultravioleta) ou CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos), enquanto o uso de um espectrômetro de massas (EM) como detector em CLAE pode fornecer excelente sensibilidade e seletividade em matrizes complexas, além de informações estruturais importantes *on-line* permitindo a desreplicação e caracterização rápida de produtos naturais (WOLFENDER, 2009).

1.2. Aplicação de técnicas acopladas no estudo de metabólitos secundários.

A desreplicação tem sido amplamente utilizada na área de produtos naturais, já que permite a caracterização rápida dos constituintes de misturas complexas utilizando técnicas acopladas. O *screening* químico utilizando técnicas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-RMN fornece rapidamente ampla informação estrutural, possibilitando em alguns casos a identificação inequívoca, de compostos sem a necessidade do isolamento clássico dos mesmos, auxiliando assim, na racionalização dos estudos de fitoquímica (WOLFENDER, 2009; WILSON & BRINKMAN, 2003; CORDELL & SHIN, 1999).

A CLAE é uma técnica muito poderosa e versátil para separação de produtos naturais em matrizes complexas como extratos brutos polares, utilizando nesse caso a análise em fase reversa. Entre todos os detectores usados em CLAE, o mais simples e o mais amplamente utilizado é o UV, embora tenha algumas limitações, sobretudo para produtos naturais que não possuem cromóforos. Contudo esse detector é o que apresenta a melhor combinação de sensibilidade, linearidade, versatilidade e confiabilidade de todos os detectores desenvolvidos até o momento. Métodos desenvolvidos em CLAE-UV ou CLAE-DAD podem ser usados para comparar os *fingerprints* e perfis metabólicos de espécies estreitamente relacionadas ou da mesma espécie proveniente de diferentes localidades (LIANG et al., 2007).

Idealmente, as técnicas acopladas devem proporcionar a mesma qualidade da informação espectroscópica adquirida com substâncias isoladas puras. No entanto, este não é o caso, e cada técnica apresenta suas limitações. Se tratando de produtos naturais desconhecidos, essas informações necessitam ser mais completas sendo necessário, por exemplo, a obtenção de dados de RMN. Esta técnica pode ser diretamente acoplada com CLAE usado em linha, com pré-concentração como a SPE-CLAE-RMN, porém isto implica em altíssimo custo. Um ponto a ser considerado é que o acoplamento de vários métodos, muitas vezes chamado hipernação pode comprometer, por exemplo, a sensibilidade do método, apesar de apresentar a grande vantagem de que todas as informações estruturais podem ser obtidas dentro de uma única análise (WILSON & BRINKMAN, 2007).

No caso da detecção por arranjo de diodos, uma técnica muito mais barata, espectros de UV são fornecidos diretamente *on-line* sendo particularmente útil para a detecção de metabólitos secundários com cromóforos característicos, como no caso de polifenóis. Para esses compostos, podem ser criadas bibliotecas de espectros de UV para serem utilizadas na desreplicação, contanto que as substâncias sejam analisadas sob as mesmas condições na análise por CLAE, como a composição da fase móvel (WOLFENDER, 2009).

Na desreplicação de produtos naturais, o método mais utilizado é CLAE-DAD-EM, em que os espectros de UV e dados de EM são utilizados em conjunto com informações quimiosistemáticas da espécie estudada, sendo por isso muito útil o acesso a bancos de dados de compostos naturais, como o NAPRALERT e o SciFinder (NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003; CORDELL & SHIN, 1999).

A ESI (ionização por *electrospray*) é a técnica de ionização mais utilizada para acoplamento com CLAE, já que permite a análise de moléculas polares, passíveis de sofrer ionização. Esse tipo de ionização ocorre à pressão atmosférica, onde um campo elétrico intenso dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de um fino *spray* de gotas carregadas que, por evaporação, ejetam íons na fase gasosa (CROTTI et al., 2006b; FENN, et al., 1989).

Os íons formados podem ser íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas além de moléculas cationizadas e anionizadas sendo que essa ionização dependerá do balanço entre as reações de oxidação e redução (que produzem íons moleculares (M^+) ou (M^-) ; reações ácido/base, nesse caso, a ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Brönsted-Lowry, ou seja, pela protonação ou desprotonação de moléculas $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) e finalmente a formação de moléculas cationizadas $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, ou anionizadas $[M+Cl]^-$ etc.) (VESSECCHI, et al., 2007).

Por ser um método brando de ionização pouca energia residual é retida pelo analito em ESI, sendo assim, limitada fragmentação ocorre já que as moléculas recebem pouca energia diretamente, o que de certa forma, é uma desvantagem da ESI para estudos de elucidação estrutural. Assim, foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas em sequência (EM/EM ou EM^n) nos quais as moléculas podem ativas por um processo colisional e serem fragmentadas na célula de colisão gerando íons que muitas vezes permitem a identificação das substâncias (CROTTI et al., 2006a).

Nas análises de EM/EM, um íon do primeiro estágio (íon precursor) é selecionado e transferido para uma célula de colisão, onde utilizando um gás inerte (usualmente Ar, N₂, He ou CO₂) a dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*) produz a fragmentação do íon precursor. Dessa forma, são gerados íons produtos ou de segunda geração, que podem proporcionar muita informação estrutural sobre o íon precursor. Dessa forma, torna-se possível a identificação de compostos desconhecidos, já que os dados de massas moleculares exatas e os espectros de íons produtos, além de no caso com acoplamento com CLAE-DAD, os tempos de retenção e espectros de UV, são dados muitas vezes suficientes para a elucidação estrutural (CROTTI et al., 2006a).

No caso de séries homólogas de compostos cuja relação estrutura-fragmentação já foi estudada e é conhecida, esse estudo se torna ainda mais prático

e rápido. Isso se aplica, por exemplo, à identificação dos ácidos clorogênicos nos trabalhos realizados por Clifford e colaboradores (2003, 2005, 2006), flavonoides (CUICKENS & CLAEYS, 2004; WARIDEL et al., 2001; CUICKENS et al., 2000; MA et al., 1997; 2001;), alcaloides (PIVATTO et al., 2005) e inclusive de lactonas sesquiterpênicas (CROTTI et al., 2005).

1.3. O Cerrado.

O Brasil é considerado um dos países de maior biodiversidade no mundo, pois se calcula que nada menos do que 10% de toda a biota terrestre encontra-se no país (MITTERMEIER et al., 1999). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e se destaca pela riqueza de fisionomias e por abrigar grande diversidade de espécies animais e vegetais. Com solo deficiente em nutrientes e rico em ferro e alumínio cobre mais de dois milhões de Km² no Brasil Central, onde abrange 10 estados além de partes da Bolívia e do Paraguai (SIMON et al., 2009).

Enquanto a estratificação vertical (existência de várias “camadas” de ambientes) da Amazônia ou da Mata Atlântica, proporciona riqueza de nichos para o estabelecimento das espécies, no Cerrado a heterogeneidade espacial (a variação dos ecossistemas ao longo do espaço) é o fator determinante para a expressiva riqueza de espécies. As fisionomias do Cerrado variam significativamente no sentido horizontal, sendo que áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas podem existir interligadas em uma mesma região (MACHADO et al., 2004).

O termo “Cerrado” designa uma vegetação de aspecto e flora própria, classificado dentro dos padrões de vegetação do mundo como savana (EITEN, 1994) destacando-se, porém, por sua variação na composição, apresenta formas florestais, savânicas e campestres (RIBEIRO & WALTER, 1998).

Apesar de sua importância, a carência de áreas de conservação no Cerrado é representativa e pode ser evidenciada quando se compara o esforço governamental em conservar os ecossistemas Amazônicos, os quais têm 12% da sua área protegida em unidades de conservação, contra menos de 2% no Cerrado. A forma de intervenção humana mais significativa nesse bioma tem sido a grande expansão das pastagens plantadas de lavouras comerciais como a soja, o milho, arroz, café, feijão e mandioca (KLINK, 1996) sendo que as taxas anuais de desmatamento no Cerrado são elevadíssimas, variando de 22.000 a 30.000 Km² por ano (MACHADO et al., 2004).

Figura 2. Adaptado de Machado et al., 2004; mapas do Brasil ilustrando a localização do Cerrado (em laranja) e as áreas restantes de vegetação nativa (em verde no detalhe aproximado).

Em 2000, Myers e colaboradores estimavam que o Cerrado brasileiro era possuidor de 10.000 espécies vegetais das quais 44% são endêmicas, o que representa aproximadamente 1,5% do total de espécies endêmicas no planeta, sendo considerado um *hotspot* de biodiversidade. Portanto, a intensificação nos estudos das espécies ocorrentes no Cerrado é fundamental para o suporte no delineamento de estratégias de conservação dentro do bioma, tendo em vista o acelerado processo de degradação ambiental e o risco eminente de extinção de muitos grupos taxonômicos (CASTRO et al., 1999; RATTER et al., 1997). Fica claro, portanto, que a proteção do Cerrado, a conservação de sua diversidade genética e o estudo de sua flora são de fundamental importância.

1.4. A espécie *Lychnophora salicifolia* Mart. (Vernonieae, Asteraceae).

Cerca de 10% da flora mundial é representada pela família Asteraceae, a qual vem sendo intensamente estudada justamente por ser uma das maiores famílias de Angiospermae, caracterizando-se não só pela diversidade morfológica e taxonômica, como também pela riqueza de metabólitos secundários apresentada pelas espécies estudadas dessa família (BREMER, 1994). Quimicamente, a família Asteraceae é caracterizada pela capacidade de biossintetizar grande diversidade de metabólitos secundários, como monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, entre eles as lactonas sesquiterpênicas, além de poliacetilenos, flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos e cumarinas (CALABRIA et al., 2009).

No Brasil há um particular interesse fitoquímico pela tribo Vernonieae (Asteraceae), pois, com cerca de 40 gêneros e 450 espécies, o país é reconhecido como um de seus principais centros de ocorrência (ROBINSON, 1999; SEMIR, 1991). Lychnophorinae é uma subtribo pertencente à tribo Vernonieae, destacando-se devido à sua distribuição restrita ao Brasil. Esta subtribo compreende 9 gêneros e 81 espécies (ROBINSON, 1999).

Nessa subtribo, espécies do gênero *Lychnophora* sp. destacam-se por estarem entre as plantas da família Asteraceae mais utilizadas na medicina popular brasileira, ao lado da carqueja (*Baccharis trimera* Less.), do guaco (*Mikania glomerata* Spreng) e do boldo (*Vernonia condensata* Backer), por exemplo. Este gênero apresenta espécies com um microendemismo bastante pronunciado, ocorrendo em regiões elevadas e tendo distribuição restrita aos complexos rupestres de quartzito da Bahia, Goiás, Tocantins e Minas Gerais (ROBINSON, 1999; SEMIR, 1991).

A espécie *Lychnophora salicifolia* Mart. (Vernonieae, Asteraceae) é considerada a espécie tipo do gênero (COILE & JONES, 1981), sendo a de maior distribuição geográfica e a mais polimórfica de *Lychnophora* sp. (SEMIR, 1991). Essa espécie tem ocorrência na Bahia, em Minas Gerais e em Goiás, crescendo em declives secos de rochas de arenito e quartzito, sobre o campo rupestre aberto (COILE & JONES, 1981). É caracterizada por um grande polimorfismo, sendo que Coile & Jones (1981) a consideraram como sinônimos de: *L. hakeaefolia*, *L. urbaniana*, *L. arrojadoana*, *L. luetzelburgii*, *L. lanigera* e *L. columnnares*. Esses autores também a classificaram como sendo a mesma espécie que *L. martiana* o que não foi aceito pela revisão taxonômica feita por Semir (1991). Outras espécies com as quais pode ser confundida são *L. diamantinana* e *L. villosissima* sendo muito parecidas (SEMIR, 1991).

L. salicifolia apresenta-se como arvoreta ou arbusto candelabrifforme, caracterizada pela presença de um ramo principal ou primário do qual emergem vários ramos secundários. Os ramos são posteriormente arqueados e com os ápices voltados para o topo, lembrando um candelabro ou um guarda-chuva invertido (SEMIR, 1991). Essa espécie pode variar de altura entre 1,5 a 2,5 m quando adulta. É caracterizada por apresentar folhas longas, com lâminas sésseis e coriáceas, além de inflorescências formadas por glomérulos hemisféricos simples. O número de flores por capítulo varia de quatro a nove e sua coloração vai do magenta ao lilás

(SEMIR, 1991) e a floração e frutificação ocorrem de outubro a maio, mas ocasionalmente podem se estender por todo o ano (COILE & JONES, 1981).

Figura 3. Fotos de indivíduos da espécie *Lychnophora salicifolia* em seu habitat natural (fotos: Norberto Peporine Lopes e Leonardo Gobbo Neto).

L. salicifolia, conhecida popularmente como arnicão, está incluída na lista de espécies aromáticas e medicinais do Cerrado com alta prioridade para coleção de germoplasma e conservação (VIEIRA, 1999), e entre seus usos etnobotânicos mais frequentes, destaca-se a ação anti-inflamatória e analgésica. Esse emprego, similar ao observado para a falsa arnica ou arnica da serra (*Lychnophora ericoides* Mart.), tem estimulado alguns estudos fitoquímicos (tabela 1) e farmacológicos, sendo relatada a ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, além de propriedades antifúngicas, incluindo contra *Candida albicans* (MIGUEL et al., 1996) além de também ter sido relatado que extratos de folhas e inflorescências apresentam ação tripanocida (JORDÃO et al., 2003).

Tabela 1. Substâncias já relatadas na espécie *Lychnophora salicifolia* e suas respectivas referências.

Substância	Referência
apigenina	KING, 1986
luteolina	KING, 1986
chrisoeriol	KING, 1986
luteolina 7,4'-dimetiléter	KING, 1986
luteolina 7,3'-dimetiléter	KING, 1986
luteolina 3',4',7'-trimetiléter	KING, 1986
quercetina 3-metiléter	KING, 1986
quercetina-3,3'-di-metiléter	KING, 1986
quercetina-3,7-di-metiléter	KING, 1986
quercetina-3,7,3'-di-metiléter	KING, 1986
quercetina-3,7,3',4'-tetra-metiléter	KING, 1986
luteolina 7- <i>O</i> -glicosídeo	KING, 1986
luteolina 7- <i>O</i> -diglicosídeo	KING, 1986
chrisoeriol 7- <i>O</i> -glicosídeo	KING, 1986
kaempferol 3- <i>O</i> -glicosídeo	KING, 1986
quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo	KING, 1986
quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	KING, 1986
quercetina 3- <i>O</i> -arabinose	KING, 1986
quercetina 3-metiléter 7- <i>O</i> -galactosídeo	KING, 1986
isorhamnetina 3- <i>O</i> -rhamnosídeo	KING, 1986
isorhamnetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	KING, 1986
Isorhamnetina 3- <i>O</i> -glicosídeo	KING, 1986
apigenina 3- <i>C</i> -glicosídeo	KING, 1986
apigenina 8- <i>C</i> -glicosídeo	KING, 1986
apigenina 6,8- <i>C</i> -di-glicosídeo	KING, 1986
luteolina 8- <i>C</i> -glicosídeo	KING, 1986
diosmetina 6- <i>C</i> -glicosídeo	KING, 1986
kaempferol (<i>p</i> -coumaroil) glicosídeo	KING, 1986
kaempferol 3-acil glicosídeo	KING, 1986

diidroflavonol	KING, 1986
ácido 15-óico-cariofilênico	BOHLMANN et al., 1980
trideca-1,11-dieno-3,5,9-pentain-1-eno	BOHLMANN et al., 1980
trideca-1,11-dieno-3,5,9-pentain-1-tetraíno	BOHLMANN et al., 1980
ácido 5,6-diidrocariofilen-15-óico	BOHLMANN et al., 1980
lupe-12-en-3-beta-ol	BOHLMANN et al., 1980
ácido 5,6-diidro-15-hidro-cariofilênico	BOHLMANN et al., 1980
5-β-6-α-epóxi-cariofilênico	BOHLMANN et al., 1980
5-β-6-α-epóxi-custonolido	BOHLMANN et al., 1980
5-β-6-α-epóxi-eremantina	BOHLMANN et al., 1983
lychnosalicifolido	BOHLMANN et al., 1983
2-epi-salicifolido	BOHLMANN et al., 1980
acetato de taraxasterila	BOHLMANN et al., 1980
β-amirina	BOHLMANN et al., 1980
acetato de β-amirina	BOHLMANN et al., 1980

Considerando o número de sinonímias descritas para essa espécie, além da variabilidade química descrita na tabela 1, fica claro a necessidade de estudos mais detalhados sobre essa espécie para colaborar não somente com os conhecimentos focados em seus usos populares, como também na tentativa de auxiliar nos estudos quimiosistemáticos.

Considerando ainda, que inúmeros fatores podem levar à variação no conteúdo de metabólitos secundários, reforça-se a necessidade do planejamento de estudos visando detectar essas variações, principalmente quanto ao local de coleta, estabelecendo parâmetros adequados para a obtenção da matéria prima vegetal com concentrações desejáveis dos metabólitos de interesse. Além de que, estudos sobre o conteúdo de metabólitos secundários também podem auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente.

2. OBJETIVOS

Considerando a carência e importância de estudos sobre a flora do Cerrado brasileiro, além da amplitude da família Asteraceae e do uso popular da espécie *L. salicifolia*, este trabalho teve por objetivo verificar nessa espécie, a existência (ou ausência) de variação interpopulacional e intraespecífica na produção dos metabólitos secundários polares majoritários, com as seguintes ações:

- Desenvolvimento e validação de uma metodologia para análise do extrato polar bruto de diferentes populações de *L. salicifolia* por CLAE-DAD,
- Identificação dos metabólitos secundários de alta e média polaridade presentes nos extratos obtidos a partir das folhas,
- Verificar a existência de possíveis quimiotipos e correlacionar a presença de variação na constituição química com o local de coleta da planta.

5. CONCLUSÕES

Com o trabalho realizado foi possível concluir que a metodologia analítica por CLAE-DAD é seletiva para os diferentes metabólitos encontrados em todas as populações estudadas, sendo possível identificar 20 substâncias presentes no extrato polar obtido a partir das folhas moídas de *L. salicifolia*: ácido protocatecuico; ácido 3-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 4-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 4-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 5-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 5-*O*-feruloilquínico; vicenina-2 (6,8-di-*C-β*-glcosilapigenina); ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3-*O*-cumaroil 5-*O-p*-cafeoilquínico; ácido 3-*O*-cafeoil, 5-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 4-feruloil-5-*O-E*-cafeoilquínico; ácido 3,4 di-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 3,5 di-*O-p*-cumaroilquínico; ácido 4,5 di-*O-p*-cumaroilquínico; ácido lychnofólico e o ácido 2-*O*-acetil lychnofólico.

Dentre as substâncias identificadas, foram utilizadas na validação da metodologia analítica uma pertencente a cada classe de compostos, no caso: ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico, vicenina-2 e o ácido 2-*O*-acetil lychnofólico. Sendo que a validação do método analítico garantiu a confiabilidade dos resultados e a credibilidade do método para os propósitos deste estudo, abrangendo a faixa de concentração necessária para as análises de variação populacional, além apresentar valores de limites de detecção e limites de quantificação, precisão e recuperação adequados.

Quanto à análise intrapopulacional, podemos concluir que há variabilidade quantitativa entre indivíduos da mesma população, porém, em média os indivíduos pertencentes à mesma população são parecidos quimicamente. Já em relação ao estudo da variação populacional, concluímos que há diferenças tanto quanti como qualitativas entre populações coletadas em regiões distintas do Brasil, sendo que a partir da análise estatística, conclui-se que existe correlação entre isolamento geográfico e diminuição da semelhança do perfil de metabólitos polares entre as plantas de populações diferentes sendo indicado que o padrão encontrado para concentração dos metabólitos é influenciado pela distribuição geográfica das amostras. Todavia, não é possível determinar a localização das amostras unicamente pelas variáveis metabólicas estudadas. Assim, a presença dos metabólitos é influenciada pela distribuição geográfica das amostras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Brasília, DF, 2003.

BEGON, M., TOWNSEND, C.R., HARPER, J.L. **Ecology, from individuals to ecosystems**. Ed. Blackwell, 4^a ed, p. 94, 2006.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. A new type of sesquiterpene lactone from *Lychnophora salicifolia*. **Liebigs Annalen der Chemie**. v. 8 p. 1455-1458, 1983.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R.M. Naturally occurring terpene derivatives. Part. 283. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**. v.19, p.2381-2385, 1980.

BOWERS, M.D.; STAMP, N.E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**. v.74, n.6, p.1778-1791, 1993.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. n.56, p. 317–333, 1998.

BREMER, K. **Asteraceae – Cladistics & Classification**. Timber Press, Portland, p.752, 1994.

CALABRIA, L.M., EMERENCIANO, V.P., SCOTTI, M.T., MABRY, T.J., Secondary Chemistry of Compositae. In: FUNK, V.A., SUSANNA, A., STUESSY, T.F., BAYER, R.J. (eds). **Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae**. cap 5. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009.

CASTRO, A.A.J.F.; MARTINS, F.R. TAMASHIRO, J.Y. SHEPHERD, G.J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? **Annals of Missouri Botanical Garden**. v.86, n.1, p.192-203, 1999.

CECH, N.B.; ENKE, C.G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**. v.20, p.362-387, 2001.

CLIFFORD, M.N.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N.; ROOZENDAAL, H.; SALGADO, P.R. LC-MS analysis of the *cis* isomers of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.106, p.379-385, 2008.

CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyldimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, p.1957-1969, 2006.

CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.3821-3832, 2005.

CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.80, p.1033-1043, 2000.

COILE, N. C.; JONES, S. B. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus endemic to the Brazilian planalto. **Brittonia**. v.33, n.4, p.528-542, 1981.

CORDELL, G.A.; SHIN, Y.G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. **Pure and Applied Chemistry**. v.71, p.1089- 1094, 1999.

CROTTI, A.E.M.; CAROLLO, C.A.; GOOBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. LC-hyphenated techniques: use in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. In:TAFT CA. **Modern Technology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala, Índia: Reaserch Signpost, p.99-101, 2006a.

CROTTI, A.E.M; VESSECCHI, R.L.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por electrospray: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias de baixo peso molecular. **Química Nova**. v.29, p.287-292, 2006b.

CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry**. v.40, p.1030-1034, 2005.

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

CUICKENS, F.; MA Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAYES, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analysis**. v.28, p.888-895, 2000.

DARROW, K.; BOWERS, M.D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v.25, n.1, p.1-11, 1997.

DESJARDINS, A. E. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, p.7587–7592, 2008.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: Pinto, M.N. (org) **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Ed. da UNB, p.17-73, 1994.

EMERENCIANO, V.P.; MILITÃO, J.S.L.T.; CAMPOS, C.C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M.A.C.; ZAMBON, M.; BRANT, A.J.C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.29, p.947-957, 2001.

EVANS, W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy. WB Saunders Company, London, 14 ed., p.612, 1996.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, FENN, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**. v. 246, p. 64-71, 1989.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. 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**. v.56, p.1193-1204, 2008.

GOBBO-NETO, L. Emprego de técnicas hífenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2007.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GRAEL, C.F.F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**. v.76, p.73-82, 2005.

JAMIESON, M.A.; BOWERS, D.M. Iridoid glycoside variation in the invasive plant dalmatian toadflax, *Linaria dalmatica* (Plantaginaceae), and sequestration by the biological control agent, *Calophasia lúnula*. **Journal of Chemical Ecology**. v.36, p.70–79, 2010.

JORDÃO, C.O.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L.C. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Phytotherapy Research**. v.18, p.332–334, 2003.

KEELEY, S.C.; ROBINSON, H. Vernonieae. In: FUNK, V.A., SUSANNA, A., STUESSY, T.F., BAYER, R.J. (eds). **Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae**, cap 28. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009.

KING, B.L.; Systematic survey of the leaf flavonoids of *Lychnophora* (Asteraceae, Vernonieae). **Systematic Botany**. v.11, p.403-415, 1986.

KLINK, C.A. Relação entre o desenvolvimento agrícola e a biodiversidade. **Anais VIII Simpósio sobre o Cerrado**, 1st International Symposium on Tropical Savanas – Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos cerrados. EMBRAPA CPAC. Brasília, 1996.

LAITINEN, M.L., TIITTO R.J., ROUSI, M. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. **Journal of Chemical Ecology**. v.26, n.7, p.1609-1622, 2000.

LIANG Z, JIANG Z, HO H, ZHAO Z. Comparative analysis of *Oldenlandia diffusa* and its substitutes by high performance liquid chromatographic fingerprint and mass spectrometric analysis. **Planta Medica**. v.73, p.1502–1508, 2007.

LINDROTH, R.L.; HSIA, M.T.S.; SCRIBER, J.M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.15, n.6, p.681- 686, 1987.

MA, Y. L., CUYCKENS, F., HEUVEL, V., CLAEYS, M. Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric *O*-diglycosyl flavonoids. **Phytochemical Analysis**. v.12, p.159–165, 2001.

MA, Y. L., LI, Q. M., HEUVEL, V., CLAEYS, M. Characterisation of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v.11, p.1357-1364, 1997.

MABRY, T.J. The chemistry of geographical races. **Pure and Applied Chemistry**. v.34, p.377-400, 1973.

MACHADO, R.B.; RAMOS-NETO, M.B.; PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E.F.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; STEININGER, E.M. Estimativas de perda da área do Cerrado Brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF. 2004.

MANLY, B.J.F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**. 3rd edn, Artmed Bookman, Porto Alegre, 2008.

MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F. et. al., Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**. v.10, p.694-696, 1996.

MITTERMEYER, R.A.; MYERS, N.; MITTERMEIER, C.G. Hotspots earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. **CEMEX conservation international**, 1999.

MORAES, L. S., TOMAZ, J. C., LOPES, N. P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for determination of the anti-inflammatory compound vicianin-2 in the leaves of *L. ericoides* Mart. **Biomedical Chromatography**. v.21, p.925–930, 2007.

MYERS, N.; MITTERMEYER, R.A.; MITTERMEIER, C.G. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v.403, p.853-858, 2000.

NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication for standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**. v.1002, p.111-136, 2003.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and Biochemical activity. *Nutrition Research*, v.18, p. 1995–2018, 1998.

PIVATTO, M.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, N.P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JR., C.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 6B, p.1431-1438, 2005.

RATTER, J.E.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**. v.80, p.223-230, 1997.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C. S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitosionomias do bioma Cerrado. In: S.M. Sano, S. P. Almeida (Eds.) **Cerrado: Ambiente e Flora. Embrapa, CPAC**, Planaltina, p.89-166. 1998.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 3a.Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 470 p. 1993.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of american Vernonieae. **Smithsonian contributions to Botany**. n.89, p.116, 1999.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae, Compositae)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 1991.

SHAHIDI, F., CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochemistry Reviews**. n. 9 p.147–170, 2010.

SIMON, M.F; GREYER, R.; QUEIROZ, L.P. SKEMA, C.; PENNINGTON, R.T.; HUGHES, C.E. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **PNAS**, v. 106 , n. 48, p. 20359–20364, 2009.

STEEVENS, J.F.; WOLLENWEBER, E.; IVVANCIC, M.; HSU, V.L.; SUNDBERG, S.; DEINZER, M.L. Leaf surface flavonoids of *Chrysomthamnus*. **Phytochemistry**. v.51, p.771-780, 1999.

VESSECCHI, R.; CROTTI, A.E.M.; GUARATINI, T.; COLEPICCOLO, P.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N.P. Radical ion generation processes of organic compounds in electrospray ionization mass spectrometry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**. v. 4, p.75-87, 2007.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In.: JANICK, J. (ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press, Alexandria, VA. p.152-159, 1999.

WARIDEL, P., WOLFENDER, J. L., NDJOKO, K., KIRSTEN, HOBBY, K. R., MAJOR, H. J., HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**. v.26, p.29–41, 2001.

WILSON, I.D.; BRINKMAN, U.A.T. Hyphenation and hypernation. The practice and prospects of multiple hyphenation. **Journal of Chromatography A**. v.1000, p.325-356, 2003.

WILSON, I.D.; BRINKMAN, U.A.T. Hype and hypernation: multiple hyphenation of column liquid chromatography and spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**. v.26, p.847–54, 2007.

WILT, F.M.; GEDDES, J.D.; TAMMA, R.V.; MILLER, G.C.; EVERETT, R.L. Interspecific variation of phenolic concentrations in persistent leaves among six taxa from subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v.20, n.1, p.41-52, 1992.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **TAG Theoretical and Applied Genetics**. v. 75, n. 2, p. 225-233, 1988.

WOLFENDER, J.L. HPLC in natural product analysis: The detection issue. **Planta Medica**. v.75, p.719–734, 2009.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v. 50, p. 115- 133, 2001.