

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Impressão digital metabólica do gênero *Espeletia* (Asteraceae) e sua correlação com dados filogenéticos e biogeográficos

Guillermo Federico Padilla González

Ribeirão Preto
2014

RESUMO

PADILLA GONZÁLEZ, G. F. **Impressão digital metabólica do gênero *Espeletia* (Asteraceae) e sua correlação com dados filogenéticos e biogeográficos.** 2014. 104f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O gênero *Espeletia* Mutis ex Bonpl (Asteraceae, Millerieae, Espeletiinae) constitui um exemplo clássico de um táxon sujeito a rápidos processos adaptativos evolutivos. Com ca. 71 espécies, este gênero se diversificou em elevadas altitudes num ecossistema emergente formado após o retraimento dos glaciares no final do Plioceno e início do Pleistoceno, os páramos, um tipo de ecossistema que biogeograficamente funciona como um complexo de “ilhas” presentes principalmente no noroeste dos Andes tropicais da Venezuela, Colômbia e Equador. Devido à sua complexa história evolutiva e morfologia característica, este gênero tem sido foco de muitas pesquisas envolvendo sua biologia, ecologia, taxonomia e filogenia. No entanto, do ponto de vista fitoquímico, tem sido pouco estudado e é desconhecida a influência da geografia na química do metabolismo secundário destas espécies. Neste estudo, a impressão digital metabólica de 120 amostras do gênero *Espeletia* foi obtida por UHPLC-UV-MS e submetida a análises quimiométricas. A correlação com dados geográficos revelou uma forte influência da biogeografia no metabolismo secundário das espécies deste gênero, apresentando uma impressão digital característica de acordo com seu país de origem numa escala global e de acordo com complexo de páramos de origem numa escala regional, o qual concorda com a filogenia atual da subtribo baseada nos marcadores ITS, ETS, rp116 e AFLPs. A análise por OPLS-DA e a desreplicação de extratos permitiu identificar as principais substâncias correlacionadas com a origem geográfica das espécies, mesmo como permitir a construção de modelos de predição da origem geográfica de novos extratos baseados nos seus perfis químicos. Além disso, uma análise filogenética efetuada com dados metabolômicos revelou, embora com pouco suporte, uma correlação geográfica em que as espécies da Venezuela correspondem ao clado ancestral do gênero. Adicionalmente, a química do metabolismo secundário da subtribo Espeletiinae foi revisada e um bando de dados, o ChemEsp (Chemistry of Espeletiinae), foi construído incluindo todos os metabólitos descritos na literatura, mesmo como outras informações químicas, botânicas e geográficas. Finalmente, a desreplicação de extratos permitiu a identificação de várias substâncias não descritas previamente no gênero *Espeletia* e/ou na subtribo Espeletiinae, incluindo uma grande variedade de flavonoides e ácidos cafeoilquínicos, junto com outros metabólitos já descritos no gênero por métodos fitoquímicos clássicos. Os resultados obtidos, além de contribuírem para a geração de conhecimento sobre a química do metabolismo secundário do gênero *Espeletia*, revelaram informações sobre as relações filogenéticas e biogeográficas do gênero baseadas em marcadores químicos, empregando-se modernas metodologias analíticas e computacionais.

Palavras chave: Asteraceae; Biogeografia; Espeletiinae; Metabolômica; Quimiotaxonomia

1 INTRODUÇÃO

No final da era do Plioceno e início do Pleistoceno, entre dois e quatro milhões de anos atrás, um novo ecossistema emergiu após o retraimento dos glaciares na região norte dos Andes tropicais na América do Sul: o páramo (HOOGHIEMSTRA; RAN, 1994; HOOGHIEMSTRA; VAN DER HAMMEN, 2004). Este ecossistema, presente em alturas de 3.500 a 4.800 m acima do nível do mar, cobre as áreas altas da cordilheira dos Andes formando uma faixa descontínua desde a cordilheira de Talamanca em Panamá e Costa Rica, passando por Colômbia, Venezuela e Equador até a depressão de Huancabamba no norte do Peru (BUYTAERT et al., 2006) (Figura 1).

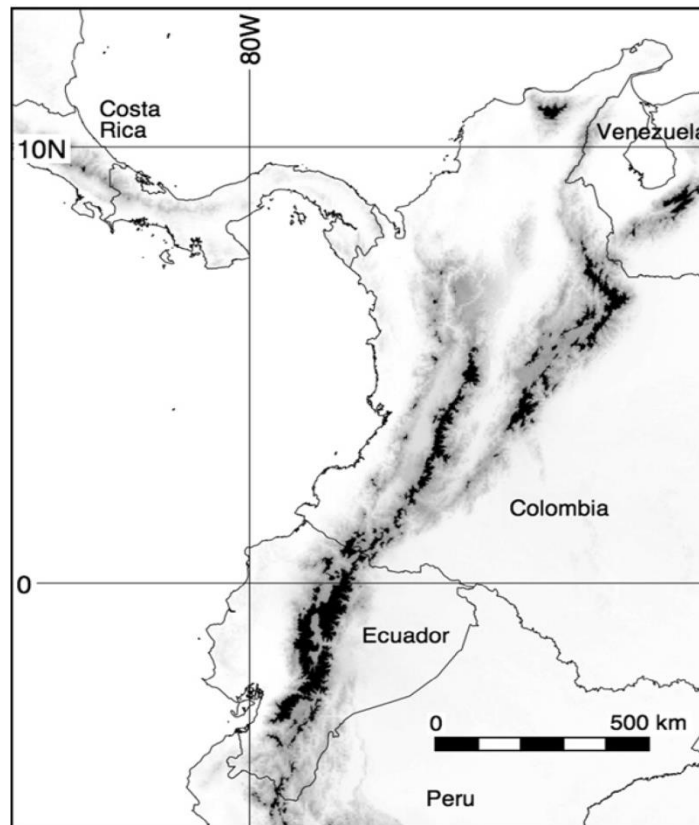


Figura 1. Extensão aproximada dos páramos (em preto) na cordilheira dos Andes (fonte: BUYTAERT et al., 2006).

O páramo (Figura 2A-B) é caracterizado por suas condições climáticas extremas como altos níveis de radiação ultravioleta (UV), solos pobres, muito drenados e com pH ácido, além de sazonalidade diária chegando a temperaturas inferiores a 0 °C a noite (em alturas superiores aos 4000 m) e superiores a 15 °C no

dia, enquanto a temperatura média anual não apresenta variação (MONASTERIO; SARMIENTO, 1991; MORALES et al., 2007). Estas características somadas aos eventos sucessivos de glaciações e inter-glaciações que deram origem a este ecossistema, geraram uma alta biodiversidade, sendo considerado o ecossistema de alta montanha de maior diversidade florística e riqueza de espécies endêmicas do mundo (SMITH; CLEEF, 1988; LUTEYN, 1999; RANGEL-CH, 2000).

Estando isolado por profundos vales andinos ou densos bosques altoandinos, o páramo é um tipo de ecossistema que biogeograficamente funciona como “ilha” já que, análogo às ilhas oceânicas, apresenta um alto grau de endemismo em que muitas espécies estão restritas a determinado local (MORALES et al., 2007), com pouca ou nenhuma comunicação entre espécies presentes em diferentes maciços de páramos. O isolamento geográfico e a origem recente deste ecossistema o levaram a ser considerado um sistema ideal para compreender relações evolutivas complexas e mecanismos de especiação em plantas (HOOGHIEMSTRA; VAN DER HAMMEN, 2004; CUATRECASAS, 2013).

Dentro dos principais grupos vegetais característicos dos páramos estão os *Frailejones* (Figura 2C-G), um grupo de espécies pertencentes à família Asteraceae, tribo Millerieae, subtribo Espeletiinae. Esta subtribo, com ca. 143 espécies agrupadas em oito gêneros (*Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Coespeletia*, *Ruilopezia*, *Libanothamnus*, *Carramboa*, *Tamania* e *Paramiflos*) (CUATRECASAS, 1976), tem sido considerada um exemplo clássico para estudar radiações adaptativas rápidas, sendo o gênero *Espeletia* Mutis ex Bonpl o principal modelo por se tratar do maior e mais diverso gênero (ca. 71 spp) da subtribo (CUATRECASAS, 1976, 2013).

Devido à grande diversidade morfológica deste grupo e sua rápida evolução adaptativa, existe grande interesse no estudo da sua biologia, ecologia, sistemática e taxonomia. Portanto, inúmeros estudos têm sido realizados desde a primeira descrição de uma espécie de *Espeletia* em 1792 até a atualidade, com o intuito de estabelecer relações taxonômicas, esclarecer sua história evolutiva e determinar a influência da geografia na diversificação deste grupo (DIAZGRANADOS, 2012; CUATRECASAS, 2013). Por exemplo, um dos primeiros estudos detalhados da subtribo Espeletiinae (CUATRECASAS, 1933) reportou que diferentes áreas geográficas apresentam diferentes espécies, concluindo, posteriormente, que devido

à geografia Andina é possível que o padrão que distribuição destas espécies reflita a evolução do grupo (CUATRECASAS, 2013). Esta hipótese foi confirmada recentemente com a filogenia da subtribo baseada em diversos marcadores moleculares (DIAZGRANADOS, 2012). No entanto, embora muito estudadas do ponto de vista de sua biologia e ecologia, quimicamente têm sido pouco estudadas e ainda é desconhecida a influência da biogeografia na química do seu metabolismo secundário ou se a composição química destas espécies reflete suas relações de parentesco evolutivo.

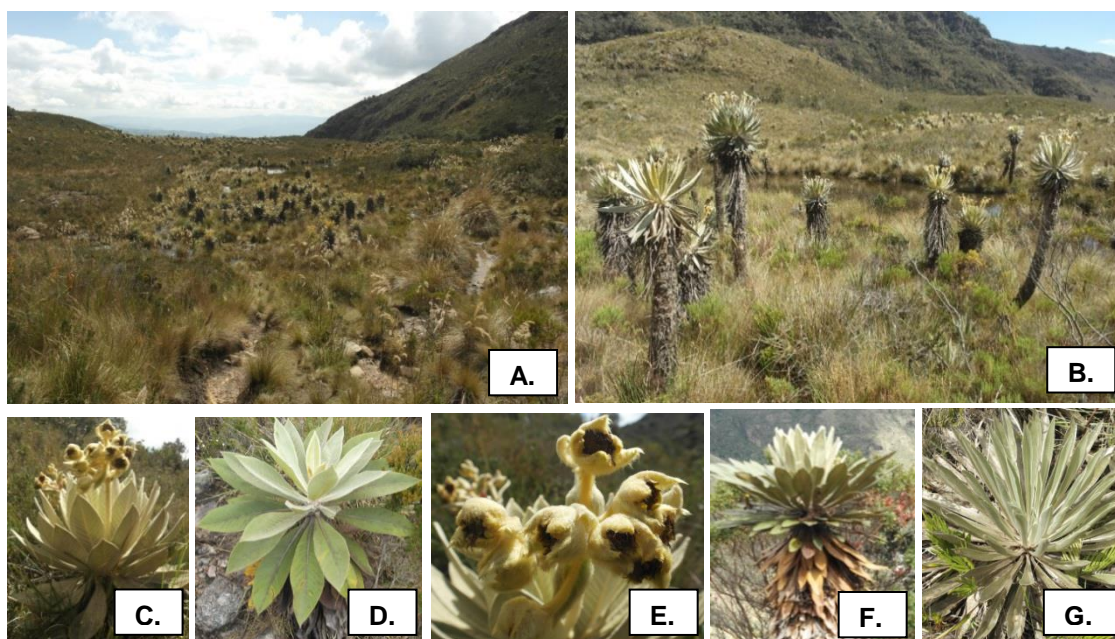


Figura 2. Ecosistema de páramo (A, B) e espécies do gênero *Espeletia* (C-G).

A química do metabolismo secundário do gênero *Espeletia* é caracterizada pela presença de metabólitos da classe dos terpenoides, especialmente diterpenos de tipo caurano, dos quais se destacam os ácidos *ent*-caurenóico, grandiflorênico, grandiflorólico e seus derivados, além de alguns mono e sesquiterpenos (PIOZZI et al., 1971; USUBILLAGA et al., 1973; MORALES et al., 1973; BOHLMANN; SUDING; CUATRECASAS; KING; et al., 1980; TORRENEGRA et al., 1994), sendo que estudos fitoquímicos empregando métodos clássicos resultaram na identificação de alguns dos metabólitos presentes em apenas 15 espécies: *E. argentea*, *E. barclayana*, *E. batata*, *E. grandiflora*, *E. hartwegiana*, *E. killipii*, *E. nana*, *E. pycnophylla*, *E. schultzii*, *E. semiglobulata*, *E. tenorae*, *E. tunjana*, *E. uribei*, *E. weddellii*, e *E. x aurantia* (USUBILLAGA; MORALES, 1970; PIOZZI et al., 1972; PROANO et al., 1972; BOHLMANN; SUDING; CUATRECASAS; KING; et al., 1980;

TORRENEGRA; TELLEZ, 1995; TELLEZ et al., 1998; USUBILLAGA et al., 2003; JANSEN et al., 2007; IBÁÑEZ; USUBILLAGA, 2008; PENA et al., 2012), das 71 que compõem o gênero.

O uso de marcadores químicos constitui uma abordagem interessante que pode auxiliar na compreensão da taxonomia deste gênero, considerando que estudos prévios relataram a presença de duas lactonas sesquiterpênicas de tipo melampolido (polimatina B e acetato de longipilina), o qual levou a questionar o status da subtribo Espeletiinae e propor uma possível circunscrição com a então subtribo Melampodiinae (TORRENEGRA; TELLEZ, 1995). Além disso, estudos desenvolvidos por Alvarenga et al. (2005) destacaram o valor quimiosistemático dos diterpenos do tipo caurano presentes no gênero *Espeletia*.

A fitoquímica clássica, apesar de ser muito utilizada em correlações com a biogeografia e taxonomia de um determinado grupo de espécies, apresenta desvantagens, tais como a dificuldade na identificação de metabólitos presentes em baixas concentrações, a alta quantidade de material vegetal requerida e o elevado tempo e esforço necessários no processo de isolamento e elucidação estrutural, dificultando assim a análise de um elevado número de espécies. São necessários, portanto, estudos sistemáticos empregando metodologias mais sensíveis que requeiram pequenas quantidades de material vegetal, permitam identificar um maior número de substâncias de uma forma rápida e padronizada, além de estudar várias dezenas de espécies ao mesmo tempo. Isto pode ser atingido mediante uma abordagem metabolômica, a qual é definida como o estudo e caracterização do conjunto de metabólitos presentes em determinado complexo biológico. A metabolômica apresenta três diferentes abordagens, a análise de “metabólitos alvo”, que se refere à “detecção e quantificação precisa de um conjunto único ou pequeno de substâncias alvo”; a análise do “perfil metabólico”, que permite a identificação e quantificação de um grupo de metabólitos associados a vias específicas ou pertencentes a determinada classe, e a “impressão digital metabólica ou *fingerprint* metabólico”, que é usada na comparação de metabolômas completos sem a necessidade da identificação das substâncias (FIEHN, 2002; KRASTANOV, 2010). Esta última abordagem, se aliada à estatística multivariada, pode ser empregada para fazer correlações entre a composição química e a origem geográfica ou proximidade taxonômica, pois possibilita estabelecer relações de parentesco entre

as espécies avaliadas de acordo com a similaridade das suas impressões digitais metabólicas.

Devido à importância de se realizar análises fitoquímicas mais detalhadas, que permitam fazer correlações mais precisas, bem como investigar a química do metabolismo secundário de um maior número de espécies de *Espeletia*, neste projeto foi proposto estudar o metaboloma de 120 amostras vegetais do gênero *Espeletia* (61 espécies, nove híbridos, cinco variedades, uma forma e 44 duplicatas), por *Ultra High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet Spectroscopy – Mass Spectrometry* (UHPLC-UV-MS) com analisador do tipo FT-Orbitrap em combinação com ferramentas de quimioinformática, estatística multivariada e métodos *in silico* de análise. Além de realizar uma abordagem moderna para detectar as impressões digitais metabólicas das espécies avaliadas, foi proposto ainda correlacionar os dados químicos obtidos com dados biogeográficos, taxonômicos e filogenéticos de *Espeletia*.

2 CONCLUSÕES

Neste trabalho, além de se apresentar a primeira revisão da química do metabolismo secundário da subtribo Espeletiinae (Asteraceae, Millerieae) e criar um banco de dados específico para este grupo (ChemEsp), apresenta-se o primeiro estudo metabolômico do gênero *Espeletia*, sendo estudadas um total de 61 espécies, nove híbridos, cinco variedades e uma forma (sem considerar réplicas), totalizando 76 táxons, dos quais 65 foram estudados pela primeira vez. A metodologia empregada permitiu desreplicar dezenas de substâncias nas espécies analisadas, muitas das quais, de valor quimiotaxonômico, não haviam sido reportadas previamente na subtribo Espeletiinae. Além disso, revelou-se uma forte influência da origem geográfica na composição química das espécies, onde as amostras se agruparam de acordo com seu país de origem numa escala global e de acordo com o maciço de páramos onde foram coletadas numa escala regional. Uma análise filogenética efetuada com dados metabolômicos revelou, embora com pouco suporte, dois principais clados correspondentes ao país de origem das espécies, em que as espécies da Venezuela correspondem ao clado ancestral do gênero. Este resultado concorda com a filogenia atual da subtribo Espeletiinae baseada em diversos marcadores moleculares. Estudos de correlação *in silico* permitiram não apenas identificar as substâncias responsáveis pelo agrupamento das espécies de acordo com sua origem geográfica, mas também a criação de modelos capazes de prever a origem geográfica de novos extratos ainda não investigados. Isto pode ser de grande utilidade para o esclarecimento de relações taxonômicas e filogenéticas em *Espeletia*, considerando o alto grau de endemismo das espécies deste gênero.

3 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, S. A. V.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P.; CABROL-BASS, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 56, p. 27–37, 2001.

ALVARENGA, S. A. V.; FERREIRA, M. J. P.; RODRIGUES, G. V.; EMERENCIANO, V. P. A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the Asteraceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 147, n. 3, p. 291–308, 2005.

ALVAREZ-SANCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 120–127, 2010.

BAILEY, N. J. C.; WANG, Y.; SAMPSON, J.; et al. Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: application of ^1H NMR spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 1, p. 117–26, 2004.

BOHLMANN, F.; SUDING, H.; CUATRECASAS, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. New diterpenes from subtribe Espeletiinae. **Phytochemistry**, v. 19, p. 267–271, 1980.

BOHLMANN, F.; SUDING, H.; CUATRECASAS, J.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from *Espeletopsis* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2399–2403, 1980.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd, 2003.

BUYTAERT, W.; CÉLLERI, R.; DE BIÈVRE, B.; et al. Human impact on the hydrology of the Andean páramos. **Earth-Science Reviews**, v. 79, n. 1-2, p. 53–72, 2006.

CALABRIA, L. M.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, M. J. P.; SCOTTI, M. T.; MABRY, T. J. A phylogenetic analysis of tribes of the Asteraceae based on phytochemical data. **Natural Product Communications**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2006.

CASOTI, R.; CHAGAS-PAULA, A. D.; OLIVEIRA, T. B.; COSTA, F. B. DA. Experimental design to optimize *Baccharis* sample extraction in metabolomic studies. 4th Brazilian Conference on Natural Products (4th BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM). **Anais do Evento**. p.PS–02 16, 2013. Natal, Brazil: SBQ.

CHAGAS-PAULA, D. **Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico***, 2013. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sao Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

CUATRECASAS, J. *Plantae Colombianae novae*. **Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales Serie Botanica**, v. 26, p. 1–31, 1933.

CUATRECASAS, J. A new subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. **Phytologia**, v. 35, p. 43–61, 1976.

CUATRECASAS, J. Speciation and radiation of the Espeletiinae in the Andes. In: F. Vuilleumier; M. Monasterio (Eds.); **High Altitude Tropical Biogeography**. p.267–303, 1986. New York, USA: Oxford University Press.

CUATRECASAS, J. **A systematic study of the subtribe Espeletiinae: Heliantheae, Asteraceae**. New York, USA: The New York Botanical Garden Press, 2013.

DE LOS RIOS, C.; HIDALGO, D. B.; CONTRERAS, Q.; CRESCENTE, O.; CASERTA, A. Phytochemical evaluation and antibacterial activity of *Espeletia schultzii* (Asteraceae) inflorescences. **Ciencia (Maracaibo)**, v. 7, p. 72–77, 1999.

DE VOS, R. C.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–791, 2007.

DIAZGRANADOS, M. **Phylogenetic and biogeographic relationships of frailejones (Espeletiinae, Compositae): an ongoing radiation in the tropical andes**, 2012. Tese (Doctor of Philosophy), Saint Louis University, St. Louis, Missouri, USA.

FARRIS, J. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. **Cladistics**, v. 12, n. 2, p. 99–124, 1996.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783, 1985.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155–171, 2002.

GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q^2 ! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 20, n. 4, p. 269–276, 2002.

GUTIERREZ, S. R.; FUENTES, O.; TELLEZ, A. N.; TORRENEGRA, R. Active antibacterial principle from *Espeletia barclayana*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 26, p. 71–74, 1998.

HANDS, S.; EVERITT, B. A Monte carlo study of the recovery of cluster structure in binary data by hierarchical clustering techniques. **Multivariate Behavioral Research**, v. 22, n. 2, p. 235–243, 1987.

HOOGHMSTRA, H.; VAN DER HAMMEN, T. Quaternary Ice-Age dynamics in the Colombian Andes: developing an understanding of our legacy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 359, p. 173–180, 2004.

HOOGHMSTRA, H.; RAN, E. T. H. Late and middle pleistocene climatic change and forest development in Colombia: pollen record Funza II (2-158 m core interval). **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 109, p. 211–246, 1994.

IBÁÑEZ, J.; USUBILLAGA, A. Estudio de la composición del aceite esencial de un frailejón híbrido entre *Espeletia schultzei* y *Coespeletia moritziana* (Espeletiinae). **Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes**, v. 50, n. 1, p. 16–19, 2008.

JANSEN, B.; NIEROP, K. G. J.; TONNEIJCK, F. H.; VAN DER WIELEN, F. W. M.; VERSTRATEN, J. M. Can isoprenoids in leaves and roots of plants serve as biomarkers for past vegetation changes? A case study from the Ecuadorian Andes. **Plant Soil**, v. 291, p. 181–198, 2007.

KIM, N.; KIM, K.; CHOI, B. Y.; et al. Metabolomic approach for age discrimination of *Panax ginseng* using UPLC-QTOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 19, p. 10435–10441, 2011.

KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays**, v. 16, n. 2, p. 123–132, 1994.

KRASTANOV, A. Metabolomics – the state of art. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 1, p. 1537–1543, 2010.

LARSSON, S. The “new” chemosystematics: phylogeny and phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2903–2907, 2007.

LEWIS, P. O. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. **Systematic Biology**, v. 50, n. 6, p. 913–925, 2001.

LUTEYN, J. L. **Páramos: a checklist of plant diversity, geographical distribution and botanical literature**. New York, USA: New York Botanical Garden Press, 1999.

MARTUCCI, M. E. P.; DE VOS, R. C. H.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *vernonia schreb.* **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93149, 2014.

MONASTERIO, M.; SARMIENTO, L. Adaptive radiation of *Espeletia* in the cold andean tropics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 6, n. 12, p. 387–391, 1991.

MORALES, A. M.; USUBILLAGA, A.; BANERJEE, A. K.; NAKANO, T. Studies on the constituents of *Espeletia weddellii*. **Planta Medica**, v. 24, n. 07, p. 243–248, 1973.

MORALES, M.; OTERO, J.; HAMMEN, T. VAN DER; et al. **Atlas de páramos de Colombia**. Bogotá, D.C.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2007.

PADILLA-GONZÁLEZ, G. F.; DIAZGRANADOS, M.; OLIVEIRA, T. B.; CHAGAS-PAULA, D.; COSTA, F. B. DA. Chemistry of the subtribe Espeletiinae and its correlation with phylogenetic and biogeographic data: an in silico chemotaxonomic approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, submetido em 2014.

PENA, A.; ROJAS, L.; APARICIO, R.; et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Espeletia nana*. **Natural Product Communications**, v. 7, p. 661–662, 2012.

PIOZZI, F.; PASSANNA, S.; PATERNOS, M. P.; SPRIO, V. Kauranoid diterpenes in *Espeletia grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1164–1166, 1971.

PIOZZI, F.; PASSANNANTI, S.; MARINO, M. L.; SPRIO, V. Structure of grandiflorenic acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 50, p. 109–112, 1972.

PROANO, O.; ARTEAGA, M.; USUBILLAGA, A. Phytochemical study of *Espeletia hartwegiana*. **Politecnica**, v. 2, p. 95–106, 1972.

RANGEL-CH, O. **La región de vida paramuna**. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales - Instituto Alexander von Humboldt, 2000.

RAUSCHER, J. T. Molecular phylogenetics of the *Espeletia* complex (Asteraceae): Evidence from nrDNA its sequences on the closest relatives of an andean adaptive radiation. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1074–1084, 2002.

REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2887–2895, 2007.

SÁNCHEZ, A. **Filogenia molecular de los Espeletiinae, una radiación adaptativa andina**, 2005. Tese (Maestría en Biología), Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

SCHMELZER, E.; JAHNEN, W.; HAHLBROCK, K. *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 9, p. 2989–93, 1988.

SCHMITT, I.; BARKER, F. K. Phylogenetic methods in natural product research. **Natural product reports**, v. 26, n. 12, p. 1585–602, 2009.

SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 4, p. 198–207, 2004.

SEVERIANO, A.; CARRIÇO, J. A.; ROBINSON, D. A.; RAMIREZ, M.; PINTO, F. R. Evaluation of jackknife and bootstrap for defining confidence intervals for pairwise agreement measures. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19539, 2011.

SMITH, J. M. B.; CLEEF, A. M. Composition and origin of the world's tropical alpine floras. **Journal of Biogeography**, v. 15, p. 631–645, 1988.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 2002. Sunderland, Massachusetts.: Sinauer Associates.

TAKENAKA, M.; YAN, X.; ONO, H.; et al. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 3, p. 793–6, 2003.

TELLEZ, N.; TORRENEGRA, R.; PEDROZO, J.; GRAY, A. Cycloartan-2 beta-2-methyl butanoate isolated from genus *Espeletia* (Asteraceae). **Molecules**, v. 3, p. M49–U4, 1998.

TERADA, S.; ITOH, K.; NOGUCHI, N.; ISHIDA, T. Alpha-glucosidase inhibitor for blood glucose level elevation and functional food containing tricaffeoylaldaric acid and method for producing tricaffeoylaldaric acid, 2009. (Patent) USA.

TORRENEGRA, R. D.; TELLEZ, A. A. N. Phytochemistry of *Espeletia killipii* Cuatr. and gibberellic activity of some of the isolated compounds. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 24, p. 2–6, 1996.

TORRENEGRA, R. D.; TELLEZ, A. N. Chemotaxonomic value of melampolides in *Espeletia* species (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, p. 449–450, 1995.

TORRENEGRA, R. D.; TELLEZ, A. N.; GARCIA, G. Chemical investigation of the species of the genus *Espeletia*. Part I. Chemistry of *Espeletia kilipii*-*Espeletia tunjana*. **Revista Colombiana de Química**, v. 23, p. 29–35, 1994.

USUBILLAGA, A.; HERNANDEZ, J. DE; PEREZ, N.; KIRIAKIDIS, M. Kauranoid diterpenes in *Espeletia* species. **Phytochemistry**, v. 12, p. 2999, 1973.

USUBILLAGA, A.; MORALES, A. Derivados del kaureno en la *Espeletia tenore*. **Revista Latinoamericana de Química**, p. 128–131, 1970.

USUBILLAGA, A.; ROMERO, M.; APARICIO, R. Kaurenic acids in Espeletiinae. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 597, p. 129–130, 2003.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; WERF, M. J. VAN DER. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, v. 7, p. 142, 2006.

VAN TUNEN, A. J. VAN; KOES, R. E.; SPELT, E.; et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. **The EMBO journal**, v. 7, n. 5, p. 1257–1263, 1988.

WAGNER, S.; SCHOLZ, K.; SIEBER, M.; KELLERT, M.; VOELKEL, W. Tools in metabonomics: an integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 7, p. 2918–26, 2007.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v. 58, n. 301, p. 236–244, 1963.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 2003.

WINK, M. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. In: C. Capinella; M. Ray (Eds.); **Naturally Occurring Bioactive Compounds**. p.251–268, 2006. London, UK.: Elsevier.

WINK, M.; BOTSCHEN, F.; WATERMAN, P. G.; SCH, H. Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism. In: M. Wink (Ed.); **Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Second ed., p.364–433, 2010. Blackwell Publishing Ltd.

WITTEN, I. H.; EIBE, F.; HALL, M. A. **Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques**. Third Edit ed. San Francisco, USA: Morgan Kaufmann, 2005.

XIE, G. X.; CHEN, T. L.; QIU, Y. P.; et al. Urine metabolite profiling offers potential early diagnosis of oral cancer. **Metabolomics**, v. 8, n. 2, p. 220–231, 2011.

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**, 2006. Tese (Doctor of Philosophy), School of Biological Sciences, The University of Texas at Austin, Austin, TX, USA.