



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Maria Elvira Poleti Martucci

**Ribeirão Preto
2016**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Martucci, Maria Elvira Poleti

Metabolômica e *screening* de interações ecoquímicas de plantas da subtribo Lychnophorinae (Asteraceae). Ribeirão Preto, 2016. 155 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Gobbo Neto, Leonardo.

1. Asteraceae. 2. Lychnophorinae. 3. Metabolômica. 4. LC-MS. 5. GC-MS. 6. Espectrometria de massas. 7. Interações inseto-planta

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Elvira Poleti Martucci
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(a): Prof. Dr. Leonardo
Gobbo Neto

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha família pelo apoio incansável desde sempre.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto pela paciência e compreensão durante toda orientação e, principalmente, pelo conhecimento e experiência generosamente compartilhados. Agradeço ainda pela liberdade, apoio e incentivo em todas as escolhas feitas.

A todos os companheiros do NPPNS, alunos, professores, funcionários e técnicos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho. Em especial, agradeço a Izabel Cristina Casanova Turatti, Jacqueline Nacau Mendonça e José Carlos Tomaz pelo apoio, disposição e, principalmente, pela paciência com a qual sempre me ajudaram.

Aos companheiros de todos os dias, Camila Godinho, Daniel Pavarini, Dayana Rubio, Denise Brentan, Eduardo Fernandes, Gabriela Buqui, Ivanildes Vasconcelos, Juliana Neves e Madeleine Ernst pela agradável convivência.

Aos alunos, funcionários e professores do Laboratório de Farmacognosia. Em especial à Daniela Chagas, Danniela Faleiro, Rosana Casoti, Federico Padilha, Anny, Thiago Branquinho e Bruno Sampaio por todo conhecimento compartilhado ao longo destes anos.

À FAPESP pela bolsa concedida (Processo nº 2012/16646-4) e pelo financiamento deste projeto.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento ao projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF), SISBIO e CNPq pelas licenças de coleta; principalmente à equipe do Parque Estadual do Itacolomi pela atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Luiz Elídio Gregório pela infraestrutura durante as coletas em Diamantina.

A toda equipe, alunos e professores do projeto temático “Estudos morfoanatômicos, metabolômicos e moleculares como subsídios a sistemática de espécies de Asteraceae e acesso ao seu potencial farmacológico” – processo FAPESP nº 2010/51454-3 - pelas enriquecedoras discussões. Agradeço em especial ao Dr. Benoit Loeuille e ao Prof. Dr. José Rubens Pirani

pelas amostras fornecidas, viagens para coletas e pela imensa colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Eloisa de Paula, Letícia Nacano, Letícia Nogueira, Leonardo Federico, Milena Junqueira, Rafhaela Cedro e Youssef por serem a minha família em Ribeirão Preto. A vocês, minha eterna gratidão.

À Universidade Federal de Alfenas pelo ensino de qualidade. Agradeço ainda ao Prof. Dr. Flavio Nunes Ramos pela admirável orientação, por ser um exemplo de amor à ciência, e por todo o incentivo durante a iniciação científica. Com toda certeza, grande parte disso tudo devo a você.

A toda equipe do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem pela pronta acolhida. Agradeço principalmente àqueles que me ensinam tanto diariamente e pacientemente: Amanda, Aline, Carina, Daniely, Elisa, Gabriel, Gustavo, Giovani, Juliana, Karina, Mariani, Márcia, Thamara, Vinícius e William.

Agradeço ao Henrique por estar ao meu lado em todos os momentos, pela compreensão na ausência e por trazer tanta alegria para a minha vida.

Agradeço, por fim, à minha família, a base e a razão disso tudo. Muito obrigada, mãe, Malu, tios e primos pela liberdade e respeito às minhas escolhas e, principalmente, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos. Não tenho palavras para expressar minha gratidão e amor por vocês. Muito obrigada! Muito obrigada mesmo!

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.

ABSTRACT

Martucci, M. E. P. **Comprehensive untargeted metabolomics and screening of insect-plant interactions of Lychnophorinae subtribe (Asteraceae: Vernoniae).** 2016. 155f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The subtribe Lychnophorinae occurs in the Cerrado domain of the Brazilian Central Plateau. The relationships among its recognized genera, as well as the relationships between Lychnophorinae and other subtribes belonging in tribe Vernoniae have been recently investigated upon a phylogeny based on molecular and morphological data. In addition, a preliminar overview of insect diversity in Brazilian Cerrado suggests that it may harbor a considerable fraction of the neotropical. We here report the use of a comprehensive untargeted metabolomics approach, combining LC-MS and GC-MS data together, followed by multivariate analyses aiming to assess the congruence between metabolomics data and the phylogenetic hypothesis, as well as its potential as a chemotaxonomic tool. Also we report the use of untargeted metabolomics approach aiming to assess insect-plant interactions. We analyzed 78 species by GC-MS and LC-MS in both positive and negative ionization modes. The metabolic profiles obtained for these species were treated in *MetAlign* and in *MSClust* and the matrices generated were combined and used in SIMCA for hierarchical cluster analyses (HCA), principal component analyses (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA). The insects were collected quarterly and analyzed by the same analytical methods as plants. Results show that metabolomics analyses are mostly congruent with the phylogenetic hypothesis especially at lower taxonomic levels. Therefore, our results suggest that data generated by metabolomics approaches provide valuable evidence for chemotaxonomical studies of Lychnophorinae subtribe, in particular as primary data for phylogenetic reconstruction of lineages as genera. Regarding to insects, it was possible to observe significative correlations between some insects and their host plants. In these samples, were able to identify triterpenes, flavonoids and sesquiterpene lactones.

Keywords: Asteraceae, Lychnophorinae, metabolomics, LC-MS, GC-MS, mass spectrometry, insect-plant interactions.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estruturas químicas dos esqueletos carbônicos básicos dos tipos de lactonas sesquiterpênicas presentes na subtribo Lychnophorinae.....06
- Figura 2** - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de 78 espécies de plantas da subtribo Lychnophorinae analisadas por GC-MS.....34
- Figura 3** - Análise de cluster hierárquico (HCA) dos perfis metabólicos de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae analisadas por GC-MS, considerando a faixa de 170-400 *m/z*.....35
- Figura 4** - Análise de cluster hierárquico (HCA) dos perfis metabólicos de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae analisadas por GC-MS, considerando a faixa de 100-400 *m/z*.....40
- Figura 5** - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de 78 espécies de plantas da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....44
- Figura 6** - Análise de cluster hierárquico (HCA) dos perfis metabólicos de 78 espécies de plantas da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....45
- Figura 7** - Gráfico de loadings da análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) a partir dos quatro grupos observados no PCA dos perfis metabólicos de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....46
- Figura 8** - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) dos perfis metabólicos de 78 espécies de plantas da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....47
- Figura 9** - Substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA e HCA das 78 espécies da subtribo Lychnophorinae nas análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF.....50
- Figura 10** - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de espécies do gênero *Lychnophora* utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto53

- Figura 11** - Gráfico de *loadings* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) a partir dos quatro grupos observados no PCA para os perfis metabólicos de espécies do gênero *Lychnophora*.....54
- Figura 12** - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) de espécies do gênero *Lychnophora*.....55
- Figura 13** - Substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Lychnophora* e os dados das análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF...59
- Figura 14** - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de espécies do gênero *Eremanthus* utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto...61
- Figura 15** - Gráfico de *loadings* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) a partir dos quatro grupos observados no PCA para os perfis metabólicos de espécies do gênero *Eremanthus*.....63
- Figura 16** - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) de espécies do gênero *Eremanthus*.....63
- Figura 17** - Compostos presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Eremanthus* e os dados das análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF.....67
- Figura 18** - Identificação dos insetos analisados por GC-MS que apresentaram íons com coeficiente de correlação significativo com os íons da planta hospedeira.....84
- Figura 19** - Identificação dos insetos analisados por UHPLC-UV-MS que apresentaram íons com coeficiente de correlação significativo com os íons da planta hospedeira.....86
- Figura 20** - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) de amostras de plantas que apresentaram correlações significativas com insetos e aquelas em que não foram observadas correlações.....94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros utilizados no *MetAlign*TM para as análises em GC-MS.....28
- Tabela 2** - Parâmetros utilizados no *MetAlign*TM para as análises em UHPLC-UV-MS.....29
- Tabela 3** - Parâmetros utilizados no *MSClust*TM29
- Tabela 4** - Valores de cada componente do modelo para a análise de 78 espécies da subtribo *Lychnophorinae* por GC-MS.....33
- Tabela 5** - Espécies pertencentes aos grupos formados no HCA dos perfis metabólicos das 78 espécies da subtribo *Lychnophorinae* obtidos por GC-MS considerando a faixa de massa de 170 – 400 m/z (Figura 3) e considerando a faixa de massa de 100 – 400 m/z (Figura 4).....39
- Tabela 6** - Valores de cada componente do modelo para a análise de 78 espécies da subtribo *Lychnophorinae* por UHPLC-UV-MS e GC-MS.....41
- Tabela 7** - Espécies da subtribo *Lychnophorinae* pertencentes aos grupos formados no PCA (Figura 5) e no HCA (Figura 6) a partir dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....42
- Tabela 8** - Identificação das substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA e HCA das 78 espécies da subtribo *Lychnophorinae* nas análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF49
- Tabela 9** - Espécies do gênero *Lychnophora* pertencentes aos grupos formados no PCA (Figura 10) a partir dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....51
- Tabela 10** - Identificação das substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Lychnophora* nas análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF.....57
- Tabela 11** - Espécies do gênero *Eremanthus* pertencentes aos grupos formados no PCA (Figura 14) a partir dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.....60

Tabela 12 - Identificação das substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de <i>Eremanthus</i> nas análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF.....	65
Tabela 13 - Marcadores quimiotaxonômicos identificados nas espécies analisadas da subtribo Lychnophorinae.....	77
Tabela 14 - Identificação da ordem dos insetos coletados em espécies de Lychnophorinae.....	81
Tabela 15 - Amostras de insetos analisadas por GC-MS que apresentaram coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$).....	84
Tabela 16 - Amostras de insetos analisadas por UHPLC-UV-MS que apresentaram coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$)...	88
Tabela 17 - Compostos responsáveis pela discriminação das amostras de plantas que apresentaram correlação significativa com as amostras de insetos.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	<i>All ion fragmentation</i>
LST	Lactonas Sesquiterpênicas
PCA	Análise por componentes principais
HCA	Análise por cluster hierárquico
PLS	Análise por mínimos quadrados parciais
PLS-DA	Análise discriminatória por mínimos quadrados parciais
OPLS	Análise por mínimos quadrados parciais ortogonais
OPLS-DA	Análise discriminatória por mínimos quadrados parciais ortogonais
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
UHPLC-UV-MS	Cromatografia líquida de ultra - eficiência com detector de ultravioleta e acoplada à espectrometria de massas
HCD	Dissociação por colisão de alta energia na célula de colisão
VIP	Gráfico de importância das variáveis
<i>Anteremanthus hatschbachii</i>	Aha
<i>Albertinia brasiliensis</i>	Abr
<i>Blanchetia heterotricha</i>	Bhe
<i>Chronopappus bifrons</i>	Cbi
<i>Eremanthus arboreus</i>	Ear

<i>E. argenteus</i>	Ear
<i>E. auriculatus</i>	Eau
<i>E. brevifolius</i>	Ebr
<i>E. capitatus</i>	Eca
<i>E. cinctus</i>	Eci
<i>E. crotonoides</i>	Ecr
<i>E. elaeagnus</i>	Eel
<i>E. erythropappus</i>	Eer
<i>E. glomerulatus</i>	Egl
<i>E. goyazensis</i>	Ego
<i>E. incanus</i>	Ein
<i>E. leucodendron</i>	Ele
<i>E. mattogrossensis</i>	Ema
<i>E. mollis</i>	Emo
<i>E. pabstii</i>	Epa
<i>E. polycephalus</i>	Epo
<i>Eremanthus</i> sp. X	EXPr
<i>Paralychnophora reflexoauriculata</i>	
<i>E. uniflorus</i>	Eun
<i>E. veadeiroensis</i>	Eve
<i>Gorceixia decurrens</i>	Gde
<i>Heterocoma albida</i>	Hal

<i>H. ekmanianum</i>	Hek
<i>H. gracilis</i>	Hgr
<i>H. lanuginosa</i>	Hla
<i>H. robinsoniana</i>	Hro
<i>Hololepis pedunculata</i>	Hop
<i>Lychnophora bishopii</i>	Lbi
<i>L. crispa</i>	Lcr
<i>L. diamantinana</i>	Ldi
<i>L. ericoides</i>	Ler
<i>L. gardneri</i>	Lga
<i>L. granmogolensis</i>	Lgr
<i>L. humillima</i>	Lhu
<i>L. "itacambirensis" sp. ined.</i>	Lit
<i>L. "jolyana" sp. Ined.</i>	Ljo
<i>L. markgravii</i>	Lma
<i>L. mellobarretoi</i>	Lme
<i>L. "mellosilvae" sp. ined</i>	Lmel
<i>L. passerina</i>	Lpa
<i>L. pinaster</i>	Lpi
<i>L. ramosissima</i>	Lra
<i>L. regis</i>	Lre
<i>L. salicifolia</i>	Lsa

<i>L. santosii</i>	Lst
<i>L. sellowii</i>	Lse
<i>L. syncephala</i>	Lsy
<i>L. tomentosa</i>	Lto
<i>L. triflora</i>	Ltr
<i>L. villosissima</i>	Lvi
<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	Lpca
<i>L. damazioi</i>	Lpda
<i>L. hatschbachii</i>	Lpha
<i>Minasia alpestris</i>	Mal
<i>M. cabralensis</i>	Mca
<i>M. "cipoensis" sp. Ined</i>	Mci
<i>M. scapigera</i>	Msc
<i>M. ramosa</i>	Mra
<i>Paralychnophora atkinsiae</i>	Pat
<i>P. bicolor - Pbi</i>	Pbi
<i>P. glaziouana</i>	Pgl
<i>P. harleyi</i>	Pha
<i>P. patriciana</i>	Ppa
<i>P. patriciana X P. bicolor</i>	PpXPb
<i>P. reflexoauriculata</i>	Pre
<i>Piptolepis ericoides</i>	Pie

<i>P. oleaster</i>	Pio
<i>P. monticola</i>	Pim
<i>P. "riparia" sp. ined.</i>	Pir
<i>P. schultzi</i>	Pis
<i>Prestelia eriopus</i>	Prer
<i>Prestelia "robusta" sp. Ined</i>	Prro
<i>Proteopsis argentea</i>	Prar
<i>P. "hermogenesii" sp. ined.</i>	Prhe

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família Asteraceae	1
1.2. Tribo Vernonieae	2
1.3. Subtribo Lychnophorinae	3
1.4. Interações inseto-planta	7
1.5. Metabolômica	11
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Plantas	18
3.2. Insetos	22
3.3. Identificação dos insetos	22
3.4. Equipamentos utilizados	23
3.5. Processamento das amostras foliares	23
3.5.1. Extratos para análise em UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF	23
3.5.2. Extratos para análise em GC-MS	24
3.6. Processamento das amostras de insetos	24
3.6.1. Extratos para análise em UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF	24
3.6.2. Extratos para análise em GC-MS	24
3.7. Método analítico em UHPLC-UV-MS	25
3.8. Método analítico em GC-MS	26
3.9. Processamento dos dados e análises multivariadas	26
3.10. Análise de correlação inseto-planta	30
3.11. Identificação de Substâncias	30
3.11.1. Identificação de substâncias nas análises por UHPLC-UV-MS	30
3.11.2. Identificação de substâncias nas análises por GC-MS	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Análises Metabolômicas	32
4.1.1. Análises metabolômicas por GC-MS	32
4.1.2. Análises metabolômicas por LC-MS e GC-MS em conjunto	41
4.1.2.1. Análises metabolômicas por UHPLC-UV-MS e GC-MS de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae	41

4.1.2.2. Análises metabolômicas por UHPLC-MS e GC-MS de espécies do gênero <i>Lychnophora</i>	51
4.1.2.3. Análises metabolômicas por LC-MS e GC-MS de espécies do gênero <i>Eremanthus</i>	60
4.2. Identificação dos compostos presentes nas espécies da subtribo Lychnophorinae	68
4.2.1. Flavonoides.....	68
4.2.2. Lactonas Sesquiterpênicas	74
4.3. Marcadores quimiotaxonômicos.....	75
4.4. Coleta de insetos	79
4.4. Identificação da ordem dos insetos.....	80
4.5. Análise dos insetos	82
4.5.1. Análise de insetos por GC-MS.....	82
4.5.2. Análises de insetos por UHPLC-UV-MS	86
5. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
APÊNDICES	113
ANEXOS	133

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 Vernoniaeae, 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).

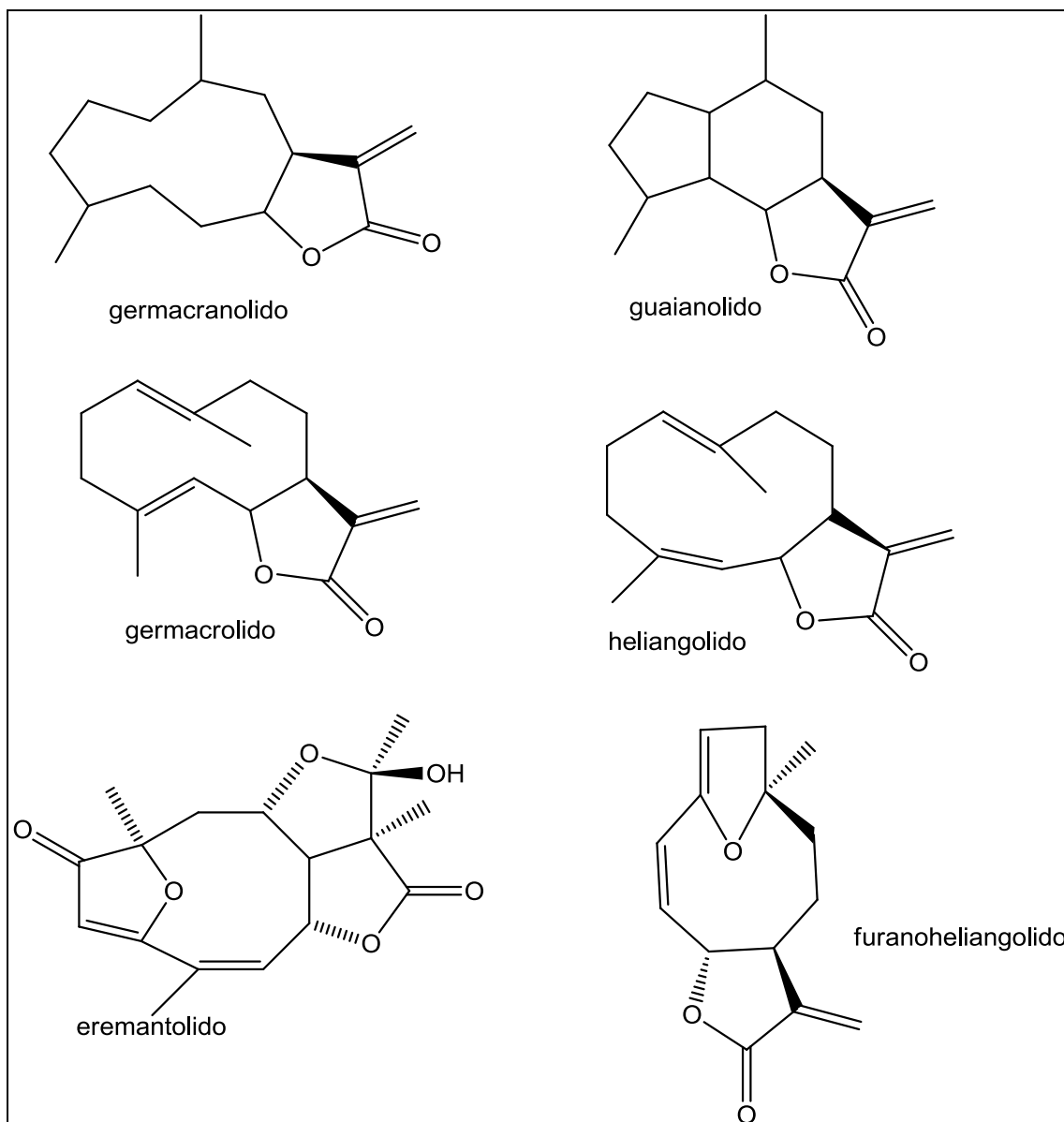


Figura 1 – Estruturas químicas dos esqueletos carbônicos básicos dos tipos de lactonas sesquiterpênicas presentes na subtribo Lychnophorinae

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).

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto de pesquisa foram obter perfis metabólicos por UHPLC-UV-MS e GC-MS 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 alimentam dessas plantas, visando identificar possíveis interações inseto-planta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plantas

As espécies da subtribo Lychnophorinae foram estudadas sob o ponto de vista quimiotaxonômico/metabolômico, visando correlacionar os perfis metabólicos com os estudos filogenéticos. Assim, foram analisadas 78 espécies de plantas pertencentes a 14 gêneros: *Anteremanthus*, *Blanchetia*, *Chronopappus*, *Eremanthus*, *Gorceixia*, *Heterocoma*, *Hololepis*, *Lychnophora*, *Lychnophoriopsis*, *Minasia*, *Paralychnophora*, *Piptolepis*, *Prestelia* e *Proteopsis*. É importante ressaltar que todas as espécies foram coletadas durante o período de floração.

Os vouchers foram depositados nos herbários SPF, UEC, HUEFS e HUFU. Estes vouchers foram depositados sob os seguintes códigos Loeuille et al. 441 (*Anteremanthus hatschbachii* H. Rob, coletado em Grão Mogol, Minas Gerais), Loeuille et al. 394 (*Blanchetia heterotricha* DC, coletado no Morro do Chapéu, Bahia), Loeuille and Albergaria Pena 460 (*Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC, coletado em Catas Altas, Minas Gerais), Loeuille et al. 510 (*Eremanthus arboreus* (Gardner) MacLeish, coletado em Crato, Ceará), Loeuille et al. 839 (*E. argenteus* MacLeish & H. Schumach, coletado em Alto Paraíso, Goiás), Loeuille et al. 836 (*E. auriculatus* MacLeish & H. Schumach, coletado em Alto Paraíso, Goiás), Loeuille et al. 71 (*E. brevifolius* Loeuille sp. Ined, coletado em Congonhas do Norte, Minas Gerais), Loeuille et al. 313 (*E. capitatus* (Spreng.) MacLeish, coletado em Abaíra, Bahia), Loeuille et al. 306 (*E. cinctus* Baker, coletado em Uberlândia, Minas Gerais), Loeuille et al. 25 (*E.*

crotonoides (DC.) Sch.Bip, coletado em Santana do Riacho, Minas Gerais), Loeuille et al. 430 (*E. elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip, coletado em Joaquim Felício, Minas Gerais), Loeuille et al. 51 (*E. erythropappus* (DC.) MacLeish, coletado em Capitólio, Minas Gerais), Loeuille et al. 438 (*E. glomerulatus* Less, coletado em Francisco Sá, Minas Gerais), Loeuille et al. 295 (*E. goyazensis* (Gardner) Sch.Bip, coletado em Pirenópolis, Goiás), Loeuille et al. 344 (*E. incanus* (Less.) Less, coletado em Abaíra, Bahia), Loeuille et al. 347 (*E. leucodendron* Mattf.: Brazil, coletado em Abaíra, Bahia), Loeuille et al. 457 (*E. mattogrossensis* Kuntze, coletado em Diamantino, Bahia), Loeuille et al. 305 (*E. mollis* Sch.Bip, coletado em Pirenópolis, Goiás), Loeuille et al. 833 (*E. pabstii* G.M. Barroso, coletado em Cristalina, Minas Gerais), Loeuille et al. 442 (*E. polycephalus* (DC.) MacLeish, coletado em Grão Mogol, Minas Gerais), Loeuille et al. 419 (*Eremanthus* sp. X *Paralychnophora reflexoauriculata* (G.M. Barroso) MacLeish, coletado em Jacobina, Bahia), Loeuille et al. 840 (*E. uniflorus* MacLeish & H. Schumach, coletado em Alto Paraíso, Goiás), Loeuille et al. 837 (*E. veadeiroensis* H. Rob, coletado em Alto Paraíso, Goiás), Loeuille et al. 821 (*Gorceixia decurrens* Baker, coletado em Leme do Prado, Minas Gerais), Loeuille et al. 450 (*Heterocoma albida* (DC. ex Pers.) DC, coletado em Serro, Minas Gerais), Loeuille et al. 838 (*H. ekmanianum* (Philipson) J.R. Grant, coletado em Alto Paraíso, Goiás), Loeuille et al. 520 (*H. gracilis* Loeuille, J.N. Nakaj. & Semir sp. Ined coletado em São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais), Loeuille et al. 635 (*H. lanuginosa* Glaz. ex Oliv, coletado em Serro, Minas Gerais), Loeuille et al. 266 (*H. robinsoniana* Loeuille, J.N. Nakaj. & Semir sp. Ined, coletado em São Roque de Minas, Minas Gerais), Loeuille et al. 259 (*Hololepis pedunculata* (DC. ex Pers.) DC, coletado em São Roque de Minas,

Minas Gerais), Oliveira 43 - HUEFS (*Lychnophora bishopii* H. Rob, coletado em Mucugê, Bahia), Harley et al. PCD 4427 - HUEFS (*L. crispa* Mattf., coletado em Rio de Contas, Bahia), Loeuille et al. 108 (*L. diamantinana* Coile & S.B. Jones, coletado em Diamantina, Minas Gerais), Loeuille et al. 834 (*L. ericoides* Mart, coletado em Alto Paraíso, Goiás), Loeuille et al. 67 (*L. gardneri* Sch.Bip, coletado em Congonhas do Norte, Minas Gerais), Loeuille et al. 445 (*L. granmogolensis* (Duarte) Semir in D.J.N. Hind, coletado em Cristália, Goiás), Zappi et al. 2325 (*L. humilima* Sch.Bip., coletado em Santana do Pirapama, Minas Gerais), Mello-Silva et al. 3186 (*L. itacambirensis* sp. ined., coletado em Itacambira, Minas Gerais), Loeuille et al. 112 (*L. joliana* sp. Ined, Santana do Riacho, Minas Gerais), Loeuille et al. 440 (*L. markgravii* G.M. Barroso, coletado em Grão Mogol, Minas Gerais), Loeuille et al. 507 (*L. mellobarretoii* G.M. Barroso, coletado em Santana do Riacho, Minas Gerais), Mello-Silva et al. 463 (*L. mellosilvae* sp. Ined, coletado em Mato Verde, Minas Gerais), Loeuille et al. 337 (*L. passerina* (Mart. ex DC.) Gardner, coletado em Abaira, Bahia), Oliveira et al. 471 (*L. pinaster* Mart, coletado em Catas Altas, Minas Gerais), Loeuille et al. 448 (*L. ramosissima* Gardner, coletado em Josenópolis, Minas Gerais), Loeuille et al. 346 (*L. regis* H. Rob., coletado em Abaira, Bahia), Loeuille et al. 841 (*L. salicifolia* Mart., coletado em Alto Paraíso, Goiás), Ferreira et al. 268 - HUEFS (*L. santosii* H. Rob, coletado em Mucugê, Bahia), Loeuille et al. 79 (*L. sellowii* Sch.Bip, coletado em Congonhas do Norte, Minas Gerais), Loeuille et al. 483a (*L. syncephala* (Sch.Bip.) Sch.Bip, coletado em Santana do Riacho, Minas Gerais), Loeuille et al. 93 (*L. tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch.Bip, coletado em Diamantina, Minas Gerais), Loeuille et al. 333 (*L. triflora* (Mattf.) H. Rob, coletado em Abaíra, Bahia). Loeuille et al. 81 (*L. villosissima* Mart., coletado em

Congonhas do Norte, Minas Gerais), Loeuille et al. 435 (*Lychnophoriopsis candelabrum* (Sch.Bip.) H. Rob, coletado em Buenópolis, Minas Gerais), Loeuille et al. 77 (*L. damazioi* (P. Beauv.) H. Rob, coletado em Congonhas do Norte, Minas Gerais), Rosa et al. 935 - HUFU (*L. hatschbachii* H. Rob, coletado em Diamantina, Minas Gerais), Nakajima et al. 4624 (*Minasia alpestris* (Gardner) H. Rob., coletado em Diamantina, Minas Gerais), Loeuille et al. 433 (*M. cabralensis* H. Rob, coletado em Joaquim Felício, Minas Gerais), Loeuille et al. 494 (*M. cipoensis* sp. Ined, coletado em Santana do Riacho, Minas Gerais), Loeuille et al. 97 (*M. scapigera* H. Rob, collected at Diamantina, Minas Gerais), Loeuille et al. 432 (*M. ramosa* Loeuille, H. Rob. & Semir, coletado em Joaquim Felício, Minas Gerais), Ferreira et al. 267 - HUEFS (*Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. Hind, coletado em Mucugê, Bahia), Loeuille et al. 330 (*P. bicolor* (DC.) MacLeish, coletado em Abaira, Bahia), Loeuille et al. 451 (*P. glaziouana* Loeuille sp. Ined, coletado em Serro, Minas Gerais), Loeuille et al. 309 (*P. harleyi* (H. Rob.) D.J.N. Hind, coletado em Piatã, Bahia), Loeuille et al. 329 (*P. patriciana* D.J.N. Hind, coletado em Abaira, Bahia), Loeuille et al. 326 (*P. patriciana* D.J.N. Hind X *P. bicolor* (H. Rob.) D.J.N. Hind, coletado em Abaira, Bahia), Loeuille et al. 396 (*P. reflexoauriculata* (G.M. Barroso) MacLeish, coletado em Morro do Chapéu, Bahia), Loeuille et al. 17 (*Piptolepis ericoides* Sch. Bip, coletado em Santana do Riacho, Minas Gerais), Loeuille et al. 517 (*P. oleaster* (Mart. ex DC.) Sch.Bip., coletado em São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais), Loeuille et al. 564 (*P. monticola* Loeuille sp. ined., coletado em Santo Antonio do Itambé, Minas Gerais), Loeuille et al. 516 (*P. riparia* sp. ined., coletado em São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais), Loeuille et al. 72 (*P. schultzi* Loeuille & D.J.N. Hind, coletado em Congonhas do Norte, Minas

Gerais), Loeuille et al. 113 (*Prestelia eriopus* Sch.Bip, coletado em Santana do Riacho, Minas Gerais), Mansanaras and Verola 340 - UEC (*P. robusta* sp. Ined, coletado em Diamantina, Minas Gerais), Loeuille et al. 344 (*Proteopsis argentea* Mart. & Zucc. ex DC, coletado em Grão Mogol, Minas Gerais), Mello-Silva et al. 3008 (*P. hermogenesii* sp. ined., coletado em Botumirim, Minas Gerais).

3.2. Insetos

As coletas de insetos foram feitas durante observações diurnas em intervalos trimestrais, de forma manual e com o auxílio de um guarda-chuva entomológico. É importante ressaltar que os insetos capturados foram encontrados alimentando-se de espécies da subtribo Lychnophorianae.

Os insetos coletados foram imediatamente congelados em gelo seco, mantidos em recipiente térmico com gelo e posteriormente armazenados em freezer a - 80 °C. As plantas, nas quais os insetos foram encontrados, também foram coletadas e analisadas.

3.3. Identificação dos insetos

Os insetos coletados foram inicialmente identificados ao nível de ordem. Para isso, utilizou-se uma chave dicotômica para identificação de insetos adultos, mas também aplicável a algumas ninfas, baseada na chave descrita por Borrer e Delong, 1969 (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

3.4. Equipamentos utilizados

As análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF foram feitas em um equipamento UHPLC *Accele* 1250 contendo um detector de arranjo de diodos (*Accele*) e acoplado a um espectrômetro de massas ESI-orbitrap *Exactive Plus* (Thermo Scientific). Os dados foram analisados com o uso do software Xcalibur™. As análises por GC-MS foram feitas em GC acoplado a um espectrômetro de massas EI-quadrupolo QP2010 (Shimadzu). Os dados obtidos por GC-MS foram analisados utilizando o software GC Solutions.

3.5. Processamento das amostras foliares

As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 50 °C, trituradas com N₂ líquido e liofilizadas durante 24 horas. Após a liofilização, as amostras de cada espécie de planta foram armazenadas em dessecador mantido em uma câmara fria.

3.5.1. Extratos para análise em UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF

As amostras foliares (1,0 mg) de cada uma das espécies analisadas foram extraídas com 1,0 mL de solução MeOH-H₂O (7:3 v/v) em banho de ultrassom durante 15 min e submetidas a *clean up* com 500 µL de hexano. Previamente à injeção no equipamento, os extratos preparados foram filtrados em membrana filtrante de PTFE (0,22 µm).

3.5.2. Extratos para análise em GC-MS

As amostras foliares de cada uma das espécies analisadas foram extraídas com diclorometano em banho de ultrassom durante 30 min, em seguida o extrato obtido foi transferido para um frasco de vidro e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Cada extrato seco foi solubilizado e injetado no cromatógrafo a uma concentração de 10 mg/mL.

3.6. Processamento das amostras de insetos

Os insetos foram triturados com N₂ líquido e liofilizados durante 24 horas. Após a liofilização, as amostras foram mantidas em freezer a - 80 °C até o momento da análise.

3.6.1. Extratos para análise em UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF

As amostras de insetos (1,0 mg) foram extraídas com 1,0 mL de solução MeOH-H₂O (7:3 v/v) em banho de ultrassom durante 15 min e submetidas a *clean up* com 500 µL de hexano. Previamente à injeção no equipamento, os extratos preparados foram filtrados em membrana filtrante de PTFE (0,22 µm).

3.6.2 Extratos para análise em GC-MS

As amostras de insetos foram extraídas com diclorometano em banho de ultrassom durante 30 min, em seguida o extrato obtido foi transferido para um frasco de vidro e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Cada

extrato seco foi solubilizado e injetado no cromatógrafo a uma concentração de 10 mg/mL.

3.7 Método analítico em UHPLC-UV-MS

As análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF foram feitas utilizando uma coluna *core shell* (Kinetex 1.7 μm XB-C18, 150 X 2.1 mm) conectada a uma pré-coluna de mesmo material. A separação foi feita utilizando H_2O - HCO_2H (0.1%) (v/v) (A) e CH_3CN (B) como fase móvel a um fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. O perfil de eluição foi de: 0 – 2 min, 5% B; 2 – 30 min, 5 – 100% B; 30 – 34 min, 100% B; 34 – 37 min, 100 – 5% B; 37 – 40 min, 5% B. A temperatura do forno foi mantida a 45 °C. O detector de DAD foi programado para registrar os comprimentos de onda entre 200 – 600 nm. O eluente da coluna foi analisado por ESI-MS e ESI-AIF, simultaneamente em ambos os modos de ionização. Os espectros de massas foram adquiridos e processados usando o software do equipamento. Os cromatogramas de íon total (TIC) foram registrados na faixa de 150 a 1200 m/z e resolução de 70000 no modo MS e de 35000 no modo AIF. Os seguintes parâmetros do espectrômetro de massas foram mantidos em todas as análises: 1.0 microscans/s; *automatic gain control* (AGC) target, 1.0e6; *maximum injection time*, 100 ms; fluxo do *sheath gas*, 30; fluxo do auxiliary gas, 10; fluxo do sweep gas, 11; temperatura do capilar, 320°C; voltagem do spray no modo positivo de ionização, 3.6 kV; voltagem do spray no modo negativo de ionização, 3.2 kV; S-lens RF, 50; HCD, energia de colisão (NCE) 35.0 eV. O N_2 foi utilizado como gás de secagem, nebulização e fragmentação.

3.8 Método analítico em GC-MS

As análises por GC-MS foram feitas no modo de injeção por *split* (3:1) a 260 °C e volume de injeção de 1,0 μL . Foi utilizada coluna de fase estacionária DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), He como gás de arraste, fluxo de 1,3 mL/min e aquecimento com programação de temperatura de 100 – 300 °C a 3 °C/min durante 90 min. Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de 50 - 500 m/z .

3.9 Processamento dos dados e análises multivariadas

Os extratos hidrometanólicos foram preparados (item 3.6.1) e analisados por LC-MS (item 3.7), resultando em impressões digitais metabólicas de todas as espécies nos modos positivo e negativo de ionização por *electrospray* (ESI). De forma semelhante, os extratos preparados em diclorometano (item 3.6.2) foram analisados por GC-MS (item 3.8), resultando em impressões digitais metabólicas de todas as espécies no modo de ionização por elétron (EI).

O pré-tratamento dos dados foi feito utilizando-se o software *MetAlign*TM (RIKILT, Holanda) com o intuito de: 1) realizar a desconvolução dos cromatogramas baseado nos dados de MS; 2) alinhar, centralizar e normalizar os cromatogramas obtidos; 3) extrair e exportar os dados dos cromatogramas de MS tratados na forma de tabelas. A interface do *MetAlign*TM é dividida em três seções: A, B e C. Estas seções (A, B e C) correspondem à importação dos dados, alinhamento do tempo de retenção (RT), e análises estatísticas, respectivamente. Dessa forma, os arquivos foram importados em um único

grupo e processados em conjunto (parte A). Na parte B, o software apresenta dois algoritmos para o alinhamento do RT, chamados *rough* e *iterative*. Neste estudo, foi usado apenas o modo *rough*, no qual uma janela de tempo definido foi usada para todo o conjunto de dados a ser analisado. Dentro de uma janela definida de RT, cada íon do sinal foi agrupado com base na amplitude.

Dessa forma, os sinais de massas foram extraídos e alinhados utilizando o software *MetAlign*TM (RIKILT, Holanda), resultando em 1061 sinais de massas com razão sinal/ruído maior que 5000, nas análises por GC-MS e resultando em 36.861 e 24.482 sinais de massas com razão sinal/ruído maior ou igual a 10^5 nas análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente. É importante observar que para as análises por GC-MS também foram testadas as faixas de massa: m/z 50-500, com o intuito de considerar o intervalo analisado no GC-MS; m/z 100-500, m/z 100-400, ambas testadas com o intuito de eliminar os íons fragmentos ($m/z < 100$) presentes em todas as amostras e m/z 170-400, testada com o objetivo de eliminar os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$).

Os sinais de massas pertencentes à mesma molécula, como isótopos, fragmentos e adutos foram subsequentemente reagrupados no software *MSClust*TM (RIKILT, Holanda), resultando no total em 6.019 metabólitos reconstruídos. Assim, as matrizes geradas pelo *MetAlign*TM a partir dos sinais de massas obtidos nas análises por GC-MS e nas análises por UHPLC-UV-MS em ambos os modos de ionização foram separadamente utilizadas no *MSClust*TM para reconstrução dos metabólitos com o intuito de reduzir a redundância das variáveis. As matrizes de dados geradas pelo *MSClust*TM foram usadas em conjunto no SIMCA (versão 13.0.3) para a análise de

componentes principais (PCA), para a análise de cluster hierárquico (HCA) e para análises discriminantes por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA). Em todas as análises multivariadas foram utilizados o escalonamento de Pareto e a transformação em log.

Os parâmetros utilizados no *MetAlign*TM para o alinhamento dos perfis metabólicos das espécies de plantas analisadas por UHPLC-UV-MS e GC-MS estão descritos na Tabela 1 e na Tabela 2, respectivamente. Os parâmetros utilizados no *MSClust*TM para reagrupar os picos e diminuir a redundância entre as variáveis estão descritos na Tabela 3.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados no *MetAlign*TM para as análises em GC-MS

Part A: Program Configuration, Data Set Selection and Baseline Correction		
Program configuration	<i>input format</i> netCDF	<i>output format</i> netCDF
Mass resolution	nominal mass	
Mass bin	0,65	
Retention begin (scan)	1	
Retention end (scan)	15000	
Maximum amplitude	1000000000	
Peak slope factor (X noise)	1	
Peak threshold factor (X noise)	2	
Peak threshold	5000	
Average peak width at half height (scans)	5	
Part B: Scaling and Aligning Data Sets		
Begin of first region	scan nr 1	max. shift 20
End of first region	15000	20
No pre-align processing		
<i>Outputting aligned data</i>		
Output options	Multivariate compatible output	
Mass	low	high
Retention	170	400
Peak threshold factor (X noise)	10	80
	3	

Tabela 2 – Parâmetros utilizados no *MetAlign*TM para as análises em UHPLC-UV-MS

Part A: Program Configuration, Data Set Selection and Baseline Correction		
Program configuration	<i>input format</i> Xcalibur	<i>output format</i> Xcalibur
Mass resolution	accurate mass	
Mass bin	0,65	
Retention begin (scan)	1	
Retention end (scan)	100	
Maximum amplitude	10000000	
Peak slope factor (X noise)	1	
Peak threshold factor (X noise)	2	
Peak threshold	100000	
Average peak width at half height (scans)	10	
Part B: Scaling and Aligning Data Sets		
Begin of first region	scan nr 1	max. shift 20
End of first region	1600	20
No pre-align processing		
<i>Outputting aligned data</i>		
Output options	Multivariate compatible output	
Mass	low	high
Retention	160	700
Peak threshold factor (X noise)	3	28
Peak threshold factor (X noise)	3	

Tabela 3 – Parâmetros utilizados no *MSClust*TM

MSClust	
Effective peaks	100
Peak width, scans ou r. time	10
P.W. margin softness	2
Correlation threshold (0.0 - 1.0)	0,8
C.T. margin softness	0,02
PD reduction (0.0 - 1.0)	0,8
PD reduction softness	0,01
Stop criterion	8

3.10 Análise de correlação inseto-planta

A análise de correlação foi realizada entre as amostras de plantas e de insetos, utilizando os dados das matrizes geradas pelo *MSClustTM*. A correlação entre os íons presentes nas amostras de plantas e amostras de insetos foi determinada pelo coeficiente de correlação (r) fornecido pela matriz de correlação obtida a partir do OPLS. Em seguida, a análise multivariada OPLS-DA foi feita entre o grupo de amostras de plantas que apresentou correlação significativa ($r > 0,7$) com os insetos e o grupo em que não foi observada correlação significativa.

3.11 Identificação de Substâncias

3.11.1 Identificação de substâncias nas análises por UHPLC-UV-MS

O gráfico da importância das variáveis fornecido pelo OPLS-DA apresentou a importância das variáveis para a discriminação de cada classe. Em seguida, as substâncias discriminantes foram identificadas com base no espectro no UV e na fórmula molecular calculada a partir da massa exata e considerando o erro inferior a 5 ppm, ambos obtidos nas análises por UHPLC-UV-MS. O espectro no UV foi usado para sugerir a classe do metabólito secundário de cada sinal cromatográfico, seguida pela busca da fórmula molecular nos bancos de dados Scifinder e Dictionary of Natural Products e também com base no levantamento sobre as substâncias identificadas na subtribo Lychnophorinae até o dado momento (Apêndice I). Além disso, os

dados de fragmentação de cada sinal cromatográfico, obtidos pelas análises por AIF, foram usados na desreplicação e na confirmação da identidade de cada substância.

3.11.2 Identificação de substâncias nas análises por GC-MS

As substâncias foram identificadas por meio de busca dos espectros de massas nas bibliotecas NIST 62, WILEY 7 e FFNSC 1.3. Além disso, os índices de Kóvats (KI) (ROBARDS et al., 1994) de cada composto foram calculados por meio da fórmula de Kóvats após a injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₉-C₂₂). A similaridade dos espectros de massas com as substâncias presentes na biblioteca e o índice de Kóvats (KI) foram utilizados para a identificação das substâncias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises Metabolômicas

O alinhamento das impressões digitais metabólicas das 78 espécies de plantas analisadas foi obtido na interface do *MetAlign*TM, em seguida os metabólitos foram reconstruídos com o algoritmo do *MSClust*TM com base nos seus respectivos espectros de massas. As matrizes de dados geradas pelo *MSClust*TM foram usadas no SIMCA (versão 13.0.3) para a análise de componentes principais (PCA), para a análise de cluster hierárquico (HCA) e para análises discriminantes por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA).

4.1.1. Análises metabolômicas por GC-MS

O modelo construído no SIMCA gerou um resumo de ajuste contendo (Tabela 4): A (número de componentes); N (número de observações no modelo); $R^2 X$ representa a fração da variação dos dados explicada por cada componente; $R^2 X$ (cum) (variação cumulativa) e $Q^2 X$ (cum) (cumulativo global com validação cruzada $R^2 X$), coeficiente de predição.

Tabela 4- Valores de cada componente do modelo para a análise de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae por GC-MS

Componente	R ² X	R ² X(cum)	eigenvalue	Q ²	Q ² (cum)
0	cent.				
1	0,23	0,23	13,1	0,172	0,172
2	0,156	0,386	8,87	0,118	0,269
3	0,128	0,513	7,27	0,0893	0,335
4	0,116	0,629	6,59	0,168	0,447
5	0,0637	0,693	3,63	0,0267	0,461
6	0,0567	0,75	3,23	0,0444	0,485
7	0,0424	0,792	2,42	0,0689	0,521

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 2) permite uma visualização das informações presentes na Tabela 4, mostrando como os perfis metabólicos de cada uma das espécies estão relacionados e se há algum grupo de espécies ou alguma espécie discrepante. O PCA também permite compreender as relações entre as variáveis, mostrando aquelas que contribuem para uma informação semelhante e aquelas que fornecem uma informação única sobre determinado perfil metabólico.

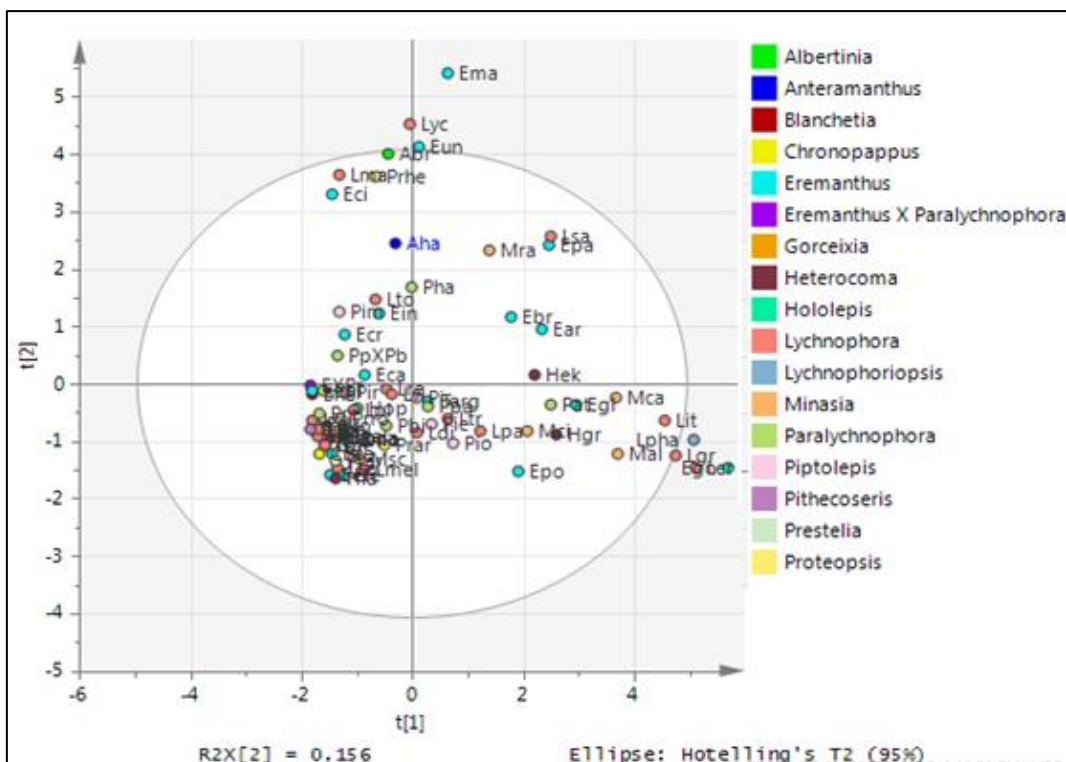


Figura 2 - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de 78 espécies de plantas da subtribo Lychnophorinae analisadas por GC-MS.

A análise de cluster hierárquico (HCA) foi feita por meio da utilização da matriz de dados gerada no *MSClustTM* e dos mesmos parâmetros presentes no modelo (Tabela 4) usado no PCA. O dendograma obtido (Figura 3) favorece a comparação dos resultados com a filogenia da subtribo Lychnophorinae (Anexo A).

A subtribo Lychnophorinae compreende 18 gêneros, e pouco é conhecido sobre as relações existentes ente eles. Comparando as análises metabômicas por GC-MS (Figura 2 e Figura 3) com os dados de filogenia (Anexo A) (LOEUILLE et al., 2015a), é possível observar resultados semelhantes entre as duas análises.

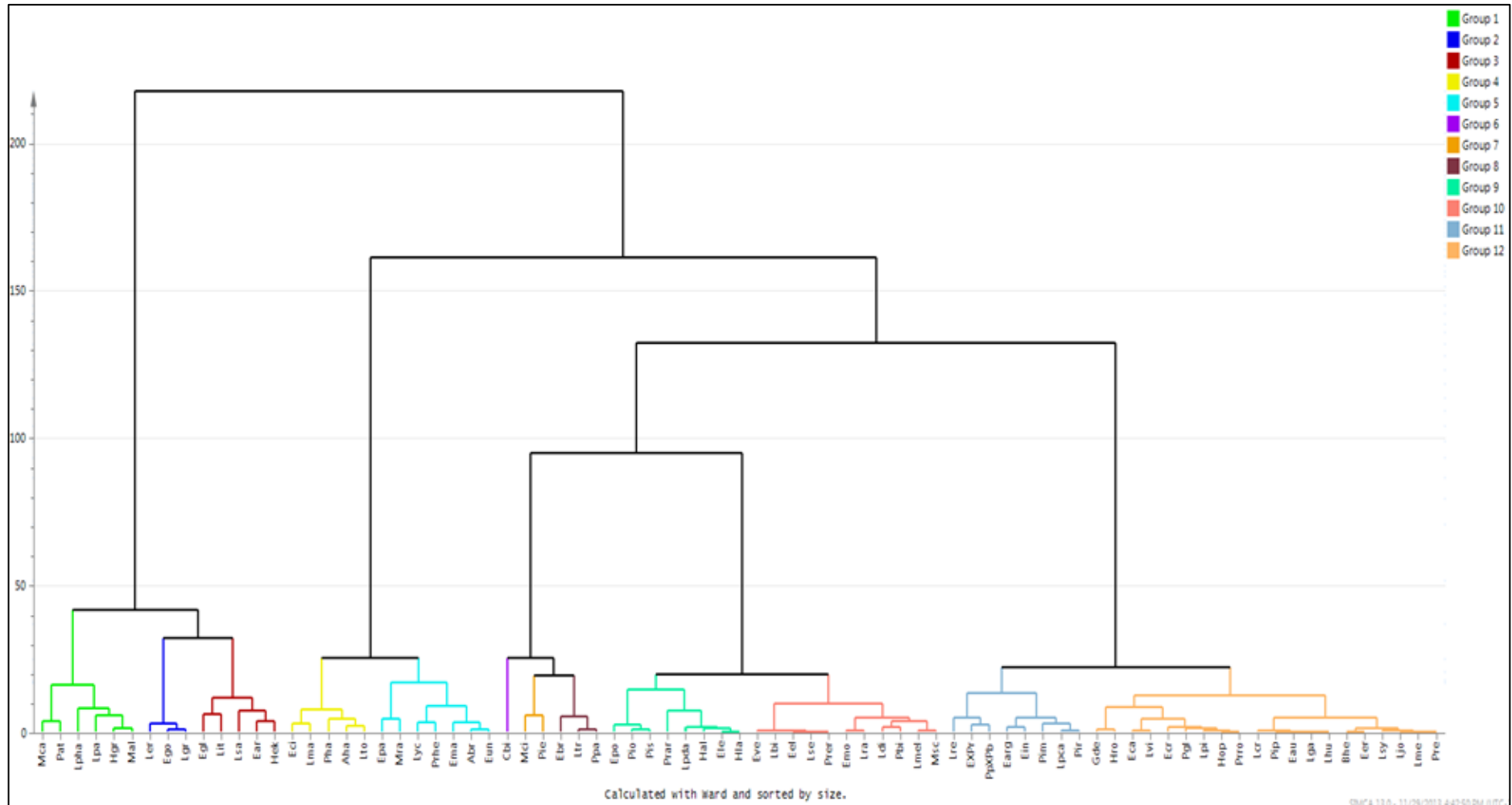


Figura 3 - Análise de cluster hierárquico (HCA) dos perfis metabólicos obtidos por GC-MS de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae analisadas por GC-MS, considerando a faixa de 170-400 m/z .

Considerando a faixa de massa (170 – 400 m/z) que exclui os monoterpenos nas análises metabolômicas (Figura 3) (Tabela 5), as espécies *Lychnophora ericoides* (Ler), *L. granmogolensis* (Lgr), *L. itacambirensis* (Lit), *L. salicifolia* (Lsa) e *L. passerina* (Lpa) pertencem a grupos bastante próximos e estão altamente relacionadas a *Lychnophoriopsis hatschbachii* (Lpha), e também estão próximas a espécies de *Eremanthus* (*E. goyazensis* - Ego, *E. glomerulatus* - Egl e *E. arboreus* - Ear), assim como foi observado para a filogenia. As espécies *Lychnophora vilosissima* (Lvi), *L. pinaster* (Lpi), *L. crispa* (Lcr) e *L. gardneri* (Lga) foram agrupadas com as espécies de *Lychnophora* acima descritas nas análises filogenéticas. Na Figura 3 é possível observar que estas espécies (Lvi, Lpi, Lcr e Lga) pertencem ao grupo 12 e estão relacionadas à espécie *Lychnophoriopsis candelabrum* (Lpca), e, principalmente às espécies de *Eremanthus* (*E. auriculatus* - Eau; *E. erythropappus* - Eer; *E. incanus* - Ein; *E. argenteus* - Earg; *E. capitatus* - Eca), também correspondente ao encontrado na filogenia.

O grupo 12 contém também outras espécies de *Lychnophora* (*L. humilima* - Lhu, *L. mellobarretoii* - Lme e *L. joliana* - Ljo), as quais estão relacionadas à *Prestelia robusta* (Prro), de acordo com o HCA (Figura 3) e com as análises filogenéticas. Estas espécies de *Lychnophora* também estão próximas a *Hololepis pedunculata* (Hop) e a *Eremanthus crotonoides* (Ecr), mas de maneira mais distante. Em relação às espécies de *Heterocoma*, é possível observar grande proximidade entre *H. albida* e *H. lanuginosa*, em consonância com o exposto na filogenia (Anexo A) (LOEUILLE et al., 2015a)

Gorceixia decurrens (Gde) e *Blanchetia heterotricha* (Bhe) pertencem ao mesmo grupo e estão próximas a *Hololepis pedunculata* (Hop) e a *Eremanthus*

crotonoides (Ecr). Tal proximidade também foi observada na filogenia (Anexo A) (LOEUILLÉ et al., 2015a). Além disso, no grupo 6 é possível observar a presença da espécie *Chronopappus bifrons* formando uma única linhagem, o que também foi observado nas análises filogenéticas (LOEUILLÉ et al., 2015a).

Robinson (1992) encontrou semelhanças entre *Anteremanthus* e *Paralychnophora glaziouana* (Pgl). Na Figura 3, observa-se a proximidade entre *Anteremanthus hatschbachii* (Aha) e *Paralychnophora harleyi* (Pha), ambas localizadas no grupo 4. Isto se opõe ao proposto pelas análises filogenéticas (Anexo A), as quais não encontraram proximidade entre *Anteremanthus* e *Paralychnophora* (LOEUILLÉ et al., 2015a).

Tabela 5 – Espécies pertencentes aos grupos formados no HCA dos perfis metabólicos das 78 espécies da subtribo Lychnophorinae obtidos por GC-MS considerando a faixa de massa de 170 – 400 *m/z* (Figura 3) e considerando a faixa de massa de 100 – 400 *m/z* (Figura 4)

Grupo	Faixa de massa de 170 – 400 <i>m/z</i> Espécies ^a	Faixa de massa 100 – 400 <i>m/z</i> Espécies
1	Hgr, Lpha, Lpa, Mca, Mal, Pat	Ego, Ler, Lgr
2	Ego, Egr, Ler	Hgr, Lpha, Mal, Mca, Pat
3	Ear, Egl, Hek, Lit, Lsa	Ear, Egl, Epo, Hek, Lit, Lsa, Pio, Pis
4	Aha, Eci, Lma, Lto, Pha	Abr, Aha, Eci, Ema, Epa, Eun, Lma, Lto, Mra, Pha, Prhe
5	Abr, Ema, Epa, Eun, Mra, Prhe	Bhe, Earg, Eau, Eca, Ecr, Ein, Eer, ExPr, Hop, Lcr, Lga, Lhu, Ljo, Lme, Lpi, Lre, Lvi
6	Cbi	Cbi, Ebr, Mci, Ltr, Pie Ppa
7	Mci, Pie	Ele, Eve, Gde, Hal Hro, Lpca, Lpda, Prar
8	Ebr, Ltr, Ppa	Eel, Emo, Lbi, Ldi, Lmel, Lra, Lse, Msc, Pbi, Prer
9	Ele, Epo, Hal, Lpda, Pio, Pis, Prar	-
10	Eel, Emo, Eve, Lbi, Ldi, Lmel, Lra, Lse, Msc, Pbi, Prer	-
11	Ear, Ein, EXPr, Lre, Lpca, Pim PpXPb	-
12	Bhe, Eau, Eca, Ecr, Gde, Hop, Hro, Lcr, Ler, Lga, Lhu, Ljo, Lme, Lpi, Lsy, Lvi, Pip, Pgl, Prro, Pre	-

^aEspécies (*Anteremanthus hatschbachii* - Aha), (*Albertinia brasiliensis* - Abr), (*Blanchetia heterotricha* - Bhe), (*Chronopappus bifrons* - Cbi), (*Eremanthus arboreus* - Ear), (*E. argenteus* - Earg), (*E. auriculatus* - Eau), (*E. brevifolius* - Ebr), (*E. capitatus* - Eca), (*E. cinctus* - Eci), (*E. crotonoides* - Ecr), (*E. elaeagnus* - Eel), (*E. erythropappus* - Eer), (*E. glomerulatus* - Egl), (*E. goyazensis* - Ego), (*E. incanus* - Ein), (*E. leucodendron* - Ele), (*E. mattogrossensis* - Ema), (*E. mollis* - Emo), (*E. pabstii* - Epa), (*E. polycephalus* - Epo), (*Eremanthus* sp. X *Paralychnophora reflexoauriculata* (G.M. Barroso) - EXPr), (*E. uniflorus* - Eun), (*E. veadeiroensis* - Eve), (*Gorceixia decurrens* - Gde), (*Heterocoma albida* - Hal), (*H. ekmanianum* - Hek), (*H. gracilis* - Hgr), (*H. lanuginosa* - Hla), (*H. robinsoniana* - Hro), (*Hololepis pedunculata* - Hop), (*Lychnophora bishopii* - Lbi), (*L. crispera* - Lcr), (*L. diamantinana* - Ldi), (*L. ericoides* - Ler), (*L. gardneri* - Lga), (*L. granmogolensis* - Lgr), (*L. humillima* - Lhu), (*L. "itacambirensis"* sp. ined., - Lit), (*L. "jolyana"* sp. ined., - Ljo), (*L. markgravii* - Lma), (*L. mellobarretoj* - Lme), (*L. "mellosilvae"* sp. ined - Lmel), (*L. passerina* - Lpa), (*L. pinaster* - Lpi), (*L. ramosissima* - Lra), (*L. regis* - Lre), (*L. salicifolia* - Lsa), (*L. santosii* - Lst), (*L. sellowii* - Lse), (*L. syncephala* - Lsy), (*L. tomentosa* - Lto), (*L. triflora* - Ltr), (*L. villosissima* - Lvi), (*Lychnophoriopsis candelabrum* - Lpca), (*L. damazioi* - Lpda), (*L. hatschbachii* - Lpha), (*Minasia alpestris* - Mal), (*M. cabralensis* - Mca), (*M. "cipoensis"* sp. ined., - Mci), (*M. scapigera* - Msc), (*M. ramosa* - Mra), (*Paralychnophora atkinsiae* - Pat), (*P. bicolor* - Pbi), (*P. glaziouana* - Pgl), (*P. harleyi* - Pha), (*P. patriciana* - Ppa), (*P. patriciana* X *P. bicolor* - PpXPb), (*P. reflexoauriculata* Pre), (*Piptolepis ericoides* - Pie), (*P. oleaster* - Pio), (*P. monticola* - Pim), (*P. "riparia"* sp. ined., - Pir), (*P. schultziana* - Pis), (*Prestelia eriopus* - Prer), (*Prestelia "robusta"* sp. ined., - Prro), (*Proteopsis argentea* - Prar), (*P. "hermogenesi"* sp. ined., - Prhe).

Considerando a faixa de massa (100 – 400 m/z) que inclui os monoterpenos nas análises metabolômicas (Figura 4) (Tabela 5), podemos observar outras similaridades com as análises filogenéticas (Anexo A) não observadas quando monoterpenos são excluídos.

O híbrido *Eremanthus* sp. X *Paralychnophora reflexoauriculata* (ExPr) está altamente relacionado ao *Eremanthus capitatus* (Eca), ambos localizados no grupo 5, o que pode ser justificado pela ocorrência destas espécies na mesma região (Jacobina, Bahia) (LOEUILLE et al., 2015a). Também é importante notar que a espécie *Paralychnophora reflexoauriculata* (Pre) está presente no mesmo grupo, apesar de estar mais distante. Estas proximidades também são observadas nas análises filogenéticas (LOEUILLE et al., 2015a), confirmando a existência do híbrido. Ainda no grupo 5, mas em outro subgrupo, é possível observar a proximidade entre *Piptolepis riparia* (Pir) e *Piptolepis monticola* (Pim).

Além disso, pode-se notar a proximidade entre *Anteremanthus hatschbachii* (Aha) e *Paralychnophora harleyi* (Pha), a qual também foi observada na Figura 3, opondo-se às análises filogenéticas, uma vez que estas não encontraram proximidade entre *Anteremanthus* e *Paralychnophora* (LOEUILLE et al., 2015a).

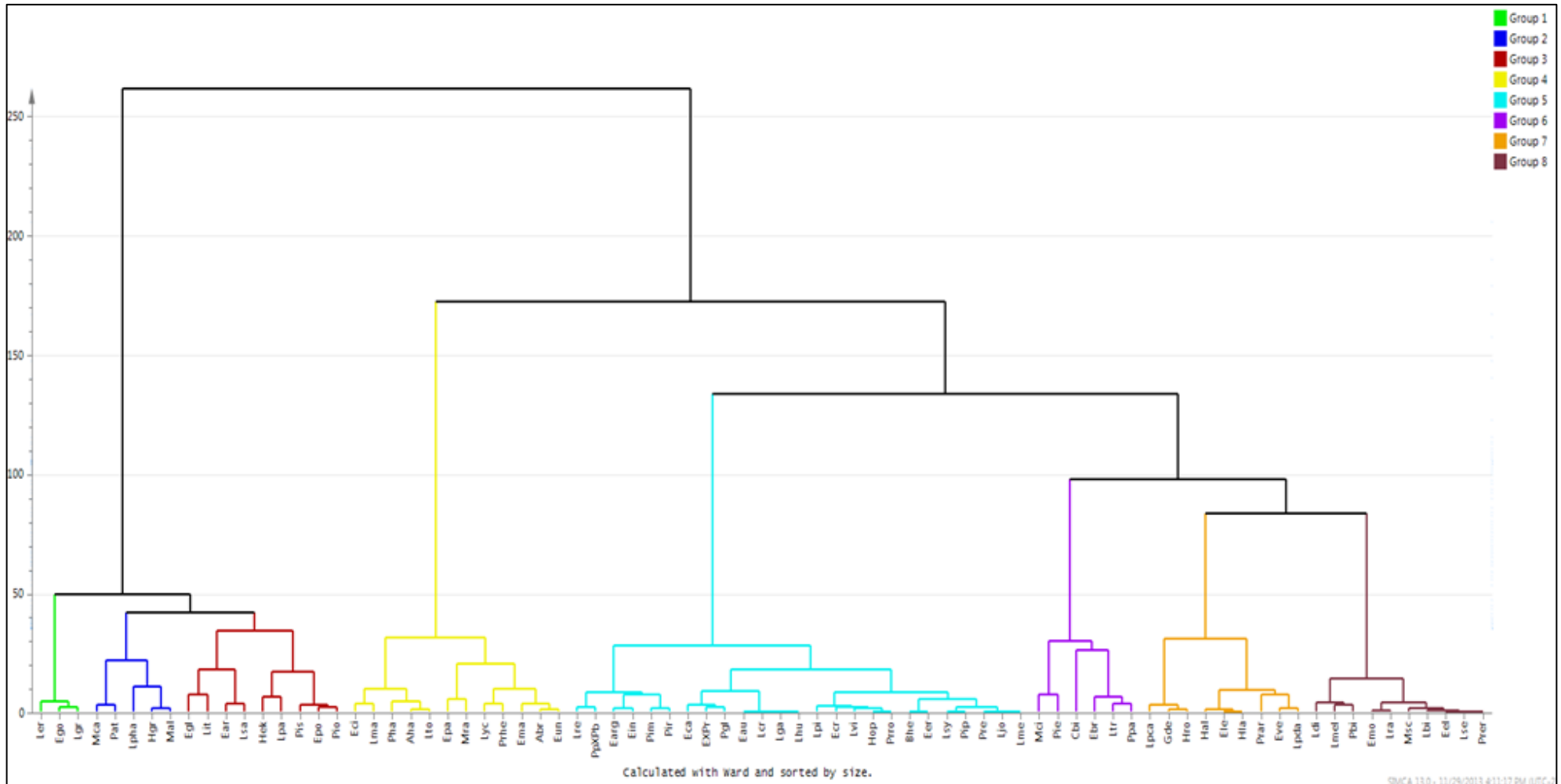


Figura 4 - Análise de cluster hierárquico (HCA) dos perfis metabólicos obtidos por GC-MS de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae analisadas por GC-MS, considerando a faixa de 100-400 m/z .

4.1.2. Análises metabolômicas por LC-MS e GC-MS em conjunto

4.1.2.1. Análises metabolômicas por UHPLC-UV-MS e GC-MS

de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae

Os dados obtidos após a análise das 78 espécies da subtribo Lychnophorinae por UHPLC-UV-MS e GC-MS foram analisados em conjunto com o objetivo de aumentar a representatividade dos metabólitos avaliados e, com isso, a robustez. O modelo construído e validado no SIMCA para análise dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto gerou os parâmetros presentes na (Tabela 6).

Tabela 6- Valores de cada componente do modelo para a análise de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae por UHPLC-UV-MS e GC-MS conjuntamente

Componente	R ² X	R ² X(cum)	eigenvalue	Q ²	Q ² (cum)
0	cent.				
1	0,236	0,236	18,4	0,215	0,215
2	0,0965	0,333	7,53	0,101	0,294
3	0,0417	0,374	3,25	0,0309	0,315
4	0,0263	0,401	2,05	0,00963	0,322
5	0,0236	0,424	1,84	0,00751	0,327
6	0,02	0,444	1,56	0,002	0,329

As análises multivariadas por PCA (Figura 5) e HCA (Figura 6) das 78 espécies mostram diversos pontos em comum com a filogenia (Anexo A) proposta por Loeuille et al (2015a) Os grupos formados nas análises multivariadas por PCA foram divididos em 1A, 1B, 1C e 1D (Tabela 7), conforme apresentado na Figura 5.

Tabela 7 – Espécies da subtribo Lychnophorinae pertencentes aos grupos formados no PCA (Figura 5) e no HCA (Figura 6) a partir dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

Grupo	Espécies ^a
1A	Aha, Earg, Ebr, Eci, Ein, Eel, Egl, Ema, Eun, EXPr, Hek, Hal, Hla, Hro, Ldi, Lma, Lmel, Lpca, Lpha, Lpi, Lre, Lst, Lsy, Ltr, Mca, Pbi, Pha, Pim, Pio, PpXPb, Prer, Prro
1B	Cbi, Epa, Lga, Lit, Lpda, Mra, Prar
1C	Eca, Epo, Lgr, Lhu, Lme, Lto, Msc, Pgl, Pir,
1D	Abr, Bhe, Gde, Eau, Ear, Ecr, Eer, Ego, Ele, Emo, Eve, Hgr, Hop, Lbi, Lcr, Ler, Ljo, Lpa, Lra, Lsa, Lse, Lvi, Mal, Mci, Pat, Pis, Pie, Ppa, Pre, Prhe

^aEspécies (*Anteremanthus hatschbachii* - Aha), (*Albertinia brasiliensis* - Abr), (*Blanchetia heterotricha* - Bhe), (*Chronopappus bifrons* - Cbi), (*Eremanthus arboreus* - Ear), (*E. argenteus* - Earg), (*E. auriculatus* - Eau), (*E. brevifolius* - Ebr), (*E. capitatus* - Eca), (*E. cinctus* - Eci), (*E. crotonoides* - Ecr), (*E. elaeagnus* - Eel), (*E. erythropappus* - Eer), (*E. glomerulatus* - Egl), (*E. goyazensis* - Ego), (*E. incanus* - Ein), (*E. leucodendron* - Ele), (*E. mattogrossensis* - Ema), (*E. mollis* - Emo), (*E. pabstii* - Epa), (*E. polycephalus* - Epo), (*Eremanthus* sp. X *Paralychnophora reflexoauriculata* (G.M. Barroso) - EXPr), (*E. uniflorus* - Eun), (*E. veadeiroensis* - Eve), (*Gorceixia decurrens* - Gde), (*Heterocoma albida* - Hal), (*H. ekmanianum* - Hek), (*H. gracilis* - Hgr), (*H. lanuginosa* - Hla), (*H. robinsoniana* - Hro), (*Hololepis pedunculata* - Hop), (*Lychnophora bishopii* - Lbi), (*L. crispa* - Lcr), (*L. diamantinana* - Ldi), (*L. ericoides* - Ler), (*L. gardneri* - Lga), (*L. granmogolensis* - Lgr), (*L. humillima* - Lhu), (*L. "itacambirensis"* sp. ined., - Lit), (*L. "jolyana"* sp. ined., - Ljo), (*L. markgravii* - Lma), (*L. mellobarretoii* - Lme), (*L. "mellosilvae"* sp. ined - Lmel), (*L. passerina* - Lpa), (*L. pinaster* - Lpi), (*L. ramosissima* - Lra), (*L. regis* - Lre), (*L. salicifolia* - Lsa), (*L. santosii* - Lst), (*L. sellowii* - Lse), (*L. syncephala* - Lsy), (*L. tomentosa* - Lto), (*L. triflora* - Ltr), (*L. villosissima* - Lvi), (*Lychnophoriopsis candelabrum* - Lpca), (*L. damazioi* - Lpda), (*L. hatschbachii* - Lpha), (*Minasia alpestris* - Mal), (*M. cabralensis* - Mca), (*M. "cipoensis"* sp. ined., - Mci), (*M. scapigera* - Msc), (*M. ramosa* - Mra), (*Paralychnophora atkinsiae* - Pat), (*P. bicolor* - Pbi), (*P. glaziouana* - Pgl), (*P. harleyi* - Pha), (*P. patriciana* - Ppa), (*P. patriciana* X *P. bicolor* - PpXPb), (*P. reflexoauriculata* - Pre), (*Piptolepis ericoides* - Pie), (*P. oleaster* - Pio), (*P. monticola* - Pim), (*P. "riparia"* sp. ined., - Pir), (*P. schultzi* - Pis), (*Prestelia eriopus* - Prer), (*Prestelia "robusta"* sp. ined., - Prro), (*Proteopsis argentea* - Prar), (*P. "hermogenesii"* sp. ined., - Prhe).

Comparando estes grupos com a filogenia (Anexo A) proposta por Loeuille et al (2015a) é possível observar que a maioria das espécies de *Eremanthus* e *Lychnophora stricto sensu* encontra-se em grupos próximos, sendo que 17 das 20 espécies analisadas do gênero *Eremanthus*, e 16 das 23 espécies analisadas do gênero *Lychnophora* são muito próximas entre si.

No que diz respeito às espécies do gênero *Heterocoma*, *H. albida* (Hal), *H. robinsoniana* (Hro) e *H. lanuginosa* (Hla) estão no mesmo grupo (1A), enquanto que *H. ekmaniana* (Hek) e *H. gracilis* (Hgr) pertencem ao grupo (1D). O HCA (Figura 6) mostra *H. albida* (Hal), *H. ekmaniana* (Hek), *robinsoniana* (Hro) e *H. lanuginosa* (Hla) no mesmo grupo, e apenas *H. gracilis* (Hgr) pertence a outro grupo.

Em relação ao gênero *Lychnophoriopsis*, *L. hatschbachii* (Lpha) e *L. candelabrum* (Lpca) pertencem ao mesmo grupo (1D), enquanto que *L. damazioi* (Lpda) pertence ao grupo (1B), o que também pode ser observado no HCA (Figura 6). As espécies do gênero *Paralychnophora*, *P. atkinsiae* (Pat), *P. patriciana* (Ppa) e *P. reflexoauriculata* (Pre) pertencem ao mesmo grupo (1D), e *P. bicolor* (Pbi) e *P. patriciana* X *P. bicolor* (PpXPb) pertencem ao grupo (1A), como pode ser confirmado pelo HCA (Figura 6). As espécies do gênero *Piptolepis*, *P. monticola* (Pmo) e *P. oleaster* (Pio) pertencem ao grupo (1A), e *P. ericoides* (Pie) e *P. schultziiana* (Pis) pertencem ao grupo (1D) como pode ser observado no HCA (Figura 6).

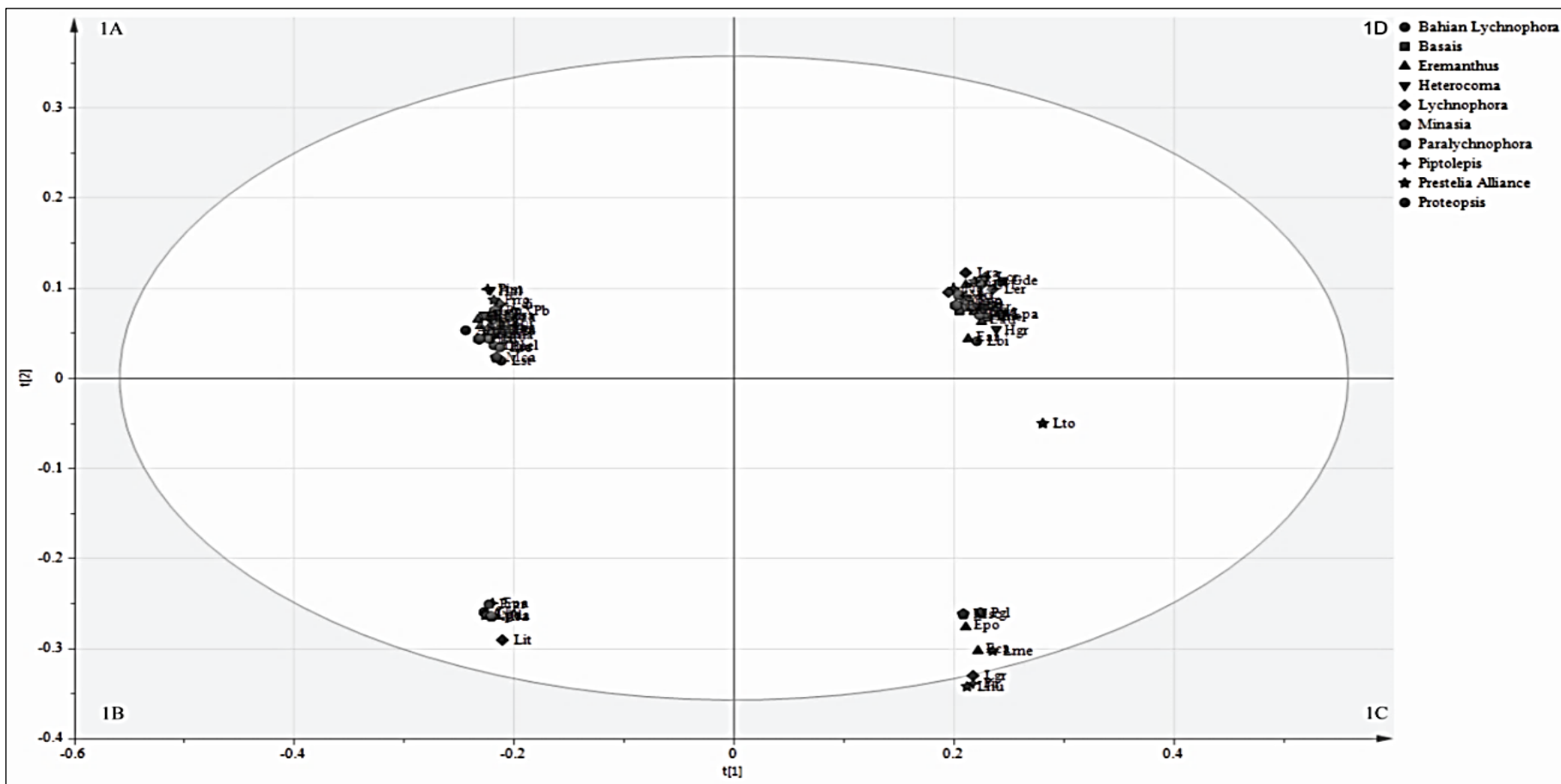


Figura 5 - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de 78 espécies de plantas da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

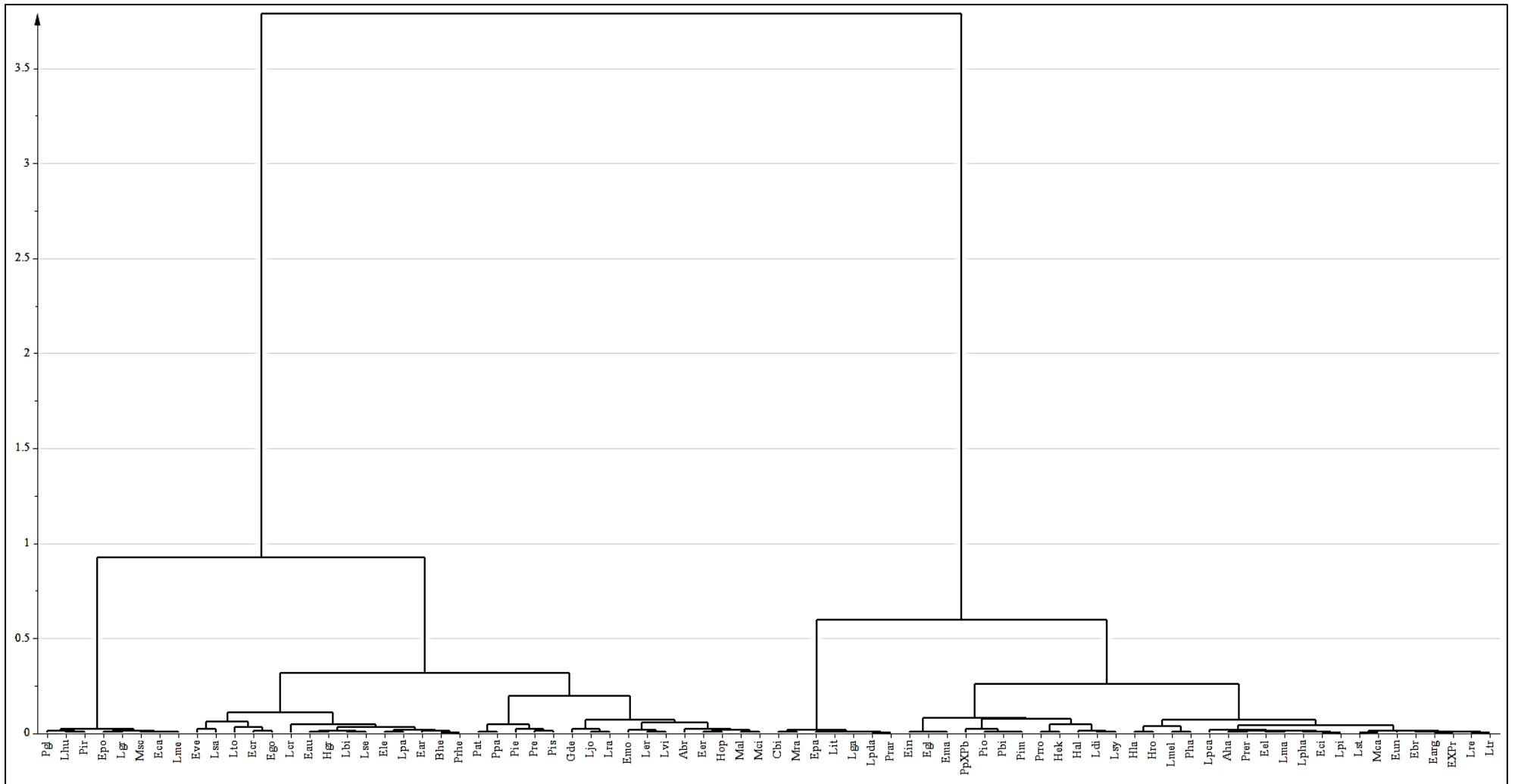


Figura 6 - Análise de cluster hierárquico (HCA) dos perfis metabólicos de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

Com base nos quatro grupos formados na análise multivariada por PCA (Figura 5), realizou-se a análise multivariada por OPLS-DA (Figura 7), por meio da qual foi possível discriminar os grupos com o intuito de determinar como as variáveis afetam a separação entre estes grupos. Dessa forma, foi obtido o gráfico de importância das variáveis (VIP) (Figura 8), capaz de informar a relação entre as variáveis Y e X e de determinar os íons capazes de diferenciar os grupos nas análises metabolômicas.

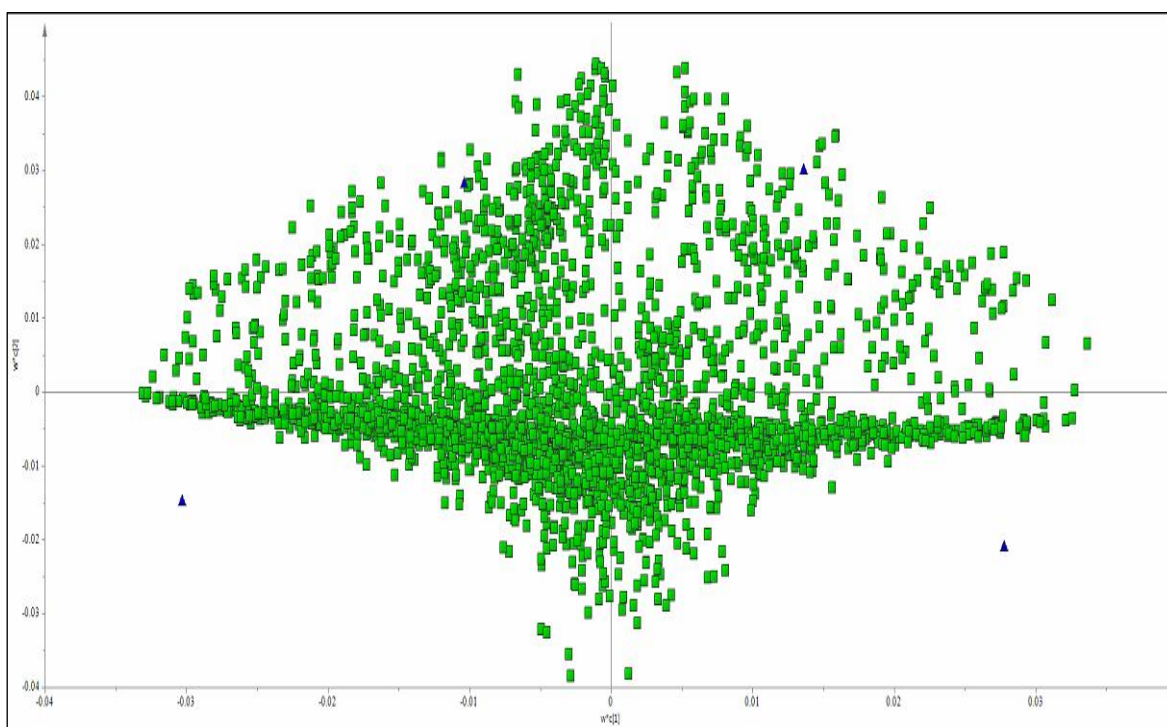


Figura 7 – Gráfico de *loadings* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) a partir dos quatro grupos observados no PCA dos perfis metabólicos de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

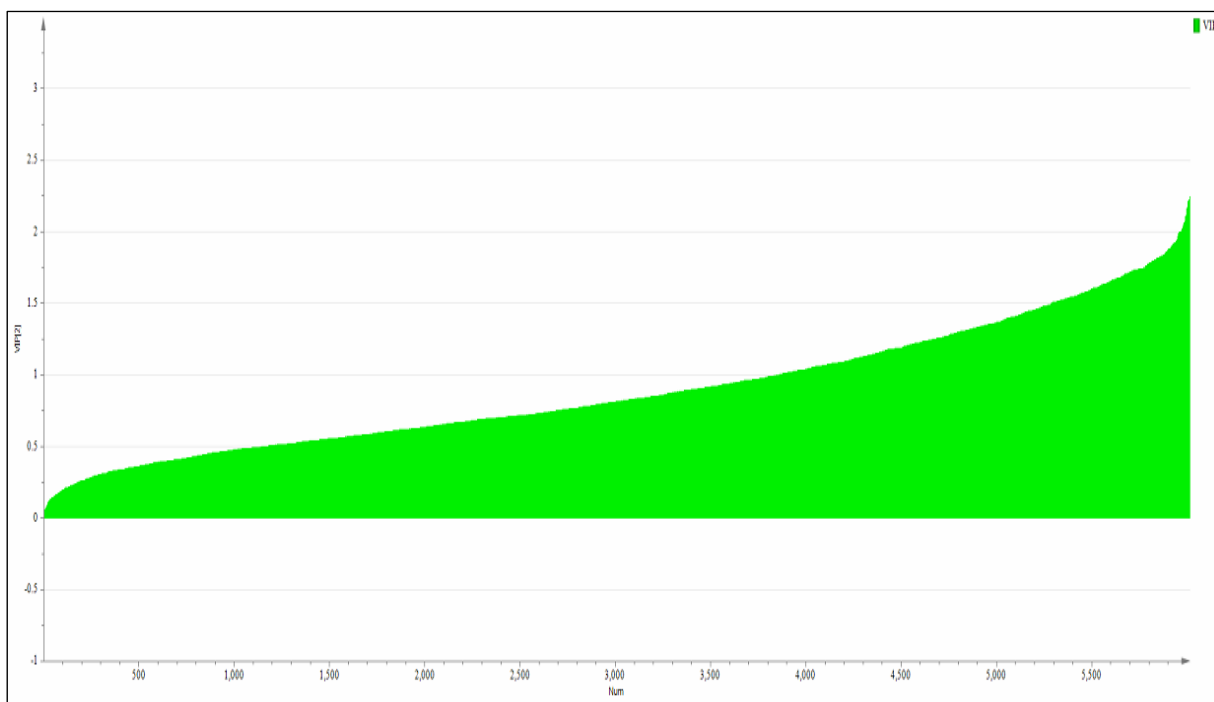


Figura 8 - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) dos perfis metabólicos de 78 espécies da subtribo Lychnophorinae utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

A partir do VIP (Figura 8), foram selecionados os 10 principais *loadings* com valor superior a 1, com os quais foi possível determinar as variáveis responsáveis pela discriminação entre os grupos obtidos nas análises multivariadas. Em seguida, essas variáveis (íons) foram submetidas à desreplicação com o intuito de identificar as substâncias discriminantes.

Os flavonoides foram importantes para a separação dos grupos, ou seja, foram discriminantes no OPLS. Entre as espécies pertencentes ao grupo (1A) foram identificados vicenina-2 e kaempferol, enquanto que os flavonoides 6-hidroxluteolina-O-dipentosídeo e 5-hidroxi-7,3,4-trimetoxiflavona foram identificados nas espécies do grupo (1D). Além disso, 3',4',7-tri-O-metilquercetina foi identificada no grupo (1B), enquanto que a orientina e 2''-coumaroilsoorientina foram identificadas no grupo (1C).

Com relação à contribuição das lactonas sesquiterpênicas (LST) para a separação é importante observar que estas substâncias foram encontradas em todos os grupos, sendo possível identificar a LST 15-hidroxi-remantolida B no grupo (1C). As substâncias discriminantes identificadas em cada um dos grupos (1A, 1B, 1C e 1D) estão descritas na Tabela 8 e representadas na Figura 9.

Tabela 8- Identificação das substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA e HCA das 78 espécies da subtribo *Lychnophorinae* nas análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF

Grupo	TR (min) ^a	Composto	Ions (m/z) no modo de ionização positivo	AIF no modo de ionização positivo	Ions (m/z) no modo de ionização negativo	AIF no modo de ionização negativo	UV max (nm)
1A	8,4	vicenina-2	[M + H] ⁺ 595.1785 bp,	595→ 577, 559, 541, 523, 481, 457 bp, 439, 409, 379, 355, 337, 325, 295	[M - H] ⁻ 593.1546 bp	593→ 473, 383, 353	271, 333
	13,3	kaempferol	[M + H] ⁺ 287.0619 bp	287	[dimero - H] ⁻ 571.0986, [M - H] ⁻ 285.0436 bp	285	252, 268 sh, 344
1B	17,0	3',4',7-tri-O-metilquercetina	[M + H] ⁺ 345.1014 bp, 316.32	345→ 330 bp, 316, 287, 259, 231	[M - H] ⁻ 343.08 bp	343→ 328, 313 bp, 301, 285, 270	254, 280 sh, 348
1C	7,7	orientina	[M + H] ⁺ 449.1285 bp, 369.1236	449→ 431, 413, 383, 353, 329 bp, 299	[dimero - H] ⁻ 895.2324, [M - H] ⁻ 447.63.31 bp,	447→ 357, 327,	255, 266, 346
	11,6	2"-coumaroilisoorientina	[M + H] ⁺ 595.1454 bp	595→ 317, 287 bp	[M - H] ⁻ 593.1345, 543.1589	593→ 447 bp, 285	267, 290 sh, 314
	13,6	15-hidroxieremantolido B	[M + H] ⁺ 379.1776 bp, [(M + H) - H ₂ O] ⁺ 361.16	379→ 361 bp, 317, 293, 277, 259, 231, 203	[M - H] ⁻ 377.1622 bp	377→ 315, 257, 239	268
1D	9,3	6-hidroxiluteolina-O-dipentósídeo	[M + Na] ⁺ 589.1587, 295.0876, 277.0712 bp,	589→ 287, 163 bp	[M - H] ⁻ 565.1644	565→ 179	272, 280 sh, 327
	22,5	5-hidroxi-7,3,4-trimetoxiflavona	[M + H] ⁺ 329.1065 bp	329→ 314, 299, 271, 243	-	-	267, 280 sh, 330

^a tempo de retenção (min)

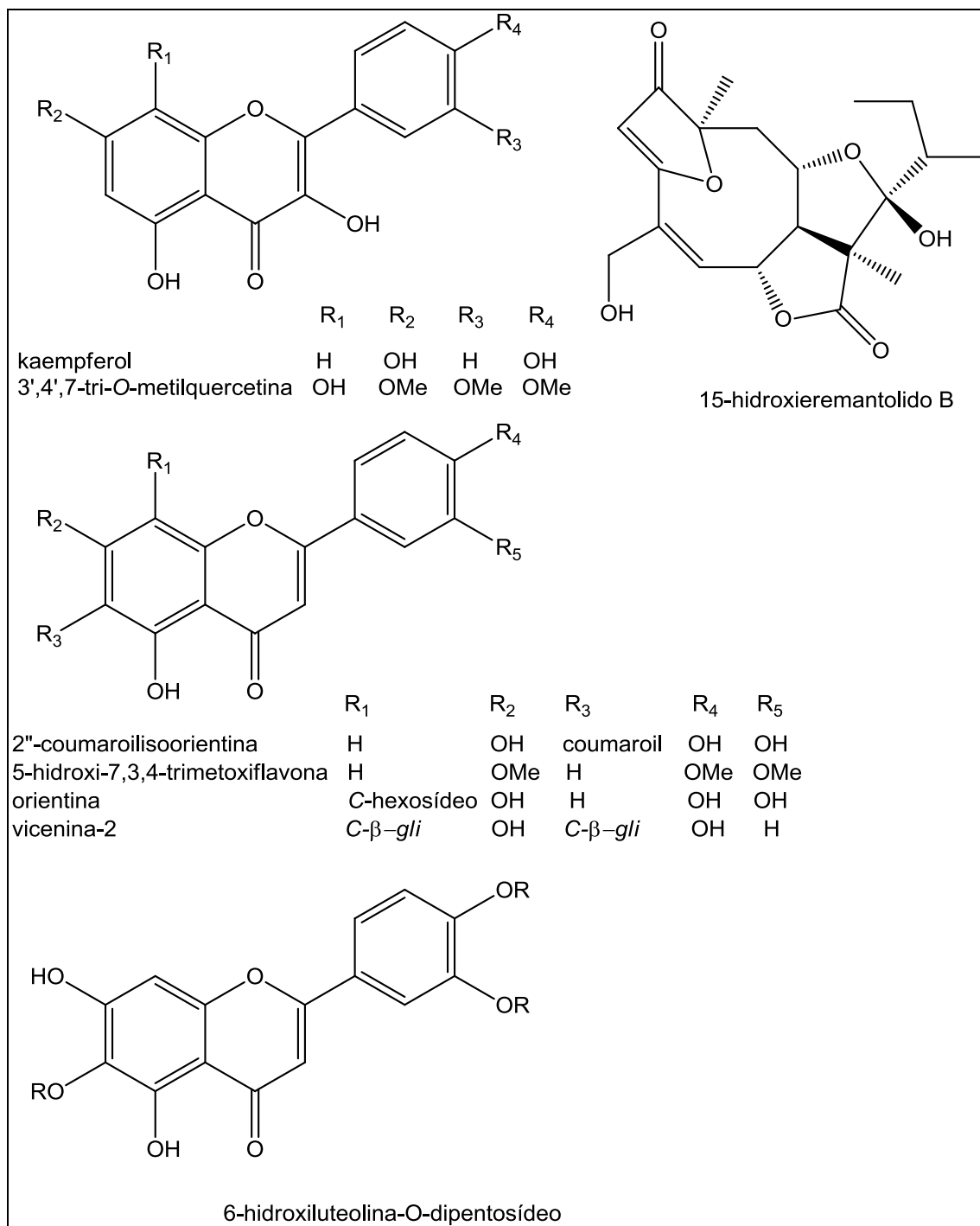


Figura 9 – Substâncias discriminantes identificadas por desreplicação nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA e HCA das 78 espécies da subtribo Lychnophorinae nas análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF

4.1.2.2. Análises metabolômicas por UHPLC-UV-MS e GC-MS de espécies do gênero *Lychnophora*

As espécies de *Lychnophora* representam a maioria das espécies analisadas, por isso, optou-se por analisá-las separadamente. As análises multivariadas realizadas com os dados obtidos para estas espécies (Figura 10) apresentam diversos aspectos semelhantes à filogenia (Anexo A) proposta por Loeuille et al. (2015a). Os grupos formados nas análises multivariadas por PCA foram divididos em 3A, 3B, 3C e 3D (Tabela 9).

Tabela 9 – Espécies do gênero *Lychnophora* pertencentes aos grupos formados no PCA (Figura 10) a partir dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

Grupo	Espécies ^a
3A	Lpda, Lit, Lgr
3B	Lbi, Ler, Lcr, Lsy, Lmel, Lma, Lpi, Lst, Lre, Ltr
3C	Lpha, Lpca, Ldi, Lsa, Lse, Lpa, Ljo, Lra, Lvi,
3D	Lhu, Lga, Lme, Lto

^aEspécies (*Lychnophora bishopii* - Lbi), (*L. crispa* - Lcr), (*L. diamantinana* - Ldi), (*L. ericoides* - Ler), (*L. gardneri* - Lga), (*L. granmogolensis* - Lgr), (*L. humillima* - Lhu), (*L. "itacambirensis"* sp. ined., - Lit), (*L. "jolyana"* sp. ined., - Ljo), (*L. markgravii* - Lma), (*L. mellobarretoii* - Lme), (*L. "mellosilvae"* sp. ined - Lmel), (*L. passerina* - Lpa), (*L. pinaster* - Lpi), (*L. ramosissima* - Lra), (*L. regis* - Lre), (*L. salicifolia* - Lsa), (*L. santosii* -Lst), (*L. sellowii* -Lse), (*L. syncephala* - Lsy), (*L. tomentosa* - Lto), (*L. triflora* - Ltr), (*L. villosissima* - Lvi), (*Lychnophoriopsis candelabrum* - Lpca), (*L. damazioi* - Lpda), (*L. hatschbachii* -Lpha)

As espécies classificadas como *Prestelia Alliance* pertencem ao mesmo grupo (3D), exceto a espécie *Lychnophoriopsis damazioi* (Lpda) que está grupo (3A) e as espécies *Lychnophora joliana* (Ljo) e *L. sellowii* (Lse) que se encontram no grupo (3C), assim como as demais espécies do gênero *Lychnophora*.

Entre as espécies de *Lychnophora* pertencentes ao grupo (3C), *L. passerina* (Lpa), *L. ramosíssima* (Lra), *L. salicifolia* (Lsa) e *L. villosissima* (Lvi) são muito próximas, e um pouco mais distantes é possível observar as espécies *L. diamantinana* (Ldi), *Lychnophoriopsis candelabrum* (Lpca) e *L. hatschbachii* (Lpha) também muito próximas entre si. Por outro lado, as espécies *L. crispa* (Lcr), *L. ericoides* (Ler) e *L. pinaster* (Lpi) estão no grupo (3B), enquanto que *L. granmogolensis* (Lgr) e *L. itacambirensis* (Lit) pertencem ao grupo (3A) e *L. gardneri* (Lga) é a única localizada no grupo (3D).

As espécies *Lychnophora markgravii* (Lma), *L. mellobarretoi* (Lme) e *L. syncephala* (Lsy) são as únicas classificadas como *Paralychnophora*, *Proteopsis* e *Eremanthus*, respectivamente, e todas pertencem ao grupo (3B). Com relação às espécies do gênero Bahian *Lychnophora*, todas se encontram no mesmo grupo (3B), sendo a *Lychnophora santosii* (Lst) *L. regis* (Lre) e *L. triflora* (Ltr) muito próximas e *L. bishopii* (Lbi) um pouco mais distante. É importante observar, que o gênero Bahian *Lychnophora* envolve espécies de *Lychnophora* e a espécie *Eremanthus leucodendron* (Ele), e estas são restritas aos campos rupestres da Chapada Diamantina, localizada na Bahia (LOEUILLE et al., 2015b).

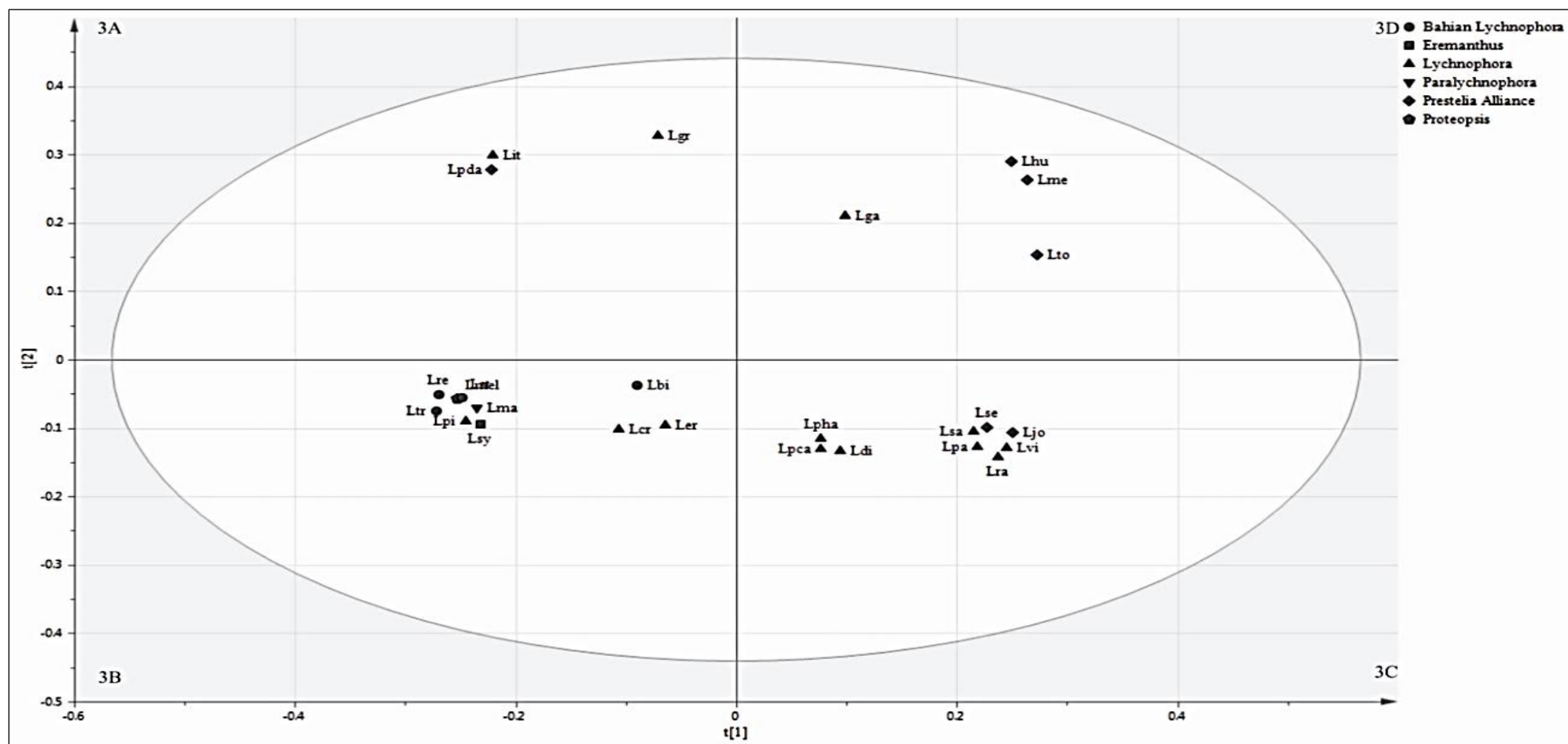


Figura 10 - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de espécies do gênero *Lychnophora* utilizando dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

Com base nos grupos formados na análise multivariada por PCA (Figura 10), foi feita a análise multivariada por OPLS-DA (Figura 11), por meio da qual foi possível discriminar os grupos com o intuito de determinar como as variáveis afetam a separação entre estes grupos. Assim, foi obtido o gráfico de importância das variáveis (VIP) (Figura 12), capaz de informar a relação entre as variáveis Y e X, e de determinar os íons capazes de diferenciar os grupos nas análises metabolômicas.

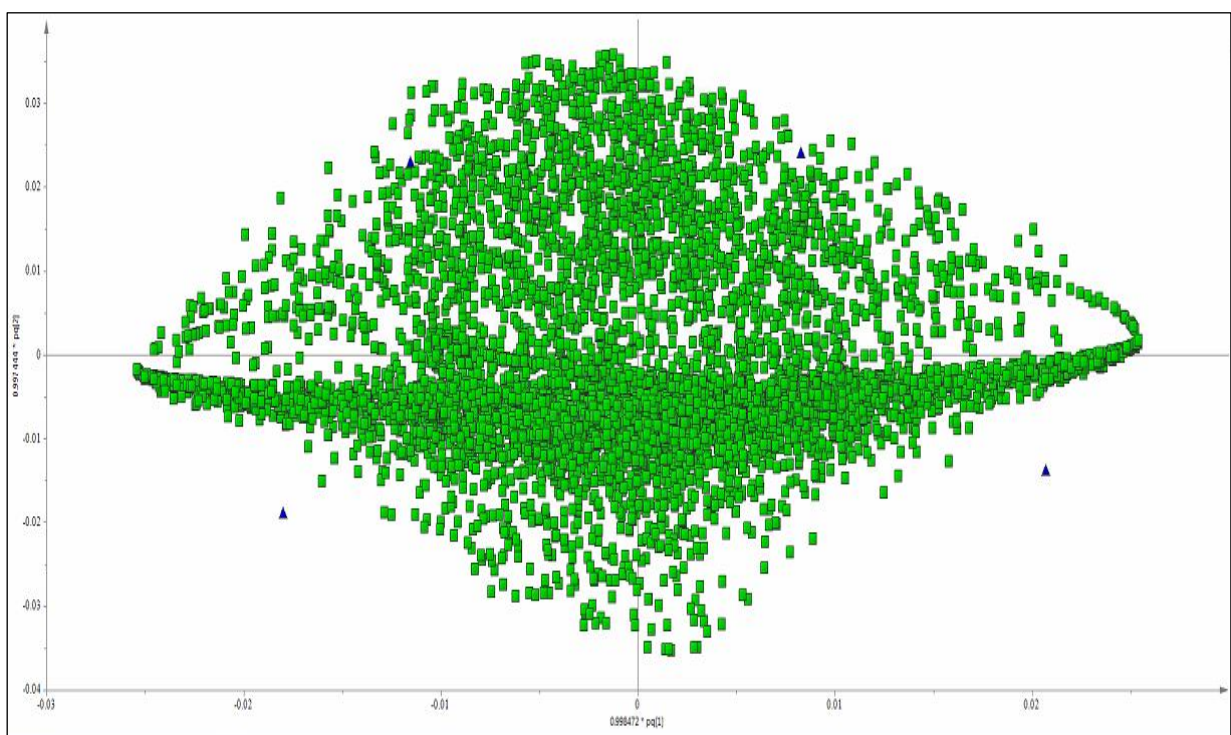


Figura 11 - Gráfico de *loadings* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) a partir dos quatro grupos observados no PCA para os perfis metabólicos de espécies do gênero *Lychnophora*.

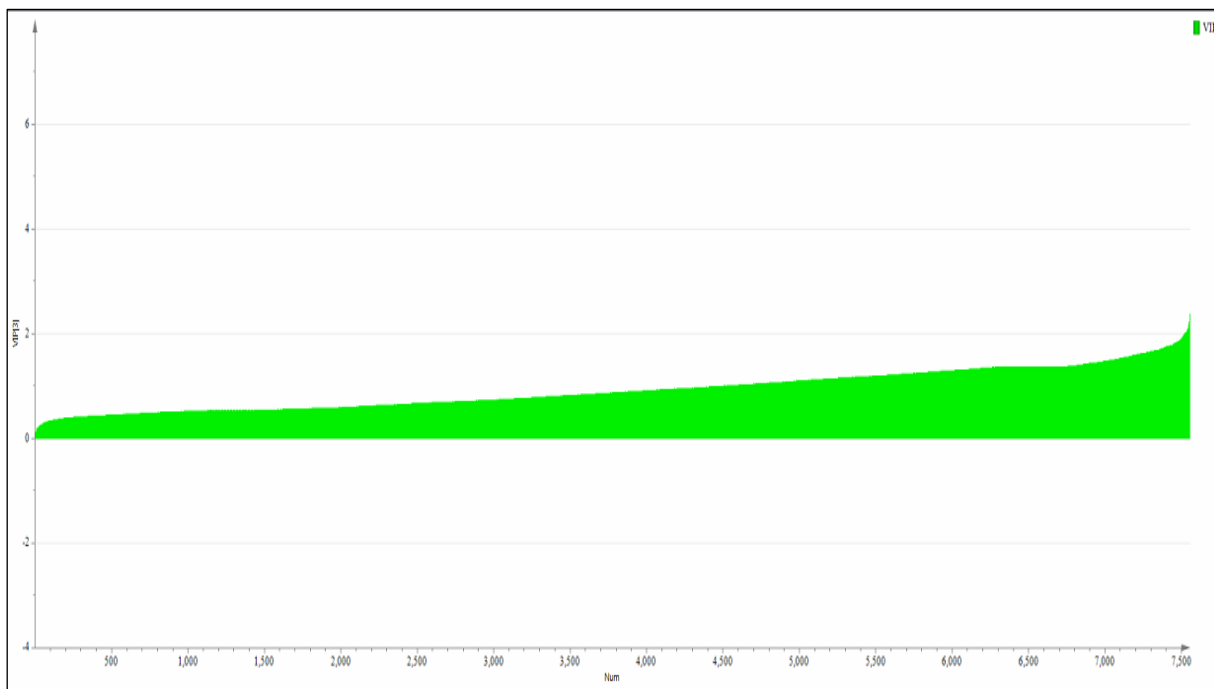


Figura 12 - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) de espécies do gênero *Lychnophora*.

A partir do VIP (Figura 12), foram selecionados os 12 principais *loadings* com valor superior a 1, com os quais foi possível determinar as variáveis responsáveis pela discriminação entre os grupos obtidos nas análises multivariadas de espécies do gênero *Lychnophora*. Em seguida, essas variáveis (íons) foram identificadas a fim de determinar as substâncias discriminantes.

As LST foram encontradas com ampla diversidade entre os grupos das espécies de *Lychnophora*. As espécies pertencentes ao grupo (3B) apresentaram 15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1'-Z-enil)-eremantolido como substância discriminante; o grupo (3C) apresentou 15-acetoxigoyazensolido, 5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido e 15-desoxigoyazensolido, e o grupo (3D) apresentou hexahidroxi-4-guaien-12,6-olido.

Além das LST, os flavonoides também foram encontrados com ampla variedade entre os diferentes grupos. Foram discriminantes para o grupo (3A) os flavonóides isorhamnetina-3-O-hexosídeo e 4'-O-metileriodictyol; o grupo (3B) apresentou 3-O-metilquercetina, 3-O-acetilpinobanksina e pinocembrina; o grupo (3C) apresentou 7-O-metilapigenina; e o grupo (3D) apresentou quercetina-3-O-(cafeoil)-hexosídeo e kaempferol-3-O-rutinosídeo.

As substâncias identificadas em cada um dos grupos (3A, 3B, 3C e 3D) estão descritas na Tabela 10 e representadas na Figura 13.

Tabela 10- Identificação das substâncias discriminantes presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Lychnophora* e os dados das análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF

Grupo	TR ^a (min)	Composto	Ions (m/z) no modo de ionização positivo	AIF no modo de ionização positivo	Ions (m/z) no modo de ionização negativo	AIF no modo de ionização negativo	UV max (nm)
3A	9,4	isorhamnetina-3-O-hexosídeo	[M + H] ⁺ 479.1287 bp, [(M + H) - 162] ⁺ 317.0794	479→ 317, 163 bp	[M - H] ⁻ 477.1034 bp	477→ 315, 314, 289, 285, 271, 243	253, 341
	13,0	4'-O-metileriodictyol	[M + H] ⁺ 303.0904 bp	303→ 289, 153 bp	[M - H] ⁻ 301.0798 bp	477→ 287	288, 323
	14,2	3-O-metilquercetina	[M + H] ⁺ 317.0713 bp	317→ 302 bp	[dimero - H] ⁻ 631.1134, [M - H] ⁻ 315.0565 bp	315→ 300 bp, 271, 255	255, 266, 313
3B	16,2	15-hidroxi-16α-(1'-metilprop-1'-Z-enil)-eremantolido	[dimero + Na] ⁺ 797.2733, [dimero + H] ⁺ 775.2945 [M + Na] ⁺ 399.1468, [M + H] ⁺ 377.1289, [M + H - (H ₂ O)] ⁺ 359.1578, 333.1390 bp	797→ 399 bp, 359, 333, 315	-	nao ioniza	267
	18,2	Pinocembrina	[M + H] ⁺ 257.0866 bp	257→ 153 bp	[M - H] ⁻ 255.0708 bp	255→ 213, 211 bp, 171	289
	18,1	3-O-acetilpinobanksina	[M + H] ⁺ 315.0959	315→ 273, 255, 227 bp, 199, 181, 153	[M - H] ⁻ 313.0757	313→ 271, 253 bp, 225, 197	293, 345
3C	14,2	15-acetoxigoyazensolido	[dimero + Na] ⁺ 743.2377, [dimero + H] ⁺ 721.2542 [M + H] ⁺ 361.1310 bp,	383, 361, 343, 291, 275, 257, 229 bp, 211, 183, 163	483.1334 bp	483, 337, 173 bp	
	18,0	15-desoxigoyazensolido	[dimero + Na] ⁺ 711.2490, [dimero + H] ⁺ 689.2643 [M + H] ⁺ 345.1456 bp, [M + Na] ⁺ 367.1189	367, 345, 259, 231, 213, 185 bp	[M - H] ⁻ 343.1322, 329.0779 bp, 299.0675, 277.0713, 215.1385		268
	18,9	7-O-metilapigenina	[M + H] ⁺ 285.1457 bp	285→ 271 bp	[M - H] ⁻ 283.0642 bp	283→ 269, 239, 211 bp	265, 330

Grupo	TR ^a (min)	Composto	Ions (m/z) no modo de ionização positivo	AIF no modo de ionização positivo	Ions (m/z) no modo de ionização negativo	AIF no modo de ionização negativo	UV max (nm)
3D	9,8	quercetina-3-O-(cafeoil)- hexosídeo	[M + H] ⁺ 627.1314	627 → 303, 163 bp	[M - H] ⁻ 625.1210 bp, 515.1234, 487.1361	625 → 463, 300	252, 265 sh, 310
	11,3	kaempferol-3-O-rutinosídeo	[M + H] ⁺ 595.1586 bp	595 → 287 bp, 177	[M - H] ⁻ 593.1302, 483.1397 bp	593 → 285 bp	267, 314
	14,7	hexahidróxi-4-guaien-12,6- olido	[M + H] ⁺ 331.0854 bp		[M - H] ⁻ 329.0765 bp	329 → 314, 299 bp, 271	254

^a tempo de retenção (min)

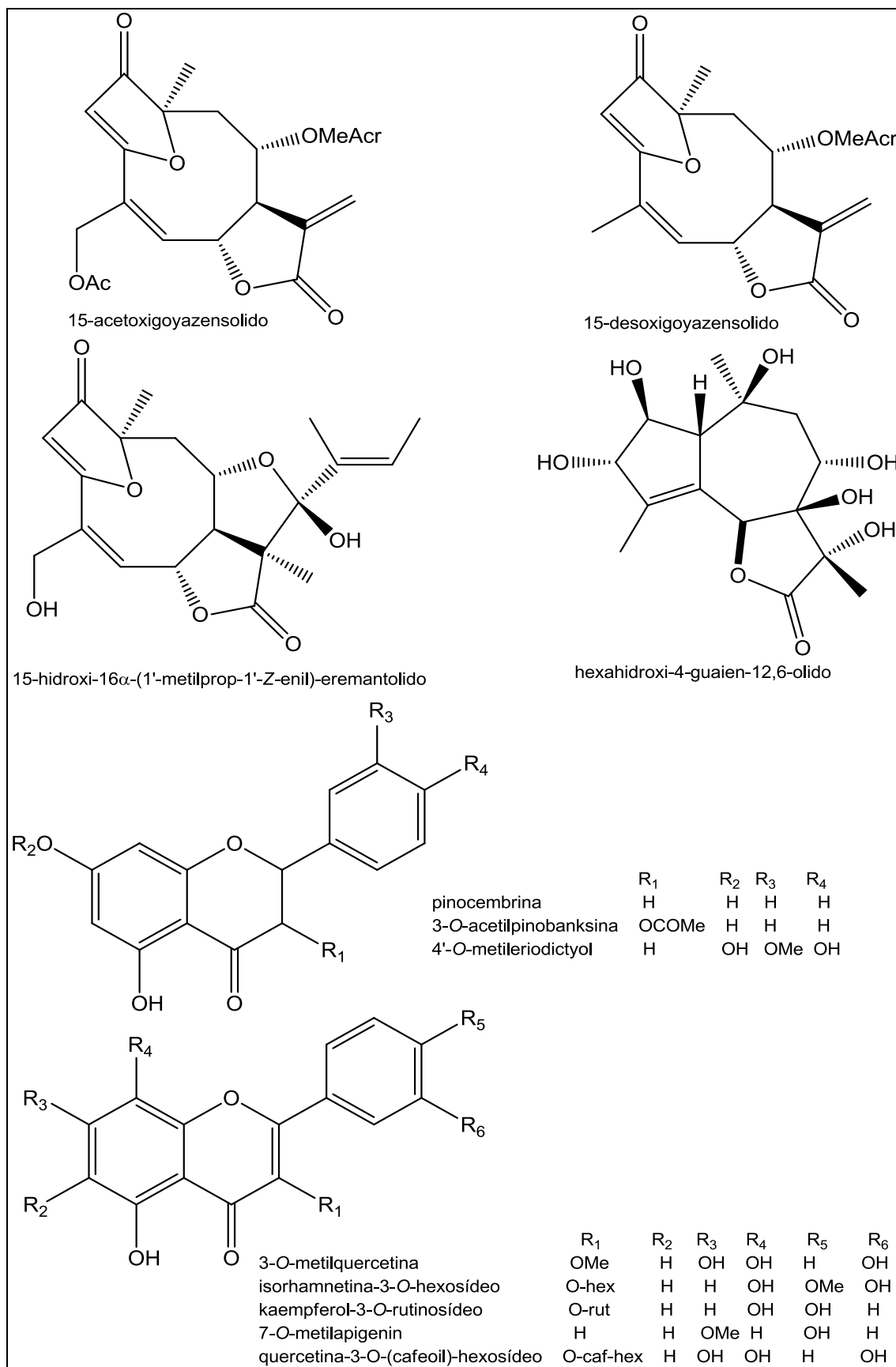


Figura 13 – Substâncias discriminantes identificadas por desreplicação nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Lychnophora* e os dados das análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF.

4.1.2.3. Análises metabolômicas por LC-MS e GC-MS de espécies do gênero *Eremanthus*

As espécies de *Eremanthus* representam o segundo maior gênero analisado, portanto, optou-se por também analisá-las separadamente, assim como realizado para *Lychnophora*. As análises multivariadas realizadas com as espécies de *Eremanthus* (Figura 14) também mostram aspectos em comum com a filogenia (Anexo A) proposta por Loeuille et al. (2015a). Os grupos formados nas análises multivariadas por PCA foram divididos em 4A, 4B, 4C e 4D (Tabela 11).

Tabela 11 – Espécies do gênero *Eremanthus* pertencentes aos grupos formados no PCA (Figura 14) a partir dos dados obtidos por UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto.

Grupo	Espécies ^a
4A	Epo, Eca
4B	Eve, Ecr, Ego, Eau, Eer, Ele, Ear, Emo
4C	Ein, Egl, Ema, Eel, Eci, Eun, Ebr, Earg, EXPr
4D	Epa

^aEspécies (*Eremanthus arboreus* - Ear), (*E. argenteus* - Earg), (*E. auriculatus* - Eau), (*E. brevifolius* - Ebr), (*E. capitatus* - Eca), (*E. cinctus* - Eci), (*E. crotonoides* - Ecr), (*E. elaeagnus* - Eel), (*E. erythropappus* - Eer), (*E. glomerulatus* - Egl), (*E. goyazensis* - Ego), (*E. incanus* - Ein), (*E. leucodendron* - Ele), (*E. mattogrossensis* - Ema), (*E. mollis* - Emo), (*E. pabstii* - Epa), (*E. polycephalus* - Epo), (*Eremanthus* sp. X *Paralychnophora reflexoauriculata* (G.M. Barroso) - EXPr), (*E. uniflorus* - Eun), (*E. veadeiroensis* - Eve).

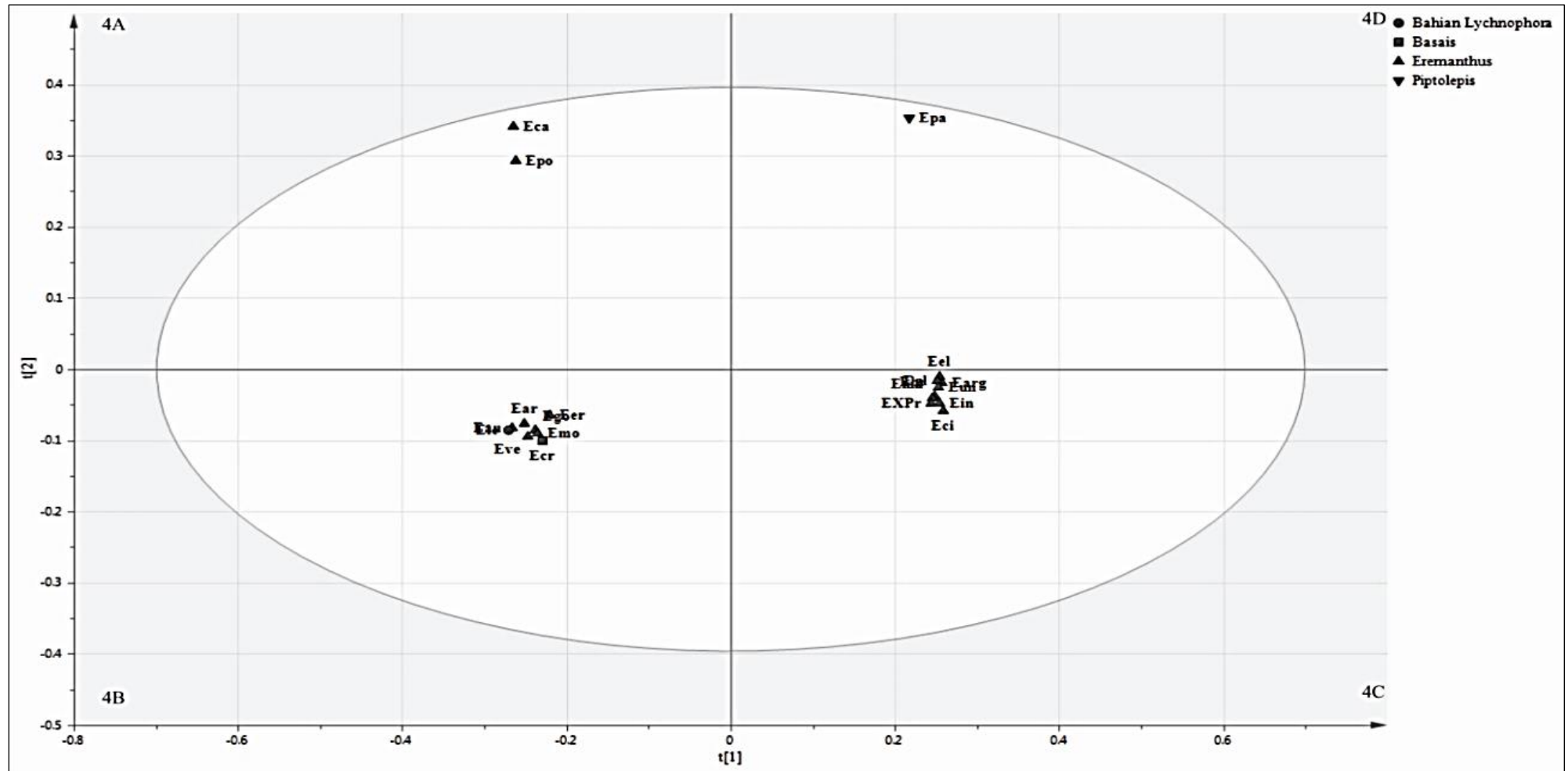


Figura 14 - Gráfico da análise de componentes principais (PC1 vs. PC2) de espécies do gênero *Eremanthus*.

A maioria das espécies de *Eremanthus* pertence aos grupos (4B) e (4C), enquanto que apenas as espécies *E. capitatus* (Eca) e *E. polycephallus* (Epo) pertencem ao grupo (4A). Além disso, a espécie *E. pabstii* (Epa) é a única classificada como *Piptolepis*, de acordo com Loeuille et al. (2015a), assim como, é a única espécie pertencente ao grupo (4D). *E. leucodendron* (Ele), classificada como Bahian *Lychnophora* e *E. crotonoides* (Ecr) pertencem ao grupo (4B).

Com base nos grupos formados na análise multivariada por PCA (Figura 14), foi feita a análise multivariada por OPLS-DA (Figura 15), por meio da qual foi possível discriminar os grupos com o intuito de determinar como as variáveis afetam a separação entre estes grupos. Assim, foi obtido o gráfico de importância das variáveis (VIP) (Figura 16), capaz de informar a relação entre as variáveis Y e X e de determinar os íons capazes de diferenciar os grupos nas análises metabolômicas.

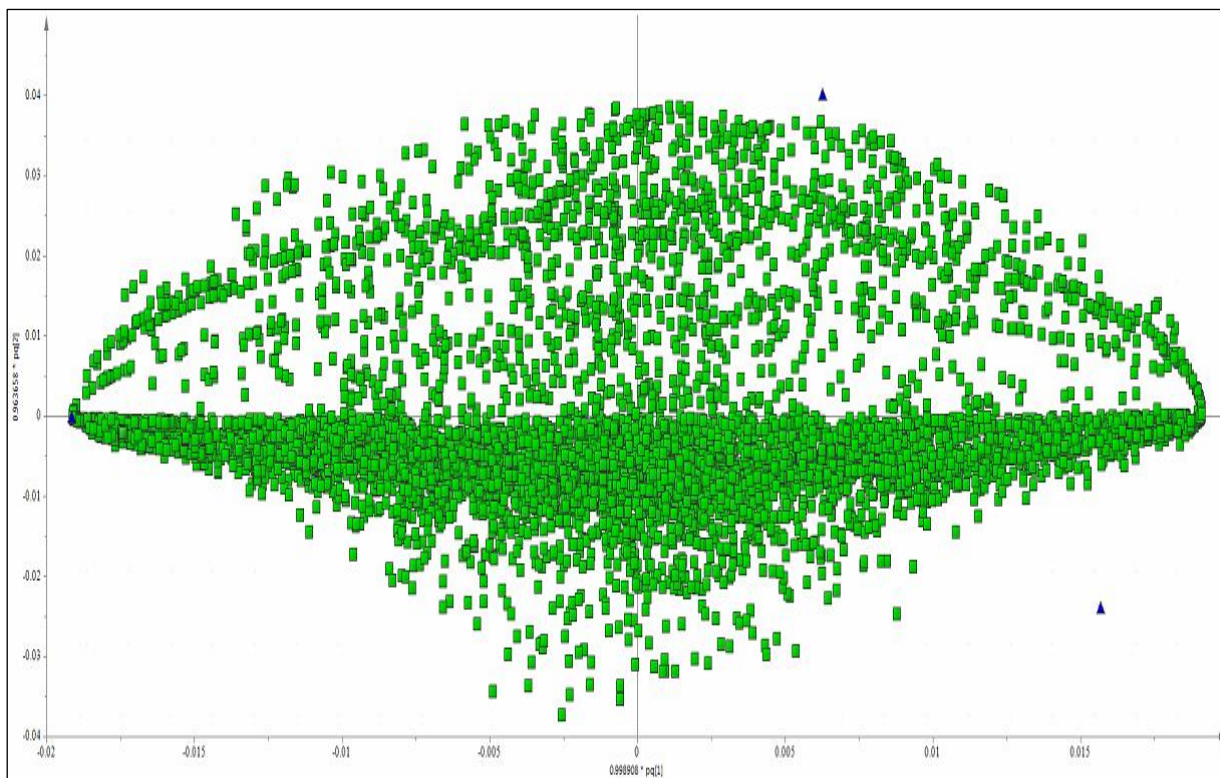


Figura 15 - Gráfico de *loadings* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) a partir dos quatro grupos observados no PCA para os perfis metabólicos de espécies do gênero *Eremanthus*.

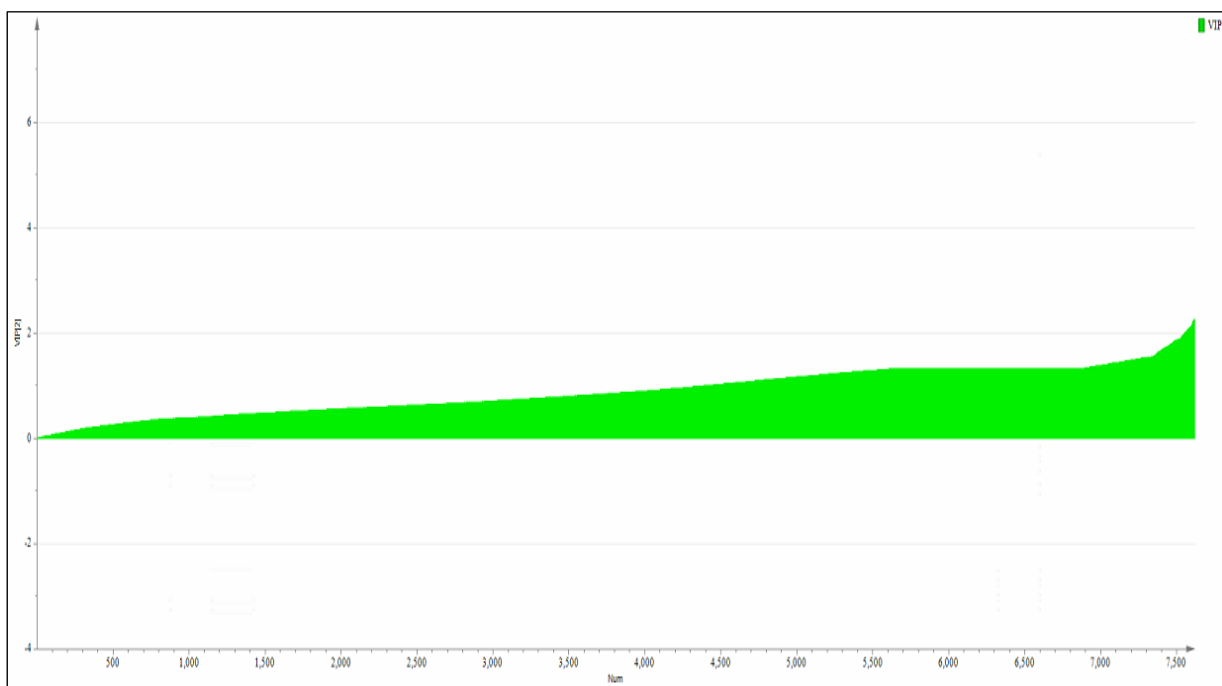


Figura 16 - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) de espécies do gênero *Eremanthus*

A partir do VIP (Figura 16), foram selecionados os 15 principais *loadings* com valor superior a 1, com os quais foi possível determinar as variáveis responsáveis pela discriminação entre os grupos obtidos nas análises multivariadas de perfis metabólicos de espécies do gênero *Eremanthus*. Em seguida, essas variáveis (íons) foram identificadas com o intuito de determinar as substâncias discriminantes.

Os flavonoides foram importantes para a separação dos grupos das espécies de *Eremanthus*. As espécies pertencentes ao grupo (4A) apresentaram luteolina-6,8-di-C-hexosídeo, quercetina-3-O-(4''-O-trans-cafeoil)- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -galactopiranosídeo, kaempferol-3-O-hexosil-O-cafeoil-O-rhamnosídeo, luteolina, apigenina e kaempferol, enquanto que isorhamnetina-3-O-hexosídeo, isoorientina-3''-O-hexosídeo e vicenina-2 foram encontrados nas espécies do grupo (4B). Além disso, as espécies pertencentes ao grupo (4C) apresentaram ermanina e 3-O-metilkaempferol, enquanto que o grupo (4D), representado pela espécie *E. pabstii* (Epa) apresentou 3-O-metilquercetina.

Com relação às LST, é importante observar que estas substâncias também foram muito importantes na separação das espécies pertencentes aos grupos (4C) e (4D). Dessa forma, o grupo (4C) apresentou eremantolido A e 15-desoxigoyazensolido como substâncias discriminantes; já a espécie *E. pabstii* (Epa), representante do grupo (4D), apresentou uma LST não identificada.

As substâncias identificadas em cada um dos grupos (4A, 4B, 4C e 4D) estão descritas na Tabela 12 e representadas na Figura 17.

Tabela 12 - Identificação das substâncias presentes nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Eremanthus* e os dados das análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF

Grupo	TR ^a (min)	Composto	Ions (m/z) no modo de ionização positivo	AIF no modo de ionização positivo	Ions (m/z) no modo de ionização negativo	AIF no modo de ionização negativo	UV max (nm)
4A	6,2	luteolina-6,8-di-C-hexosídeo	[M + H] ⁺ 611.1635 bp	611→ 593, 575, 557, 539, 497, 473 bp, 455, 425, 395, 371, 353, 341, 311, 277, 255	[M - H] ⁻ 609.1532 bp	609→ 489, 471, 429, 399, 369, 191, 161	272, 280 sh, 336
	7,1	quercetina-3-O-(4'''-O-trans-cafeoil)-α-rhamnopiranosil-(1→6)-β-galactopiranosídeo	[M + H] ⁺ 773.1983 bp	773→755, 737, 707, 677, 653, 635, 627, 587, 557, 533, 503, 471, 437, 395, 353, 325, 303, 277, 255, 163	[M - H] ⁻ 771.1687 bp	771→ 609, 591, 531, 471, 369	273, 280 sh, 335
	8,6	kaempferol-3-O-hexose-O-cafeoil-O-rhamnosídeo	[M + H] ⁺ 757.2095	757→739, 637, 611, 577, 541, 517, 471, 457, 439, 379, 355, 337, 325, 287, 177, 163	[M - H] ⁻ 755.1839 bp, 652.1898, 579.1732	755→ 593, 575, 473, 455, 335, 179	272, 290, 330
	10,9	luteolina	[M + H] ⁺ 287.0634 bp	287	[dimero - H] ⁻ 571.0914, [M - H] ⁻ 285.0490 bp	M 285	253, 262 sh, 293sh, 347
	12,2	apigenina	[M + H] ⁺ 271.0609 bp	271→229, 153	[M - H] ⁻ 269.0598 bp	M 269	268, 333
	12,4	kaempferol	[M + H] ⁺ 287.0619 bp	271→165	[dimero - H] ⁻ 571.0932, [M - H] ⁻ 285.0436 bp	M 285	265, 289, 365
4B	8,2	vicenina-2	[M + H] ⁺ 595.1785 bp	595→ 577, 559, 541, 523, 481, 457 bp, 439, 409, 379, 355, 337, 325, 295	[M - H] ⁻ 593,1546 bp	593→ 473, 383, 353	271, 334
	12,3	isorhamnetina-3-O-hexosídeo	[M + H] ⁺ 479.1287 bp, [(M + H) -162] ⁺ 317.0794	479→ 317 bp	[M - H] ⁻ 477.1034 bp	477→ 315, 314, 271, 243	254, 347
	13,1	isoorientina-3''-O-glucopiranosídeo	[M + H] ⁺ 611.1298 bp, 549.2340	611→ 287, 163 bp	[M - H] ⁻ 609.1233 bp, 547.2209	609→ 547, 323, 285, 179, 161	264, 288 sh, 329

Grupo	TR ^a (min)	Composto	Ions (m/z) no modo de ionização positivo	AIF no modo de ionização positivo	Ions (m/z) no modo de ionização negativo	AIF no modo de ionização negativo	UV max (nm)
4C	15,6	3-O-metilkaempferol	[M + H] ⁺ 301.0787 bp	301→286, 258 bp, 229, 165	[M - H] ⁻ 299.0678 bp	299→ 284 bp, 256, 227	267, 290, 346
	19,0	eremantolido A	[M + H] ⁺ 349.1699 bp , [M + H - (H ₂ O)] ⁺ 331.1506	349→283, 268 bp, 239, 211	-		268
	19,5	ermanina	[M + H] ⁺ 315.0954 bp	315→ 300 bp, 285, 257, 229, 201	[M - H] ⁻ 313.0795 bp	313→ 298, 283, 255, 211, 183	267, 280 sh, 340
	20,4	15-desoxigoyazensolido	[M + H] ⁺ 345.1456 bp, 316.3207, 259.1976		-		268
4D	14,7	3-O-metilquercetina	[M + H] ⁺ 317.0713 bp	317→302, 255 bp	[M - H] ⁻ 315.0565 bp	315→ 300 bp, 255, 243, 227	271, 333
	15,2	não identificado (LST)	[M + Na] ⁺ 395.2907 bp, [M + H] ⁺ 373.6252	395→373, 361, 327, 267, 255 bp	-		246

^aTempo de retenção (min)

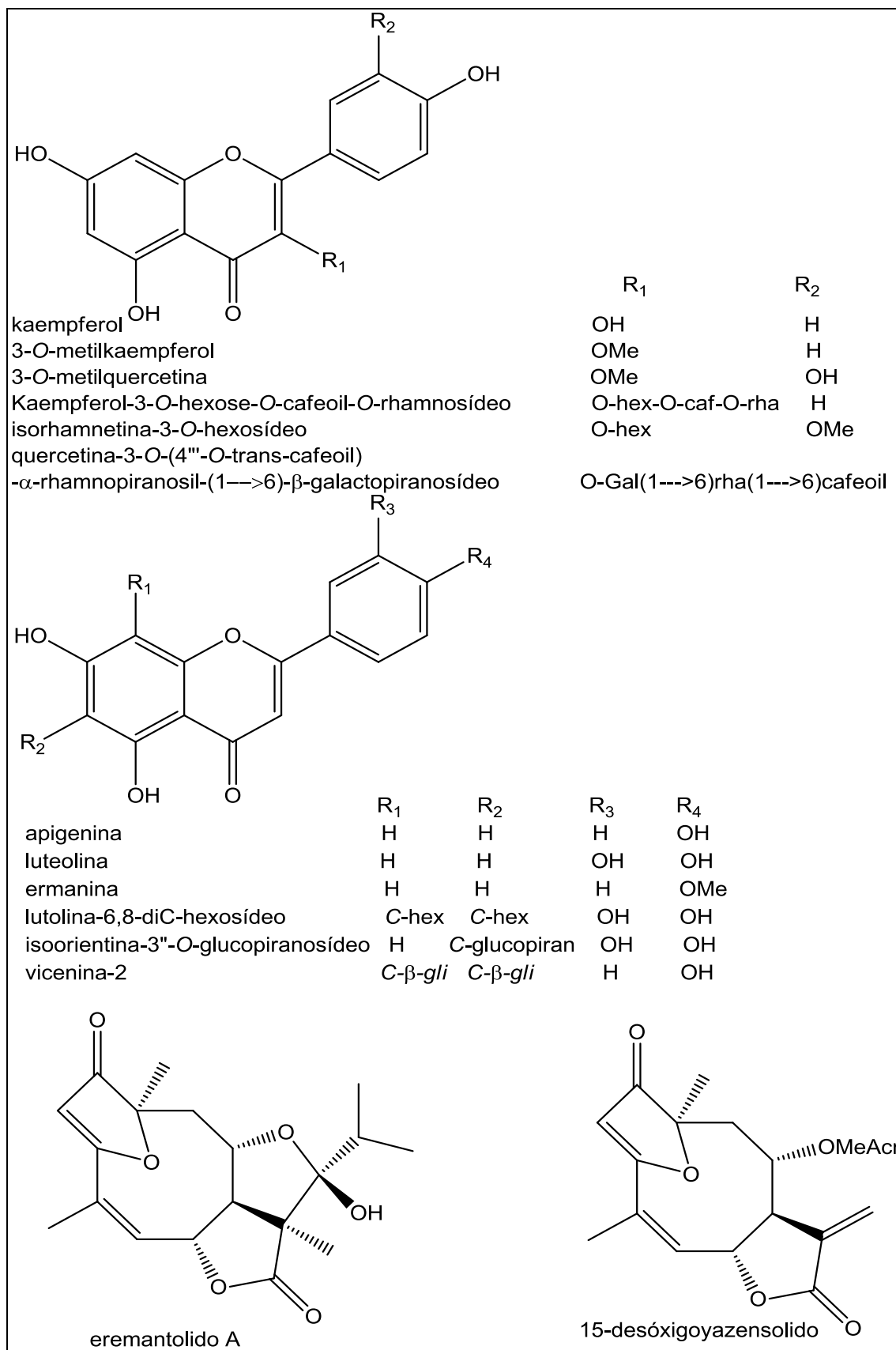


Figura 17 – Substâncias discriminantes identificadas por desrepleção nos grupos formados nas análises multivariadas por PCA das espécies de *Eremanthus* e os dados das análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF.

4.2. Identificação dos compostos presentes nas espécies da subtribo Lychnophorinae

4.2.1. Flavonoides

A luteolina e o kaempferol foram identificados por meio dos espectros obtidos no UV e pelos dados dos espectros de massas. Ambos apresentam o mesmo íon precursor m/z 287 $[M + H]^+$ ($C_{15}H_{10}O_6$), entretanto os íons formados no AIF em ambos os modos de ionização permitem diferenciá-los. Assim, o kaempferol apresentou o íon característico m/z 165 (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003) no espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo, enquanto que a luteolina apresentou o íon característico m/z 199 (CUYCKENS; CLAEYS, 2004) no espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo.

A apigenina apresentou espectro no UV com absorção máxima em 268 e 333 nm (MARKHAM, 1982). O espectro de massas no modo negativo de ionização apresentou o íon precursor m/z 269 $[M - H]^-$ e o espectro de massas no modo positivo de ionização apresentou o íon precursor m/z 271 $[M + H]^+$. Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou o íon m/z 153, característico desta substância.

A pinocembrina apresentou os íons precursores m/z 257 $[M + H]^+$ e m/z 255 $[M - H]^-$ ($C_{15}H_{12}O_4$). Os íons formados no espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo foram os esperados para esta substância (GOBBO-NETO; LOPES, 2008).

A vicenina-2 (6,8-di-C- β -glucupiranosilapigenina) apresentou espectro no UV \approx 271 e 334 nm e íons precursores m/z 593 [M - H]⁻ e m/z 595 [M + H]⁺ característicos para esta substância (GOBBO-NETO et al., 2008a; ISWALDI et al., 2011; MARKHAM, 1982). Esta identificação foi confirmada pelos íons m/z 473, m/z 383 e m/z 353 presentes no espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo (GOBBO-NETO et al., 2008a)

A substância luteolina-6,8-di-C-hexosídeo apresentou o íon precursor m/z 609 [M - H]⁻ (C₂₇H₃₀O₁₆) e o espectro de massas obtido por AIF foi característico para esta substância. No espectro de massas por AIF no modo de ionização negativo é possível observar a presença do íon m/z 399, o qual representa a aglicona ligada a um resíduo de açúcar, portanto, indica que esta aglicona é uma triidróxiflavona (BREITER et al., 2011).

Por meio do espectro no UV característico para 3',4'-diOH em flavonas e do espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo, contendo os íons m/z 357 e m/z 327, foi possível identificar a orientina (luteolina-8-C-glicosídeo). Ambos os íons indicam a presença de mono-C-glicosídeos. Por fim, a ausência do íon m/z 429 é característica para orientina (BREITER et al., 2011).

A substância 6-hidroxluteolina-O-dipentosídeo apresentou espectro no UV característico para luteolina. O espectro de massas apresentou os íons precursores m/z 589 [M + Na]⁺ e m/z 565 [M - H]⁻. Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou o íon m/z 287, o qual corresponde à aglicona luteolina (BREITER et al., 2011).

Isoorientina-3"-O-glucupiranosídeo apresentou espectro no UV com máxima de absorção em 264 e 329 nm e um ombro em 288 nm. Os íons

precursores m/z 609 $[M - H]^-$ e m/z 611 $[M + H]^+$ ($C_{27}H_{30}O_{16}$), e a comparação com dados da literatura permitiram a identificação desta substância (DENG et al., 2008).

A substância kaempferol-3-O-hexose-cafeoil-rhamnosídeo apresentou os íons precursores m/z 757 $[M + H]^+$ e m/z 755 $[M - H]^-$ ($C_{37}H_{40}O_{17}$). O espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou os íons m/z 611, formado pela perda de rhamnosil, m/z 471, m/z 325, m/z 287 e m/z 163 (MARTUCCI et al., 2014).

O íon precursor m/z 593 $[M - H]^-$ e o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo apresentou o íon m/z 285, formado após a eliminação de rutinosídeo, sugerindo se tratar do kaempferol-3-O-rutinosídeo. Ademais, no modo de ionização positivo, o espectro de massas obtido por AIF apresentou o íon m/z 287, também formado após a eliminação do rutinosídeo (MARTUCCI et al., 2014).

A substância quercetina-3-O-(4''-O-trans-cafeoil)- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -galactopiranosídeo apresentou o íon precursor m/z 773 $[M + H]^+$ ($C_{36}H_{36}O_{19}$). Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou os íons m/z 627, m/z 471, m/z 325 e m/z 303, os quais são característicos da quercetina (LI et al., 2009). Por fim, a comparação com padrão permitiu confirmar esta identificação.

O espectro no UV similar ao esperado para o flavonoide pinobanksina e os íons precursores m/z 315 $[M + H]^+$ e m/z 313 $[M - H]^-$ ($C_{17}H_{12}O_6$) sugeriram tratar-se da 3-O-acetilpinobanksina. O espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo apresentou íons m/z 253 e m/z 271 resultantes de perdas neutras de ácido acético e C_2H_2O , respectivamente. Enquanto que no

espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo, foi possível observar a presença do íon m/z 153, confirmando os substituintes propostos para o anel A do flavonoide (GOBBO-NETO; LOPES, 2008).

A substância 3-O-metilquercetina apresentou espectro no UV típico de flavonas. Além disso, os íons precursores m/z 317 $[M + H]^+$ e m/z 315 $[M - H]^-$ ($C_{16}H_{12}O_7$) e os espectros de massas obtidos por AIF em ambos os modos de ionização foram os esperados para esta substância (LI et al., 2009).

A 3',4',7-tri-O-metilquercetina (CUYCKENS; CLAEYS, 2004) apresentou espectro no UV típico de flavonas. Os espectros de massas apresentaram os íons precursores m/z 345 $[M + H]^+$ e m/z 343 $[M - H]^-$. Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou o íon m/z 330 como pico base, formado após a perda de duas metilas, enquanto que o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo apresentou o íon m/z 301, característico de quercetina.

A substância 5-hidroxi-7,3,4-trimetoxiflavona (SACILOTTO et al., 2002) apresentou espectro no UV, típico de flavonas, com absorção máxima em 254 e 348 nm e um ombro em 280 nm. Os espectros de massas apresentaram os íons precursores m/z 329 $[M + H]^+$ e m/z 327 $[M - H]^-$ ($C_{18}H_{16}O_6$) e o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou os íons m/z 314 e m/z 299, formados após a perda de uma e duas metilas, respectivamente.

O 3-O-metilkaempferol apresentou espectro no UV similar ao obtido para o kaempferol. Os íons precursores m/z 317 $[M + H]^+$ e m/z 315 $[M - H]^-$ e os espectros de massas obtidos por AIF foram característicos para esta

substância, com destaque para o íon m/z 165, característico da fragmentação de kaempferol (BOHLMANN et al., 1981a).

O espectro no UV com absorção máxima em 288 e um ombro em 323 nm e os íons precursores presentes nos modos positivo e negativo de ionização foram m/z 303 $[M + H]^+$ e m/z 301 $[M - H]^-$, respectivamente, indicando a presença de 4'-metileriodictyol. Além disso, os espectros de massas obtidos por AIF nos modos positivo e negativo de ionização apresentaram os íons m/z 289 e m/z 287, ambos correspondentes à aglicona eriodictyol, formada após a perda de uma metila (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003).

A substância 7-O-metilapigenina apresentou espectro no UV similar ao obtido para a apigenina. Os espectros de massas apresentaram os íons precursores m/z 285 $[M + H]^+$ e m/z 283 $[M - H]^-$. Os espectros de massas obtidos por AIF no modo de ionização positivo e no modo de ionização negativo também apresentaram os íons m/z 271 e m/z 269, respectivamente. Ambos os íons correspondem à aglicona e são formados após a perda de uma metila (MARKHAM, 1982; MARTUCCI et al., 2014).

A isorhamnetina-3-O-hexosídeo (GRAEL et al., 2010) foi identificada devido à presença dos íons precursores m/z 477 $[M - H]^-$ e m/z 479 $[M + H]^+$ ($C_{16}H_{12}O_7$). No espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo, é possível observar a presença do íon 317, correspondente à aglicona e formado após a perda da unidade de açúcar (SANTOS et al., 2011). Além disso, no espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo, foi possível observar o íon m/z 271, o qual é característico da fragmentação desta substância.

A substância 2''-cumaroilisoorientina apresentou os íons precursores $[M + H]^+$ m/z 595 e $[M - H]^-$ m/z 593 e espectro no UV com absorção máxima em 267, 290 sh, 314, o que é esperado para a isoorientina. No espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo, é possível observar a presença do íon 447, formado após a perda de cumaroil (DENG et al., 2008).

A ermanina (5,7-diidroxí-3',4'-dimetoxiflavona) (VICHNEWSKI et al., 1999) apresentou espectro no UV com absorção máxima em 267 e 340 nm e um ombro em 280 nm. Os espectros de massas apresentaram os íons precursores m/z 315 $[M + H]^+$ e m/z 313 $[M - H]^-$. Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou os íons m/z 300 e m/z 285, formados após a perda de uma e duas metilas, respectivamente.

A quercetina-3-O-(cafeoil)-hexosídeo apresentou UV máximo característico de ácido hidroxicinâmico. Entretanto, o padrão de fragmentação indicou um flavonol O-substituído. Os íons precursores presentes nos espectros de massas foram m/z 627 $[M + H]^+$ e m/z 625 $[M - H]^-$. Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização negativo apresentou o íon m/z 463, formado após a perda do cafeoil, e o íon m/z 301, o qual corresponde à aglicona quercetina (FRANCESCATO et al., 2013).

4.2.2. Lactonas Sesquiterpênicas

A lactona sesquiterpênica 15-hidroxi-eremantolido B (VICHNEWSKI et al., 1999) apresentou absorção máxima no UV em 268 nm, típico de eremantolidos. O espectro de massas apresentou os íons precursores m/z 377 $[M - H]^-$ e m/z 379 $[M + H]^+$. Já o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou os íons m/z 361, correspondente à perda de água; m/z 293 e m/z 317, os quais são correspondentes ao padrão de fragmentação desta lactona sesquiterpênica (GOBBO-NETO e LOPES, 2008).

A substância 15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1'-Z-enil)-eremantolido apresentou absorção máxima no UV em 267 nm. O espectro de massas obtido no modo de ionização positivo apresentou o íon precursor m/z 377 $[M + H]^+$ e o espectro de massas obtido por AIF no mesmo modo de ionização apresentou os íons m/z 359, correspondente a perda de água e m/z 315 (GOBBO-NETO e LOPES, 2008).

A substância 15-acetoxigoyazensolido apresentou absorção máxima no UV a 268 nm. O espectro de massas no modo de ionização positivo apresentou o íon precursor m/z 361 $[M + H]^+$. Além disso, o espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo apresentou os íons m/z 343 correspondente à perda de água, m/z 301 referente à perda de acetato e m/z 229 (DA COSTA et al., 1993).

A substância 15-desoxigoyazensolido apresentou absorção máxima no UV em 268 nm. O íon precursor presente no espectro de massas obtido no modo de ionização positivo foi m/z 345 $[M + H]^+$ e o íon m/z 259 $[M + H - (C_4H_6O_2)]^+$ correspondente à perda do éster metacrilato. Além disso, a

ocorrência desta substância em espécies da subtribo Lychnophorinae permitiu sua identificação (BORELLA., et al 1998; SAKAMOTO et al., 2003).

A substância eremantolido A apresentou absorção máxima no UV em 268 nm e o espectro de massas no modo de ionização positivo apresentou o íon m/z 349 $[M + H]^+$. A ocorrência desta substância na subtribo Lychnophorinae e dados da literatura permitiram a sua identificação (BOHLMANN et al., 1982b; BORELLA., et al 1998; DAVALIAN; GARRAT, 1975; HERZ; KUMAR, 1980).

O espectro no UV com absorção máxima em 254 nm é típico de guaianólidos. A busca por LST desta classe no DNP (Dictionary of Natural Products), utilizando a fórmula molecular calculada ($C_{15}H_{22}O_8$) sugere que se trata da substância hexahidroxi-4-guaien-12,6-olido. As LST do tipo guaianólidos estão presentes em espécies da subtribo Lychnophorinae (ROBINSON, 1980; BOHLMANN et al. 1980a; BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990).

4.3. Marcadores quimiotaxonômicos

As análises multivariadas realizadas com os dados de UHPLC-UV-MS, obtidos nos modos de ionização positivo e negativo, quando utilizados em conjunto com os dados de GC-MS foram mais robustas (R^2 cumulativa = 0,444 e Q^2 cumulativa = 0,325) (Tabela 5) do que quando realizadas apenas com os dados obtidos por UHPLC-UV-MS (R^2 cumulativo = 0,291 e Q^2 cumulativo = 0,167). Por outro lado, as análises multivariadas utilizando apenas os dados de GC-MS foram ainda mais robustas (R^2 cumulativo = 0,776 e Q^2 cumulativo = 0,481) (Tabela 4) que as análises utilizando os dados de UHPLC-UV-MS e GC-MS em conjunto. Entretanto, como pode ser observado na (Figura 2) (item

4.1.1), apresentaram baixa semelhança com a filogenia (Anexo A) obtida por LOEUILLÉ et al. (2015a).

Dessa forma, é importante observar que análises metabolômicas por PCA (Figura 4) e HCA (Figura 5) com os dados das 78 espécies da subtribo Lychnophorinae analisadas por UHPLC-UV-MS e GC-MS indicaram a provável presença de marcadores quimiotaxonômicos entre flavonoides e lactonas sesquiterpênicas (Tabela 13).

Tabela 13 - Marcadores quimiotaxonômicos identificados nas 78 espécies analisadas da subtribo Lychnophorinae

Gênero	Espécies	Marcadores Quimiotaxonômicos
<i>Heterocoma</i>	<i>H. albida</i> (Hal), <i>H. ekmaniana</i> (Hek), <i>H. robinsoniana</i> (Hro), <i>H. lanuginosa</i> (Hla)	kaempferol
<i>Paralychnophora</i> <i>Piptolepis</i>	<i>P. bicolor</i> (Pbi), <i>P. patriciana</i> X <i>P. bicolor</i> (PpXPb) <i>P. monticola</i> (Pmo), <i>P. oleaster</i> (Pio)	vicenina-2
<i>Lychnophoriopsis</i> <i>Paralychnophora</i>	<i>L. hatschbachii</i> (Lpha), <i>L. candelabrum</i> (Lpca) <i>P. atkinsiae</i> (Pat), <i>P. patriciana</i> (Ppa), <i>P. reflexoauriculata</i> (Pre)	6-hidroxluteolina-O-dipentosídeo 5-hidroxi-7,3,4-trimetóxi flavona
<i>Piptolepis</i>	<i>P. ericoides</i> (Pie), <i>P. schultziiana</i> (Pis)	
<i>Prestelia Alliance</i>	<i>L. humílima</i> (Lhu), <i>L. melobarretoi</i> (Lme), <i>L. tomentosa</i> (Lto)	quercetina-3-O-(cafeoil)-hexosídeo kaempferol-3-O-rutinosídeo hexahidroxi-4-guaien-12,6-olido
<i>Bahian Lychnophora</i>	<i>L. santosii</i> (Lst), <i>L. regis</i> (Lre), <i>L. triflora</i> (Ltr), <i>L. bishopii</i> (Lbi)	3-O-metilquercetina
<i>Lychnophora</i>	<i>L. crispa</i> (Lcr), <i>L. ericoides</i> (Ler), <i>L. pinaster</i> (Lpi)	3-O-acetilpinobanksina 15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1'-Z-enil)- eremantolido
<i>Lychnophora</i>	<i>L. passerina</i> (Lpa), <i>L. ramosíssima</i> (Lra), <i>L. salicifolia</i> (Lsa), <i>L. villosíssima</i> (Lvi) <i>L. diamantinana</i> (Ldi), <i>Lychnophoriopsis candelabrum</i> (Lpca), <i>L. hatschbachii</i> (Lpha)	15-acetoxigoyazensólido 5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15- isogoyazensanolido 15-desoxigoyazensólido 7-O-metilapigenina

Os flavonoides kaempferol e vicenina-2 são prováveis marcadores quimiotaxonômicos para espécies do gênero *Heterocoma* [*H. albida* (Hal), *H. ekmaniana* (Hek), *robinsoniana* (Hro) e *H. lanuginosa* (Hla)], do gênero *Paralychnophora* [*P. bicolor* (Pbi) e *P. patriciana* X *P. bicolor* (PpXPb)] e para as espécies do gênero *Piptolepis* [*P. monticola* (Pmo) e *P. oleaster* (Pio)]. Entretanto, os flavonoides 6-hidroxiluteolina-O-dipentosídeo e 5-hidroxi-7,3,4-trimetoxiflavona são possíveis marcadores para espécies do gênero *Lychnophoriopsis* [*L. hatschbachii* (Lpha) e *L. candelabrum* (Lpca)]; para espécies do gênero *Paralychnophora* [*P. atkinsiae* (Pat), *P. patriciana* (Ppa) e *P. reflexoauriculata* (Pre)] e para espécies do gênero *Piptolepis* [*P. ericoides* (Pie) e *P. schultziiana* (Pis)].

Em relação às espécies do gênero *Lychnophora*, podemos notar que os flavonoides quercetina-3-O-(cafeoil)-hexosídeo e kaempferol-3-O-rutinosídeo e a lactona sesquiterpênica hexahidroxi-4-guaien-12,6-olido são possíveis marcadores quimiotaxonômicos para espécies do gênero *Prestelia Alliance* [*L. humílima* (Lhu), *L. melobarretoii* (Lme) e *L. tomentosa* (Lto)].

Os flavonoides 3-O-metilquercetina, 3-O-acetilpinobanksina e pinocembrina e a lactona sesquiterpênica 15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1'-Z-enil)-eremantolido são possíveis marcadores para espécies do gênero Bahian *Lychnophora* [*L. santosii* (Lst) *L. regis* (Lre), *L. triflora* (Ltr) e *L. bishopii* (Lbi)]. Em relação às espécies *L. crispa* (Lcr), *L. ericoides* (Ler) e *L. pinaster* (Lpi) do gênero *Lychnophora*, as três apresentam os mesmos prováveis marcadores quimiotaxonômicos das espécies do gênero Bahian *Lychnophora*.

Por outro lado, as lactonas sesquiterpênicas 15-acetoxigoyazensolido, 5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido e 15-desoxigoyazensolido

e o flavonoide 7-O-metilapigenina são possíveis marcadores para as espécies *L. passerina* (Lpa), *L. ramosíssima* (Lra), *L. salicifolia* (Lsa) e *L. villosissima* (Lvi), *L. diamantinana* (Ldi), *Lychnophoriopsis candelabrum* (Lpca) e *L. hatschbachii* (Lpha), também do gênero *Lychnophora*.

Os flavonóis, flavanonas e lactonas sesquiterpênicas do tipo heliangolido, subtipo eremantolido foram amplamente encontradas em espécies de *Lychnophora* (SARGENTI; VICHNEWSKI, 2000; SAKAMOTO et al., 2003; GOBBO-NETO; LOPES, 2008), confirmando a provável presença destes marcadores quimiotaxonômicos nas espécies de Bahian *Lychnophora*, assim como as lactonas sesquiterpênicas do tipo heliangolido, subtipo goyazensolido também foram identificadas como marcadores no gênero *Lychnophora* (BOHLMANN et al., 1980b, CHICARO et al., 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2008). A LST do tipo heliangolido foi considerada um importante marcador capaz de caracterizar a subtribo Lychnophorinae (ROBINSON, 1999; LOEUILLE et al., 2015b). Dessa forma, corrobora a possibilidade dos subtipos eremantolido e goyazensolido serem importantes marcadores quimiotaxonômicos para espécies do gênero *Lychnophora* e do gênero Bahian *Lychnophora*.

4.4. Coleta de insetos

Os insetos coletados foram aqueles encontrados alimentando-se de espécies da subtribo Lychnophorinae. As coletas foram realizadas durante observações diurnas em intervalos trimestrais. Dessa forma, foram coletados espécimens de insetos presentes nas seguintes espécies de plantas:

Eremanthus erythropappus, *Eremanthus incanus*, *Eremanthus elaeagnus*, *Lychnophora pinaster*, *Lychnophora vilosíssima*, *Lychnophora* sp., *Minasia scapigera* e *Proteopsis argentea*. É possível observar (Tabela 14), que a maior parte dos insetos foi coletada nas espécies *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus*.

4.4. Identificação da ordem dos insetos

Inicialmente, os insetos coletados foram identificados em relação à ordem, de acordo com a chave dicotômica descrita por Borror e DeLong, 1969 (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011) para identificação de inseto adulto e aplicável a algumas ninfas. A Tabela 14 contém a identificação da ordem dos espécimens coletados em cada uma das plantas durante as coletas nas regiões de Ouro Preto e Diamantina.

Tabela 14 - Identificação da ordem dos insetos coletados em espécies de Lychnophorinae

Local	Período	Espécie de Planta	Ordem dos Insetos
Diamantina	março/abril-2013	<i>E. erythropappus</i>	Orthoptera
		<i>E. erythropappus</i>	Hymenoptera
		<i>P. argentea</i>	Hymenoptera
		<i>P. argentea</i>	Hemiptera
		<i>L. vilosissima</i>	Hymenoptera
Ouro Preto	março/abril-2013	<i>E. erythropappus</i>	Hymenoptera
		<i>E. incanus</i>	Hymenoptera
Ouro Preto	março/abril-2013	<i>E. incanus</i>	Hymenoptera
		<i>E. incanus</i>	Homoptera
		<i>L. pinaster</i>	Hymenoptera
Ouro Preto	março/abril-2013	<i>E. erythropappus</i>	Protura
		<i>E. erythropappus</i>	Hemiptera
Catas Altas	março/abril-2013	<i>L. pinaster</i>	Hymenoptera
		<i>L. pinaster</i>	Hemiptera
Diamantina	julho/agosto-2013	<i>E. erythropappus</i>	Hemiptera
		<i>Lychnophora</i> sp.	Diptera
		<i>L. vilosissima</i>	Coleoptera
		<i>E. incanus</i>	Homoptera
		<i>E. elaeagnus</i>	Homoptera
		<i>P. argentea</i>	Orthoptera
		<i>Lychnophora</i> sp.	Coleoptera
		<i>M. scapigera</i>	Hymenoptera
		<i>M. scapigera</i>	Hymenoptera
<i>Lychnophora</i> sp.	Homoptera		
Ouro Preto	julho/agosto-2013	<i>E. erythropappus</i>	Hemiptera
		<i>E. erythropappus</i>	Hymenoptera
		<i>E. incanus</i>	Hymenoptera
		<i>E. incanus</i>	Hemiptera
		<i>L. pinaster</i>	Hymenoptera
Ouro Preto	janeiro-2014	<i>E. erythropappus</i>	Coleoptera
		<i>E. erythropappus</i>	Hemiptera
Diamantina	janeiro-2014	<i>E. erythropappus</i>	Hemiptera
		<i>E. incanus</i>	Homoptera
		<i>E. elaeagnus</i>	Homoptera
		<i>P. argentea</i>	Orthoptera
		<i>P. argentea</i>	Hemiptera
		<i>M. scapigera</i>	Hymenoptera

4.5. Análise dos insetos

Os extratos hidrometanólicos de insetos foram preparados (item 3.6.1) e analisados por UHPLC-UV-MS (item 3.7), resultando em impressões digitais metabólicas nos modos positivo e negativo de ionização por *electrospray* (ESI). De forma semelhante, também foram preparados extratos em diclorometano (item 3.6.2) e analisados por GC-MS (item 3.8), resultando em impressões digitais metabólicas no modo de ionização por elétron (EI).

O pré-tratamento dos dados foi realizado da mesma forma como relatado para as plantas (item 3.9). As análises estatísticas foram feitas no SIMCA e forneceram uma matriz de correlação contendo os coeficientes de correlação entre as plantas hospedeiras e os insetos.

4.5.1. Análise de insetos por GC-MS

As amostras de insetos 18a, 21a, 41a, 47a e 58a analisadas por GC-MS apresentaram íons com coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$) com os íons da planta, na qual foram coletados (Tabela 14). Estas plantas podem ser hospedeiras destes insetos, uma vez que, foi identificada uma correlação entre estas e os insetos. O coeficiente de correlação quantifica a relação entre duas variáveis, ou seja, analisa a tendência de determinada variável ser afetada por outra variável. Quando possível estas amostras de insetos (Figura 18) foram classificadas de forma mais específica ao nível de gênero com a colaboração do Prof. Dr. Sinval Neto, (Museu de Entomologia-ESALQ-USP).

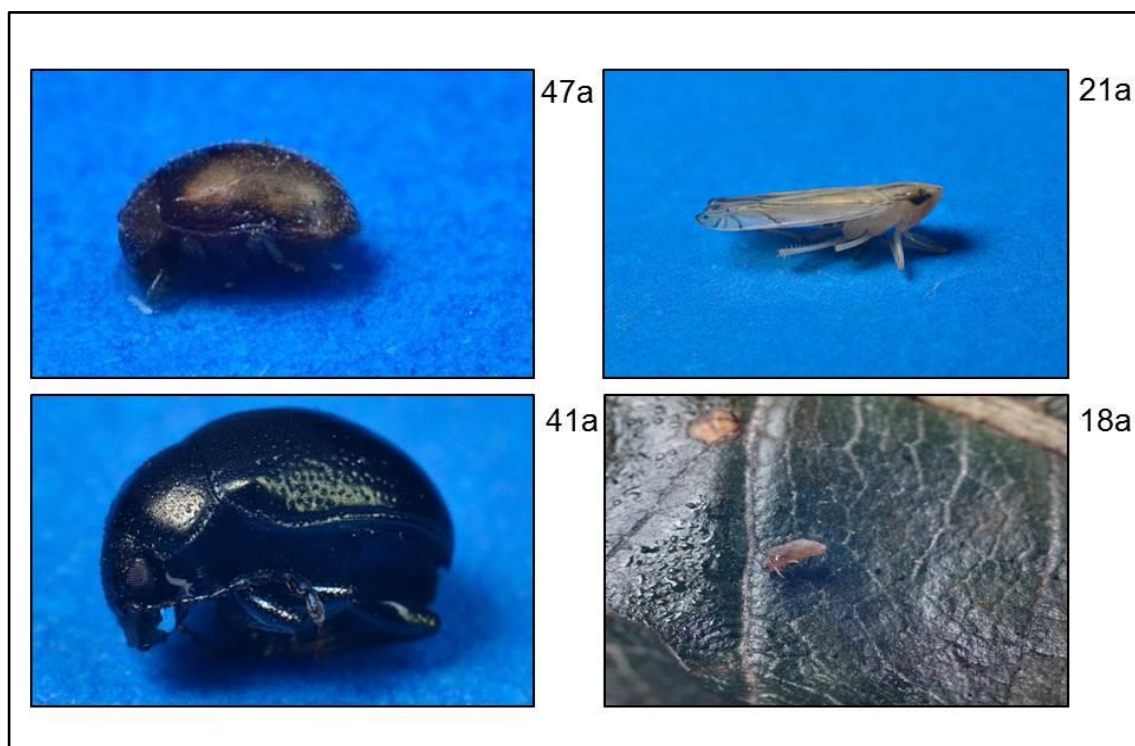


Figura 18 – Fotografias dos insetos (47A-Coleoptera; 41A-Coleoptera; 21A-Hemiptera, Cicadellidae; 18A-Hemiptera, Psyllidae) analisados por GC-MS que apresentaram íons com coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$) com os íons da planta hospedeira.

A avaliação da matriz de correlação e da matriz de dados geradas pelas análises multivariadas mostrou que o tempo de retenção e a massa dos compostos responsáveis pela correlação significativa entre a planta hospedeira e o inseto correspondem aos terpenos lupeol e acetato de lupeol.

Tabela 15 - Amostras de insetos analisadas por GC-MS que apresentaram coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$)

Inseto	Amostra	Planta hospedeira	r
Hemiptera, Psyllidae	18a	<i>E. erythropappus</i>	0,7211
Hemiptera, Cicadellidae	21a	<i>E. erythropappus</i>	0,8035
Coleoptera	41a	<i>E. erythropappus</i>	0,7127
Coleoptera	47a	<i>E. erythropappus</i>	0,7704
Hemiptera	58a	<i>L. pinaster</i>	0.7181

Ao comparar os cromatogramas dessas amostras de inseto com os cromatogramas das plantas hospedeiras, é possível observar a presença de lupeol e acetato de lupeol em ambos cromatogramas, conforme apresentado no Apêndice II. A identificação dos compostos nas análises por GC-MS foi feita como descrito no (item 3.11.2) e o espectro de massas de lupeol e acetato de lupeol, indicando a presença destas substâncias nas amostras de inseto, são apresentados nos Apêndices III e IV, respectivamente.

A planta hospedeira, na qual foram encontradas as amostras de insetos 18a, 21a, 41a, 47a foi a espécie *Eremanthus erythropappus*, enquanto que a planta hospedeira da amostra 58a foi a espécie *Lychnophora pinaster*. Os terpenos lupeol e acetato de lupeol foram identificados em espécies do gênero *Eremanthus* (BOHLMANN et al., 1980a; BOHLMANN et al., 1981a; SACILOTTO et al., 2002), assim como na espécie *Lychnophora pinaster* (ABREU et al., 2011) e em outras espécies do gênero *Lychnophora* (BOHLMANN et al., 1981b; BOHLMANN et al., 1982a; BORELLA et al., 1998; MIGUEL et al., 1996; SARTORI et al., 2002).

A presença de lupeol e derivado nos insetos indica que este triterpeno foi obtido a partir da herbivoria pelos insetos. Triterpenos presentes nas plantas são biossintetizados a partir do esqualeno, resultante do acoplamento de dois grupos farnesila que ocorre apenas em plantas e em vertebrados (MORGAN, 2004), o que permite concluir que o lupeol não foi sintetizado pelos insetos.

De acordo com Silfver et al. (2015), os detritos produzidos por folhas submetidas a baixa herbivoria apresentam altas concentrações de terpenos, sugerindo que a alta herbivoria diminui a produção de terpenos nas plantas, e portanto, estes metabólitos secundários provavelmente não são produzidos

para a defesa contra herbivoria. Dessa forma, a correlação significativa entre o inseto e a planta hospedeira, causada pela presença de lupeol e acetato de lupeol, pode ser explicada pelo fato destes terpenos não terem função de defesa nestas plantas e, portanto, foram obtidos pelos insetos a partir do material vegetal.

Por outro lado, o baixo número de correlações significativas entre os íons presentes nas amostras de insetos e os íons presentes nas plantas hospedeiras pode ser devido ao fato dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelas partes vegetativas das plantas serem um importante mecanismo de defesa contra o estresse biótico e abiótico (GIRÓN-CALVA et al., 2014). As funções de defesa dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas plantas incluem deterrência direta de herbívoros; atração indireta de inimigos naturais de herbívoros e atuação como a defesa inicial de partes da planta não atacadas ou de plantas vizinhas não atacadas (PIESIK et al., 2013).

Assim, de modo geral, os terpenos e outros compostos orgânicos voláteis podem ser responsáveis pelo preparo da defesa de partes não atacadas da planta (FARAG; PARÉ, 2002; FROSTE et al., 2007; PIESIK et al., 2013). Estes compostos também podem estimular as respostas de defesa das plantas não atacadas e induzir a produção de outros compostos orgânicos voláteis (PIESIK et al., 2013) preparando estas plantas para uma defesa mais eficiente caso sejam atacadas. Portanto, as plantas hospedeiras dos insetos analisados, provavelmente, apresentam compostos orgânicos voláteis com função de defesa contra herbivoria, tornando a correlação entre o inseto e sua planta hospedeira baixa, uma vez que estes insetos não foram capazes de utilizar as substâncias presentes no material vegetal.

4.5.2. Análises de insetos por UHPLC-UV-MS

As amostras de insetos 11a, 12a, 13a, 14a, 15a, 38a e 39a analisadas por UHPLC-UV-MS em ambos os modos de ionização, apresentaram íons no modo de ionização positivo com coeficiente de correlação significativo com os íons da planta, na qual foram coletadas (Tabela 16). Estas plantas podem ser hospedeiras destes insetos, uma vez que, foi identificada uma correlação entre estas e os insetos. Dessa forma, quando possível, estas amostras de insetos (Figura 19) foram classificadas de forma mais específica com a colaboração do Prof. Dr. Sinval Neto, (Museu de Entomologia-ESALQ-USP).

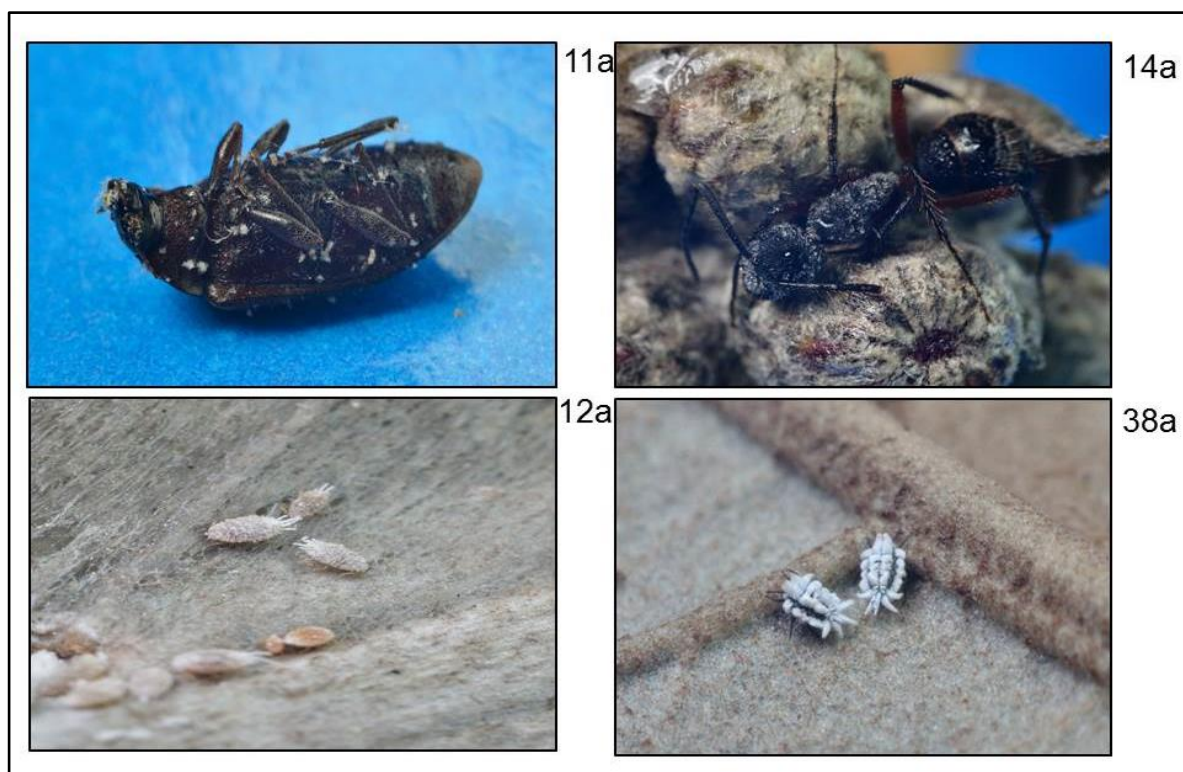


Figura 19 - Identificação dos insetos (11A-Coleoptera, Tenebrionidae, Tribolium sp; 12A-Hemiptera, Pseudococcidae; 14A-Hymenoptera, Formicidae, Camponotus sp; 38A-Coleoptera, Coccinellidae) analisados por UHPLC-UV-MS que apresentaram íons com coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$) com os íons da planta hospedeira.

A avaliação da matriz de correlação e da matriz de dados geradas pelas análises multivariadas mostrou os íons responsáveis pela correlação significativa entre a planta hospedeira e o inseto (Tabela 16). Estes íons foram analisados e suas respectivas substâncias foram identificadas (item 3.11.1).

Tabela 16- Amostras de insetos analisadas por UHPLV-UV-MS que apresentaram coeficiente de correlação significativo ($r \geq 0,6$)

Inseto	Amostra	Planta Hospedeira	Ions (m/z) no modo de ionização positivo	r	Substância provável
Hymenoptera, Tenebrionidae, Tribolium sp	11a	<i>E. erythropappus</i>	[M + H] ⁺ 595,1576	0,8711	vicenina-2
			[M + H] ⁺ 495,3291	0,9493	quercetina-3-O-glicuronil
			[M + H] ⁺ 465,3328	0,9871	isoquercetrina
Hemiptera, Pseudococcidae	12a	<i>E. incanus</i>	[M + H] ⁺ 512,4976	0,8741	não identificado
			[M + H] ⁺ 521,3448	0,9500	3,7-O-dimetil-isorhamnetina-glicuronil
			[M + H] ⁺ 595,1585	0,8741	vicenina-2
			[M + H] ⁺ 484,4632	0,9231	não identificado
Coleoptera	13a	<i>E. incanus</i>	[M + H] ⁺ 617,1298	0,9281	8, 8"-metileno-bisquercetina
			[M + H] ⁺ 476,0784	0,8959	3-O-metilkaempferol-glicuronil
			[M + H] ⁺ 607,2957	0,7777	chrysoeriol-7-O-neohesperidosideo
Hemiptera, Formicidae, Camponotus sp	14a	<i>E. incanus</i>	[M + H] ⁺ 251,1640	0,9774	LST
			[M + H] ⁺ 496,3321	0,9589	não identificado
			[M + H] ⁺ 763,5167	0,8284	flavonoide
Hemiptera	15a	<i>E. incanus</i>	[M + H] ⁺ 658,5985	0,8970	não identificado
			[M + H] ⁺ 702,5334	0,920	não identificado
			[M + H] ⁺ 485,4219	0,8538	ácido di-O-p-cumaroilquínico
Hemiptera, Coccinellidae	38a	<i>E. erythropappus</i>	[M + H] ⁺ 556,4435	0,9676	não identificado
			[M + H] ⁺ 438,3789	0,9188	não identificado
			[M + H] ⁺ 375,1054	0,8962	5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido

Inseto	Amostra	Planta Hospedeira	Ions (<i>m/z</i>) no modo de ionização positivo	r	Substância provável
Hymenoptera	39a	<i>E. erythropappus</i>	[M + H] ⁺ 466,3387	0,9664	não identificado
			[M + H] ⁺ 375,1098	0,8337	5α-hidroxi-6α-angeloiloxi-δ-4,15-isogoyazensanolido
			[M + Na] ⁺ 523,0132	0,8594	15-acetoxieremantholido B-sulfato

As amostras de insetos analisadas por UHPLC-UV-MS apresentaram íons no modo de ionização positivo com correlação com a planta na qual foram coletados. As prováveis substâncias correspondentes a estes íons pertencem à classe dos flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. Os insetos são incapazes de sintetizar estas substâncias, portanto estas foram obtidas a partir da herbivoria do material vegetal (MORGAN, 2004).

Os insetos são provavelmente o único grupo de animais capazes de sequestrar flavonoides das plantas (MORGAN, 2004). E o fato deles serem capazes de diferenciar as plantas, sugere que os flavonoides apresentem um papel importante na seleção da planta hospedeira (SIMMONDS et al., 2001). Entretanto, poucos estudos foram feitos com o intuito de identificar os flavonoides, e seu sequestro e metabolismo não seguem um padrão simples (MORGAN, 2004).

Os compostos fenólicos, tais como derivados de quercetina e kaempferol, apresentam um papel importante na dinâmica da interação inseto-planta (FERRERES et al., 2009). Feeny et al. (1988) mostrou que flavonoides isolados são capazes de estimular o comportamento de seleção da planta hospedeira, porém não há evidências de que estes flavonoides ativos são ausentes nas plantas não hospedeiras (SIMMONDS et al., 2001).

De acordo com Harborne e Grayer (1994), o flavonol isoquercetrina (quercetina-3-O-glicosídeo) é capaz de estimular o comportamento alimentar dos insetos. Entretanto, não são todos os derivados de quercetina que são capazes de estimular a alimentação dos insetos (LINDROTH; PETERSON, 1988). No presente estudo, os flavonoides quercetina-3-O-glicuronil e 3,7-O-dimetil-isorhamnetina-glicuronil foram identificados apenas nos insetos,

portanto foram biotransformados por meio de hidroxilação e conjugação com ácido glucurônico, talvez por apresentarem propriedades prejudiciais aos insetos.

Além disso, a endemicidade da subtribo Lychnophorinae no Cerrado, expõe estas espécies a alta incidência de radiação solar (ALVARES et al. 2014; SPOLADOR et al. 2006). A frequente exposição destas plantas à radiação UV-B diminui a qualidade do tecido vegetal oferecido a herbivoria, a qual pode ser atribuída a diversas causas, incluindo variação na concentração de nitrogênio foliar e presença de compostos fenólicos (IZAGUIRRE et al., 2007). Dessa forma, a endemicidade em ambiente com alto índice de radiação UV-B pode justificar o baixo número de insetos presentes nas espécies estudadas da subtribo Lychnophorinae e conseqüentemente, o baixo número de correlações entre os insetos e a planta coletada.

Em relação às lactonas sesquiterpênicas acumuladas pelos insetos que apresentaram coeficiente de correlação significativo com a planta hospedeira, as únicas identificadas foram 5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido e 15-acetoxieremantholido B. As LSTs formam adutos de Michael com sítios amino, sulfidrilas ou hidroxilas presentes em proteínas e ácidos nucleicos (FRANKFATER et al. 2005; NAWROT; HARMATHA, 1994). A presença de múltiplos sítios de ligação podem causar alterações no DNA e nas funções de macromoléculas levando ao estresse oxidativo (FRANKFATER et al. 2005). A característica irreversível dessas ligações causa a deterrência alimentar em vez da toxicidade direta (NAWROT; HARMATHA, 1994). Assim, o baixo número de lactonas sesquiterpênicas identificadas nos insetos

correlacionados com a planta pode ser explicado pela ação deterrente destas substâncias.

Entretanto, de acordo com Nawrot e Harmatha (2012), a deterrência alimentar ocorre apenas com α -exometileno- γ -lactonas, e a ligação α -exometilênica não é de suma importância para a deterrência alimentar. Além disso, as LSTs substituídas podem ser menos deterrentes, e atuarem como imunostimulantes. Dessa forma, o acúmulo de 5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido pelos insetos 38a e 39a provavelmente foi benéfico, podendo atuar na proteção destes insetos. A LST 15-acetoxieremantholido B foi biotransformada pelo inseto 39a por sulfatação, uma vez que esta substância não foi identificada na sua forma sulfatada em *E. erythropappus*. A sulfatação é um processo metabólico previamente observado em excrementos de insetos durante a metabolização de flavonoides (FERRERES et al., 2009). Assim, a sulfatação do 15-acetoxieremantholido B pelo inseto pode ter ocorrido com o intuito de excretá-lo posteriormente.

É possível observar, uma habilidade seletiva da maioria dos insetos, com correlação com a planta na qual foram coletados, para acumular os flavonoides na sua forma intacta, assim como na sua forma biotransformada (com glicuronídeo). Por outro lado, estes insetos parecem ter habilidade seletiva para eliminar a maior parte das LST da sua dieta, exceto os insetos 38a e 39a que foram capazes de acumular goyazensolido e eremantholido B.

Além disso, é importante destacar que os insetos que acumularam flavonoides, não acumularam LST, exceto o inseto 14a (Hemiptera, Formicidae, *Camponotus* sp) que foi capaz de acumular ambas as classes de substâncias. Também, apenas Hemipteras e Hymenopteras foram capazes de acumular

LST. O acúmulo e a capacidade de metabolização de LST pelos insetos, mostra que estes insetos foram capazes de tolerar estas substâncias típicas da família Asteraceae (SEAMAN, 1982), o que é incomum já que durante os estudos de observação em campo foram notados raros danos nas plantas em decorrência de herbivoria, provavelmente devido à toxicidade previamente conhecida destas substâncias (SCHMIDT, 1999).

É importante observar que a subtribo Lychnophrinae é altamente endêmica, provocando altos níveis de diversidade entre as populações destas plantas e também entre os herbívoros associados. Conforme estudo realizado para espécies endêmicas por Becerra (2007), as interações inseto-planta ocorrem apenas em subconjuntos de espécies, nos quais determinados compostos são “novos”, ainda que ocorram em outras espécies pertencentes a populações diferentes. Portanto, a endemidade da subtribo Lychnophorinae pode justificar a presença de herbívoros em um pequeno número de espécies de plantas e também pode justificar o baixo número de correlações com os insetos coletados, presentes principalmente nas espécies *E. incanus* e *E. erythropappus*.

Com base nestas correlações inseto-planta significativas, foi feita a análise multivariada por OPLS-DA, a fim de determinar as substâncias responsáveis pela discriminação entre as amostras de plantas que apresentaram correlações significativas com insetos e aquelas em que não foram observadas correlações significativas. O OPLS-DA determina como as variáveis afetam a separação entre estes dois grupos, ou seja, entre o grupo que apresentou correlação significativa com os insetos e o grupo que não apresentou tal correlação de forma significativa. Assim, foi obtido o gráfico de

importância das variáveis (VIP) (Figura 20), capaz de informar a relação entre as variáveis e de determinar os íons capazes de diferenciar os dois grupos.

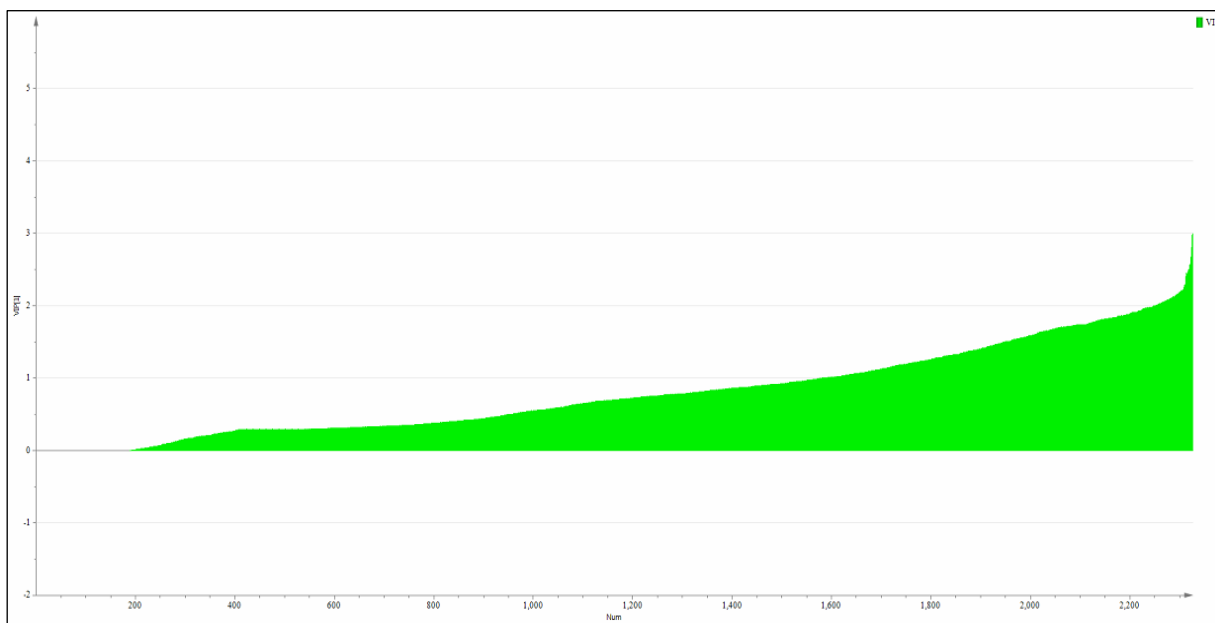


Figura 20 - Gráfico de importância das variáveis (VIP) obtido por análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) de amostras de plantas que apresentaram correlações significativas com insetos e aquelas em que não foram observadas correlações significativas.

A partir do VIP (Figura 20), foram selecionados os seis principais *loadings*, com os quais foi possível determinar as variáveis responsáveis pela discriminação entre as amostras de plantas que apresentaram correlações significativas com insetos e aquelas em que não foram observadas correlações significativas. Em seguida, essas variáveis (íons) foram submetidas à desreplicação com o intuito de identificar as substâncias discriminantes. As seis substâncias mais importantes para a discriminação das amostras de plantas que apresentaram correlação significativa com as amostras de insetos estão listadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Substâncias responsáveis pela discriminação das amostras de plantas que apresentaram correlação significativa com as amostras de insetos

TR ^a (min)	Ions (<i>m/z</i>) no modo de ionização positivo	Substância provável
5,2	[M + H] ⁺ 485,4093	ácido di- <i>O-p</i> -cumaroilquínico
5,7	[M + H] ⁺ 339,2532	ácido 5- <i>O-p</i> -cumaroilquínico
9,4	[M + H] ⁺ 581,3851	flavonoide
10,8	[M + H] ⁺ 527,4390	flavonoide
11,4	[M + H] ⁺ 688,5203	não identificado
12,5	[M + H] ⁺ 543,3412	flavonoide

^aTempo de retenção (min)

Dentre as substâncias identificadas, podemos observar a presença de compostos fenólicos derivados do ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico). O ácido 4-hidroxicinâmico é precursor da síntese de flavonoides, na qual ocorre o aumento da cadeia da 4-hidroxicinamoil-COA com três moléculas de malonil-COA. Esta molécula estendida sofre reações de Claisen gerando anéis aromáticos e formando chalconas como produtos finais. As chalconas são precursores de uma ampla gama de flavonoides presentes nas plantas. A maior parte destes flavonoides contém um anel heterocíclico de seis membros que origina a flavanona, a qual dá origem a diversos esqueletos básicos, por exemplo flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas (Dewick, 2009).

De acordo com Johnson e Felton (2001), a eficiência de compostos fenólicos contra a herbivoria não é previsível, uma vez que o aumento da síntese destes compostos pela planta pode não aumentar a resistência à herbivoria, e ainda, pode provocar um efeito contrário fornecendo propriedades antioxidantes benéficas aos insetos.

Assim, as substâncias fenólicas presentes nas plantas com correlação significativa com os insetos podem estar relacionadas à ampla presença de flavonoides nestes insetos (item 4.5.2), que lhes conferem propriedades antioxidantes e conseqüentemente, diminuem a produção de radicais livres. Ou seja, a presença do ácido di-*O-p*-cumaroilquínico e do ácido 5-*O-p*-cumaroilquínico nas amostras de plantas que apresentaram correlação significativa com as amostras de insetos pode estar relacionada à capacidade destes insetos de se beneficiarem das propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes nas plantas, em detrimento das demais substâncias presentes nas outras espécies da subtribo Lychnophorinae avaliadas neste estudo.

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.; GOUVEA, 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 PLSDA versus OPLSDA. **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.

APÊNDICES

Apêndice I - Substâncias isoladas e/ou identificadas em plantas da subtribo Lychnophorinae

Espécie	Substância	Autor		
<i>Eremanthus arboreus</i>	15-acetoxieremantolido B	Vichneweski et al., 1999		
	15-hidroxieremantolido B			
	diidroxiaçido 2			
	5,7-diidroxí-3,4'-dimetoxiflavona			
<i>Eremanthus argenteus</i>	6,9-epoxi-2 <i>H</i> -1,4-dioxaciclo-deca[<i>cd</i>]pentaleno-2,7(4 <i>aH</i>)-diona, 3-(1,2-diidroxí-1-metilpropil)-2 <i>a</i> ,3,5,6,11 <i>a</i> ,11 <i>b</i> -hexaidro-3-hidroxí-2 <i>a</i> ,6,10-trimetil	Sakamoto et al., 2010		
	6,9-Epoxy-2 <i>H</i> -1,4-dioxacyclo-deca[<i>cd</i>]pentalene-2,7(4 <i>aH</i>)-dione, 3-(2,3-dimethyl-2-oxiranyl)-2 <i>a</i> ,3,5,6,11 <i>a</i> ,11 <i>b</i> -hexahydro-3-hydroxy-2 <i>a</i> ,6,10-trimetil			
	ácido butanoico, 2,3-diidroxí-2-metil-, (3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,11 <i>aR</i>)-2,3,3 <i>a</i> ,4,5,6,7,11 <i>a</i> -octaidro-6,10-dimetil-3-metileno-2,7-dioxo-6,9-epoxi(10 <i>Z</i>)-ciclo-deca[<i>b</i>]furan-4-ol ester			
	2-oxiranecarboxílico ácido, 2,3-dimetil-, (3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,11 <i>aR</i>)-2,3,3 <i>a</i> ,4,5,6,7,11 <i>a</i> -octaidro-6,10-dimetil-3-metileno-2,7-dioxo-6,9-epoxi(10 <i>Z</i>)-ciclo-deca[<i>b</i>]furan-4-ol ester			
	3,7-dimetil- <i>O</i> -isorhamnetina			
	3',4',7-trimetil- <i>O</i> -luteolina			
	3-metil- <i>O</i> -quercetina			
	<i>Eremanthus crotonoides</i>		goyazensólido	Lobo et al., 2012
			centraterina	

Espécie	Substância	Autor
<i>Eremanthus crotonoides</i>	germacreno D	Bohlmann et al., 1982a
	bicyclogermacreno	
	α -humuleno	
	cariofileno	
	lupeol	
	acetato de lupeol	
	taraxasterol	
	acetate de taraxasterol	
	stigmasterol	
	eremantolido C	
	eremantolido A	
	16 α -(1'-metilprop-1'-E-enil)eremantholido	
	15-desoxigoyazensolido	
	lychnopholido	
	6 α -tiglinoiloxi-goyazensolanolido	
2',3'-diidro-15-desoxygoyazensolido		
5 β -Hidroxi-4, 5-diidro-15-desoxygoyazensolido		
5 β -hidroxi-4, 5, 2', 3'-tetraidro-15-desoxygoyazensolido		
<i>Eremanthus elaeagnus</i>	eremantina	Garcia et al., 1976; Vichneweski e Gilbert, 1972
	eremantolido A	Davalian e Garrat, 1975
	eremantolido B	
	eremantina (I)	Baker et al., 1972
	costunolido	
	α -cyclocostunolido (II)	
<i>Eremanthus erythropappus</i>	α -bisabolol	Kamatou e Viljoen, 2010

Espécie	Substância	Autor
<i>Eremanthus erythropappus</i>	ácido isovalérico α -cariofileno β -cariofileno α -farneseno α -bisabolol oxido A α -bisabolol oxido B limonen 1,2-epoxido α -bisabolol pulegona verrucarol eremantina	de Souza et al., 2008
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	eremantolido C 16-[1-methylprop-1Z-enil]- eremantholanolido 6,9-Epoxi-2H-1,4-dioxaciclodeca[cd]pentaleno-2,7(4aH)-diona, 2a,3,5,6,11a,11b-hexaidro-3-metoxi-2a,6,10-trimetil-3-(1-metil-1- propenyl) 15-hidroxieremantolido C ácido-2-propenoico, 2-metil-, 6-(acetiloxi)-2,3,3a,4,5,6,7,10,11,11a- decaidro-6,10-dimetil-3-metileno-2,7-dioxociclodeca[b]furan-4-ol ester diidroxiaçido- 2 6,9-Epoxi-2H-1,4-dioxaciclodeca[cd]pentaleno- 2,7(4aH)-diona, 2a,3,5,6,11a,11b-hexaidro-3-hidroxi-10- (hidroximetil)-2a,6-dimetil, 3-[(1Z)-1-metil-1-propen-1-ol] 6,9-Epoxi-2H-1,4-dioxaciclodeca[cd]pentaleno-2,7(4aH)-diona, ,2a,3,5,6,11a,11b-hexaidro-10-(hidroximetil)-3-metoxi-2a,6-dimethyl- 3-[(1Z)-1-metil-1-propenil] trideca-3,5,7,9-tetraioa-1,11-dieno	Barros et al., 1985
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	lupeol	Bohlmann et al 1980a; Bohlmann et al 1982b

Espécie	Substância	Autor
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	acetato de lupeol	Bohlmann et al 1980a
	germacreno D	
	biciclogermacreno	
	humuleno	
	5,4'dioxi-3,7-dimethoxi-flavona	
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	8 α -angeloiloxi-10 α -hidroxi-10,14-diidroestafiatina	Bohlmann et al 1981a
	ereglomerulido	
	2,3-trans-ereglomerulido	
	3 β -hidroxi-2,3-diidroereglomerulido	
	lupenona	
	15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1Z-enyl)- eremantanolido	
	16 α -(1'-metil-1,2-epoxipropil)-eremantanolido	
	16 β -(1'-metil-1,2-epoxipropil)-eremantanolido	
	2- acido oxiranecarboxilico, 3-metil-, 2,3,3a,4,9,10,11,11a-octaidro-6,10-dimetil-3-metilene-2,9-dioxo-7,10-epoxicicludeca[b]furan-4-ol ester	
	6 α -[2'-(1')-hidroxietilacriloiloxil]-goyazensanolido	
	6 α -(5'hidroxitigloiloxi)-goyazensanolido	
	6 α -(2'-metil-2',3'-epoxibutiriloxi)-5 β -hidroxi-4(15)-goyazensanolido	
	8 β -hidroxizexbrevanolido	
<i>Eremanthus goyazensis</i>	ácido 2-propenoico , 2-metil-2,3,3a,4,5,6,7,11a-octaidro-10-(hidroximetil)-6-metil-3-metileno-2,7-dioxo-6,9-epoxi(10Z)-cicludeca[b]furan-4-ol ester	Vichneweski et al., 1989
	1-oxo-3,10-epoxi-8-metacriloixigermacra-2,11(13)-dien-6,12-olido	
	1-oxo-3,10-epoxi-8-(2,3-epoxipropinoiloxi)-germacra-2,11(13)-dieno-6,12-olido	

Espécie	Substância	Autor
<i>Eremanthus goyazensis</i>	1-oxo-3,10-epoxi-8-(2,3-diidroxiopropanoiloxi)-germacra-2,11(13)-dien-6,12-olido	Vichnewski et al., 1989
	6,9-epoxi-2H-1,4-dioxaciclodeca[cd]pentaleno-2,7(4aH)-diona, 2a,3,5,6,10,11,11a,11b-octaidro-3-hidroxi-2a,6,10-trimetil-3-(1-metiletênil)-4,5-diidro-17,18-epoxieremantolido C	
	eremantolido C	Vichnewski, 1977
	15-hidroxi-eremantolido C	
<i>Eremanthus incanus</i>	isorhamnetina	Asakawa et al 1981; Herz e Kumar, 1980
	eregoyazidina	
	eremantina	Asakawa et al 1981; Bohlmann et al., 1980a
	eremantolido A	
eremantolido B	Bohlmann et al., 1980a	
bisabolol		
costunolido		
lupeol		
<i>Eremanthus mollis</i>	acetato de lupeol	Bohlmann et al., 1981a
	isobutirato de cumambrina B	
	germacreno D	
	biciclogermacreno	
	α -humuleno	
α -cedreno		
	lupeol	

Espécie	Substância	Autor
<i>Eremanthus mollis</i>	acetato de lupeol	Bohlmann et al., 1981a
	ácido <i>p</i> -metoxicinâmico	
	3-metil- <i>O</i> -kaempferol	
	3,7-dimetil- <i>O</i> -kaempferol	
	centraterina	
	goyazensolido	
<i>Eremanthus veadeiroensis</i>	3-[3,5-dimetoxi] 4- <i>trans</i> -hidroxifenillpropanol	Sacilotto et al 2002
	3-[3,5-dimetoxi] 4- <i>cis</i> -hidroxifenillpropanol	
	α -humuleno-14-oico	
	9,10- α -epoxi-eremantina	
	eremantina	
	5-hidroxi-7,3,4-trimetoxiflavona	
	tilirosideo	
	β -Friedelinol	
	ácido 3 β -acetil-betulinico	
	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona	
	taraxasterol	
	α -amirina	
	friedelan-3-ona	
β -amirina		
lupeol		
apigenina		
ácido betulinico		
20-taraxasten-3 β -ol		
stigmasterol		
<i>Heterocoma albida</i>	lupeol	Herz e Kumar, 1980

Espécie	Substância	Autor
<i>Hololepis pedunculata</i>	apigenina ácido betulinico 20-taraxasten-3 β -ol stigmasterol sitosterol stigmasterol centraterina isocentraterina goyazensolido 15-hidroxieremantolido C luteolin-7- <i>O</i> -rutinosideo	Almeida et al., 2006
<i>Lychnophora crispa</i>	lychnopholido 6 α -tiglinoiloxi-goyazensolanolido 8 α -tiglinoiloxi-zexbrevanolido 8 β -angeloiloxi-zexbrevanolido 16 α -(1'-metilprop-1 <i>E</i> -enil)-eremantolanolido 16 α -(1'-metilprop-1 <i>Z</i> -enil)-4 β ,5H-eremantolanolido	Bohlmann et al., 1982c
<i>Lychnophora crispa</i>	15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1 <i>Z</i> -enil)-eremantolanolido lupeol acetato de lupeol	Bohlmann et al., 1982c
<i>Lychnophora diamantinana</i>	isorhamnetina pinocembrina pinobanksina centraterina goyazensolido	da Costa et al., 1993

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora diamantinana</i>	15-acetoxicentraterina 15-acetoxigoyazensolido	da Costa et al., 1993
<i>Lychnophora ericoides</i>	<i>orto</i> -acetoxi-bisabolol	Pavarini et al 2013
	6,8-di-C- β -glucopiranosilchrisina chrisina 3- <i>O</i> -acetilpinobanksina	Gobbo-Neto et al 2008a
	vicenina-2	Gobbo-Neto et al 2005; Gobbo-Neto et al 2008a; Gobbo-Neto et al 2010; Grael et al 2010
	pinocembrina	Gobbo-Neto et al 2008a; Gobbo-Neto et al 2008b; Sakamoto et al 2003
	pinostrobina	Gobbo-Neto et al 2008a; Gobbo-Neto et al 2008b; Gobbo-Neto e Lopes, 2008; Sakamoto et al 2003
	pinobanksina	Borella et al 1998; Gobbo-Neto et al 2008a; Gobbo- Neto et al 2008b; Sakamoto et al 2003; Sargenti e Vichnewski 2000
	luteolina dendrantemosideo A apigenina icarisideo F2	Borella et al 1998; Gobbo-Neto et al 2008b Gobbo-Neto et al 2008b
	ácido 3,5-di- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico ácido 4,5-di- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico ácido 3,4, 5-tri- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico	Gobbo-Neto et al 2008b; Gobbo-Neto et al 2010 Gobbo-Neto et al 2008b; Gobbo-Neto et al 2010
	ácido 3- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico ácido 3- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloilquinico ácido 4- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico lucenina-2 ácido 4- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloilquinico ácido 5- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloilquinico	Gobbo-Neto e Lopes, 2008

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora ericoides</i>	ácido 3,4-di- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloilquinico	Gobbo-Neto e Lopes, 2008
	3- <i>O</i> -metilquercetina	
	tilirosideo	
	zexbrevanolideo tiglato	
	3- <i>O</i> -propionilalpinona	
	3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -(<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaroil)- β -glucopiranosilisorhamnetina	
	ácido 5- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico	Gobbo-Neto e Lopes, 2008; Gobbo-Neto et al 2010
	ácido 3,4-di- <i>O</i> -(<i>E</i>)-cafeoilquinico	
	15-hidroxieremantolido C	
	15-hidroxi-16 α -(1'-metilprop-1'- <i>Z</i> -enil)eremantolido	Gobbo-Neto e Lopes, 2008; Gobbo-Neto et al 2010;
	4,5-diidrolychnopholido	Sakamoto et al 2003
	16 α -(1'-metilprop-1'- <i>Z</i> -enil)eremantolido	
	4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	
	4,5-diidroeremantolido C	Gobbo-Neto e Lopes, 2008; Gobbo-Neto et al 2010
	4,5-diidro-16 α -(1'-metilprop-1'- <i>Z</i> -enil)eremantolido	
4,5-diidro-16 α -(1'-metilprop-1'- <i>E</i> -enil) eremantolido		
2',4',6'-triidroxichalcona		
2',6'-diidroxi-4'-metoxichalcona	Gobbo-Neto e Lopes, 2008; Gobbo-Neto et al 2010	
3- <i>O</i> -acetilalpinona		
3- <i>O</i> -acetilpinobanksina		
lychnopholido	Gobbo-Neto e Lopes, 2008; Gobbo-Neto et al 2010;	
	Sakamoto et al 2003; Sargenti e Vichnewski 2000	
centraterina	Borella et al 1998; Gobbo-Neto et al 2010;	
	Sakamoto et al 2003	
4,5-diidro-16 α -(1'-metilprop-1'- <i>E</i> -enil)-eremantolido	Gobbo-Neto et al 2010	
α -thujeno	Lyra et al 2008	
sabineno		

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora ericoides</i>	γ -terpineno	Lyra et al 2008
	trans-sabineno-hidrato	
	<i>n</i> -nonanal	
	δ -elemeno	
	β -maalieno	
	isocomeno	
	γ -curcumeno	
	(<i>E</i>)-difroapofarnesol	
	ácido hexadecanóico	
	óxido de cariofileno	
	<i>o</i> -cymeno	Curado et al 2006; Lyra et al 2008
	limoneno	
	terpinen-4-ol	
	α -terpineol	
	(<i>E</i>)-nerolidol	
	α -bisabolol	
	triciclono	Curado et al 2006
	linalool	
	(<i>E</i>)-cariofilleno	
	<i>ar</i> -curcumeno	
	cameroonan-7 α -ol	
	silfiperfolan-7 β -ol	
	<i>ar</i> -turnerol	
	ar-diidro-turmerona	
	α -cadinol	

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora ericoides</i>	epi- α -bisabolol	Curado et al 2006
	stigmasterol	dos Santos et al 2004a
	campesterol	
	β -sitosterol	
	goyazensolido	dos Santos et al 2004a; Sakamoto et al 2003
	15-desoxigoiazensolido	Sakamoto et al 2003; Sargenti e Vichnewski 2000
	eremantolido C	
	1-oxo-3(10),8(16)-diepoxi-16-metilprop-1Z-enil-16-metoxigermacra-2-en-6(12)-olido	Sakamoto et al 2003
	1-oxo-3,10-epoxi-8-angeloiloxigermacra-2-en-6(12)-olido	
	15-desoxieremantolido C	
	4,5-diidro-[8 α -(2-metilbut-2Z-enoxi)]-15 α -desoxigoiazensolido	
	4,5-diidro-15 α -eremantolido C	
	4,5-diidro-15 β -eremantolido C	
	4,5-dihidro-15 α -[16 α (1-metilprop-1Z-enil)]eremantolido	
	α -amirina	
	β -amirina	
	5,7-diidroxi-3-metoxi-flavonol	Sargenti e Vichnewski, 2000
	7,4'-diidroxi-flavonol	
	7,4'-diidroxi-diidroflavonol	
	galangina	
	5,7,4'-triidroxi-diidroflavonol	
	7-hidroxi-4'-metoxi-diidroflavonol	
	5,7'-diidroxi-4'-hidroxi-flavanona	
7-hidroxi-4'-metoxi-flavanona		
5,7-diidroxi-flavona		

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora ericoides</i>	acacetina	Sargenti e Vichnewski, 2000
	7-hidroxi-3',4'-diidroxi-isoflavona	
	2',3'-diidro-15-desoxigoyazensolido	
	4,5-diidroeremantolido A	
<i>Lychnophora ericoides</i>	friedelanol	Borella et al 1998
	lupeol	
	eremantolido A	
	quercetina	
	(4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 7 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 11 <i>S</i> , 16 <i>R</i>)-4,5-diidroeremantolido A	
	eremantolido A	
<i>Lychnophora gardneri</i>	16 α -isopropil-4 β ,5H-eramantolanolido	Grael et al 2010
	ácido cafeico	
	vicenina-2	
	3- <i>O</i> -metil-galangina	
<i>Lychnophora gardneri</i>	3- <i>O</i> -glucose-isorhamnetina	Grael et al 2010
	3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -coumaroil)-glucose-isorhamnetina	
	3- <i>O</i> -metil-quercetina	
	luteolina	
	pilloina	
	tectochrysina	
	pinobanksina	
	3-acetato-pinobanksina	
	pinocembrina	
	<i>Lychnophora granmogolense</i>	
eriodictyol		
eriodictyol 4'-metil éter		
eriodictyol 7,4'-dimetil éter		
isorhamnetina		

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora markgravii</i>	friedelan-3 β -ol	Sartori et al., 2002
	eremantina	
	α -amirina	
	β -amirina	
	lupeol	
	taraxasterol	
	pseudotaraxasterol	
	stigmasterol	
	β -sitosterol	
	15-desoxigoyazensolido	
	8 α -tiglinoiloxigoyazensolido	
	tectochrysin	
	pinocembrina	
	3-metil- <i>O</i> - galangina	
tilirosideo		
<i>Lychnophora passerina</i>	goyazensolido	Chicaro et al 2004; de Oliveira et al 1996
	15-deoxigoyazensolido	Chicaro et al 2004
	luteolina	
	kaempferol	
	apigenina	
	quercetina	
	tilirosideo	
<i>Lychnophora pinaster</i>	ácido lychnophólico	de Oliveira et al 1996
	3- <i>O</i> -acetil-lupeol	Abreu et al 2011
	3- <i>O</i> -acetil-pseudotaraxasterol	
	3- <i>O</i> -acetil- α -amirina	

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora pinaster</i>	4,4-dimetil-colesta-22,24-dien-5-ol	Abreu et al 2011
	α -amirina	
	lupeol	
	Δ 7-bauerenil acetate	
	friedelina	
	stigmasterol	
	sitosterol	
	vitexina	Silveira et al 2005
	isovitexina	
	ácido isoclorogênico	
	ácido cafeico	Ferreira et al 2005; Silveira et al 2005
ácido cinâmico	Ferreira et al 2005	
pinobanksina		
ácido clorogênico		
<i>Lychnophora pinaster</i>	metil (<i>Z</i>) cinamato	Reis et al 2010
	metil (<i>E</i>) cinamato	
	β -cariofileno	
	α -humuleno	
	germacreno D	
	epi-longipinanol	
	óxido de cariofileno	
	guaiol	
	humuleno epóxido II	
	isoaromadendreno epóxido	
	cariofila-4(14),8(15)-dien-5 α -ol	
	cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol	
	α -cadinol	

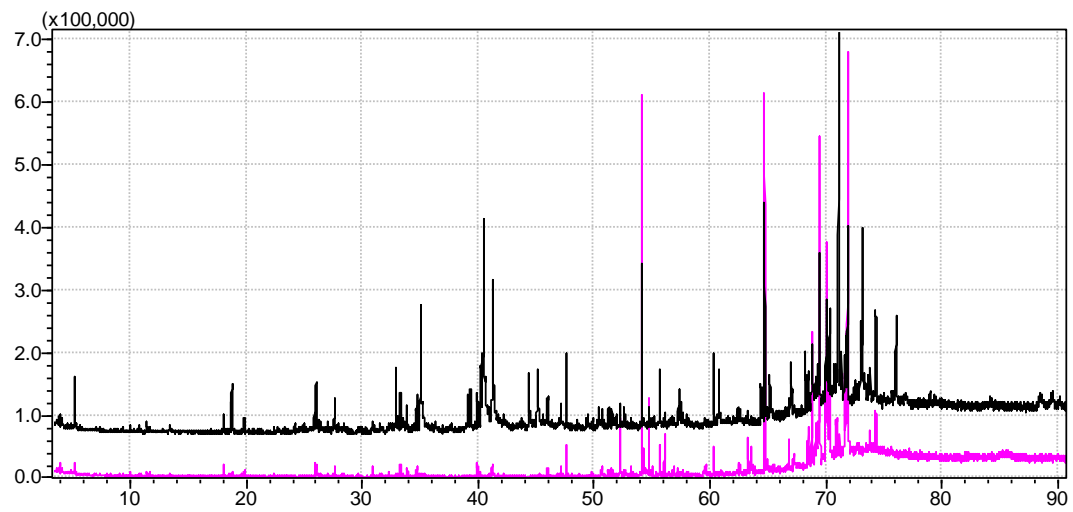
Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora pinaster</i>	metil <i>p</i> -metoxicinnamato	Reis et al 2010
<i>Lychnophora salicifolia</i>	acetato de lupeol	Bohlmann et al., 1981b
	β-amirina	
	β-amirina acetato	
	15-hidroxi-5β,6α-epoxi-5,6-diidrocariofileno	
	ácido lychnopholico	Gouvea et al 2012; Miguel et al 1996
	ácido lychnopholico acetato	Miguel et al 1996
	lupeol	
	3,7, 3', 4'-tetrametil- <i>O</i> -quercetina	Kanashiro et al 2004
	3, 5, 7, 3', 4'-pentametil- <i>O</i> -quercetina	
	ácido protocatecuico	Gouvea et al 2012
	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	
	ácido 3- <i>O-p</i> -coumaroilquinico	
	ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	
	ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	
	ácido 4- <i>O-p</i> -coumaroilquinico	
	ácido 5- <i>O-p</i> -coumaroilquinico	
	ácido 5- <i>O</i> -feruloilquínico	
	vicenin-2	
	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	
	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	
	ácido 3- <i>O-E</i> -coumaroil-5- <i>O-p</i> -cafeoilquínico	
	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoil-5- <i>O-p</i> -coumaroilquinico	
	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	
	ácido 4- <i>O</i> -feruloil 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	
	ácido 3,4-di- <i>O-p</i> -coumaroilquinico	

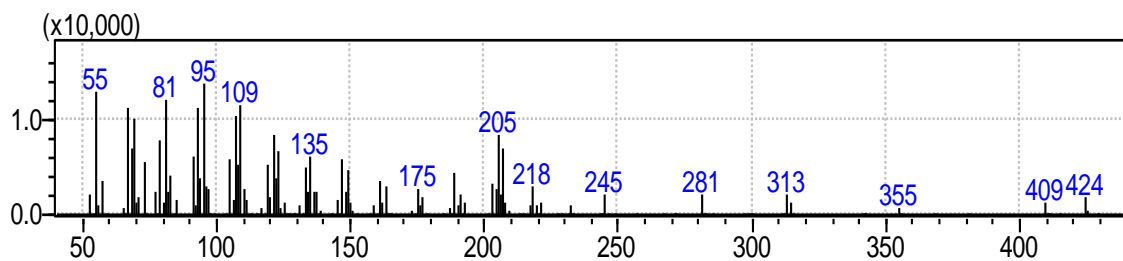
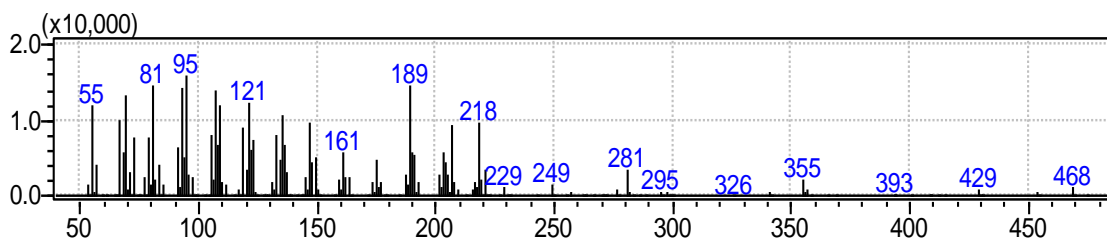
Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophora salicifolia</i>	ácido 3,5-di-O- <i>p</i> -coumaroilquinico	Gouvea et al 2012
	ácido 4,5-di-O- <i>p</i> -coumaroilquinico	
	ácido 2-O-acetil lychnopholico	
	pentaineno	Bohlmann et al., 1980b
	enetetraineno	
	cariofileno	
	costunolideo	
	eremanthina	
	ácido 8 β -acetoxi-cariofilen-15-oico	
	ácido lychnopholico metil ester	
cariofileno		
ácido cariofileno-15-oico		
ácido 5,6-diidrocariofile-15-oico		
<i>Lychnophora sellowii</i>	<i>ent</i> -kaureno	Bohlmann et al., 1982c
	lupeol	
	acetato de lupeol	
	eramantina	
	5 α -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido	
	5 β -hidroxi-6 α -angeloiloxi- δ -4,15-isogoyazensanolido	
	lychnopholido	
	centraterina	
	9-oxo-bisabolol-1-ona	
	α -bisabolol-1-ona	
	2-ciclohexen-1-one, 6-(2-hidroxi-1,5-dimetil-4-hexen-1-il)-3-metil	

Espécie	Substância	Autor
<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	lupeol α -amirina β -amirina 7-metil- <i>O</i> -galangin 7-methyl- <i>O</i> kaempferol pinocembrina galangina 3-acetoxi-5,7-diidroxi-flavanona acacetina	dos Santos et al 2004b
<i>Minasia alpestris</i>	15-desoxigoyazensolido 2',3'-diidro-15-desoxigoyazensolido 8 α -tigloiloxi-15-desoxigoyazensolido 2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido eremantholido C 8 β -hidroxigoyazensolido 11 α ,13-diidro-13-metoxi-15-desoxigoyazensolido 11 β ,13-diidro-8 α -hidroxi-goyazensolido	Crotti et al 2005
<i>Piptolepis ericoides</i>	pentaineno poliisopreno lupenona 8 β -angeloiloxi-zexbrevanolideo piptolepolideo	Bohlmann et al 1981c
<i>Proteopsis argentea</i>	poliisopreno lupeol lupenona acetato de lupeol 1-trideceno-3,5,7,9,11-pentano	Zdero et al., 1981

Espécie	Substância	Autor
<i>Proteopsis argentea</i>	1,11-tridecadieno-3,5,7,9-tetrano lychnopholido 6 α -[2,3-epoxi-butiriloxi]-goyazensolanolido 16-[1-metilprop-1Z-enil]- eremantolanolido 16-[1-metil-1,2-epoxipropil]-eremantolanolido	Zdero et al., 1981

Apêndice II – Cromatograma (rosa) da amostra de inseto e cromatograma (preto) da planta hospedeira (*E. erythropappus*) evidenciando a presença de substâncias sintetizadas pela planta no corpo do inseto



Apêndice III – Espectro de massas referente ao lupeol**Apêndice IV- Espectro de massas referente ao acetato de lupeol**

ANEXOS

Anexo A - Análise filogenética da subtribo Lychnophorinae (Loeuille et al., 2015a).

