**“Análise de variação populacional e caracterização dos
metabólitos secundários presentes nas folhas de
Lychnophora granmongolense (Duarte) Semir & Leitão Filho”**

LEANDRO DE SANTIS FERREIRA

“Análise de variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários
presentes nas folhas de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho”

Resumo

FERREIRA, L. S. **Análise de variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho.** 2010. 114f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Uma das principais características da família Asteraceae é sua capacidade de produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários que podem possuir efeitos terapêuticos ou tóxicos. Para verificar a existência de variações inter e intrapopulacionais na sua composição metabólica secundária de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho e caracterização desses metabólitos foi desenvolvida uma metodologia analítica em CLAE – DAD. Essa metodologia permitiu a identificação de três compostos, vicenina-2, quercetina e pinocembrina, através da coinjeção de padrões, ou seja, pela comparação do tempo de retenção com padrões previamente isolados associados com os dados do espectro no UV. Com a utilização da técnica de espectrometria de massas, CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, foram identificadas quatro lactonas sesquiterpênicas (LST), centraterina, 4,5-di-idrocentraterina, lychnofolido e 15–desoxigoyazensolido. No estudo de variação populacional, os resultados indicaram grandes variações quantitativas e qualitativas tanto inter quanto intrapopulacionais para os metabólitos de alta e média polaridade. A análise dos metabólitos mais apolares presentes nas folhas permitiu a identificação de 8 triterpenos e 8 triterpenos acetilados. Contudo, esses metabólitos apresentam somente pequena variação que não é significativa. Assim, esse estudo contribuiu para o aumento do conhecimento sobre o ritmo metabólico dessa espécie.

Palavras-Chave: *Lychnophora granmongolense*, metabólitos secundários, variação populacional, técnicas hifenadas, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides.

Introdução

Uma das principais características da família Asteraceae, uma das maiores do reino vegetal com cerca de 1535 gêneros e 23000 espécies conhecidas, é a sua elevada capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com grande diversidade estrutural (BREMER, 1994). Os principais metabólitos reportados pertencem às classes dos poliacetilenos, flavonoides, cumarinas e terpenoides (HEYWOOD *et al.*, 1977; ZDERO; BOHLMANN, 1990). Dentro dos terpenoides, cabe realçar a ocorrência das lactonas sesquiterpênicas (LST) presentes em quase todas as 17 tribos, as quais apresentam diferentes atividades biológicas e são consideradas marcadores quimiotaxonômicos (PICMAN, 1986; RODRIGUEZ *et al.*, 1976; SCHMIDT, 1999).

Os marcadores quimiotaxonômicos podem ser definidos como sendo as micromoléculas, na maioria das vezes os metabólitos secundários, ou até mesmo em alguns casos primários, que permitem a observação de diferença entre indivíduos em qualquer nível hierárquico (BRANT, 2003). Assim, a identificação quimiotaxonômica nada mais é do que, por exemplo, a identificação de um espécimen como sendo pertencente a uma espécie devido às suas características químicas de metabolismo. Portanto, quando esses metabólitos forem característicos de um grupo de plantas (podendo ser uma família, gênero ou mesmo tribo) podem ser utilizados para identificação quimiotaxonômica. Recentemente, esses marcadores tem sido utilizados como marcadores de ritmo metabólico de um determinado grupo vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Como o ritmo metabólico é susceptível a variações, alguns estudos tentam relacionar e principalmente entender a influência de determinados fatores sobre a produção de metabólitos secundários em nível qualitativo ou no balanço de ausência e presença. Normalmente, estes fatores atuam concomitantemente na natureza, sendo difícil monitorar seu efeito isoladamente. Os principais fatores que influenciam o metabolismo secundário vegetal são a altitude; a temperatura; a disponibilidade de água, macronutrientes e micronutrientes; a idade; a herbivoria e o ataque de patógenos; a composição atmosférica naquele ambiente; a radiação ultravioleta (UV); o índice pluviométrico; o ritmo circadiano; e a sazonalidade (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A ação concomitante dos fatores interferentes resulta em uma variação populacional, ou seja, indivíduos de uma mesma espécie possuem diferenças, mesmo que não exteriorizadas, quanto à sua constituição química. Estas diferenças podem ser observadas entre populações diferentes ou às vezes até mesmo entre indivíduos dentro de uma mesma população. Estas variações são classificadas como inter e intrapopulacionais, respectivamente, e podem ser verificadas nas diferentes populações em diferentes espécies de plantas. Logo, o conceito de população utilizado é aquele, que define como população, um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie que habitam o mesmo local o que permite um fluxo gênico entre esses indivíduos (AZEVEDO, 2004).

A existência de variações populacionais em várias espécies leva à percepção de uma característica evidente desses indivíduos, ou seja, apesar dos fenótipos serem semelhantes os seus genótipos são diferentes. Essas são as características das populações quimicamente distintas que definem as raças químicas ou quimiotipos. Assim sendo, apesar de idênticas na aparência externa, diferem em seus constituintes químicos. Logo, essas variações químicas geneticamente controladas influenciam e afetam diretamente o nível dos metabólitos secundários. Entretanto, é importante ressaltar que o conceito de raça química é distinto do conceito de polimorfismo local que é resultante de variações induzidas por fatores externos e que também podem levar a variações no metabolismo (EVANS, 1996).

Assim, sendo observada essa diferença de conceitos, ainda pode ser sugerido que nos casos em que são relatadas raças químicas bem definidas, elas deveriam ser tratadas como taxa intra-específica (MABRY, 1973). Neste âmbito, a procura por um conjunto de caracteres taxonômicos que auxiliem na definição de taxa complexos e na determinação de quimiotipos pode ser complementada por resultados de estudos de variação na produção de metabólitos secundários em determinada planta caso essas análises revelem que as substâncias estudadas são úteis como marcadores químicos. Logo, é demonstrada a importância do estudo de substâncias que podem ser características de um nível hierárquico (família, gênero, espécie, tribo, etc.) as quais permitem diferenciar aquele conjunto de plantas das demais presentes em um mesmo nível, como, por exemplo, diferenciar duas tribos dentro de uma mesma família (BRANT, 2003; MABRY, 1973; WILT *et al.*, 1992).

Alguns exemplos de classes de metabólitos secundários de Asteraceae que têm se demonstrado confiáveis como caracteres quimiosistemáticos, metabólitos

característicos que permitem a classificação do indivíduo, são os flavonoides (EMERENCIANO *et al.*, 2001; FIASSON *et al.*, 1991), ácidos fenólicos (MAÑEZ *et al.*, 1994) e as LST (SEAMAN, 1982; ZDERO; BOHLMANN, 1990). Todavia, há padrões de metabólitos secundários similares e às vezes idênticos em espécies fortemente correlatas ou entre populações de uma espécie. Nesses casos, para a discriminação de taxas e quimiotipos, os estudos quimio sistemáticos quantitativos podem ser úteis e fornecer parâmetros adicionais. Os pré-requisitos para o uso de dados de estudos fitoquímicos para a distinção entre taxas são: a) o grau de variação química entre diferentes populações de um táxon em qualquer ambiente; b) a variação entre indivíduos dentro de uma população; c) diferenças no conteúdo de uma dada substância durante o período de crescimento e no decorrer do ano; d) variações entre populações crescendo em diferentes ambientes ecológicos (ZIDORN; STUPPNER, 2001).

Dentro da família Asteraceae, há uma tribo pantropical, Vernonieae, que é amplamente estudada no Brasil, pois o país é seu principal local de ocorrência (BREMER, 1994; SEMIR, 1991). Compreendida nessa tribo, a espécie *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho possui distribuição concentrada nos estados da Bahia e Minas Gerais (AZEVEDO, 2004) onde também é conhecida como arnica da serra. Entretanto, as freqüentes alterações de reclassificação o que modifica drasticamente o número de espécies do gênero (ROBINSON, 1999; SEMIR, 1991), evidenciam a complexidade em relação à sua taxonomia e corroboram com a possível contribuição de estudos fitoquímicos nessa área.

Os metabólitos secundários característicos desta subtribo são as LST (principalmente do tipo furanoelíngolido) e os flavonoides, contudo outros metabólitos tem sido reportado como derivados do ácido clorogênico e lignanas. A estes metabólitos secundários já foram atribuídas inúmeras atividades farmacológicas como antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica e tripanocida (CHIARI *et al.*, 1996; GOBBO-NETO, 2005; GRAEL *et al.*, 2000; JORDÃO *et al.*, 1997; KANASHIRO *et al.*, 2004; MIGUEL *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 1996; SANTOS, 2005).

Essa variedade de atividades demonstra o potencial deste gênero para a descoberta de novas substâncias e novas atividades biológicas. Mesmo assim, o seu uso ainda se restringe à medicina popular, principalmente nas formas de extratos hidroalcoólicos e pó vegetal (BORELLA *et al.*, 1998; SAKAMOTO *et al.*,

2003), pois não há nenhum tipo de medicamento comercializado que utilize algum composto obtido a partir de alguma espécie desse gênero ou que seja um fitoterápico.

Para a espécie *L. granmongolense*, figura 1, foram relatados o acúmulo de flavonoides e LST. Esses compostos, figura 2, foram isolados a partir do extrato em acetato de etila das partes aéreas e as substâncias descritas foram: eriodictiol 7,3'-dimetil éter; ramnazina; velutina; homoeriodictiol; di-idroisoramnetina; crisoeriol; eriodictiol; centraterina; lychnoforolido B; e goyazensolido (GRAEL *et al.*, 2000). Apesar de seu uso, até hoje somente dois estudos foram realizados sobre essa espécie para a verificação de sua ação farmacológica como analgésico (GRAEL *et al.*, 2000) e inibidor da geração de espécies reativas de oxigênio (KANASHIRO *et al.*, 2004). Mesmo não sendo relacionadas com o uso popular para o tratamento de doenças inflamatórias, estas atividades, previamente estudadas, incentivam a investigação de outras possíveis atividades farmacológicas ou tóxicas desta espécie.

Figura 1 – Foto de indivíduo da espécie *L. granmongolense*.

Figura 2 – Substâncias que já foram isoladas a partir do extrato de acetato de etila de *L. granmongolense*

Na área de produtos naturais, o processo clássico de isolamento e posterior elucidação estrutural, para espécies já estudadas, com certeza, é menos vantajoso, principalmente em relação ao tempo e quantidade de solvente utilizado quando comparado as análises de extratos ou frações por técnicas acopladas. Esse processo de acoplamento de um sistema de separação cromatográfica a um detector espectroscópico ou espectrométrico visando à obtenção de informações estruturais de metabólitos de interesse e conhecidos vêm sendo denominadas recentemente como “técnicas hifenadas” (HARVEY, 2007).

Os protocolos para desreplicação geralmente combinam uma técnica para fracionamento da mistura complexa, bioensaios para verificação da atividade biológica, técnicas espectroscópicas para caracterização dos produtos isolados, e pesquisa em base de dados para verificação de quais compostos são já reportados na literatura (KONISHI *et al.*, 2007). Os primeiros avanços na análise de misturas complexas ocorreram com o acoplamento do espectrômetro de massas (EM) no aparelho de cromatografia gasosa (CG). Para a cromatografia líquida (CL) os primeiros detectores a integrarem os sistemas hifenados ou de simples detecção foram o ultravioleta (UV). Todavia, essas técnicas apresentavam como limitação a análise de pequenas moléculas em misturas não muito complexas e que volatilizavam, ou apresentavam cromóforo, entre outros (CROTTI *et al.*, 2006).

Apesar do fator limitante de existência de um cromóforo único para diferentes metabólitos para propiciar a detecção em UV fixo, o desenvolvimento de detectores de arranjo de diodos (DAD- *diode array detector*, ou PDA - *photo diode array*) estimulou o desenvolvimento de análises de misturas complexas por CL hifenada. Nas técnicas hifenadas envolvendo espectrometria de massas, o espectrômetro de massas é acoplado em linha com um método de separação (CLAE, eletroforese capilar, fluido supercrítico, etc.). Após o processo de separação, o eluente é dividido por um *splitter* (divisor de fluxo) localizado no final da coluna, direcionando parte do eluente para a ionização do espectrômetro de massas e a outra parte pode ser direcionada a outro tipo de detector, como o DAD (CROTTI *et al.*, 2006).

Assim, uma ampla informação estrutural pode ser rapidamente fornecida em uma triagem química utilizando técnicas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-RMN, resultando, em muitos casos, na identificação inequívoca, de compostos *on-line*, o que auxilia na racionalização dos estudos de fitoquímica (WILSON; BRINKMAN, 2003). Logo, essas técnicas viabilizam uma triagem química ou a

determinação do perfil metabólico de extratos de produtos naturais de maneira rápida e confiável através da distinção entre compostos previamente isolados e novas moléculas, diretamente a partir de extratos vegetais brutos (KONISHI *et al.*, 2007).

Com o exposto nos parágrafos anteriores, fica claro que a combinação dos procedimentos analíticos hifenados é uma poderosa ferramenta para os estudos de ritmo metabólico e permite uma maior rapidez e detalhamento das análises essenciais para os estudos da fisiologia de espécies nativas.

Conclusões

A utilização de técnicas hifenadas evitou a necessidade de um estudo fitoquímico clássico das folhas de *L. granmongolense*. Três metabólitos secundários dessa espécie, vicianina-2, quercetina e pinocembrina, foram identificados pela comparação com padrões do tempo de retenção e espectro no UV. Outras substâncias, pertencentes à classe das LST, tiveram suas estruturas elucidadas através do acoplamento do espectrômetro de massas ao sistema CLAE-DAD. Também foram realizadas análises adicionais por CG-EM da fração mais apolar do extrato de todos os indivíduos de todas as populações. Apesar de não evidenciar nenhuma informação de variação inter ou intrapopulacional, esse estudo forneceu um perfil mais completo dos constituintes do extrato metanólico foliar de *L. granmongolense*. A somatória dessas ações permitiram identificar no final 3 flavonoides, 4 LST, 8 triterpenos e 8 triterpenos acetilados.

O desenvolvimento de metodologia analítica despendeu uma grande parte do tempo de estudo até agora por conter várias etapas e testes. Mesmo assim, após a definição de todos os parâmetros, obteve-se um método satisfatório que foi seletivo tanto para o padrão interno quanto para as amostras e permitiu a análise das amostras destinadas ao estudo de variação populacional.

Apesar do estudo de variação populacional ser semiquantitativo para os metabólitos de média e alta polaridade, os resultados indicaram grandes variações quantitativas e qualitativas tanto inter quanto intrapopulacionais. Dessa forma, um possível estudo deverá ser realizado para saber se há relação quimiotaxonômica entre os indivíduos. Esse é um dado extremamente importante, pois o gênero *Lychnophora* sp. Mart. é muito utilizado na medicina popular e alterações na constituição do extrato pode influenciar diretamente no efeito terapêutico desse tipo de preparação. Além disso, seria interessante também a realização de um estudo genético das plantas utilizadas nesse estudo para compreender melhor as razões das variações encontradas em uma espécie que apresenta pouca variabilidade gênica.

Referências Bibliográficas

AZEVEDO, M. T. A. **Padrões evolutivos em um complexo de espécies de *Lychnophora* Mart. (Asteraceae) endêmico dos campos rupestres.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 111p., 2004.

BRANT, A. J. C. **Flavonoides, Cumarinas e Benzofuranos como marcadores quimiotaxômicos em Asteraceae.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, USP, São Paulo, 182p., 2003.

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

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovilosissima*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 26, p. 671-676, 1998.

CHIARI, E.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. M. S.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B. In vitro screening of Asteraceae plant species against *T. cruzi*. **Phytother. Res.**, v. 10, p. 636-638, 1996.

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. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, nº 8, p. 1030-1034, 2005.

CROTTI, A. E. M.; CAROLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. In: TAFT, C.A. **Modern biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala, Índia: Research Signpost, p.99-141, 2006.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **J. Mass Spectrom.**, v. 39, p.1-15, 2004.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C. Flavonoid as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 29, p. 947- 957, 2001.

EVANS, W.C. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14^a ed. London: W.B.Saunders Company, 612p., 1996.

FIASSON, J. L.; GLUCHOFF-FIASSON, K.; MUGNIER, C.; BARGHI, N.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Flavonoid analysis of European species of the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 19, p. 157- 162, 1991.

GOBBO-NETO L.; SANTOS M. D.; KANASHIRO A., ALMEIDA M. C.; LUCISANO-VALIM Y. M., LOPES J. L. C., SOUZA G. E. P., LOPES N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Med.**, v. 71, nº 1, p. 3-6, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v.30, p.374-381, 2007.

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas 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, 254p., 2007.

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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, nº 4, p. 1193-1204, 2008.

GRAEL, C. F. F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, J. L. C.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W. R. A Study of the Trypanocidal and Analgesic Properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytother. Res.**, v.14, p. 203–206, 2000.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Curr. Opinion Chem. Biol.**, v. 11, p. 480–484, 2007.

HEYWOOD, V. A.; HARBONE, J. B.; TURNER, B. L. **The Biology and Chemistry of the Compositae.** London: Acad. Press, v. I e II, 1977.

JORDÃO, C. O.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W. Biological activity of the crude extracts and isolated substances from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Bolletino Chim. Farm.**, v. 136, n.2, p. 56, 1997.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytother. Res.*, v. 18, n.1, p. 61-65, 2004.

KONISHI Y, KİYOTA T, DRAGHICI C, GAO J-M, YEBOAH F, ACOCA S, JARUSSOPHON S, PURISMA E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to facilitate dereplication of natural products. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 1187-1197, 2007.

MABRY, T. J. The chemistry of geographical races. **Pure Appl. Chem.**, v. 34, p. 337-400, 1973.

MAÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; SANZ, M. J.; TERCENCIO, M. C.; PERIS, J. B.; STUBING, G.; RIOS, J. L. A chemotaxonomy review of the subtribe *Crepidinae* based on its phenolic constituents. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 22, p. 297- 305, 1994.

MIGUEL, O. G.; LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, S. T. A.; MONACHE, F. D.; BELLA CRUZ, A.; BELLA CRUZ, R. C.; CHECHINEL FILHO, V. Antimicrobial

activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytother. Res.**, v. 10, n. 8, 1996.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytother. Res.**, v. 10, n. 4, p. 292-295, 1996.

OWEN, R. W.; HAUBNER, R.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; HABER, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1727–1738, 2003.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 1986.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of american Vernonieae. **Smiths. Contrib. Bot.**, n. 89, 116 p., 1999.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1573- 1580, 1976.

SAKAMOTO, H. T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E. E.; STARK, C. B. W.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 693- 695, 2003.

SANTOS, M. D.; GOBBO-NETTO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of dicaffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 545-549, 2005.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Curr. Org. Chem.**, v. 3, p. 577- 608, 1999.

SEAMAN F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in Asteraceae. **Bot. Rev.**, v. 48, n. 2, 1982.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de Lychnophora Mart. (Vernonieae, Compositae)**. Tese de doutorado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 515p., 1991.

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

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). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 20, n. 1, p. 41- 52, 1992.

ZDERO, C.; BOHLLMAN, F. Systemaics and evolution within the Compositeae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Syst. Evol.**, v. 171, p. 1-14, 1990.

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