



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise metabolômica aplicada à quimiotaquonomia de espécies do
gênero *Vernonia sensu lato* (Vernonieae)**

Marília Elias Gallon

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise metabólica aplicada à quimiotaxonomia de espécies do gênero *Vernonia sensu lato* (Vernonieae)

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Marília Elias Gallon

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto

Ribeirão Preto
2017

GALLON,
M.E.

**Análise metabolômica aplicada à quimiotaxonomia de espécies
do gênero *Vernonia sensu lato* (Vernonieae)**

Espaço de 2,5 cm
reservado para
etiqueta de
localização da
biblioteca

MESTRADO

FCFRP-
USP

2017

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.

Gallon, Marília Elias

Análise metabolômica aplicada à quimiotaxonomia de espécies do gênero *Vernonia sensu lato* (Vernonieae). Ribeirão Preto, 2017.

201 p.; 30cm.

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

Orientador: Leonardo Gobbo Neto

1.Asteraceae. 2.Vernoniinae. 3.Lepidaploinae. 4.Metabolômica. 5.LC-MS. 6.Química de Produtos Naturais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marília Elias Gallon

Análise metabolômica aplicada à quimiotaxonomia de espécies do gênero *Vernonia* *sensu lato* (Vernonieae).

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À toda minha família pelo apoio e incentivo. Aos meus pais e a minha irmã por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador, Leonardo Gobbo Neto, por todas as dicas e sugestões; pela oportunidade e pelo conhecimento compartilhado.

À CAPES e à FAPESP (processo nº 2015/05453-9) pelo apoio financeiro.

A todos os colegas e amigos que fazem parte do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos. Em especial aos amigos de todos os dias, pela agradável convivência e por tornar os momentos difíceis mais leves e divertidos, sempre com muito queijo e bacon: Ariane, Camila, Duda, Gabi, Pâmela, Giovana, Gibson, Larissa, Janjão, Risadinha, Daniel, Arthur, Juliano, Lucas, Rodrigo e Andrés.

Aos técnicos e professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais. Especialmente aos funcionários do bloco J, por estarem sempre dispostos a ajudar: Izabel Cristina, Jacqueline e Tomaz.

Aos alunos, funcionários e professores do laboratório de Farmacognosia. Em especial aos integrantes do AsterBioChem: Anny, Rosana, Federico, Jolindo, Gari, Ricardo e Marcelo.

À Universidade Federal de Alfenas. Aos professores Geraldo e Marcelo Aparecido, por terem me incentivado a seguir o caminho da pós-graduação. Às amigas da graduação, Daniela, Larissa, Glenda e Bruna, pelos momentos de diversão e por manterem a amizade até hoje.

Ao Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Marcelo Monge, pelas discussões e materiais fornecidos.

Agradeço a imensamente Deus por ter me guiado e iluminado meu caminho.

*“We're just moments
we're clever but we're clueless
We're just human, amusing, confusing
But the truth is all we got is questions
We'll never know”*

(Jack Johnson)

RESUMO

GALLON, M.E. **Análise metabolômica aplicada à quimiotaxonomia de espécies do gênero *Vernonia sensu lato* (Vernonieae)**. 2017. 201f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Vernonia sensu lato é um dos maiores e mais complexos gêneros da tribo Vernonieae. A tribo pertence a família Asteraceae, a qual representa cerca de 10% da flora mundial e é considerada uma das maiores famílias dentre as plantas superiores. As espécies da tribo Vernonieae apresentam distribuição pantropical e são caracterizadas pela presença de lactonas sesquiterpênicas e flavonoides (principalmente flavonas e flavonóis). Ao longo dos anos, diversas classificações têm sido propostas para o gênero *Vernonia s.l.*, porém ainda não há um consenso entre os pesquisadores. Nas classificações mais antigas, o gênero *Vernonia s.l.* inclui cerca de 1000 espécies (*sensu* Baker), distribuídas em seções e subseções; em uma divisão mais atual, essas espécies foram segregadas em vários novos gêneros e o gênero *Vernonia*, nas Américas, foi consideravelmente reduzido (*sensu* Robinson), ficando restrito a espécies distribuídas principalmente na América do Norte. Neste estudo, foram realizadas análises metabolômicas e estatísticas de espécies do gênero *Vernonia s.l.*, pertencentes às subtribos Vernoniinae, Lepidaploinae e Rolandrinae, com o intuito de verificar se a abordagem metabolômica pode ser utilizada como uma ferramenta quimiotaxonômica e auxiliar nas classificações taxonômicas do gênero. A partir das impressões digitais metabólicas obtidas por UHPLC-UV-MS, foram realizadas análises estatísticas não-supervisionadas (HCA e PCA) e supervisionadas (OPLS-DA). A análise por HCA permitiu a identificação de quatro grupos principais, os quais sugerem que as espécies apresentaram tendência em se agruparem de acordo com os gêneros criados por Robinson. Além disso, observou-se que as espécies dos gêneros *Stenocephalum*, *Stilpnopappus* e *Rolandra* (Grupo 1) estão relacionadas às espécies do gênero *Vernonanthura* (Grupo 2), enquanto que as espécies dos gêneros *Chrysolaena*, *Cyrtocymura* e *Echinocoryne* (Grupo 3) estão relacionadas às espécies dos gêneros *Lessingianthus* e *Lepidaploa* (Grupo 4), indicando que as subtribos Vernoniinae e Lepidaploinae são parafiléticas. Diversos metabólitos foram identificados nas espécies analisadas, destacando-se os ácidos clorogênicos, os flavonoides e as lactonas sesquiterpênicas. Através da análise por OPLS-DA foi possível determinar os metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos obtidos na análise por HCA. As espécies do Grupo 1 foram caracterizadas pela ausência de ácido 3-O-cafeoilquínico e 3,5-di-O-cafeoilquínico; o Grupo 2 foi caracterizado pela ausência de quercetina e presença de kaempferol 3-O-rutinosídeo; o Grupo 3 foi o único grupo no qual não foi identificado o flavonoide 7,3',5'-trihidroxí-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona e as espécies do Grupo 4 caracterizaram-se por apresentarem baixa prevalência de flavonas. Dessa maneira, as análises metabolômicas em conjunto com análises estatísticas multivariadas auxiliaram no esclarecimento da classificação taxonômica das espécies do gênero *Vernonia s.l.* e permitiram a identificação de potenciais marcadores quimiotaxonômicos.

Palavras-chave: Asteraceae. Vernoniinae. Lepidaploinae. Metabolômica. LC-MS. Química de Produtos Naturais.

ABSTRACT

GALLON, M. E. **Metabolomics analysis applied to chemotaxonomic study of species from *Vernonia sensu lato* (Vernonieae)**. 2017. 201f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Vernonia sensu lato is one of the largest and more complex genus of the tribe Vernonieae. The tribe belongs to Asteraceae, one of the largest families of flowering plants. Vernonieae is distributed widely in tropical and subtropical regions of America, Africa and Asia and it is chemically characterized by the presence of sesquiterpene lactones and flavonoids (flavones and flavonols). Over the years, several taxonomic classifications have been proposed for the genus *Vernonia s.l.*, however there has been no consensus among the researches. According to the traditional classification, the genus *Vernonia s.l.* comprises more than 1000 species and it is divided into sections and subsections (*sensu* Baker). In a recent classification, these species have been segregated into new genera, while the genus *Vernonia sensu stricto* was restricted to 22 species distributed mainly in North America (*sensu* Robinson). In this study, species belonging to the subtribes Vernoniinae, Lepidaploinae and Rolandrinae were analysed, employing UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap), followed by multivariate analyses. Data mining was performed using unsupervised (HCA and PCA) and supervised statistical analysis (OPLS-DA). The HCA showed segregation into four main groups. Comparing the HCA with the taxonomical classifications, we observed that the groups of the dendrogram were in accordance with the genera created by Robinson. The species of the genera *Stenocephalum*, *Stilpnopappus* and *Rolandra* (Group 1) are more related with the species of the genus *Vernonanthura* (Group 2), while the genera *Cyrtocymura*, *Chrysoaena* and *Echinocoryne* (Group 3) are chemically more similar to the genera *Lessingianthus* and *Lepidaploa* (Group 4). These findings indicate that the subtribes Vernoniinae and Lepidaploinae are paraphyletic groups. Several metabolites were identified, highlighting chlorogenic acids, flavonoids and sesquiterpene lactones.). According to OPLS-DA loading plot, it was possible to determine which variables are important for the discrimination among the groups. The species of the Group 1 were characterized by the absence of 3-*O*-caffeoylquinic acid and 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid. Group 2 was characterized by the absence of quercetin (flavonol with free OH) and by the presence of kaempferol 3-*O*-rutinoside. Group 3 was the only group that do not show the flavonoid 7,3',5'-trihydroxy-4'-methoxy-3-*O*-glycosylflavone. The species of the Group 4, especially the species of the genus *Lessingianthus*, were characterized by the low prevalence of flavones. Therefore, untarget metabolomic approach associated with multivariate analysis allowed the identification of potential chemotaxonomic markers, helping in the taxonomical classifications.

Keywords: Asteraceae. Vernoniinae. Lepidaploinae. Metabolomics. LC-MS. Chemistry of Natural Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxo de trabalho utilizado em <i>untarget metabolomic studies</i> , mostrando as diferentes etapas envolvidas.	11
Figura 2: Fluxograma do método utilizado para o preparo dos extratos.	33
Figura 3: Cromatogramas obtidos para a espécie <i>Lessingianthus onopordioides</i> no modo de ionização negativo, utilizando os métodos propostos.....	34
Figura 4: Cromatogramas obtidos para a espécie <i>Lessingianthus onopordioides</i> no modo de ionização positivo, utilizando os métodos propostos.	35
Figura 5: Cromatogramas da espécie <i>Lessingianthus onopordioides</i> no método escolhido (método C) para realização das análises metabolômicas.....	36
Figura 6: Análise por HCA das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS, utilizando a matriz binária dos dados e como algoritmo de agrupamento a distância euclidiana ordinária com método de ligação do tipo Ward (software R)..... Erro! Indicador não definido.	
Figura 7: Ampliação do dendograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 1.	44
Figura 8: Ampliação do dendograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 2.	45
Figura 9: Ampliação do dendograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 3.	46
Figura 10: Ampliação do dendograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 4.	47
Figura 11: PCA <i>score plot</i> em função da primeira e segunda componentes.....	52
Figura 12: PCA <i>score plot</i> em função da segunda e terceira componentes.....	53
Figura 13: OPLS-DA <i>score plot</i> das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS, utilizando como classes os grupos obtidos na análise por HCA.	55
Figura 14: OPLS-DA <i>loading plot</i> das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS.	57
Figura 15: OPLS-DA <i>loading plot</i> das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS, destacando, em vermelho, as variáveis com valores de VIP maiores que 1.....	58
Figura 16: Impressão digital metabólica da espécie <i>Chrysolaena desertorum</i> (CD004) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	59
Figura 17: Impressão digital metabólica da espécie <i>Lepidaploa lilacina</i> (LA023) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	59
Figura 18: Impressão digital metabólica da espécie <i>Lessingianthus buddleiifolius</i> (LB051) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).....	60
Figura 19: Impressão digital metabólica da espécie <i>Stenocephalum apiculatum</i> (SA083) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	60

Figura 20: Impressão digital metabólica da espécie <i>Stilpnopappus tomentosus</i> (ST096) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	61
Figura 21: Impressão digital metabólica da espécie <i>Vernonanthura almedae</i> (VA097) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	61
Figura 22: Impressão digital metabólica da espécie <i>Vernonanthura hilairiana</i> (VH118) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	62
Figura 23: Impressão digital metabólica da espécie <i>Vernonanthura petiolaris</i> (VP134) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).	62
Figura 24: VIP <i>plot</i> obtido a partir da análise por OPLS-DA.....	87
Figura 25: Principais metabólitos indicados como discriminantes para os grupos definidos a partir da análise por HCA.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subtribos e gêneros da tribo Vernonieae.....	3
Tabela 2: Lista das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS para a obtenção das impressões digitais metabólicas.....	17
Tabela 3: Métodos e concentrações dos extratos utilizados para a adaptação da metodologia.....	28
Tabela 4: Parâmetros utilizados durante a adaptação da metodologia.....	29
Tabela 5: Funções realizadas pelos softwares <i>MzMine</i> e <i>MetAlign</i> no pré-processamento de dados.....	37
Tabela 6: Valores dos coeficientes de correlação (R^2X) e determinação (Q^2) obtidos após os pré-processamentos e tratamentos dos dados.....	39
Tabela 7: Parâmetros utilizados no software <i>MzMine</i> TM para o pré-processamento dos dados obtidos nas análises por UHPLC-UV-MS (Orbitrap TM).....	40
Tabela 8: Valores de R^2X e Q^2 obtidos nas análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas (PCA) e supervisionadas (PLS-DA e OPLS-DA).....	54
Tabela 9: Valores de R^2X e Q^2 gerados pelo software SIMCA na análise por OPLS-DA.....	56
Tabela 10: Metabólitos identificados nas espécies analisadas através de comparação com dados da literatura.....	63
Tabela 11: Espécies do gênero <i>Vernonia s.l.</i> em que foram identificados os metabólitos descritos.....	78
Tabela 12: Metabólitos identificados como discriminates para as espécies analisadas de acordo com os grupos definidos na análise por HCA.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	<i>All Ion Fragmentation</i>
ESI	<i>Eletrospray ionization</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
MS	Espectrômetro de massas
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i>
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
Q^2	<i>Goodness of prediction</i>
R^2X	<i>Goodness of fit</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
t_R	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
UV/DAD	Ultravioleta/ Detector por arranjo de diodos
VIP	<i>Variable Influence on Projection</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A família Asteraceae e a tribo Vernonieae	1
1.2	O Gênero <i>Vernonia</i> e “The <i>Vernonia</i> Problem”	5
1.3	Características dos Gêneros Analisados	7
1.4	Análises Metabolômicas	9
1.5	Aplicação das análises metabolômicas à quimiotaonomia	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	METODOLOGIA	15
3.1	Biblioteca de Dados	15
3.2	Análises Metabolômicas	16
3.2.1	Material vegetal.....	16
3.2.2	Metodologia analítica em UHPLC-UV-MS e preparo dos extratos.....	27
3.2.3	Análises metabolômicas comparativas.....	29
3.2.4	Análise de correlação <i>in silico</i>	30
3.3	Análise Qualitativa	31
3.3.1	Identificação de metabólitos previamente relatados.....	31
3.3.2	Identificação dos metabólitos discriminantes.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Biblioteca de Dados	32
4.2	Análises Metabolômicas	32
4.2.1	Metodologia analítica em UHPLC-UV-MS e preparo dos extratos.....	32
4.2.2	Análises metabolômicas comparativas.....	37
4.2.2.1	MetAlign <i>versus</i> MzMine.....	37
4.2.2.2	Transformações e Escalonamentos.....	40
4.2.3	Análises de correlação <i>in silico</i>	41
4.2.3.1	Análises Estatísticas Multivariadas não-supervisionadas.....	41
4.2.3.1.1	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>	42
4.2.3.1.2	<i>Principal Component Analysis</i>	50

4.2.3.2	Análises Estatísticas Multivariadas Supervisionadas.....	54
4.3	Análise Qualitativa	59
4.3.1	Identificação de metabólitos previamente relatados em <i>Vernonia s.l.</i>	59
4.3.1.1	Ácidos Clorogênicos	70
4.3.1.2	Flavonoides.....	71
4.3.1.2.1	Flavonas	71
4.3.1.2.2	Flavonóis.....	73
4.3.1.2.3	Flavonóis O-glicosídicos	74
4.3.1.3	Lactonas Sesquiterpênicas	75
4.3.2	Identificação dos metabólitos discriminantes	86
5	CONCLUSÕES	102
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
	APÊNDICES	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Asteraceae e a tribo Vernoniaeae

A família Asteraceae Brecht. & J. Presl. pertence à ordem Asterales e é considerada a maior família dentre as eudicotiledôneas, representando aproximadamente 10% da flora mundial (BREMER, 1994; FUNK et al., 2009). A classificação da família permaneceu estável por vários anos; porém, a partir do surgimento da cladística, este panorama mudou e a classificação das espécies pertencentes à família Asteraceae sofreu grandes alterações nos últimos 30 anos. Estudos filogenéticos revelaram que a família é constituída por 13 subfamílias, 44 tribos, cerca de 1600 gêneros e 24000 espécies (FUNK et al., 2009; PANERO et al., 2014).

Representantes da família Asteraceae estão distribuídos em todos os continentes, com exceção da Antártida, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (BARROSO, 1991; FUNK et al., 2005, 2009). DeVore e Stuessy (1995) associaram o grande sucesso evolutivo da família à ocorrência de mecanismos de polinização e dispersão muito eficientes, além da presença de metabólitos secundários muito ativos. Adicionalmente, eventos de paleo-poliploidização e duplicação de genomas, contribuíram para a explicação da grande diversidade da família (PANERO; CROZIER, 2016; TANK et al., 2015).

Sob o ponto de vista econômico, as espécies da família Asteraceae destacam-se por serem utilizadas como alimentos (*Lactuca sativa* L., alface; *Cichorium endivia* L., endívia; *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob., yacón), como produtoras de óleos e néctares (*Carthamus tinctorius* L., cártamo; *Helianthus annuus* L., girassol) e por fornecerem material bruto para a fabricação de produtos industriais como inseticidas, medicamentos, sabões, detergentes, cosméticos, perfumes, produtos alimentícios, flavorizantes e corantes de bebidas e alimentos (*Artemisia dracuncululus* L., estragão; *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip., piretro) . Além disso, algumas espécies são reconhecidas como plantas ornamentais (*Chrysanthemum indicum* L., crisântemo; *Gerbera linnaei* Cass., gérbera; *Calendula officinalis* L., calêndula) e outras são utilizadas na fitoterapia e na medicina popular por possuírem diversas atividades farmacológicas (*Echinacea purpurea* (L.) Moench, "purple

coneflower”; *Matricaria chamomilla* L., camomila) (ANDERBERG et al., 2007; SIMPSON, 2009).

Dentre as tribos da família Asteraceae destaca-se a tribo Vernonieae Cass., a qual apresenta distribuição pantropical e é subdividida em 21 subtribos, com aproximadamente 1500 espécies distribuídas entre 126 gêneros (BREMER, 1994; KEELEY; ROBINSON, 2009; ROBINSON, 2007). A tribo Vernonieae é um grupo monofilético e está inserida na subfamília Cichorioideae, possuindo como grupo irmão a tribo Liabeae (Cass. ex Dumort.) Rydb. (ANDERBERG et al., 2007; FUNK et al., 2005; KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; PANERO; FUNK, 2008; ROBINSON, 2007). O Brasil, é considerado um centro de diversidade da tribo, onde foram identificados cerca de 50 gêneros e 450 espécies (DE MELO; PEREIRA, 2015; GANDARA; ALVES; ROQUE, 2016; NAKAJIMA et al., 2015; ROBINSON, 1999a; SEMIR, 1991). Estudos fitoquímicos revelaram que a tribo Vernonieae é caracterizada pela presença de lactonas sesquiterpênicas da classe dos germacranolidos altamente oxigenados e poliacetilenos simples, bem como pela ausência de diterpenos, fenilpropanos e derivados *p*-hidroxiacetofenos (BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990).

As classificações propostas para a tribo Vernonieae não definem claramente os limites entre os gêneros, havendo dúvidas e posições contrárias quanto ao número de gêneros e de suas respectivas espécies, principalmente relacionadas ao gênero *Vernonia sensu lato* (BREMER, 1994; KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; KEELEY; ROBINSON, 2009; ROBINSON, 2007). Bentham (1873) dividiu a tribo Vernonieae em duas subtribos: Euvernonieae e Lychnophoreae. Esta classificação se manteve praticamente intacta por vários anos; porém, posteriormente foram realizadas algumas modificações (JEFFREY, 1988; JONES, 1977; ROBINSON, 1999a, 1999b, 1999c). Robinson (1999a, 1999b) propôs a classificação das espécies da tribo Vernonieae do Novo Mundo em 12 subtribos: Centratherinae H. Rob., F. Bolhmann & R.M. King, Chrestinae H. Rob., Elephantopodinae Less., Leiboldiinae H. Rob., Lychnophorinae Benth. & Hook., Pacourininae H. Rob, Piptocarphinae H. Rob., F. Bohlmann, Rolandrinae Cass. ex Dumort., Sipolisiinae H. Rob., Stokesiinae H. Rob., Trichospirinae Less. e Vernoniinae Cass. ex Dumort., & R.M. King. Para as espécies do Velho Mundo, Robinson (1999c) propôs uma divisão incluindo três subtribos: Centrapalinae H. Rob., Erlangeinae H. Rob. e Gymnantheminae H. Rob. Ao longo dos anos, foram realizados estudos morfológicos e filogenéticos, que descreveram seis novas subtribos: Diptercypselinae S.C. Keeley & H. Rob., Distephaninae S.C. Keeley

& H. Rob., Hesperomanniinae S.C. Keeley & H. Rob., Lepidaploinae S.C. Keeley & H. Rob., Linziinae S.C. Keeley & H. Rob., Mesanthophorinae S.C. Keeley & H. Rob. (KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; KIM et al., 1998; ROBINSON, 2007). Tais subtribos foram formadas principalmente pela segregação da subtribo Vernoniinae, a qual era constituída por 25 gêneros e cerca de 400 espécies de acordo com Robinson (1999a, 1999b), tendo sido reduzida, a partir desses estudos, à 9 gêneros e cerca de 150 espécies. Assim, atualmente, a tribo Vernoneia é subdividida em 21 subtribos, sendo que 15 ocorrem no Novo Mundo e seis no Velho Mundo (KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; KEELEY; ROBINSON, 2009).

Tabela 1: Subtribos e gêneros da tribo Vernoneiae

	Subtribo	Gêneros
Novo Mundo	Centratherinae	<i>Centratherum</i> Cass. (3); <i>Oiospermum</i> Less. (1);
	Chrestinae	<i>Chresta</i> Vell. ex DC. (11); <i>Pithecoseris</i> Mart. ex DC. (1); <i>Soaresia</i> Sch.Bip. (1);
	Dipterocypselinae	<i>Dipterocypsela</i> S.F. Blake (1); <i>Heterocypsela</i> H. Rob. (1); <i>Manyonia</i> H. Rob. (1);
	Elephantopinae	<i>Caatinganthus</i> H. Rob. (2); <i>Elephantopus</i> L. (~28); <i>Orthopappus</i> Gleason (1); <i>Pseudelephantopus</i> Rohr (2);
	Leiboldiinae	<i>Bolanosa</i> A. Gray (1); <i>Leiboldia</i> Schltld. ex Gleason (2); <i>Lepidonia</i> S.F. Blake (7); <i>Stramentopappus</i> H. Rob. & V. Funk (1)
	Lepidaploinae	<i>Aynia</i> H. Rob. (1); <i>Chysolaena</i> H. Rob. (9); <i>Echinocoryne</i> H. Rob. (6); <i>Harleya</i> S.F. Blake (1); <i>Lepidaploa</i> (Cass.) Cass. (~140); <i>noLessingianthus</i> H. Rob. (~102); <i>Mattfeldanthus</i> H. Rob. & R.M. King (2); <i>Pseudopiptocarpha</i> H. Rob. (2); <i>Stenocephalum</i> Sch.Bip. (5); <i>Stilpnopappus</i> Mart. ex DC. (20); <i>Struchium</i> (L.) Kuntze (2); <i>Xiphochaeta</i> Poepp. (1)
	Lychnophorinae	<i>Anteremanthus</i> H. Rob. (1); <i>Chronopappus</i> DC. (1); <i>Eremanthus</i> Less (27); <i>Lychnophora</i> Mart. (30); <i>Lychnophoriopsis</i> Sch.Bip. (4); <i>Minasia</i> H. Rob. (5); <i>Piptolepis</i> Sch.Bip (~6); <i>Prestelia</i> Sch.Bip. (1); <i>Proteopsis</i> Mart. & Zucc. ex Sch.Bip. (1);
	Mesanthophorinae	<i>Acilepidopsis</i> H. Rob. (1); <i>Mesanthophora</i> H. Rob. (2); <i>Telmatophila</i> Mart. ex Baker (1);
	Pacourininae	<i>Pacourina</i> Aubl. (1)
Piptocarphinae	<i>Blanchetia</i> DC (1); <i>Critoniopsis</i> Sch.Bip. (~45); <i>Cuatrecasanthus</i> H. Rob. (3); <i>Dasyandantha</i> H. Rob. (1); <i>Ekmania</i> Gleason (1); <i>Huberopappus</i> Pruski (1); <i>Irwinia</i> G.M. Barroso (1); <i>Joseanthus</i> H. Rob (5); <i>Piptocarpha</i> R. Br. (43); <i>Piptocoma</i> Cass. (18);	

	Rolandriinae	<i>Rolandra</i> Rottb. (1); <i>Spiracantha</i> Kunth (1)
	Sipolisiinae	<i>Bishopalea</i> H. Rob. (1); <i>Heterocoma</i> DC. (1); <i>Hololepis</i> DC. (2); <i>Sipolisia</i> Glaz. ex Oliver (1); <i>Xerxes</i> J.R. Grant (2)
	Stokesiinae	<i>Stokesia</i> L'Her. (1)
	Trichospirinae	<i>Trichospira</i> Kunth (1)
	Vernoniinae	<i>Albertinia</i> Spreng. (1); <i>Cololobus</i> H. Rob. (3); <i>Cyrtocymura</i> H. Rob. (6); <i>Dasyanthina</i> H. Rob. (2); <i>Eirmocephala</i> H. Rob. (3); <i>Quechualia</i> H. Rob. (4); <i>Trepadonia</i> H. Rob. (2); <i>Vernonanthura</i> H. Rob. (~70); <i>Vernonia</i> Schreb. (22)
Velho Mundo	Centrapalinae	<i>Acilepis</i> D. Don. (~10); <i>Bechium</i> DC (~2); <i>Cabobanthus</i> H. Rob. (2); <i>Centauroopsis</i> Boj. ex DC (8); <i>Centrapalus</i> Cass. (2); <i>Dewildemanina</i> O. Hoffm. (7); <i>Hilliardiella</i> H. Rob. (~8); <i>Iodocephalus</i> Thorel ex Gagnep. (1); <i>Koyamasia</i> H. Rob. (1); <i>Msuata</i> O. Hoffm. (1); <i>Oliganthes</i> Cass. (9); <i>Phyllocephalum</i> Blume (~9)
	Distephaninae	<i>Distephanus</i> Cass. (~50)
	Erlangeinae	<i>Ageratinastrum</i> Mattf. (5); <i>Ambassa</i> Steetz (~3); <i>Bothriocline</i> Oliver ex Benth. (30); <i>Brachythrix</i> Wild & G.V. Pope (6); <i>Cyanthillium</i> Blume (7); <i>Decastylocarpus</i> Humbert (1); <i>Diapraectanthus</i> Humbert (1); <i>Erlangea</i> Sch.Bip. (~10); <i>Ethulia</i> L. (19); <i>Gutenbergia</i> Sch.Bip. (~20); <i>Herderia</i> Cass. (1); <i>Hystrichophora</i> Mattf. (1); <i>Kinghamia</i> C. Jeffrey (5); <i>Muschleria</i> S. Moore (1); <i>Omphalopappus</i> O. Hoffm. (~3); <i>Oocephala</i> (S.B. Jones) H. Rob. (2); <i>Orbivestus</i> H. Rob. (~4); <i>Parapolydora</i> H. Rob. (1); <i>Paurolepis</i> S. Moore (3); <i>Polydora</i> Fenzl (8); <i>Rastrophyllum</i> Wild & G.V. Pope (2); <i>Vernoniastrum</i> H. Rob. (8)
	Gymnantheminae	<i>Brenadendron</i> H. Rob. (3); <i>Gymnanthemum</i> Cass. (~24); <i>Lampropappus</i> (O. Hoffm.) H. Rob. (3); <i>Myanmaria</i> H. Rob. (1)
	Hesperomanniinae	<i>Hesperomania</i> A. Gray (3)
	Linziinae	<i>Adenoon Dalzell</i> (1); <i>Aedesia</i> O. Hoffm. (3); <i>Baccharoides</i> Moench (~30); <i>Camchaya</i> Gagnep. (6); <i>Lachnorhiza</i> A. Rich. (1); <i>Linzia</i> Sch.Bip. ex Walp. (~7); <i>Neurolakis</i> Mattf. (1); <i>Pleurocarpaea</i> Benth. (1)
	Sem subtribo definida	<i>Acanthodesmos</i> C.D. Adams & M.C. du Quesnay (1); <i>Decaneuropsis</i> H. Rob. & J. Skvarla (1); <i>Eremosis</i> Gleason (25); <i>Gorceixia</i> Baker (1); <i>Monosis</i> DC. (7); <i>Strobocalyx</i> (Blume ex DC.) Spach. (~10); <i>Tarlmounia</i> H. Rob., S. Keeley, J.J. Skvarla & R. Chan (1); <i>Tephrothamnus</i> Sch.Bip. (1).

Legenda: entre parênteses são indicados os números de espécies existentes em cada gênero.
(Adaptado de KEELEY; ROBINSON, 2009)

1.2 O Gênero *Vernonia* e “The *Vernonia* Problem”

O gênero *Vernonia sensu lato* apresenta mais de 1000 espécies e é considerado um dos maiores gêneros da família Asteraceae, estando distribuído nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (JONES, 1977; KEELEY; ROBINSON, 2009; ROBINSON, 1999a; STUTTS, 1988). Na América do Sul foram identificadas cerca de 350 espécies, sendo que Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil são os países de maior ocorrência (BREMER, 1994; ROBINSON, 1999a). No Brasil, as espécies estão distribuídas principalmente em áreas do Cerrado, e muitas possuem endemismo nessa região. Além disso, o gênero possui grande diversidade em áreas de Mata Atlântica e algumas espécies ocorrem em outras partes do Brasil (áreas de Caatinga, Chaco e Floresta Amazônica), em países da América do Sul e, ocasionalmente, das Américas do Norte e Central (LEITÃO-FILHO, 1972; MOREIRA; TELES, 2014; NAKAJIMA; SEMIR, 2001; RIVERA, 2006).

As espécies americanas do gênero *Vernonia s.l.* são caracterizadas quimicamente pela presença de lactonas sesquiterpênicas e flavonoides (principalmente flavonas e flavonóis) (BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990; IGUAL et al., 2013; LOPES, 1991; MABRY et al., 1975; POLLORA et al., 2003; VASSALLO et al., 2013; YOUN et al., 2014; ZHANG et al., 2014); nas espécies africanas, em especial em *Vernonia amygdalina*, foram identificadas saponinas, como vernoninosídeo D1, D2 e E (IGILE et al., 1995; SCHMITTMANN; ROTSCHEIDT; BREITMAIER, 1994). Dentre as lactonas sesquiterpênicas, foram relatados com maior frequência as pertencentes a classe dos glaucolidos e dos hirsutinolidos (BOHLMANN; WALLMEYER; JAKUPOVIC, 1982; LOPES, 1991).

Por apresentar uma grande diversidade morfológica e ampla distribuição geográfica, o gênero *Vernonia s.l.* é considerado um dos gêneros mais complexos da família Asteraceae sob o ponto de vista taxonômico (STUTTS, 1988). “The *Vernonia* Problem” (BREMER, 1994) surgiu pois um grande número de espécies (aproximadamente 1000 espécies, das 1500 pertencentes a tribo Vernonieae) foram classificadas no gênero *Vernonia s.l.* (JONES, 1977) devido à ausência de caracteres específicos que determinassem semelhanças ou diferenças entre as espécies. Assim, o gênero *Vernonia s.l.* era definido por “o que não é” e somente gêneros que possuíam características autapomórficas (únicas dentro do grupo) ou não usuais, eram reconhecidos como gêneros distintos de *Vernonia s.l.* (KEELEY; ROBINSON, 2009).

Uma das classificações mais antigas das espécies do gênero *Vernonia s.l.* foi proposta por Baker (1873), dividindo-as em seções e subseções. Posteriormente novas divisões para o gênero foram sugeridas, de acordo com características da inflorescência (CABRERA, 1994; GLEASON, 1923), morfologia dos grãos de pólen (JONES, 1979; KEELEY; JONES, 1977) e número de cromossomos (TURNER; BEAMAN; ROCK, 1961). Jones (1979, 1981) propôs a divisão de *Vernonia s.l.* em dois subgêneros: *Vernonia*, para as espécies do Novo Mundo, e *Orbivestus*, para as espécies do Velho Mundo; sendo que, cada subgênero possuía seções, subseções e séries (KEELEY; ROBINSON, 2009). Jeffrey (1988) também contribuiu para a classificação infragenérica de *Vernonia s.l.* do Velho Mundo, reconhecendo táxons infragenéricos e sugerindo que estes deveriam ser elevados ao nível genérico. Adicionalmente, Jeffrey (1988) indicou que poderiam haver relações entre táxons do Novo Mundo e do Velho Mundo, pondo em cheque a classificação de Jones (1979, 1981) em apenas dois subgêneros.

Nas últimas décadas, Robinson (1999a, 1999b) propôs uma nova classificação para as espécies americanas da tribo Vernonieae, na qual segregou as espécies do gênero *Vernonia s.l.*, descrevendo novos gêneros e restabelecendo outros, principalmente através da elevação de seções e subseções ao nível genérico. Esta proposta foi baseada em micromorfologia, em especial de grãos de pólen, adquirida através de microscopia eletrônica de varredura, caracteres quimiotaxonômicos, citogenéticos e morfológicos. Com esta implosão, o gênero *Vernonia sensu stricto* (s.s.) foi restringido à 22 espécies, com maior diversidade na América do Norte. Assim, as espécies de *Vernonia s.l.* da América do Sul foram segregadas nos gêneros: *Acilepidopsis*, *Aynia*, *Chrysolana*, *Cololobus*, *Critoniopsis*, *Cuatrecasacanthus*, *Cyrtocymura*, *Dasyandantha*, *Dasyanthina*, *Echinocoryne*, *Eirmocephala*, *Joseanthus*, *Lepidaploa*, *Lessingianthus*, *Mattfeldanthus*, *Mesanthophora*, *Minasia*, *Pseudopiptocarpha*, *Quechualia*, *Stenocephalum*, *Trepadonia*, *Vernonanthura* e *Xiphochaeta*.

A proposta de Robinson (1999a, 1999b) para as espécies originalmente classificadas como *Vernonia s.l.* contribuiu para um melhor entendimento taxonômico dessas espécies; porém, tal classificação não é totalmente aceita entre os pesquisadores. Embora as alterações tenham sido aprovadas por alguns autores, existem correntes científicas discordantes e que continuam utilizando a classificação original. Segundo tais correntes, a elevação de algumas seções e subseções para o

nível genérico seria prematura e não resolveria o problema taxonômico a que se propõe (DE OLIVEIRA; FORNI-MARTINS; SEMIR, 2007; NAKAJIMA; SEMIR, 2001; RIVERA, 2006). Dessa maneira, existem opiniões divergentes quanto aos limites dos gêneros e das subtribos, especialmente relacionadas a segregação de *Vernonia s.l.*, indicando que ainda existe um longo caminho para solucionar as relações dentro da tribo Vernonieae, em especial a circunscrição das subtribos e gêneros que se mostraram parafiléticos (KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; KEELEY; ROBINSON, 2009; MARTUCCI et al., 2014; RIVERA, 2006; ROBINSON, 1999a).

1.3 Características dos Gêneros Analisados

Stenocephalum é um gênero pequeno, com 5 espécies descritas. Os caracteres diagnósticos que diferenciam o gênero dos demais gêneros da subtribo Lepidaploinae são: quantidade de flores reduzida nos capítulos (4 a 7); poucas brácteas involucrais (15 a 22); capítulos sésses nas axilas das inflorescências e ausência de ráfides nos frutos. *Stenocaphalum* apresenta-se distribuído na América do Sul, com 3 espécies presentes no Brasil, Uruguai e Argentina, uma espécie no Paraguai e outra na Colômbia (ROBINSON, 1987a, 1999a).

O gênero *Stilpnopappus* é constituído por cerca de 20 espécies, sendo que a maioria ocorre no Brasil (especialmente no Nordeste) e algumas na Venezuela (ESTEVES; GONÇALVES-ESTEVES, 2003; KEELEY; ROBINSON, 2009). Apresentam-se como plantas pequenas e delicadas, possuindo como caracteres diagnósticos: cerdas do pápus alargado e comprimido dorso-ventralmente e ráfides quadradas na parede das células dos frutos (CARRIJO et al., 2005). Aparentemente, não existem claras relações morfológicas entre *Stenocephalum* e *Stilpnopappus*, a não ser pela pequena quantidade de flores nos capítulos. Assim, estudos citogenéticos, micromorfológicos e anatômicos, podem auxiliar na classificação destas espécies (informação verbal)¹.

Vernonanthura é um gênero de arbustos e árvores, heliófilos, que ocorrem em áreas de vegetação aberta (cerrados e chaco) ou áreas de ambiente fechado (Mata Atlântica). As espécies deste gênero possuem base da antera alongada e glândulas no apêndice apical, além de inflorescências paniculiformes triangulares ou tirsoideas. (ROBINSON, 1992, 1999a). As relações filogenéticas recuperadas por Keeley,

¹ Informação fornecida por Marcelo Monge

Forsman e Chan (2007) e Loeuille, Keeley e Pirani (2015) em relação à *Vernonanthura* são intimamente relacionadas à *Vernonia* s.s., sendo confirmadas pela morfologia .

Chrysolaena é um gênero sul-americano de plantas herbáceas, que ocorrem em ambiente campestres e possui 12 espécies descritas. O gênero é caracterizado pelo indumento seríceo a velutino, cipelas com glândulas, estilete sem a presença de um nó basal e anteras com glândulas (DEMATTEIS, 2009; ROBINSON, 1988a). Entretanto, glândulas na antera e nos frutos também são encontrado em *Vernonanthura*. Algumas espécies previamente posicionadas por Robinson (1988b) em *Lessingianthus* foram transferidas para *Chrysolaena* (DEMATTEIS, 2007); assim, a delimitação entre *Chrysolaena* e *Lessingianthus* é, muitas vezes, confusa.

Echinocoryne é um gênero brasileiro de plantas herbáceas e subarustivas, que ocorrem em áreas campestres e possui seis espécies descritas (KEELEY; ROBINSON, 2009). O gênero possui como características diagnósticas: capítulos pedunculados; brácteas involucrais com ápice acuminado à pungente; indumento seríceo com ausência de glândulas; proporção de lata:brácteas involucrais e flores de até 100:1 e pólen lofado com columela rizomatosa (ROBINSON, 1987b). A delimitação de *Echinocoryne* não é considerada problemática, pois os caracteres utilizados para diferenciá-lo não estão presentes em outros gêneros (informação verbal)².

O gênero *Cyrtocymura* ocorre na América Central, caribe e América do Sul e possui seis espécies descritas (KEELEY; ROBINSON, 2009; ROBINSON, 1987c), das quais, *Cyrtocymura scorpioides* é uma das ervas daninhas mais comuns no Brasil (informação verbal)³. São plantas herbáceas, heliófilas e que possuem como caracteres diagnósticos os lobos eretos e superfície externas indumentada da corola, capítulos velhos com flores e brácteas decíduas, anteras com apêndice basal indistinto e ausência de ráfides nos frutos (ROBINSON, 1987c). No que se refere a morfologia deste gênero e suas espécies, há grande homogeneidade em nível genérico e, portanto, não há problemas de delimitação evidentes (informação verbal)⁴.

O gênero *Lepidaploa*, é composto por ervas e subarustos heliófilos, que ocorrem na América Central, Caribe e América do Sul (KEELEY; ROBINSON, 2009; ROBINSON, 1990). Os representantes do gênero possuem capítulos sésseis e pequenos; estilete com nódulo basal; ausência de glândulas nos apêndices da antera, podendo haver glândulas nos lobos da corola; presença de glândulas nas cipelas e pólen lofado com parte rizomatosa nas crestas. *Lepidaploa* possui inflorescências em cimeiras seriadas, as quais ocorrem também em *Echinocoryne*, *Chrysolaena*,

^{2, 3, 4} Informação fornecida por Marcelo Monge

Stenocephalum e *Lessingiantus*, o que pode levar a enganos em relação ao posicionamento genérico (ROBINSON, 1990). Por sua vez, *Lessingianthus* é um gênero composto por subarbustos e arbustos, também heliófilos, com ocorrência restrita à América do Sul (KEELEY; ROBINSON, 2009; ROBINSON, 1988b). Os caracteres diagnósticos do gênero são capítulos frequentemente pedunculados e grandes; ausência de nódulo basal no estilete; ausência de glândulas nas cipselas e pólen sem parte rizomatosa das crestas (ROBINSON, 1988b).

1.4 Análises Metabolômicas

O metaboloma é definido como o conjunto de todos os metabólitos produzidos por um organismo (animal, vegetal ou microrganismo) em um determinado momento. As análises metabolômicas são, então, definidas como a determinação do metaboloma. A determinação do metaboloma, porém, não é tão simples, já que a maioria dos métodos de análise disponíveis atualmente não são capazes de determinar, simultaneamente, todos os metabólitos produzidos por um organismo (FIEHN, 2001; VILLAS-BÔAS et al., 2005; WOLFENDER et al., 2015). Dessa maneira, os estudos do metaboloma são realizados, basicamente, através de duas estratégias:

- *Target metabolomic studies*: os experimentos são guiados por uma hipótese e são caracterizados pela análise de um conjunto pré-definido de metabólitos;
- *Untarget metabolomics studies*: análises caracterizadas pela medida simultânea do maior número de metabólitos possível em uma amostra, sem o conhecimento prévio da identidade dos metabólitos (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; VILLAS-BÔAS et al., 2005; YI et al., 2016)

Metabolite profiling (perfil metabólico) e *metabolite fingerprinting* (impressão digital metabólica) são termos usados com frequência para descrever as análises de parte do metaboloma. O termo *metabolite profiling* é utilizado para indicar a análise de um determinado conjunto de dados, enquanto *metabolite fingerprinting* é utilizado para descrever a análise inespecífica de uma amostra e não fornece, portanto, informações sobre metabólitos específicos (VILLAS-BÔAS et al., 2007).

Os estudos metabolômicos empregam técnicas de separação cromatográficas acopladas a um detector espectroscópico ou espectrométrico, que são capazes de demonstrar informações estruturais dos metabólitos e a diversidade química das espécies vegetais. Tais técnicas incluem a cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência acoplada a detectores de espectrometria de massa ou de ressonância magnética nuclear, bem como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (ALLWOOD; GOODACRE, 2010; BAMBA; FUKUSAKI, 2006; CHAGAS-PAULA et al., 2015; FERREIRA, 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; SUMNER; MENDES; DIXON, 2003; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Atualmente, grande destaque tem sido dado a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* e detector de alta resolução do tipo Orbitrap (UPLC-UV-HRFTMS), por ser uma técnica de grande abrangência e alta sensibilidade (CHAGAS-PAULA et al., 2015; MARTUCCI et al., 2014).

Untarget metabolomic studies são caracterizados pela produção de dados que, além de numerosos, são altamente complexos. Assim, para tornar possível a análise de uma grande quantidade de dados complexos, é necessário o emprego da quimiometria, destacando-se as ferramentas de quimioinformática (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; FERREIRA, 2015; YI et al., 2016). A quimioinformática é definida como a aplicação de métodos de informática para a resolução de problemas químicos. O emprego de ferramentas de quimioinformática possibilita, portanto, a extração das informações úteis dos dados (*data mining*) e a transformação dessas informações em conhecimento (CHEN, 2006; GASTEIGER, 2006). A Figura 1 apresenta um fluxograma típico das etapas empregadas nesses estudos.

O fluxo de trabalho utilizado nas análises metabolômicas inicia com o preparo da amostra, seguido pela aquisição dos dados, na qual são empregadas técnicas de separação cromatográficas acopladas a um detector espectroscópico ou espectrométrico. Os dados espectrais obtidos constituem, então, as impressões digitais metabólicas e/ou perfil metabólico; estes dados são submetidos ao pré-tratamento dos dados, durante o qual são realizados procedimentos como a correção da linha de base, redução de ruído, alinhamento dos picos, normalização, desconvolução, entre outros. Atualmente, estão disponíveis diversos softwares (livres e proprietários) que realizam estes procedimentos; dentre os softwares livres destacam-se *MzMine*, *XCMS*, *MetAlign* e *MSClust* (CASTILLO et al., 2011; COBLE; FRAGA, 2014; LOMMEN, 2009; TIKUNOV et al., 2012).

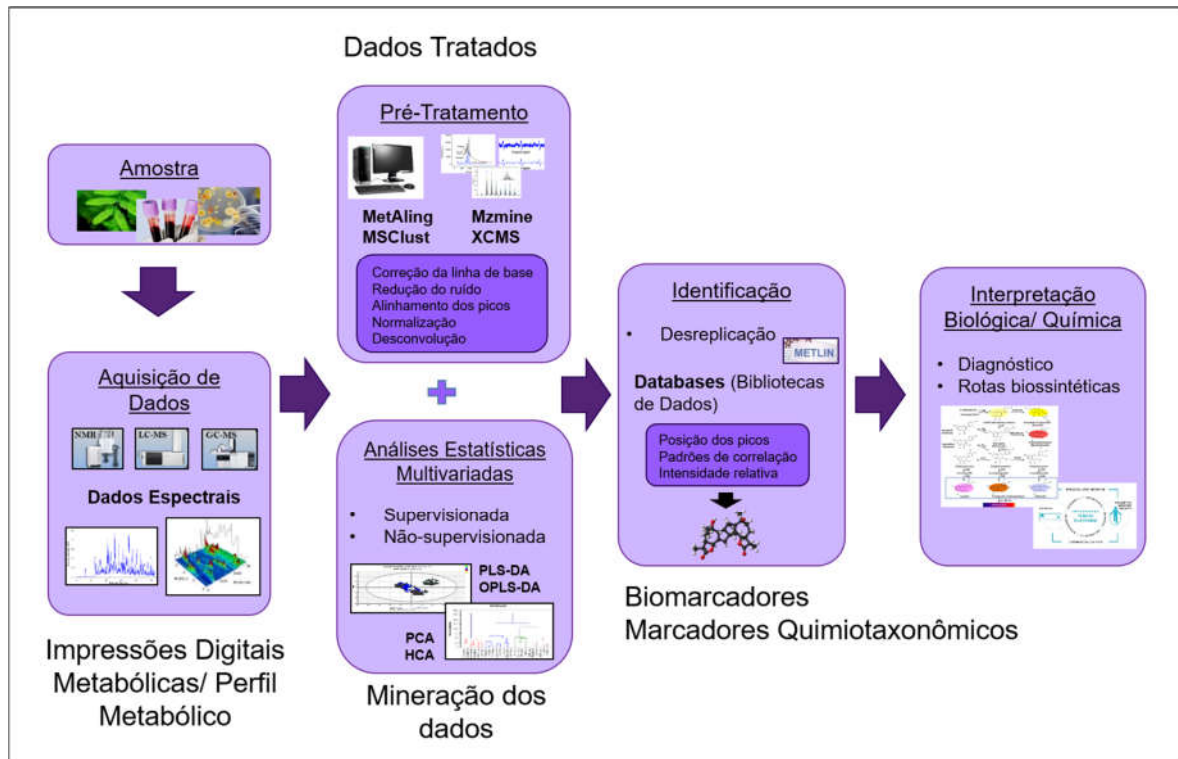


Figura 1: Fluxo de trabalho utilizado em *untargeted metabolomic studies*, mostrando as diferentes etapas envolvidas.

Na etapa de mineração dos dados (*data mining*) são extraídas as informações úteis dos dados previamente tratados, sendo realizada através de análises estatísticas multivariadas. Para isto, são aplicadas técnicas supervisionadas (como PLS, *Partial Least Squares* e OPLS, *Orthogonal Partial Least Squares*) ou não-supervisionadas (como PCA, *Principal Components Analysis* e HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*); além disso, as redes neurais artificiais também podem ser utilizadas na mineração dos dados (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; FERREIRA et al., 2005; ZUPAN; GASTEIGER, 1991). Os métodos não-supervisionados (método de análise exploratória de dados) são aplicados para resumir a complexidade dos dados metabolômicos, sem considerar o tipo ou classe da amostra. Nos métodos supervisionados, são pré-estabelecidas classes para as amostras, as quais são utilizadas para identificar as características de interesse; os métodos supervisionados também são utilizados na construção de modelos de predição (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; ERIKSSON et al., 2013; FERREIRA, 2015).

A partir do processamento dos dados é possível identificar metabólitos que constam em bibliotecas de dados (*databases*) via desreplcação, utilizando

informações sobre as posições, os padrões de correlação e as intensidades relativas dos picos (BANERJEE et al., 2015; SMITH et al., 2005; WANG et al., 2014). Assim, estes metabólitos podem ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico de doenças, como marcadores quimiotaconômicos para a resolução de problemas taxonômicos ou determinações de rotas biossintéticas, entre diversas outras aplicações (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; CLARK et al., 2014; COX et al., 2014).

1.5 Aplicação das análises metabolômicas à quimiotaconomia

A utilização de impressões digitais metabolômicas (*metabolite fingerprinting*) e/ou perfil metabolômico (*metabolic profiling*) em conjunto com análises estatísticas multivariadas tem se mostrado uma ferramenta quimiotaconômica em potencial (ALVARENGA et al., 2001; MARTUCCI et al., 2014). Nos últimos anos, a utilização de marcadores quimiotaconômicos para resolver problemas botânicos tem tido grande destaque e está sendo alvo de numerosos estudos (ALVARENGA et al., 2001; ALVES, 2009; COX et al., 2014; DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; MARTUCCI et al., 2014). Diversos grupos de substâncias são utilizados como marcadores quimiotaconômicos, uma vez que algumas rotas biossintéticas proporcionam metabólitos exclusivos a determinados gêneros, tribos e até mesmo famílias do reino vegetal, auxiliando na classificação das espécies e fornecendo informações importantes sobre a evolução de determinados táxons vegetais (ALVARENGA et al., 2001; PUGIALLI; KAPLAN; GOTTLIEB, 1993). Na família Asteraceae, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas têm sido utilizados como marcadores quimiotaconômicos (EMERENCIANO et al., 1987, 2001; SEAMAN, 1982; SEAMAN; FUNK, 1983).

A obtenção de impressões digitais metabolômicas tem tido grande aplicação entre os produtos naturais, pois possibilita desde o controle de qualidade de plantas até a resolução de problemas taxonômicos, além de permitir a identificação de diferenças nas composições químicas entre plantas com atividades farmacológicas e as que não possuem tais atividades, podendo ser utilizada para a identificação dos metabólitos ativos (CHAGAS-PAULA et al., 2015; COX et al., 2014; MARTUCCI et al., 2014).

Na abordagem metabolômica, a identificação de metabólitos é realizada preferencialmente através da desreplcação, a qual possibilita uma caracterização

rápida dos constituintes da amostra com o intuito de identificar aqueles já relatados na literatura e que constam em bancos de dados, sem necessidade de seu isolamento (CROTTI et al., 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; MARTUCCI et al., 2014).

A partir dos estudos metabolômicos, é possível comparar diferentes amostras para a determinação de seus componentes, permitindo uma caracterização detalhada sobre as diferenças e semelhanças na composição fitoquímica (KEURENTJES et al., 2006; SCHAUER; ZAMIR; FERNIE, 2005). Assim, ao invés das clássicas e trabalhosas triagens fitoquímicas, os resultados obtidos a partir de técnicas atuais de abordagens metabolômicas, associados a análises multivariadas, podem ser aplicados na quimiotaxonomia para auxiliar nas classificações taxonômicas (ALVARENGA et al., 2001; ALVES, 2009; DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; EMERENCIANO et al., 2007; FERREIRA et al., 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; MARTUCCI et al., 2014; PADILLA-GONZÁLES, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar análises metabolômicas e estatísticas de espécies do gênero *Vernonia s.l.*, verificando se a abordagem metabolômica pode ser utilizada como uma ferramenta quimiotaxonômica e auxiliar nas classificações taxonômicas do gênero.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento bibliográfico para a construção de uma biblioteca de dados de metabólitos presentes nas espécies do gênero *Vernonia s.l.*;
- Obter amostras de folhas de espécies do gênero *Vernonia s.l.*;
- Adaptar, para esse grupo de plantas, a metodologia de extração e análise em uso no nosso grupo de pesquisa;
- Obter as impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*) por LC-MS para cada uma das amostras vegetais;
- Realizar as análises metabolômicas e estatísticas utilizando os dados brutos e com transformações, obtidos nos modos de ionização positivo e negativo;
- Verificar se as impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*) podem ser utilizadas como ferramentas quimiotaxonômicas;
- Comparar os agrupamentos obtidos nas análises estatísticas às classificações taxonômicas propostas por Baker (1873) e Robinson (1999a, 1999b);
- Determinar os metabólitos discriminantes para cada grupo obtido nas análises estatísticas e identificá-los, quando possível.

3 METODOLOGIA

3.1 Biblioteca de Dados

A biblioteca de dados foi construída em colaboração com o grupo de pesquisa AsterBioChem, liderado pelo Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, com o intuito de fornecer novas estruturas para o AsterDB e auxiliar, posteriormente, na identificação das substâncias encontradas em cada espécie. O AsterDB é uma biblioteca de dados local (*in house*) de acesso livre, que contém estruturas químicas reportadas para as espécies da família Asteraceae, sendo a primeira biblioteca de dados dedicado exclusivamente a esta família. Ele pode ser acessado através do site: <http://www.asterbiochem.org/asterdb>.

Para a construção da biblioteca de dados, foi realizado um levantamento bibliográfico dos metabólitos relatados para as espécies do gênero *Vernonia s.l.*. Para isto, foi utilizado o site SciFinder® como fonte de pesquisa e os nomes de cada espécie como palavra-chave. Dessa maneira, os artigos relacionados às espécies foram obtidos e analisados, coletando-se informações sobre os metabólitos secundários relatados.

Os metabólitos descritos em cada artigo foram selecionados e inseridos em uma planilha do Excel. A planilha foi elaborada dividindo as colunas em: família, tribo, subtribo, espécie, país de origem, país de coleta, local de coleta, voucher, parte da planta, subclasse do composto, tipo de esqueleto, estrutura, nome usual, nome sistemático (SciFinder), fórmula molecular, número CAS, massa monoisotópica, massa molecular e referência bibliográfica consultada, sendo que, as estruturas de cada molécula foram inseridas com o auxílio do aplicativo JChem for Excel (versão 17.3.2700), desenvolvido por ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Assim, em cada linha foi representado um metabólito, com suas respectivas características. A planilha gerada foi utilizada na construção da biblioteca de dados, integrando o AsterDB.

3.2 Análises Metabolômicas

3.2.1 Material vegetal

Foram analisadas 79 espécies vegetais diferentes que já foram classificadas no gênero *Vernonia s.l.* e, atualmente, estão classificadas nos gêneros *Chrysoleaena*, *Cyrtocymura*, *Echinocoryne*, *Lepidaploa*, *Lessingianthus*, *Rolandra*, *Stenocephalum*, *Stilpnopappus* e *Vernonanthura*. Para algumas espécies, foram analisadas diferentes populações, havendo um total de 154 amostras (Tabela 2). As amostras foram obtidas a partir de material herborizado (Herbário UEC, Instituto de Biologia, UNICAMP), sendo fornecidas, coletadas e identificadas pelos colaboradores deste estudo, Prof. Dr. João Semir e o doutorando Marcelo Monge, do Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, os quais também colaboraram na discussão taxonômica dos resultados obtidos. No Apêndice 1 são fornecidas as sinônimas para as espécies analisadas.

Tabela 2: Lista das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS para a obtenção das impressões digitais metabólicas.

Código	Classificação Robinson & posterior	Subtribo atual	Local de Coleta	Estado	Data da coleta	Coletor	Número de Registro
CC001	<i>Chrysolaena cognata</i> (Less.) M. Dematt.	Lepidaploinae	General M Belgrano	Misiones	12/2011	Veja	27
CC002	<i>Chrysolaena cognata</i> (Less.) M. Dematt.	Lepidaploinae	Sorocaba	SP	04/2012	Monge	1006
CC003	<i>Chrysolaena cristobaliana</i> Dematt.	Lepidaploinae	Cristais	MG	06/1998	Goldemberg	561
CD004	<i>Chrysolaena desertorum</i> (Mart. ex DC.) M. Dematt.	Lepidaploinae	Mineiros	GO	06/1999	Batalha	3315
CO005	<i>Chrysolaena obovata</i> (Less.) M. Dematt.	Lepidaploinae	Monte Verde	MG	27/12/2008	Monge	694
CO006	<i>Chrysolaena obovata</i> (Less.) M. Dematt.	Lepidaploinae	Camanducaia/ Monte Verde	MG	1/9/2001	Meireles	558
CP007	<i>Chrysolaena platensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Lepidaploinae	Ponta Grossa	PR	19/12/2013	Monge	2412
CP008	<i>Chrysolaena platensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Lepidaploinae	Presidente Venceslau	SP	6/1/2013	Monge	1357
CP009	<i>Chrysolaena platensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Lepidaploinae	Campina Grande do Sul	PR	1/4/2014	Monge	2764
CP010	<i>Chrysolaena propinqua</i> (Hieron.) H. Rob.	Lepidaploinae	Torres	RS	21/04/2014	Monge	2941
CS011	<i>Chrysolaena propinqua</i> (Hieron.) H. Rob.	Lepidaploinae	Manoel Viana	RS	28/04/2014	Monge	3139
CV012	<i>Chrysolaena verbascifolia</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	General M Belgrano	Misiones	12/2011	Veja	28
CC013	<i>Cyrtocymura cincta</i> (Griseb.) H. Rob.	Vernoniinae	La Paz	Bolivia	14/08/2010	Dematteis	4047
CH014	<i>Cyrtocymura harleyi</i> (H. Rob.) H. Rob.	Vernoniinae	Itatim	BA	04/2000	Correia	11
CM015	<i>Cyrtocymura mattos-silvae</i> (H. Rob.) H. Rob.	Vernoniinae	Jaguaquara	BA	06/2006	Urdampilleta	304

CS016	<i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Cipó	MG	17/02/2013	Monge	379
CS017	<i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Cipó	MG	01/10/2008	Monge	521
CS018	<i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Cipó	MG	22/07/2008	Monge	376
EH019	<i>Echinocoryne holosericea</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Lavras	MG	06/1987	Leitão-Filho	19305
EH020	<i>Echinocoryne holosericea</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Brasilia	DF	03/2000	Guarino	293
ES021	<i>Echinocoryne schwenkiaefolia</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Canastra	MG	05/2011	Kinoshita	11/375
ES022	<i>Echinocoryne schwenkiaefolia</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	06/2001	Semir	01/156
LA023	<i>Lepidaploa lilacina</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	18/02/2013	Monge	1388
LA024	<i>Lepidaploa lilacina</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Estrada Conselheiro da Mata	MG	04/06/1985	Leitão Filho	17285
LA025	<i>Lepidaploa araripensis</i> (Gardn.) H. Rob	Lepidaploinae	Linhares	ES	13/01/1995	Folli	2484
LA026	<i>Lepidaploa aurea</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Assis	SP	27/06/2003	Rossato	153
LA027	<i>Lepidaploa aurea</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Distrito Federal	DF	08/05/2005	Costa, I.R.	571
LB028	<i>Lepidaploa barbata</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Cipó	MG	23/07/2008	Monge	443
LC029	<i>Lepidaploa canescens</i> (Kunth) H. Rob.	Lepidaploinae	Assis	SP	12/04/2003	Oliveira	44
LC030	<i>Lepidaploa canescens</i> (Kunth) H. Rob.	Lepidaploinae	Assis	SP	12/04/2003	Oliveira	45
LC031	<i>Lepidaploa chamissonis</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Bom Sucesso do Itararé	SP	05/04/2012	Monge	1032
LC032	<i>Lepidaploa chamissonis</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Agudos	SP	02/05/2002	Fabricante	60

LC033	<i>Lepidaploa chamissonis</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Bauru	SP	17/02/2003	Coral	12
LC034	<i>Lepidaploa cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) H. Rob.	Lepidaploinae	Lençois	BA	20/07/1985	Kral	s.n.
LE035	<i>Lepidaploa eriolepis</i> (Gardn.) H. Rob.	Lepidaploinae	Itapeva	SP	26/06/2008	Almeida	4
LE036	<i>Lepidaploa eriolepis</i> (Gardn.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Japi	SP	05/07/2011	Vasconcelos	Sn
LE037	<i>Lepidaploa eriolepis</i> (Gardn.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Japi	SP	10/09/2009	Monge	818
LE038	<i>Lepidaploa eriolepis</i> (Gardn.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Japi	SP	10/09/2009	Monge	800
LG039	<i>Lepidaploa grisea</i> (Baker) H. Rob.	Lepidaploinae	Butirama	CE	22/04/1980	A.fernandes	s.n.
LG040	<i>Lepidaploa grisea</i> (Baker) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra Branca	BA	09/11/2006	Siqueira-Filho	1662
LO041	<i>Lepidaploa opposita</i> A.Teles, Sobral & J.N.Nakaj	Lepidaploinae	Santa Teresa	ES	09/2013	Monge	1316
LR042	<i>Lepidaploa remotiflora</i> (L.C. Rich.) H. Rob.	Lepidaploinae	Porto Murtinho	MS	26/06/2013	Monge	1777
LR043	<i>Lepidaploa remotiflora</i> (L.C. Rich.) H. Rob.	Lepidaploinae	Cáceres	MT	08/06/2011	Morais	464
LR044	<i>Lepidaploa remotiflora</i> (L.C. Rich.) H. Rob.	Lepidaploinae	Ladário	MS	30/06/2013	Monge	1931
LR045	<i>Lepidaploa rufogrisea</i> (A. St.-Hil.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Cipó	MG	01/10/2008	Monge	519
LR046	<i>Lepidaploa rufogrisea</i> (St. Hil.) H. Rob.	Lepidaploinae	Distrito Federal	DF	08/05/2005	Costa, I.R.	570
LA047	<i>Lessingianthus ammophilus</i> (Gardner) H. Rob.	Lepidaploinae	Cristalina	GO	03/2002	Perreira-Silva	6143
LA048	<i>Lessingianthus argyrophyllus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Sengés	PR	11/2013	Monge	2342
LA049	<i>Lessingianthus argyrophyllus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Lagoa Dourada	MG	08/03/1995	Souza	7993

LA050	<i>Lessingianthus asteriflorus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Itapeva	SP	02/03/1969	Mazaro	12
LB051	<i>Lessingianthus buddleiifolius</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	19/02/2013	Monge	1475
LC052	<i>Lessingianthus coriaceus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Pedregulho	SP	20/03/2004	Sasaki	964
LC053	<i>Lessingianthus coriaceus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	19/02/2013	Monge	1469
LC054	<i>Lessingianthus coriaceus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	18/02/2013	Monge	1394
LD055	<i>Lessingianthus durus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Cipó	MG	22/07/2008	Monge	352
LD056	<i>Lessingianthus durus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Chapada dos Guimarães	MT	03/07/2013	Monge	1984
LD057	<i>Lessingianthus durus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Pedregulho	SP	24/05/2003	Sasaki	491
LD058	<i>Lessingianthus durus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Santana do Riacho	MG	03/10/2008	Monge	554
LF059	<i>Lessingianthus floccosus</i> (Gardner) H. Rob.	Lepidaploinae	Brasilia	DF	06/06/1999	Calago	199
LG060	<i>Lessingianthus glabratus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Campinas	SP	02/04/2012	Monge	1003
LG061	<i>Lessingianthus glabratus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Jaguariaíva	PR	13/11/2013	Monge	2347
LG062	<i>Lessingianthus glabratus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Terra Rica	PR	08/01/1991	Barros	2134
LG063	<i>Lessingianthus grandiflorus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Pirassununga	SP	27/11/1982	Kirizawa	625
LL064	<i>Lessingianthus lacunosus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Brasilia	DF	06/2004	Bringel	142
LL065	<i>Lessingianthus ligulifolius</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Pedregulho	SP	20/04/1997	Amaral	97/98
LL066	<i>Lessingianthus linearis</i> (Spreng.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Cipó	MG	01/08/1985	Kral	

LO067	<i>Lessingianthus obscurus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Brasilia	DF	06/2004	Bringel	138
LO068	<i>Lessingianthus obtusatus</i> (Less.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	19/02/2013	Monge	1454
LO069	<i>Lessingianthus onopordioides</i> (Baker) H. Rob.	Lepidaploinae	Atinópolis	SP	17/03/1994	Marcondes-Ferreira	749
LP070	<i>Lessingianthus polyphyllus</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	Lepidaploinae	Ponta Grossa	PR	19/11/2013	Monge	1374
LP071	<i>Lessingianthus polyphyllus</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	Lepidaploinae	Itapeva	SP	07/03/1984	Rocha	16760
LP072	<i>Lessingianthus pycnostachyus</i> (DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Campos do Jordão	SP	13/02/2004	Arzolla	462
LP073	<i>Lessingianthus pycnostachyus</i> (DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Planalto de Diamantina	MG	10/05/2012	Scatigna	65
LP074	<i>Lessingianthus pycnostachyus</i> (DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Campos do Jordão	MG	01/06/2014	Monge	3215
LR075	<i>Lessingianthus roseus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Cipó	MG	01/10/2008	Monge	536
LR076	<i>Lessingianthus roseus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Serra do Cipó	MG	23/07/2008	Monge	416
LS077	<i>Lessingianthus secundus</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	Lepidaploinae	Brasilia	DF	12/2004	Passo	12
LV078	<i>Lessingianthus vepretorum</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Diamantina	MG	01/02/2013	Monge	1537
LZ079	<i>Lessingianthus zuccarinianus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	Lepidaploinae	Pedregulho	SP	24/05/2003	Sasaki	510
RF080	<i>Rolandra fruticosa</i> (L.) Kuntze	Rolandrinae	Recife	PE	09/1997	Conceição	2
RF081	<i>Rolandra fruticosa</i> (L.) Kuntze	Rolandrinae	Piracuruca	PI	06/2001	Alencar	1381
SA082	<i>Stenocephalum apiculatum</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Brasilia	DF	25/03/2002	Perreira-Silva	6219

SA083	<i>Stenocephalum apiculatum</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Campos do Jordão	SP	17/03/1964	Gomes Jr.	1631
SB084	<i>Stenocephalum brevifolium</i> (DC.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Carrancas	MG	10/1997	Martins	35687
SH085	<i>Stenocephalum hexanthum</i> Sch. Bip.	Lepidaploinae	Sengés	PR	19/11/2013	Monge	2344
SJ086	<i>Stenocephalum jucundum</i> (Gleason) H. Rob.	Lepidaploinae	Oxaca	México	21/11/1984	Teles	8186
SM087	<i>Stenocephalum megapotamicum</i> (Spreng.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Niquelândia	GO	31/05/1996	Fonseca, M.L.	999
SM088	<i>Stenocephalum megapotamicum</i> (Spreng.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Cabeceira Grande	MG	06/2004	Santos	1819
SM089	<i>Stenocephalum megapotamicum</i> (Spreng.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Extrema	MG	05/2004	Kinoshita	Apr-69
ST090	<i>Stenocephalum tragiaefolium</i> (DC.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Carrancas	MG	10/1998	Simões	485
ST091	<i>Stenocephalum tragiaefolium</i> (DC.) Sch. Bip.	Lepidaploinae	Canastra	MG	12/1996	Nakajima	2479
SP092	<i>Stilpnopappus pantanalensis</i> H. Rob.	Lepidaploinae	Corumbá	MS	06/1998	Kinup	1122
SF093	<i>Stilpnopappus ferrugineus</i> Baker	Lepidaploinae	Niquelândia	Go	-	Silva	3810
SS094	<i>Stilpnopappus speciosus</i> (Less.) Baker	Lepidaploinae	Diamantino	GO	05/1997	Souza	16050
SS095	<i>Stilpnopappus speciosus</i> (Less.) Baker	Lepidaploinae	Canastra	MG	11/2011	Costa	58
ST096	<i>Stilpnopappus tomentosus</i> Gardn.	Lepidaploinae	Barra da estiva	Ba	05/1999	Souza	22664
VA097	<i>Vernonanthura almedae</i> (H. Rob.) H. Rob.	Vernoniinae	Brasília	DF	05/02/1992	Perreira	2037
VB098	<i>Vernonanthura brasiliiana</i> (L.) H. Rob.	Vernoniinae	Presidente Venceslau	SP	01/07/2013	Monge	2010
VB099	<i>Vernonanthura brasiliiana</i> (L.) H. Rob.	Vernoniinae	São Carlos	SP	15/08/2013	Monge	2055

VB100	<i>Vernonanthura brasiliiana</i> (L.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Cipó	MG	11/08/2005	Sato	47
VB101	<i>Vernonanthura brasiliiana</i> (L.) H. Rob.	Vernoniinae	Chapada dos Guimarães	MT	03/07/2013	Monge	2000
VB102	<i>Vernonanthura beyrichii</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Ubatuba	SP	26/04/1995	Moraes	22
VB103	<i>Vernonanthura beyrichii</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Cananéia	SP	07/04/1982	Fortes	12
VD104	<i>Vernonanthura densiflora</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Urubici	SC	11/05/2013	Monge	1613
VD105	<i>Vernonanthura densiflora</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Urubici	SC	09/05/2013	Monge	1593
VD106	<i>Vernonanthura densiflora</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Aratinga	RS	18/04/2014	Monge	2795
VD107	<i>Vernonanthura densiflora</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Aratinga	RS	18/04/2014	Monge	2794
VD108	<i>Vernonanthura diffusa</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Japi	SP	10/09/2009	Monge	798
VD109	<i>Vernonanthura diffusa</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Camanducaia	MG	-	Monge	846
VD110	<i>Vernonanthura diffusa</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Japi	SP	10/09/2013	Monge	2087
VD111	<i>Vernonanthura diffusa</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Campos do Jordão	SP	01/06/2014	Monge	3207
VD112	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Urubici	SC	16/05/2013	Monge	1689
VD113	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Campos do Jordão	SP	01/03/1998	Robim	549
VD114	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Guaratinguetá	SP	01/06/2014	Monge	3171
VD115	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Linhares	ES	25/10/1984	Folli	525

VF116	<i>Vernonanthura ferruginea</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Dourados	MS	25/06/2013	Monge	1765
VH117	<i>Vernonanthura hilairiana</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Campos do Jordão	SP	01/06/2014	Monge	3149
VH118	<i>Vernonanthura hilairiana</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Passa Quatro	MG	28/07/2006	Monge	47
VH119	<i>Vernonanthura hilairiana</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Caparaó	ES	16/03/2014	Monge	2534
VH120	<i>Vernonanthura hilairiana</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernoniinae	Jundiaí	SP	10/09/2009	Monge	821
VL121	<i>Vernonanthura lucida</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Ponta Grossa	PR	15/02/2014	Monge	2447
VM122	<i>Vernonanthura mariana</i> (Mart. ex Baker) H. Rob.	Vernoniinae	Diamantina	MG	18/02/2013	Monge	1386
VM123	<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Cambará do Sul	RS	21/04/2014	Monge	2920
VM124	<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Extrema	MG	06/10/2009	Monge	859
VM125	<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Caparaó	MG	13/08/2011	Monge	987
VM126	<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Campos do Jordão	SP	15/10/2008	Monge	583
VM127	<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Caparaó	MG	21/09/2012	Monge	1277
VM128	<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	Vernoniinae	Urubici	SC	11/05/2013	Monge	1697
VM129	<i>Vernonanthura mucronulata</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Itararé	Sp	01/12/1994	Souza	4346
VO130	<i>Vernonanthura oligactoides</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Jaguriaiva	PR	05/04/2012	Monge	1038

VO131	<i>Vernonanthura oligolepis</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	Vernoniinae	Sarapuí	SP	04/04/2012	Monge	1010
VP132	<i>Vernonanthura petiolaris</i> (DC.) H. Rob.	Vernoniinae	Jundiaí	SP	29/07/2012	Monge	1103
VP133	<i>Vernonanthura petiolaris</i> (DC.) H. Rob.	Vernoniinae	Camanducaia/ Monte Verde	MG	-	Monge	788
VP134	<i>Vernonanthura petiolaris</i> (DC.) H. Rob.	Vernoniinae	Nova Friburgo	RJ	01/09/2012	Monge	1144
VP135	<i>Vernonanthura phaeoneura</i> (Toledo) H. Rob.	Vernoniinae	Camanducaia	MG	27/04/2012	Monge	1053
VP136	<i>Vernonanthura phaeoneura</i> (Toledo) H. Rob.	Vernoniinae	Campos do Jordão	SP	07/09/2004	Arzolla	606
VP137	<i>Vernonanthura phaeoneura</i> (Toledo) H. Rob.	Vernoniinae	Cambará do Sul	SC	21/04/2014	Monge	2924
VP138	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	Vernoniinae	Campinas	SP	13/08/2013	Monge	2036
VP139	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	Vernoniinae	Caparaó	MG	09/2012	Monge	1192
VP140	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	Vernoniinae	Parque Estadual do Jaraguá	SP	07/08/2007	Esteves	185
VP141	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Japi	SP	2010	Vasconcellos	Sn
VP142	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	Vernoniinae	Nova Friburgo	RJ	09/2012	Monge	1166
VP143	<i>Vernonanthura puberula</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Campos do Jordão	SP	06/2012	Monge	3150
VP144	<i>Vernonanthura puberula</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Extrema	MG	02/10/2009	Semir	17/2009
VR145	<i>Vernonanthura rubriramea</i> (Mart. ex DC.) Loeulle & P.N. Soares	Vernoniinae	Bauru	SP	08/05/1997	Pinheiro	285

VR146	<i>Vernonanthura rubriramea</i> (Mart. ex DC.) Loeuille & P.N. Soares	Vernoniinae	Porto Ferreira	SP	29/04/2010	Oliveira	22
VR147	<i>Vernonanthura rubriramea</i> (Mart. ex DC.) Loeuille & P.N. Soares	Vernoniinae	Mogi Guçu	SP	24/05/1965	Mattos	12244
VT148	<i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	Vernoniinae	Bauru	SP	24/02/1998	Pinheiro, M.H.O.	720
VT149	<i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	Vernoniinae	Campinas Grande do Sul	PR	01/04/2014	Monge	2758
VT150	<i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	Vernoniinae	Itararé	SP	05/04/2012	Monge	1024
VV151	<i>Vernonanthura viscidula</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	São Roque de Minas	MG	28/06/1994	Romero	1060
VW152	<i>Vernonanthura westiniana</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Café	SP	01/04/2014	Monge	2755
VW153	<i>Vernonanthura westiniana</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Tijucas do Sul	PR	08/05/2013	Monge	1568
VW154	<i>Vernonanthura westiniana</i> (Less.) H. Rob.	Vernoniinae	Serra do Japi	SP	11/03/2011	Monge	904

3.2.2 Metodologia analítica em UHPLC-UV-MS e preparo dos extratos

A obtenção das impressões digitais metabólicas foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) em um equipamento *Accele* 1250, acoplada a detector de arranjo de diodos (UV/DAD – *Accele*) e espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador tipo Orbitrap™, *Exactive Plus* (Thermo Scientific), nos modos de ionização positivo e negativo. Os cromatogramas e espectros foram adquiridos, visualizados e analisados utilizando o software Xcalibur™.

Folhas completamente desenvolvidas e de aparência saudável de cada exsicata amostrada foram pulverizadas com auxílio de nitrogênio líquido. Em cada amostra pulverizada, foi adicionada solução extratora de metanol:água (7:3) (v:v) com hidrocortisona, procedendo-se a extração em ultrassom por 10 minutos. Os extratos foram, posteriormente, centrifugados e filtrados.

A metodologia analítica foi adaptada a partir do método em uso no nosso grupo de pesquisa (Método A). Foram selecionadas cinco espécies vegetais (*Chrysolaena platensis*, *Lessingianthus onopordioides*, *Stenocephalum megapotamicum*, *Lepidaploa rufogrisea* e *Vernonathura phosphorica*), as quais foram analisadas em quatro métodos diferentes (Tabela 3). Na etapa de preparo dos extratos, foram avaliadas a quantidade de material vegetal e a concentração do padrão interno (hidrocortisona); para isto, utilizou-se 10 e 20 mg das folhas previamente processadas e 1 mL de solução extratora com hidrocortisona em concentrações de 5 e 10 µg/mL. Para a análise em UHPLC-UV-MS foi utilizada coluna Kinetex™ Core-Shell (Phenomenex) XB-C18 1,7 µm (100 Å; 150 x 2,1 mm), protegida por pré-coluna de mesmo material, e fase móvel constituída por água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas com ácido fórmico 0,1% (v/v), com vazão de 400 µL/min. O detector de UV (DAD) foi programado para registrar os comprimentos de onda entre 200 a 600 nm. O eluente da coluna foi analisado por ESI-MS e ESI-AIF (*All ion fragmentation*), simultaneamente em ambos os modos de ionização. A Tabela 4 fornece os parâmetros mantidos constantes durante a adaptação da metodologia.

Após a escolha da metodologia analítica mais adequada aos propósitos das análises metabólômicas, as amostras foram injetadas (2µL) em sequência utilizando injetor automático. No início e durante as análises (a cada 50 amostras) foram injetadas solução “branco” de metanol:água (7:3) e amostra “pool”, constituída por

todas as amostras vegetais, com o intuito de verificar a reprodutibilidade do método. Para o preparo da amostra “pool” foram utilizados 10 µL de cada extrato anteriormente preparado (Apêndices 2 e 3).

Tabela 3: Métodos e concentrações dos extratos utilizados para a adaptação da metodologia

Método	Gradiente	Concentração do extrato *
Método A	0-2 minutos: 5% B 2-30 minutos: 5-100% B 30-34 minutos: 100% B 34-37 minutos: 100-5% B 37-40 minutos: 5% B	10 mg/mL
Método B	0-30 minutos: 2-100% B 30-33 minutos: 100% B 33-35 minutos: 100-2% B 35-40 minutos: 2% B	20 mg/mL
Método C	0-15 minutos: 1-40% B 15-30 minutos: 40-100% B 30-34 minutos: 100% B 34-37 minutos: 100-1% B 37-40 minutos: 1% B	10 mg/mL
Método D	0-2 minutos: 3% B 2-15 minutos: 3-40% B 15-20 minutos: 40-50% 20-30 minutos: 50-100% 30-33 minutos: 100% B 33-35 minutos: 100-3% B 35-40 minutos: 3% B	10 mg/mL

Legenda: B, acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1% v:v); mg/mL, miligramas por mililitro.

* Concentração referente a quantidade de material vegetal utilizado no preparo dos extratos.

Os parâmetros mantidos constantes durante as análises encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros utilizados durante a adaptação da metodologia.

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência	Espectro de massas de íon total (TIC)	Espectrômetro de massas	Fonte de ionização
Vazão da fase móvel: 400 μ L/min	Faixa de varredura Full MS (modo positivo e negativo): 100 a 1000 m/z	Resolução: 70000 no modo MS e 35000 no modo AIF	Gás de secagem, nebulização e fragmentação: N_2
Volume de injeção: 2 μ L			Fluxo do gás de bainha: 30 Ua
Temperatura do forno: 45 °C	Faixa de varredura Full MS-MS (modo positivo e negativo): 80 a 1000 m/z	1,0 μ scans/s	Fluxo do gás auxiliar: 10 Ua
			Temperatura do capilar: 300 °C
Temperatura da estante: 10 °C		Tempo máximo de injeção: 200 ms	Voltagem do spray: 3,6 kV (modo positivo) e 3,2 kV (modo negativo)
			Corrente no spray: 21 μ A

Legenda: N_2 , nitrogênio; mL/min, mililitros por minuto; μ L, microlitro; m/z , razão massa carga; ms, milissegundo; μ scans/s, microscans por segundo; MS, espectrômetro de massas; AIF, *All Ion Fragmentation*; Ua, unidade arbitrária; kV, quilovolt; μ A, microampère.

3.2.3 Análises metabolômicas comparativas

Os extratos obtidos e analisados por meio da metodologia analítica adaptada, produziram as impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*) nos modos de ionização positivo e negativo do MS, as quais foram utilizadas na comparação entre as diferentes espécies vegetais por métodos estatísticos.

Os arquivos obtidos em .raw foram separados em modo positivo e negativo e, posteriormente, convertidos em formato .mzXML pelo software ProteoWizard-MSconvert (Proteowizard Software Foundation, EUA). Dessa maneira, os arquivos em formato .mzXML de cada modo de ionização foram submetidos, separadamente, ao pré-processamento dos dados utilizando diferentes softwares para avaliar e comparar os dados gerados por cada um. Para isto, utilizou-se, paralelamente e individualmente, os softwares *MzMine*TM (BMC Bioinformatics, Reino Unido) ou *MetAlign*TM (RIKILT, Holanda) seguido de *MSClust*TM (Plant Research International, Holanda).

As matrizes dos modos de ionização positivo e negativo dos dados pré-processados foram, separadamente, exportados em planilhas do Excel. Após a identificação dos picos, os dados obtidos em ambos os modos de ionização foram unidos em uma única planilha. Para cada pré-processamento (*MzMine* ou *MetAlign/MSClust*), foram realizados diferentes tratamentos nas matrizes de dados com o intuito de avaliar e determinar o tratamento mais adequado aos propósitos da quimiotaxonomia, de acordo com a análise por HCA e os valores dos coeficientes de correlação (R^2X) e de determinação (Q^2). Para isto, foram utilizadas, separadamente, as matrizes dos dados brutos e as matrizes após os tratamentos, sendo eles: transformação por logaritmo na base 10 (Log_{10}); escalonamento por Pareto; transformação por Log_{10} seguida de escalonamento por Pareto ou utilização de matriz binária.

3.2.4 Análise de correlação *in silico*

Os dados tratados foram utilizados, então, em análises de correlação por métodos estatísticos multivariados, visando mineração de dados (*data mining*). Inicialmente, foi realizada a análise por HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) em cada matriz de dados (dados brutos e com as diversas transformações) utilizando o software R (*R Project for Statistical Computing*); como algoritmo de agrupamento, foi utilizada a distância euclidiana ordinária com método de ligação do tipo Ward.

Após a determinação do pré-processamento e tratamento mais adequado dos dados, foram realizadas a análise por PCA (*Principal Component Analysis*), bem como as análises estatísticas multivariadas supervisionadas, PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) e OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*), utilizando o software SIMCA 13.0.3.0© (Umetrics). As classes para as análises por PLS-DA e OPLS-DA foram determinadas a partir dos agrupamentos obtidos pela análise por HCA.

3.3 Análise Qualitativa

3.3.1 Identificação de metabólitos previamente relatados

As impressões digitais metabólicas de cada espécie foram analisadas e os principais picos cromatográficos foram identificados com o auxílio da biblioteca de dados previamente construída. Inicialmente foi realizada pesquisa na biblioteca de dados utilizando a massa acurada do sinal de interesse, com margem de erro inferior a 5ppm; as fórmulas moleculares foram calculadas utilizando o software Molecular Weight Calculator (versão 6.50), desenvolvido por Matthew Monroe (<http://www.alchemistmatt.com>). Além disso, os espectros de UV foram utilizados para inferir a classe do metabólito e os padrões de fragmentação obtidos pelas análises por AIF foram utilizados para confirmar a identidade de cada metabólito.

3.3.2 Identificação dos metabólitos discriminantes

A determinação dos metabólitos discriminantes de cada grupo obtido na análise por HCA foi realizada utilizando o VIP (*Variable Influence on Projection*) fornecido pela análise por OPLS-DA. A massa acurada e o tempo de retenção das variáveis indicadas como discriminantes foram utilizados para a identificação dos quimiomarcadores, a partir de consulta à biblioteca de dados construída e aos metabólitos anteriormente identificados. Adicionalmente, os espectros de UV e os dados de fragmentação foram utilizados para a confirmação das substâncias identificadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biblioteca de Dados

Através da construção da biblioteca de dados, foi possível verificar na literatura mais de 500 metabólitos relatados para as espécies do gênero *Vernonia s.l.*. Dentre os metabólitos relatados, encontram-se principalmente os pertencentes às classes das lactonas sesquiterpênicas e dos flavonoides, além de alguns triterpenos. No Apêndice 4 está representada parte da planilha do Excel utilizada na construção da biblioteca de dados.

Os glaucolidos e hirsutinolidos foram os tipos de lactonas sesquiterpênicas relatados com maior frequência; além desses, também foram descritos cadinanolidos, mikanolidos, furanoheliangolidos, eremantolidos, eudesmanolidos, guaianolidos e rolandrolidos. Em relação aos tipos de flavonoides mais comumente relatados, destacam-se os flavonóis e as flavonas.

4.2 Análises Metabolômicas

4.2.1 Metodologia analítica em UHPLC-UV-MS e preparo dos extratos

Analisando os métodos testados, observou-se que a extração utilizando 10 mg de material vegetal e concentração do padrão interno (hidrocortisona) de 10 µg/mL foi a mais adequada aos objetivos das análises. Na Figura 2 está esquematizado o método completo utilizado para o preparo dos extratos de cada amostra.

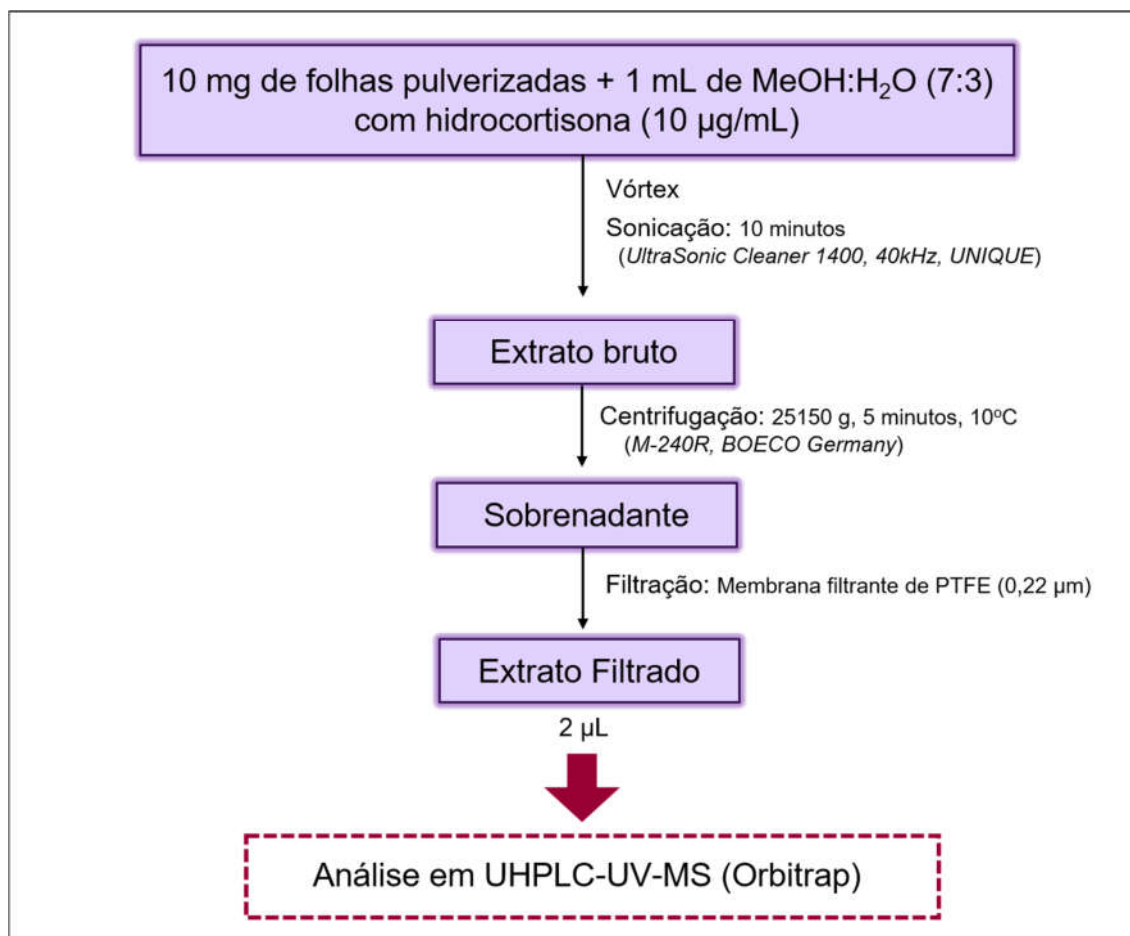


Figura 2: Fluxograma do método utilizado para o preparo dos extratos.

Comparando os gradientes utilizados em cada método, pode-se observar que nos métodos A e B houve sobreposições de picos no início dos cromatogramas. Para solucionar isto, foi utilizado um gradiente de eluição com rampa menos íngreme até o tempo de retenção de 15 minutos (método C e D). Tanto o método C quanto o método D apresentaram resoluções cromatográficas melhores, contudo por ter um número menor de transições no gradiente de eluição o método C se ajustou melhor aos propósitos das análises metabômicas (Figuras 3 e 4). Dessa maneira, considerando a variabilidade química entre as espécies estudadas, o método C foi o escolhido.

No Figura 5 são mostrados os cromatogramas nos modos de ionização positivo e negativo do MS para a espécie *Lessingianthus onopordioides* utilizando o método escolhido (método C). Podemos observar que há melhor separação cromatográfica e que os principais picos aparecem na região central do cromatograma.

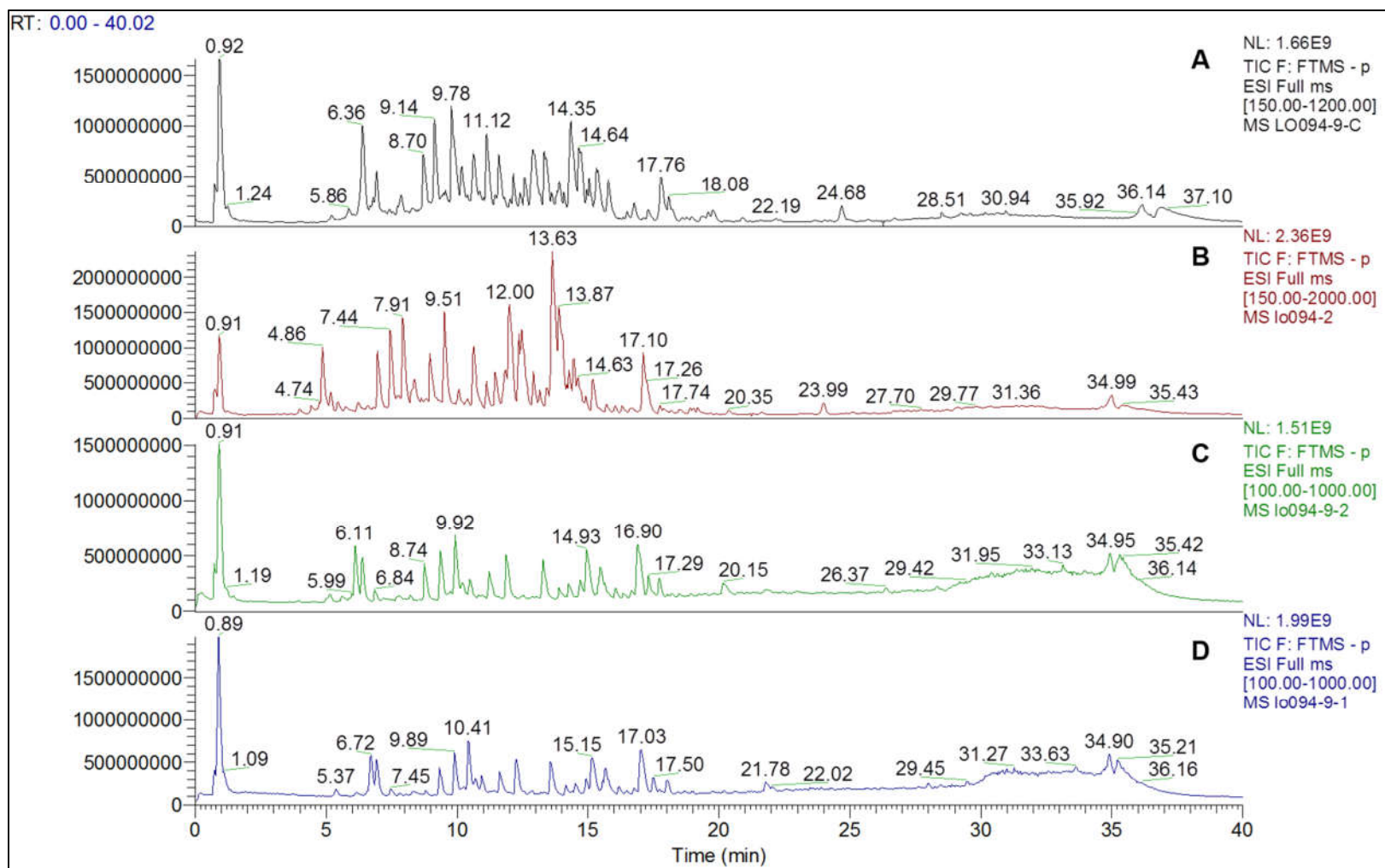


Figura 3: Cromatogramas obtidos para a espécie *Lessingianthus onopordioides* no modo de ionização negativo, utilizando os métodos propostos. A=Método A; B=Método B; C= Método C; D= Método D. Os métodos estão descritos na Tabela 3.

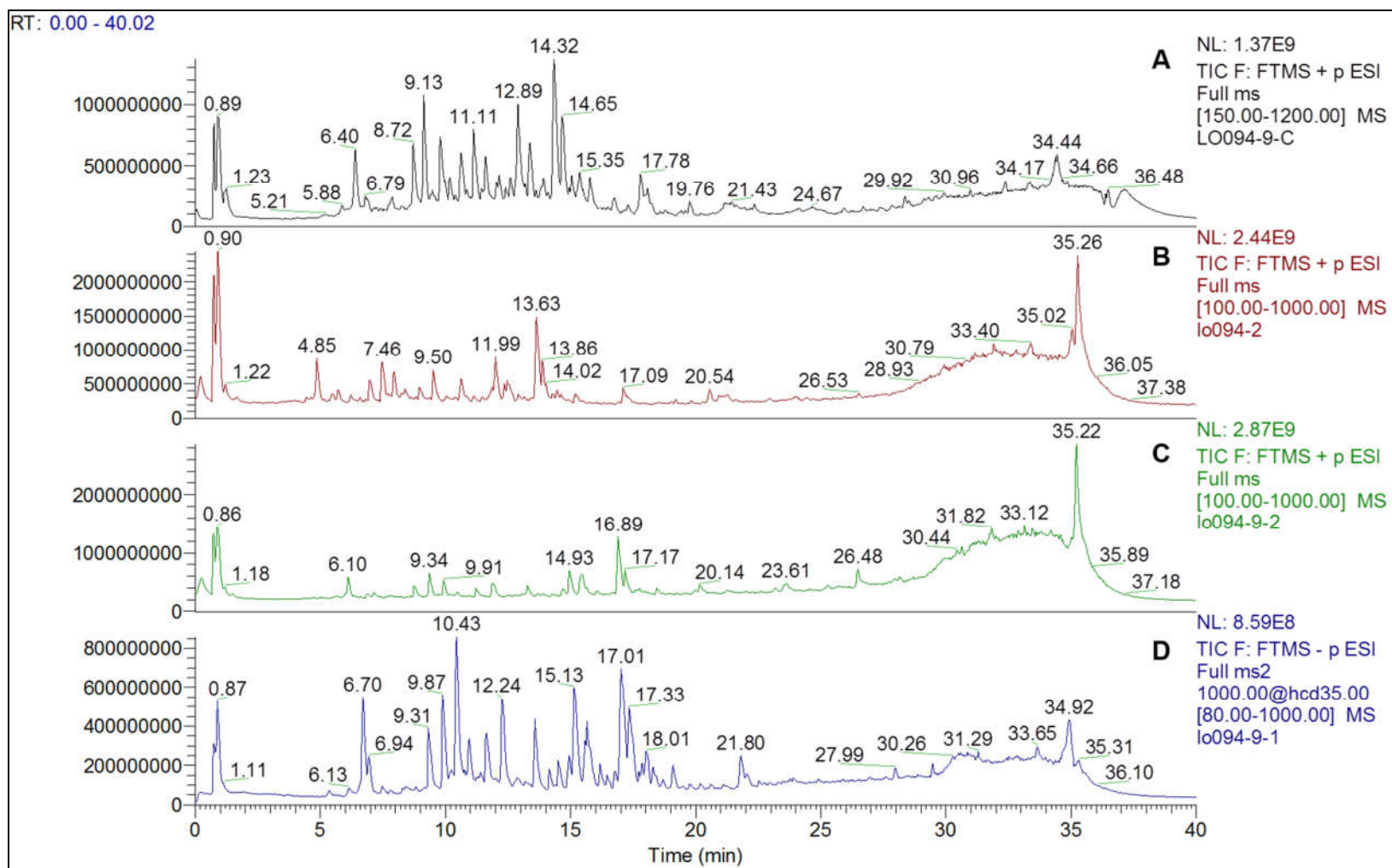


Figura 4: Cromatogramas obtidos para a espécie *Lessingianthus onopordioides* no modo de ionização positivo, utilizando os métodos propostos. A=Método A; B=Método B; C= Método C; D= Método D. Os métodos estão descritos na Tabela 3.

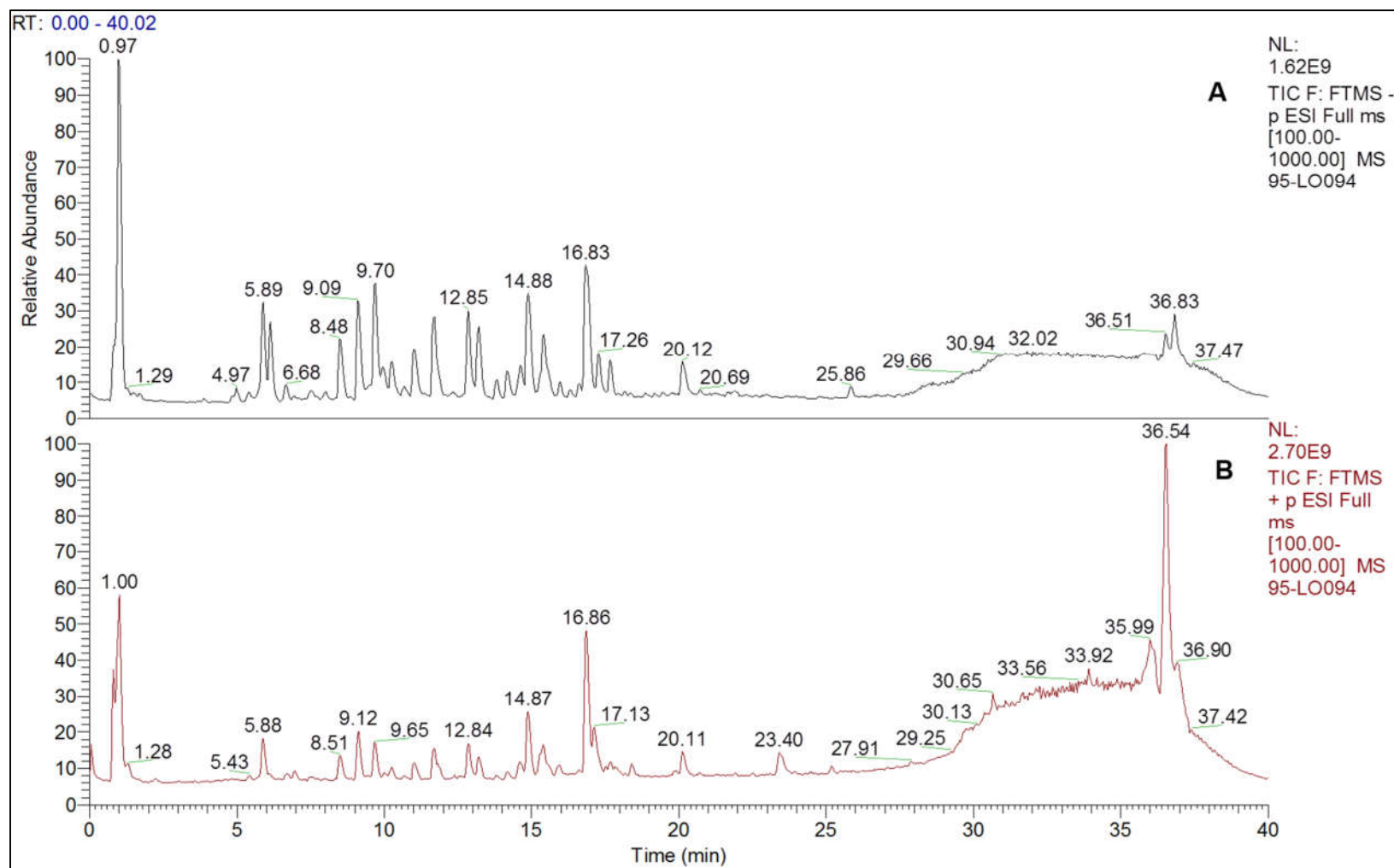


Figura 5: Cromatogramas da espécie *Lessingianthus onopordioides* no método escolhido (método C) para realização das análises metabolômicas. A= Modo de ionização negativo; B= Modo de ionização positivo.

4.2.2 Análises metabolômicas comparativas

4.2.2.1 MetAlign versus MzMine

Os softwares *MetAlign* e *MzMine* estão entre os softwares livres mais utilizados para o pré-processamento de dados nos estudos metabolômicos. As etapas realizadas por cada software, bem como os algoritmos aplicados em cada parâmetro, apresentam algumas diferenças (CASTILLO et al., 2011; COBLE; FRAGA, 2014). A Tabela 5 apresenta as funções realizadas por cada software.

Tabela 5: Funções realizadas pelos softwares *MzMine* e *MetAlign* no pré-processamento de dados.

Software	Filtering	Peak detection	Deisotoping	Alignment	Gap filling	Visualization	Identification	Normalization
<i>MetAlign</i>	X	X	-	X	-	-	-	-
<i>MzMine</i>	X	X	X	X	X	X	X	X

(Adaptado de CASTILLO et al., 2011)

Na etapa *filtering* os sinais dos compostos de interesse são separados dos sinais provenientes da matriz da amostra ou de interferências instrumentais; além disso, esta etapa realiza a remoção do ruído e das distorções da linha de base, facilitando a detecção dos picos e reduzindo a detecção de picos falso-positivos (CASTILLO et al., 2011; YI et al., 2016).

O objetivo da função *peak detection* é identificar e quantificar os sinais correspondentes às moléculas da amostra, promovendo a redução na complexidade dos dados e facilitando as análises posteriores (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; CASTILLO et al., 2011; YI et al., 2016).

A função *deisotoping* é utilizada para agrupar os picos dos isótopos pertencentes a um mesmo composto. Esta função simplifica a matriz final dos dados através da remoção de informações redundantes (CASTILLO et al., 2011).

A etapa *alignment* é necessária para comparar as características (metabólitos) entre as amostras, tendo como objetivo remover os deslocamentos entre os sinais pertencentes a um mesmo metabólito em diferentes amostras (CASTILLO et al., 2011; YI et al., 2016).

Gap filling é utilizado para recuperar picos não detectados (*missing peaks*) dos dados brutos. *Missing peak* é um pico que não foi detectado na etapa de detecção dos picos (*peak detection*) devido à baixa intensidade, à forma anormal do pico ou a algum erro na detecção do pico (CASTILLO et al., 2011). O objetivo da etapa *normalization* é remover as variações sistemáticas indesejadas (de origem experimental, por exemplo), mantendo as variações relevantes (originadas da amostra). Este parâmetro deve ser utilizado quando existem diferença na massa ou volume da amostra ou após etapas de purificação de amostras nas quais possa haver variação na recuperação do produto; sendo amplamente utilizado na análise de amostras biológicas complexas (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; CASTILLO et al., 2011; YI et al., 2016). Assim, os parâmetros *gap filling* e *normalization* não foram utilizados durante o pré-processamento dos dados, já que para avaliar se as diferenças nas concentrações dos metabólitos são importantes para a quimiotaonomia, as informações sobre a presença ou ausência de determinado metabólito e as intensidades originais dos picos devem ser mantidas. Além disso, a etapa *normalization* não foi realizada pois não houve variação no volume de amostra analisado.

O software *MzMine* apresenta funções adicionais àquelas realizada pelo *MetAlign*; dessa maneira, para fins de comparação entre os softwares, foi realizado inicialmente o pré-processamento dos dados utilizando somente as funções disponíveis em ambos os softwares (*filtering*, *peak detection* e *alignment*). Adicionalmente, foi realizado um novo pré-processamento dos dados com o software *MzMine* incluindo a função *deisotoping*, a qual não é realizada pelo software *MetAlign*. Os valores utilizados em cada uma das respectivas funções foram extensivamente estudados e ajustados de acordo com as características dos dados.

Os dados tratados com o software *MetAlign* foram, em seguida, processados utilizando o software *MSClust*. Esta etapa, porém, não foi realizada para os dados tratados com o software *MzMine*. O software *MSClust* promove o agrupamento de sinais de massa pertencentes a mesma molécula (como adutos, fragmentos e isótopos), diminuindo a redundância nas variáveis através da reconstrução dos metabólitos (TIKUNOV et al, 2012). Os valores dos parâmetros utilizados são apresentados nos Apêndices 5, 6 e 7.

Para avaliar a eficiência de cada pré-processamento e tratamento dos dados, os dendogramas e os coeficientes de correlação e determinação obtidos nas análises

por HCA e PCA foram analisados em conjunto (Tabela 6). Os dendogramas obtidos após cada pré-processamento e tratamento são apresentados nos Apêndices 8, 9 e 10.

Tabela 6: Valores dos coeficientes de correlação (R^2X) e determinação (Q^2) obtidos após os pré-processamentos e tratamentos dos dados.

Software	Transformação	A	R^2X (cum)	Q^2 (cum)
<i>MetAlign/MSClust</i>	Pareto	1	0.148	0.124
	Log10	4	0.602	0.569
	Log10 + Pareto	2	0.068	0.026
	Matriz Binária	4	0.573	0.537
<i>MzMine</i> (Height)	Pareto	3	0.219	0.099
	Log10	9	0.726	0.664
	Log10 + Pareto	3	0.144	0.063
	Matriz Binária	7	0.708	0.660
<i>MzMine</i> (Area)	Pareto	3	0.237	0.116
	Log10	7	0.717	0.671
	Log10 + Pareto	3	0.144	0.064
	Matriz Binária	7	0.708	0.660
<i>MzMine</i> : Deisotop (Area)	Pareto	3	0.233	0.117
	Log10	11	0.751	0.679
	Log10 + Pareto	2	0.112	0.065
	Matriz Binária	8	0.720	0.669

Legenda: A, número de componentes principais; R^2X , *goodness of fit*; Q^2 , *goodness of prediction*

Para o software *MetAlign*, o dado final é expresso em função da altura do pico, enquanto que com o software *MzMine*, é possível escolher se o dado final será dado em função da altura ou da área do pico. Observou-se que os agrupamentos obtidos nos dendogramas e os valores de R^2X e Q^2 foram similares tanto ao utilizar o resultado em função da altura do pico, quanto em função da área do pico.

Comparando os valores dos coeficientes de correlação e determinação após os pré-processamentos realizados com os softwares *MetAlign/MSClust* e com o software *MzMine*, observou-se que o software *MzMine* resultou em valores maiores de R^2X e Q^2 . Além disso, os agrupamentos obtidos na análise por HCA foram mais condizentes com a classificação taxonômica ao utilizar o software *MzMine*.

Ao incluir a função *deisotoping*, notou-se que as diferentes populações de uma mesma espécie apresentaram tendência maior em se agruparem, bem como valores

de R^2X e Q^2 maiores. Dessa maneira, esta nova etapa mostrou-se importante para a separação entre os diferentes gêneros, indicando que o processamento realizado com o software *MzMine* utilizando o parâmetro *deisotoping* foi o mais apropriado para o pré-processamento dos dados (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros utilizados no software *MzMine*TM para o pré-processamento dos dados obtidos nas análises em UHPLC-UV-MS (OrbitrapTM).

<i>Raw data methods/</i>	<u>Mass detection</u> : Noise level=1,0E6
<i>Peak detection</i>	<u>Chromatogram builder</u> : Minimum time span (min)= 0,2; Minimum height= 3,0E6; <i>m/z</i> tolerance= 0,001 <i>m/z</i> ou 5,0 ppm
<i>Peak list methods</i>	<u>Chromatogram deconvolution</u> - Baseline cut-off: Minimum peak height= 3,0E6; peak duration= 0,3 a 5,0; baseline level= 1,0E6 <u>Isotopic peaks grouper</u> : <i>m/z</i> tolerance= 0,002 <i>m/z</i> ou 5 ppm; Retention time tolerance= 0,2 min; Maximum charge= 2; Representative isotope= most intense. <u>Alignment</u> - Join aligner: <i>m/z</i> tolerance= 0,001 <i>m/z</i> ou 5 ppm; Weight for <i>m/z</i> = 20; Retention time tolerance= 5%; weight for RT= 20

Legenda: min, minutos; *m/z*, razão massa carga; ppm, partes por milhão.

4.2.2.2 Transformações e Escalonamentos

Observou-se que ao utilizar as matrizes com os dados brutos não foram obtidos agrupamentos condizentes com a classificação taxonômica, indicando a necessidade de realizar algum tipo de transformação dos dados. A escolha do tipo de tratamento é uma etapa importante nas análises metabolômicas pois cada tratamento enfatiza uma determinada característica dos dados, influenciando na seleção dos metabólitos mais importantes para a discriminação entre as amostras (VAN DEN BERG et al., 2006; WORLEY; POWERS, 2013).

Avaliando os tratamentos realizados, notamos que ao utilizar escalonamento por Pareto e transformação por Log10 seguida de escalonamento por Pareto foram obtidos valores de R^2X e Q^2 abaixo do aceitável para as análises metabolômicas

(Tabela 6), indicando que estes tratamentos não são apropriados para a quimiotaonomia.

Ao utilizar transformação por Log10 e a matriz binária dos dados (que considera somente a presença ou ausência de determinado pico), observou-se valores maiores de R^2X e Q^2 e agrupamentos na análise por HCA mais condizentes com a classificação taxonômica. A transformação por Log10 é eficiente em remover a heterocedasticidade (dispersão dos dados em torno de uma reta) e fazer com que os dados adquiram distribuição normal, além de reduzir as diferenças entre valores grandes e pequenos, promovendo um efeito de pseudo escalonamento (ERIKSSON et al., 2013; VAN DEN BERG et al., 2006). A matriz binária avalia somente a presença ou ausência de determinado pico, sem considerar a concentração dos respectivos metabólitos.

Embora os valores de R^2X e Q^2 para os dados transformados por Log10 tenham sido ligeiramente superiores aos obtidos ao utilizar matriz binária, o dendograma obtido ao utilizar matriz binária apresentou agrupamentos mais condizentes com a classificação taxonômica, especialmente em relação às espécies do gênero *Vernonanthura*, as quais ficaram distribuídas em um único grupo (Apêndices 8 e 9). Sendo assim, podemos concluir que embora as diferenças quantitativas entre as substâncias estejam sendo aplicadas nas determinações de quimiotipos entre indivíduos da mesma espécie (PERRY et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2005), para os propósitos da quimiotaonomia somente a informação sobre a presença ou ausência de determinado metabólito é suficiente para estabelecer uma separação adequada entre os grupos. Isto indica que existem metabólitos que determinam a semelhança dentro dos grupos, independentemente das condições em que as espécies se desenvolveram (região geográfica, clima, relevo) e das variações nas concentrações dos metabólitos.

4.2.3 Análises de correlação *in silico*

4.2.3.1 Análises Estatísticas Multivariadas não-supervisionadas

4.2.3.1.1 Hierarchical Cluster Analysis

A análise por HCA permitiu a identificação de quatro grupos principais quando é realizado corte na altura 35 do eixo y (Figura 6), sendo eles constituídos por:

- **Grupo 1:** espécies dos gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus* e as espécies *Rolandra fruticosa*, *Lessingianthus vepretorum*, *L. zuccarinianus*, *L. secundus* e *L. roseus*.
- **Grupo 2:** espécies do gênero *Vernonanthura*;
- **Grupo 3:** espécies dos gêneros *Cyrtocymura*, *Chrysolaena* e *Echinocoryne*.
- **Grupo 4:** espécies dos gêneros *Lessingianthus* e *Lepidaploa*.

No **Grupo 1** estão presentes espécies pertencentes a subtribo Lepidaploinae, bem como a espécie *Rolandra fruticosa*, pertencente à subtribo Rolandrinae. Assim como no estudo filogenético realizado por Loeuille, Keeley e Pirani (2015), os gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus* não se agruparam com os demais representantes da subtribo Lepidaploinae (*Chrysolaena*, *Echinocoryne*, *Lessingianthus* e *Lepidaploa*), com exceção de algumas espécies de *Lessingianthus* (*L. vepretorum*, *L. zuccarinianus*, *L. secundus* e *L. roseus*). Observamos que a espécie *Rolandra fruticosa* se agrupou com as demais espécies do gênero *Stenocephalum*; isto também foi reportado por Loeuille, Keeley e Pirani (2015), segundo os quais o gênero *Stenocephalum* é um grupo monofilético e irmão de *Rolandra* (Rolandrinae), estando, provavelmente, relacionado à *Soaresia* (Chrestinae), *Elephantopappus* e *Ortopappus* (Elephantopodinae). De acordo com a análise por HCA, os gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus* estão relacionados com o gênero *Vernonanthura*; este fato, porém, não foi observado no estudo de Loeuille, Keeley e Pirani (2015), no qual tais gêneros estariam relacionados aos demais gêneros da subtribo *Lepidaploinae* (*Chrysolaena*, *Echinocoryne*, *Lepidaploa* e *Lessingianthus*) (Figura 7).

As espécies do gênero *Lessingianthus* (*L. vepretorum*, *L. zuccarinianus*, *L. secundus* e *L. roseus*) que não se agruparam com as demais espécies deste gênero não apresentam nenhuma diferença morfológica em relação a estas. Além disso, não se observou-se nenhuma semelhança biogeográfica que justificasse o agrupamento entre estas espécies.

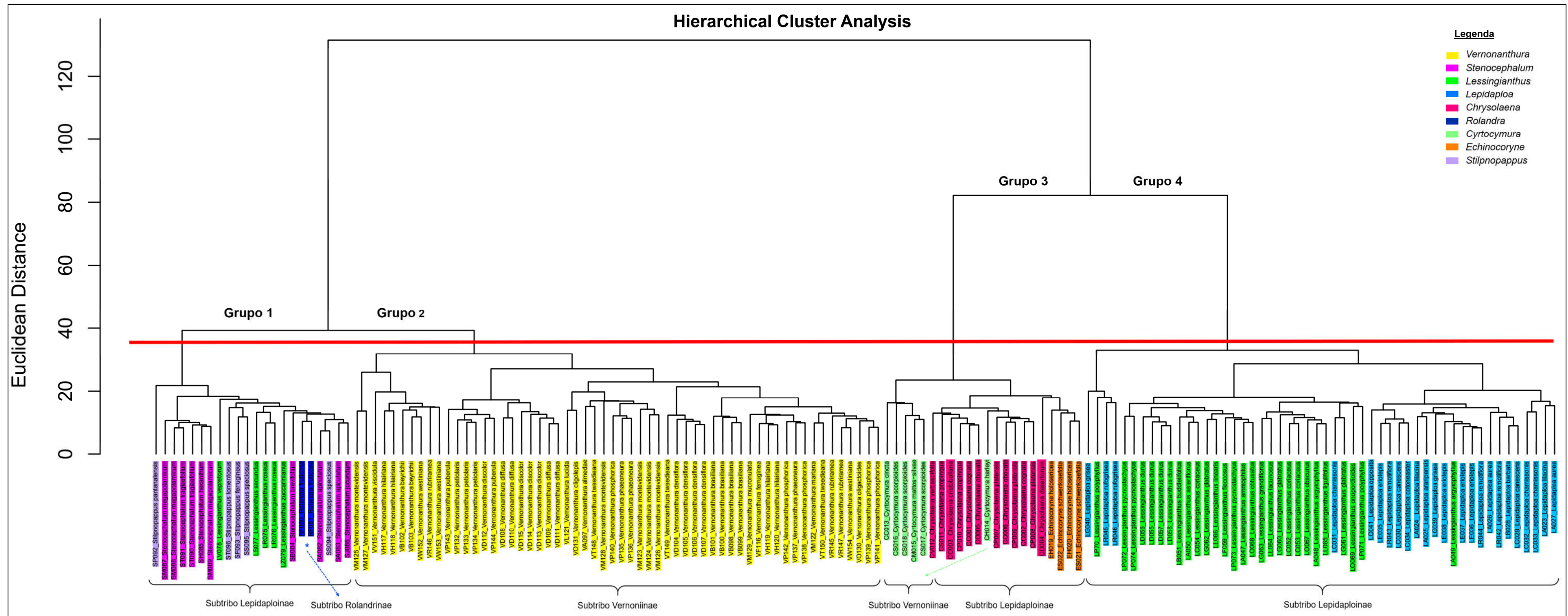


Figura 6: Análise por HCA das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS, utilizando a matriz binária dos dados e como algoritmo de agrupamento a distância euclidiana ordinária com método de ligação do tipo Ward (software R). As espécies foram coloridas de acordo com os gêneros definidos por Robinson (1999a,1999b).

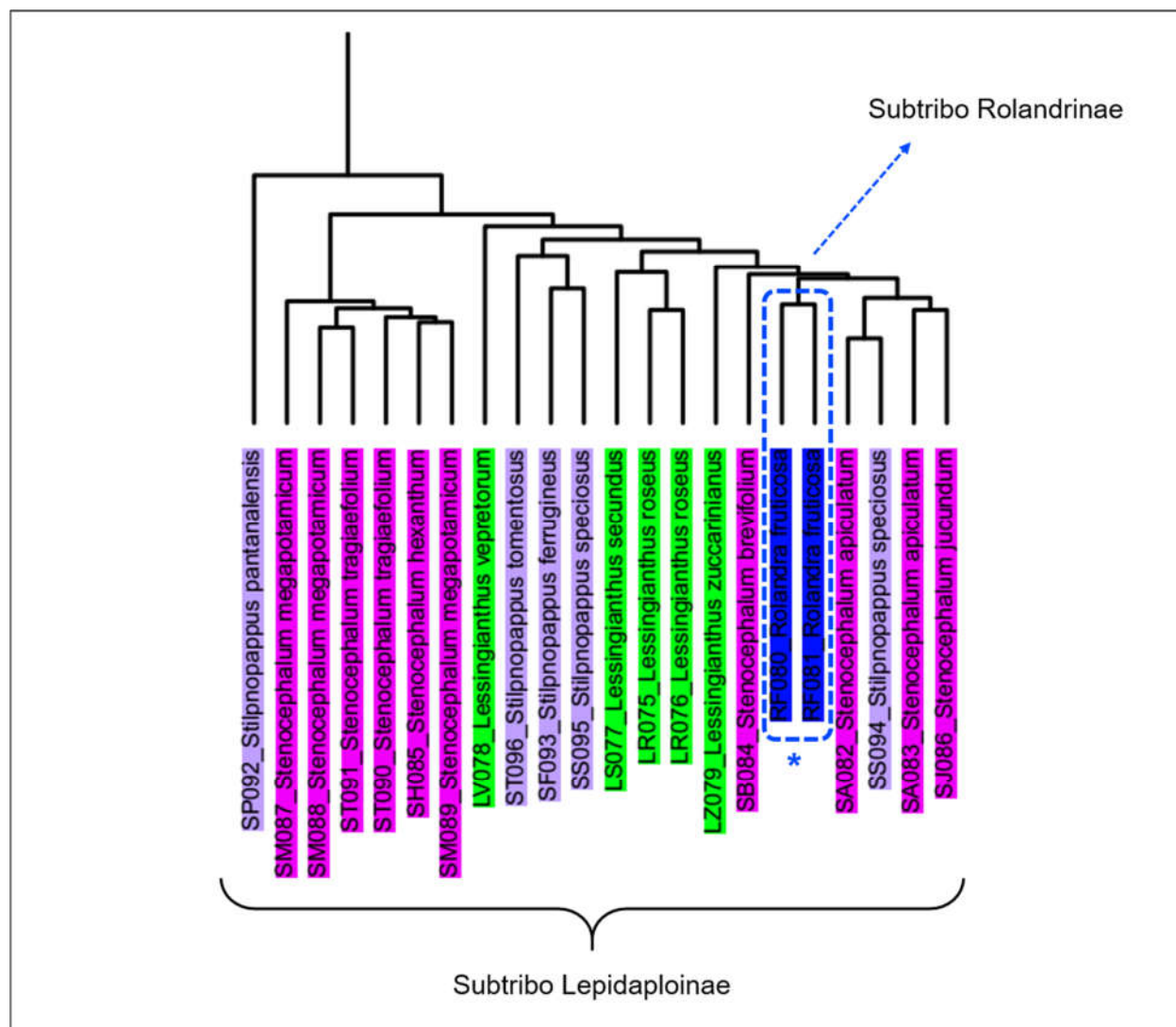


Figura 7: Ampliação do dendrograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 1.

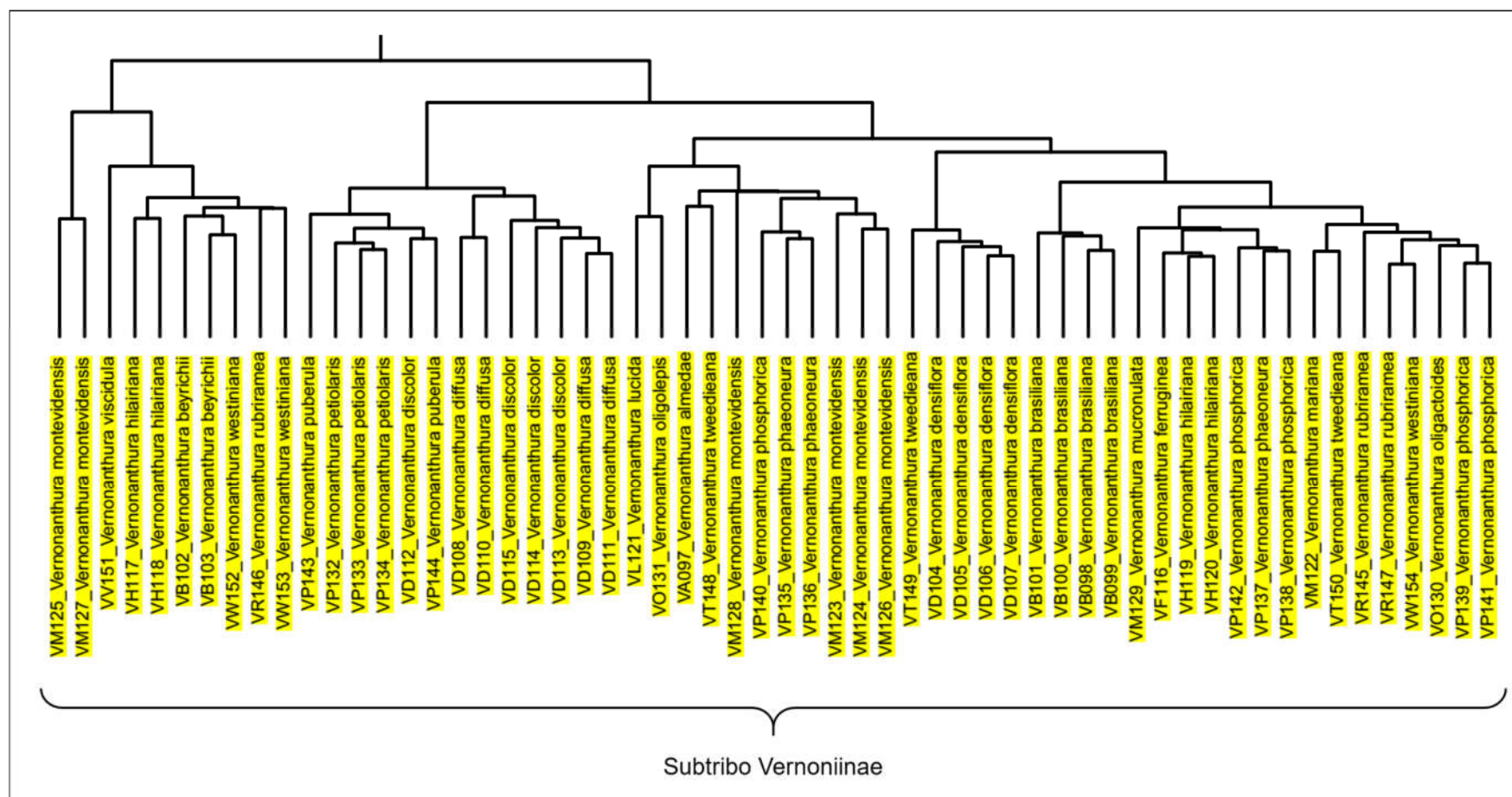


Figura 8: Ampliação do dendrograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 2.

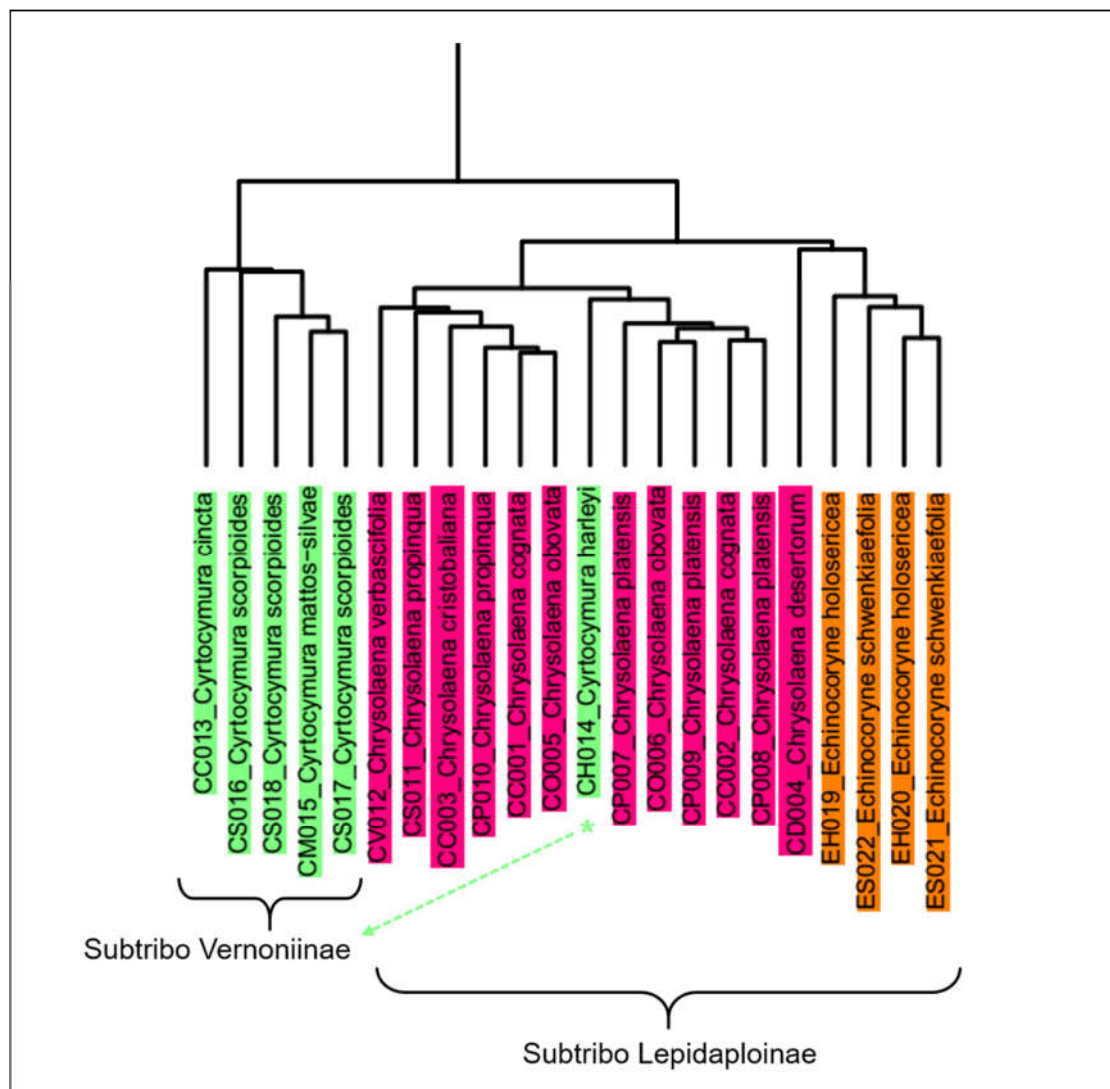


Figura 9: Ampliação do dendrograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 3.

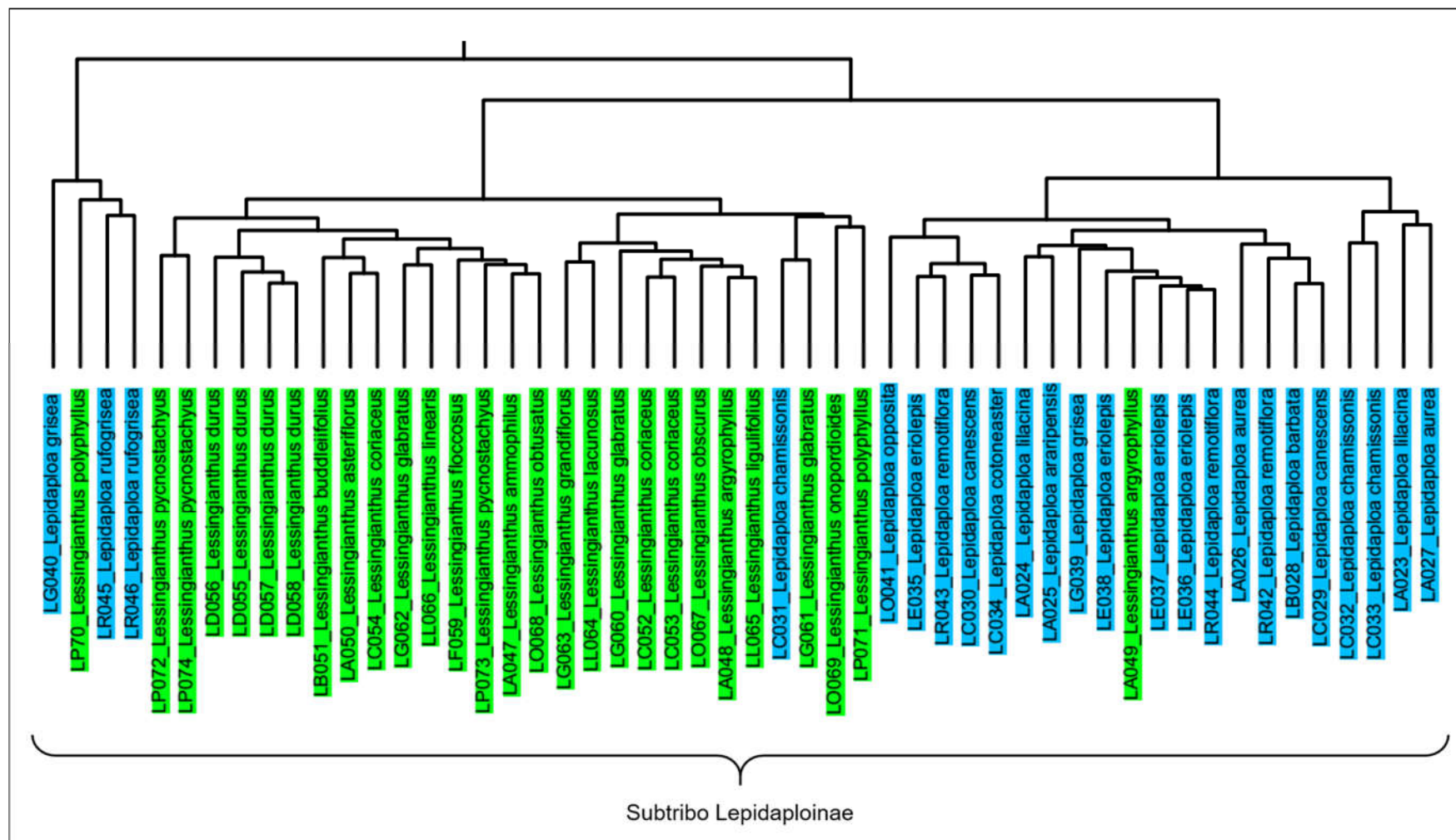


Figura 10: Ampliação do dendrograma apresentado na Figura 6, destacando as espécies que constituem o Grupo 4.

O **Grupo 2** é constituído exclusivamente por espécies da subtribo Vernoniinae. Todas as espécies analisadas do gênero *Vernonanthura* agruparam-se e ficaram inseridas neste grupo, o qual está próximo ao grupo constituído pelas espécies do gênero *Stenocephalum*. Os estudos de Keeley, Forsman e Chan (2007) e Loeuille, Keeley e Pirani (2015) evidenciaram que as espécies do gênero *Vernonanthura* estão intimamente relacionadas à *Vernonia* s.s. e não estariam diretamente relacionadas às demais Vernoniinae (*Echinocoryne*, *Chrysolaena*, *Cyrtocymura*); este último fato é corroborado por nossos resultados. Verificou-se que plantas da mesma espécie, porém de populações diferentes, apresentaram tendência em se agrupar. As populações de *Vernonanthura petiolaris* (VP132; VP133 e VP134), coletadas em diferentes estados (São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro), apresentaram-se agrupadas, assim como as populações de *V. densiflora*, *V. brasiliiana*, *V. montevidensis*, *V. discolor* e *V. rubriramea*. Porém, algumas espécies apresentaram suas populações dispersas ao longo de todo o grupo, como por exemplo *Vernonanthura hilariana*. Essas diferenças podem ser devido a processos históricos, onde cada população teria uma história diferente na produção de metabólitos, ou causadas por alterações no desenvolvimento de cada população devido a variações climáticas, disponibilidade de água, características do solo, dentre outros fatores (Figura 8). Dessa maneira, *Vernonanthura* apresenta-se como um gênero bem estabelecido e com limites precisos, entretanto só uma amostragem mais completa de *Vernonanthura* e *Vernonia* s.s. poderão esclarecer certas dúvidas em relação aos limites destes dois gêneros.

O **Grupo 3** é composto pelas espécies dos gêneros *Chrysolaena*, *Echinocoryne* (pertencentes à subtribo Lepidaploinae) e *Cyrtocymura* (pertencente à subtribo Vernoniinae). Parcialmente, estes resultados são congruentes com as relações filogenéticas obtidas por Loeuille, Keeley e Pirani (2015), segundo os quais os gêneros *Chrysolaena* e *Echinocoryne* seriam gêneros irmãos e compartilhariam o mesmo ancestral comum do “core” Lepidaploinae. Este último fato, entretanto, não foi observado em nosso estudo, pois na análise por HCA estes gêneros se agruparam com espécies do gênero *Cyrtocymura* (pertencentes à subtribo Vernoniinae) (Figura 9). O Grupo 3 possui grande heterogeneidade do ponto de vista morfológico e biogeográfico, sendo necessários estudos mais aprofundados para esclarecer as relações entre as espécies deste grupo.

O **Grupo 4** é constituído por espécies dos gêneros *Lessingianthus* e *Lepidaploa*, que são, atualmente, os gêneros mais diversificados da tribo Vernonieae, com cerca de 105 spp. e 140 spp., respectivamente. Essa diversidade representa 15% de todas as espécies da tribo. De modo geral, foi possível observar agrupamentos consistentes entre as espécies do gênero *Lessingianthus*, com somente uma espécie do gênero *Lepidaploa* entre seus representantes (*Lepidaploa chamissonis*), bem como entre as espécies do gênero *Lepidaploa*, com apenas *Lessingianthus argyrophyllus* entre as amostras de *Lepidaploa*. Entretanto, houve a formação de um pequeno grupo constituído pelas espécies *Lepidaploa rufogrisea*, *Lepidaploa grisea* e *Lessingianthus polyphyllus*, que não se agruparam com as demais espécies dos gêneros (Figura 10). Os gêneros *Lepidaploa* e *Lessingianthus* constituem o “core” da subtribo Lepidaploinae. Dessa maneira, nossos resultados são congruentes com estudos filogenéticos, morfológicos e citológicos, que demonstraram a grande ligação entre *Lessingianthus* e *Lepidaploa*, assim como as suas diferenças marcantes na circunscrição genérica (ANGULO; DEMATTEIS, 2012; DE OLIVEIRA; FORNIMARTINS; SEMIR, 2007; KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; KEELEY; ROBINSON, 2009; LOEUILLE; KEELEY; PIRANI, 2015; ROBINSON, 1999a).

Comparando os agrupamentos obtidos na análise por HCA com as classificações taxonômicas propostas por Baker (1873) e Robinson (1999a, 1999b) observou-se que tais agrupamentos são, de modo geral, condizentes com os gêneros criados por Robinson (1999a, 1999b). O dendograma indicou que há uma separação entre as espécies, sendo que as espécies de um mesmo gênero (dentro dos gêneros criados por Robinson), apresentaram tendência em se agruparem. Dessa maneira, a classificação de Robinson (1999a, 1999b) seria mais apropriada do que a classificação estabelecida por Baker (1873), na qual o gênero *Vernonia s.l.* inclui mais de 1000 espécies.

No presente estudo não foram encontradas similaridades marcantes entre os representantes da subtribo Lepidaploinae, pois estes emergiram em três grandes grupos: o primeiro grupo, denominado de "core" Lepidaploinae, é composto pelos gêneros *Lepidaploa* e *Lessingianthus*; o segundo grupo é composto pelos gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus* e algumas espécies de *Lessingianthus*; o terceiro grupo é o mais heterogêneo e é composto pelos gêneros *Chrysolaena*, *Echinocoryne* (pertencentes à subtribo Lepidaploinae) e *Cyrtocymura* (pertencente à subtribo Vernoniinae). Considerando que os gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus* não se

agruparam com os demais representantes da subtribo *Lepidaploinae*, os agrupamentos obtidos na análise por HCA corroboram os estudos filogenéticos realizados por Loeuille, Keeley e Pirani (2015), segundo os quais a subtribo *Lepidaploinae* é parafilética, ou seja, não possui um único ancestral comum.

Estudos metabolômicos demonstraram que existem diferenças entre os metabólitos apresentados pelos representantes brasileiros de diversos gêneros das subtribos *Vernoniinae* e *Lepidaploinae* e destacaram a utilização da metabolômica como ferramenta quimiotaxonômica (MARTUCCI et al., 2014). O trabalho de Keeley; Forsman e Chan (2007) apresentou a primeira filogenia molecular para *Vernonieae*, com uma ampla amostragem da tribo, no qual evidenciaram que possivelmente a subtribo *Vernoniinae* não seria monofilética. Isto tornou possível que Keeley & Robinson (2009), elevassem *Lepidaploinae* ao nível de subtribo. Posteriormente, Loeuille, Keeley e Pirani (2015) ampliaram a amostragem dos táxons brasileiros em um estudo filogenético com base em dados moleculares e morfológicos, mostrando que ambas as subtribos, *Vernoniinae* e *Lepidaploinae*, assim como outras, não são monofiléticas.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, notamos que a atual classificação de *Vernonieae* pode necessitar de algumas alterações, pois diversas subtribos possuem gêneros que não estão relacionados (como por exemplo, os gêneros pertencentes às subtribos *Lepidaploinae* e *Vernoniinae* que não se agruparam com os demais representantes da sua subtribo). Além disso, existem evidências morfológicas que indicam que a classificação atual destas subtribos necessita de alterações, pois para alguns gêneros há sobreposição de características que foram consideradas diagnósticos para o grupo (informação verbal)⁵.

4.2.3.1.2 *Principal Component Analysis*

A análise por PCA é utilizada para se ter uma visão geral dos dados, revelando grupos de observações, tendências e/ou outliers (amostras anômalas, ou seja, que apresentam comportamento diferenciado do restante do conjunto) (ERIKSSON et al., 2013; FERREIRA, 2015). Para os dados analisados por PCA, foram obtidos valores de R^2X e Q^2 de 0,720 e 0,669, respectivamente.

⁵ Informação fornecida por Marcelo Monge.

De acordo com o PCA *score plot* das duas primeiras componentes, foi possível observar que as espécies tendem a formarem dois grupos distintos, sendo estes referentes aos dois ramos principais do dendograma. A primeira componente explica 59,5% da variância, enquanto a segunda componente explica 4,71% da variância. A diferenciação entre os dois grupos é observada através do eixo vertical sendo, portanto, explicada pela segunda componente (Figura 11).

O PCA *score plot* em função da segunda e terceira componentes indicou que as amostras tendem a formarem quatro grupos, de forma semelhante ao observado na análise por HCA. Notou-se que as espécies do grupo 3 apresentaram-se no quadrante superior direito, enquanto as espécies do grupo 4 apresentaram-se no quadrante inferior direito, sendo que a separação entre estes grupos é explicada, portanto, pela terceira componente (Figura 12).

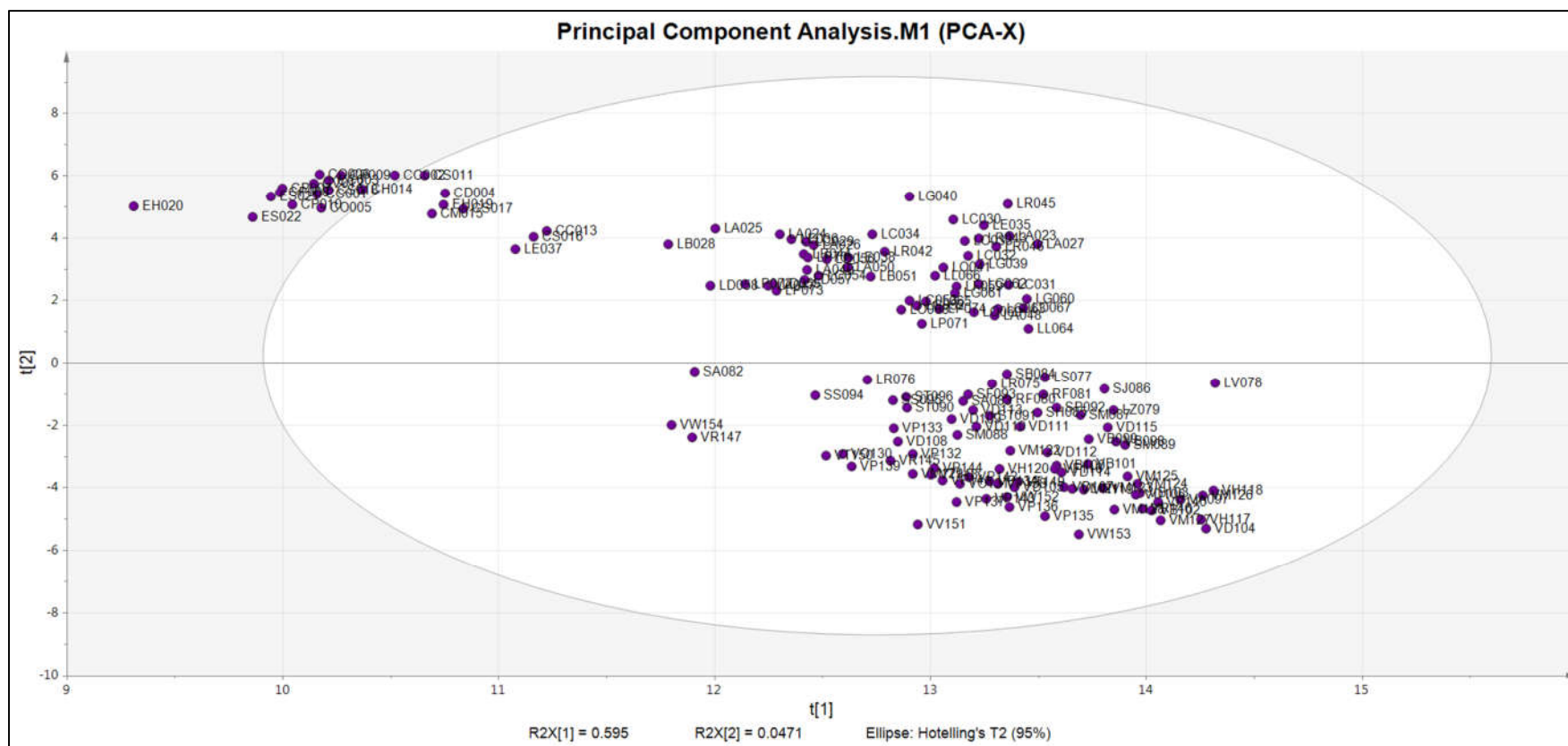


Figura 11: PCA score plot em função da primeira e segunda componentes. A primeira componente explica 59,5% da variação e a segunda componente explica 4,71% da variação.

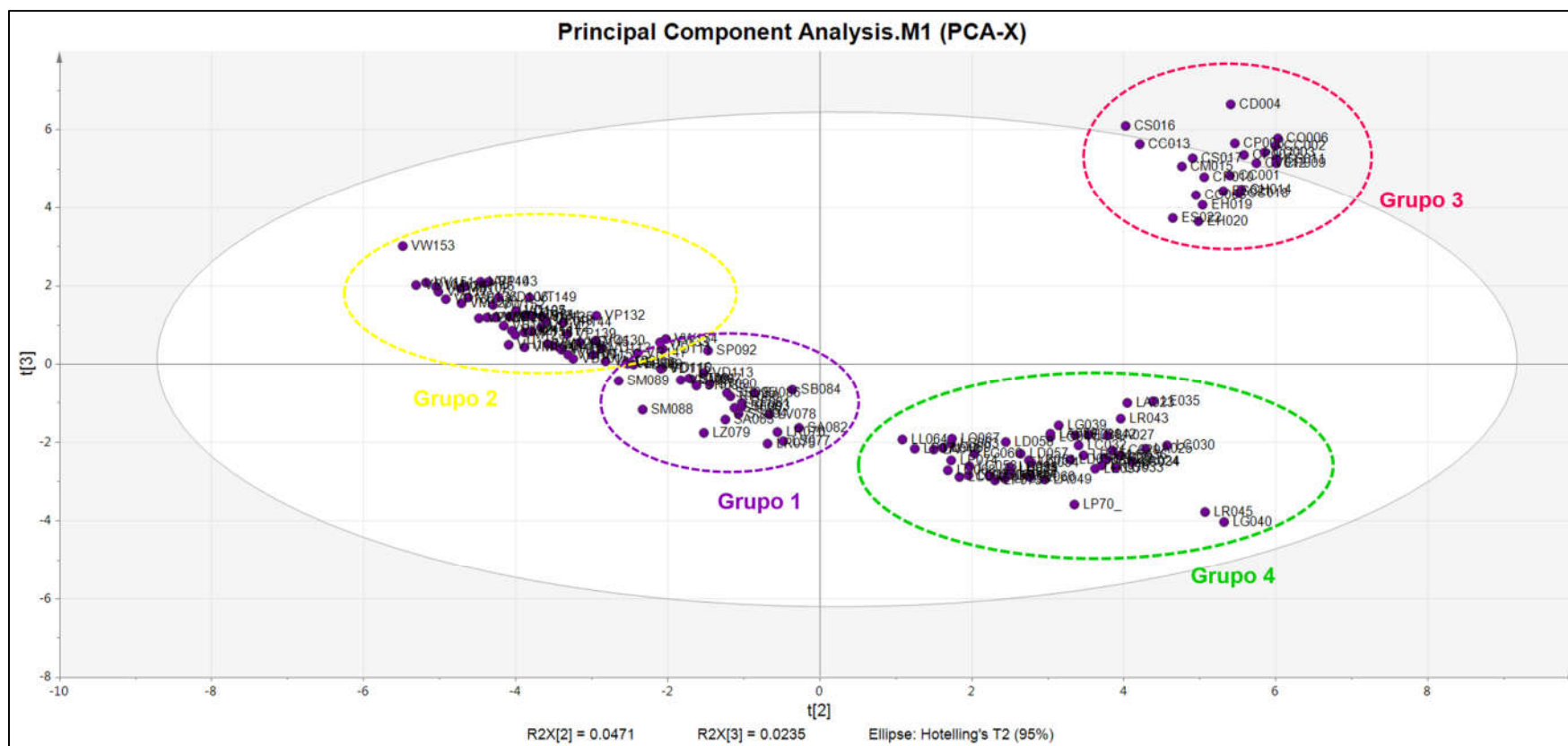


Figura 12: PCA score plot em função da segunda e terceira componentes. A segunda componente explica 4,71% da variação e a terceira componente explica 2,35% da variação. Os destaques mostram as espécies pertencentes aos grupos 1 (roxo), 2 (amarelo), 3 (rosa) e 4 (verde).

4.2.3.2 Análises Estatísticas Multivariadas Supervisionadas

Nas análises por PLS-DA e OPLS-DA, foram obtidos valores de R^2X e Q^2 ligeiramente superiores para as análises por PLS-DA (Tabela 8). As diferenças entre R^2X e Q^2 para estas análises são, porém, normais, já que o método utilizado para calcular os valores dos coeficientes é diferente para cada uma das análises. Para determinar qual o modelo mais adequado aos propósitos da quimiotaxonomia, avaliamos, portanto, os PLS-DA *score plot* e OPLS-DA *score plot*. Na análise por OPLS-DA foi possível observar que cada classe, referente aos grupos obtidos na análise por HCA, ficou inserida em um quadrante, sendo que na análise por PLS-DA, não foi possível observar esta mesma distinção, indicando que a inserção de componentes ortogonais é importante para a discriminação entre as classes (Apêndice 11). Assim, a análise por OPLS-DA mostrou-se como o modelo mais adequado para a diferenciação entre os grupos (Figura 13).

Tabela 8: Valores de R^2X e Q^2 obtidos nas análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas (PCA) e supervisionadas (PLS-DA e OPLS-DA)

Modelo	Tipo	A	N	$R^2X_{(cum)}$	$R^2Y_{(cum)}$	$Q^2_{(cum)}$
M1	PCA-X	8	154	0,720		0,669
M2	PLS-DA	7	154	0,702	0,980	0,940
M3	OPLS-DA	3+3+0	154	0,697	0,963	0,908

Legenda: A, número de componentes principais; N, número de amostras; R^2X , *goodness of fit* (bloco X); R^2Y , *goodness of fit* (bloco X e Y); Q^2 , *goodness of prediction*

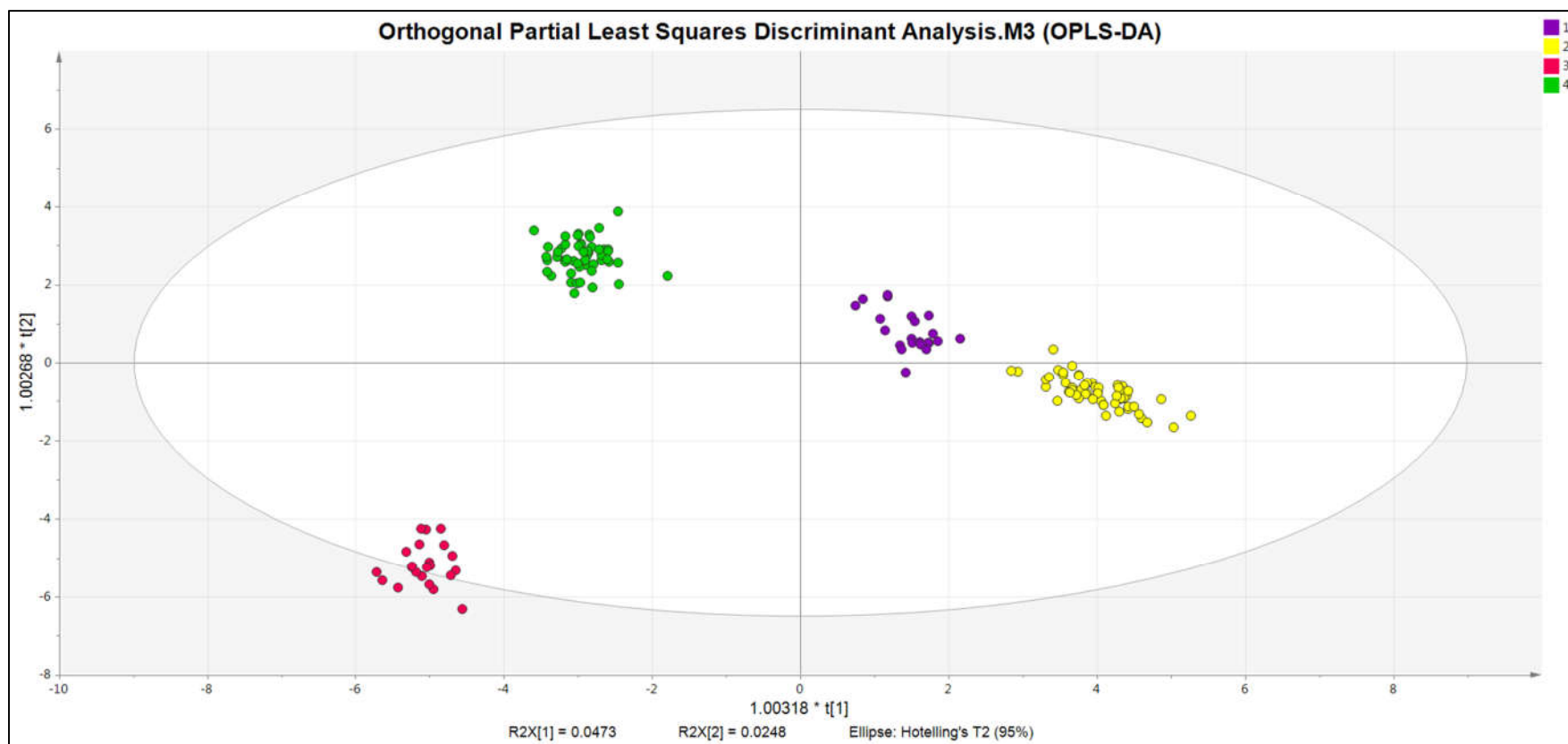


Figura 13: OPLS-DA score plot das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS, utilizando como classes os grupos obtidos na análise por HCA. Grupo 1 (roxo), Grupo 2 (amarelo), Grupo 3 (rosa) e Grupo 4 (verde).

Dessa maneira, concluímos que a separação das espécies em quatro grupos principais obtidos na análise por HCA foi condizente com a análise por OPLS-DA, sendo possível estabelecer uma separação entre os grupos. Os valores de R^2X e Q^2 para as componentes preditivas e ortogonais do modelo OPLS-DA são indicados na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de R^2X e Q^2 gerados pelo software SIMCA na análise por OPLS-DA.

	R^2X	$R^2X_{(cum)}$	E	R^2Y	$R^2Y_{(cum)}$	Q^2	$Q^2_{(cum)}$
Total		0,697			0,963		0,908
Pred		0,0809			0,963		0,908
P1	0,0473	0,0473	17,8	0,365	0,365	0,349	0,349
P2	0,0248	0,0721	9,32	0,312	0,678	0,316	0,666
P3	0,0088	0,0809	3,32	0,285	0,963	0,243	0,908
Ort		0,616			0		
O1	0,5910	0,591	0,33	0	0		
O2	0,0143	0,606	5,39	0	0		
O3	0,0104	0,616	3,91	0	0		

Legenda: Total, soma das componentes preditivas e ortogonais; Pred, componentes preditivas (P1, P2 e P3); Ort, componentes ortogonais (O1, O2 e O3); R^2X , *goodness of fit* (bloco X); $R^2X_{(cum)}$, *goodness of fit* cumulativo (bloco X); E, *eigenvalue*; R^2Y , *goodness of fit* (Bloco X e Y); $R^2Y_{(cum)}$, *goodness of fit* cumulativo (Bloco X e Y); Q^2 , *goodness of prediction*; $Q^2_{(cum)}$, *goodness of prediction* cumulativo.

No OPLS-DA *loading plot* é possível determinar as variáveis responsáveis pela separação entre os grupos. Enquanto que no *score plot* são representadas as observações (cada amostra analisada), no *loading plot* são representadas as relações entre as variáveis. Dessa forma, os *score* e *loading plots* são complementares e sobreponíveis, fazendo com que os padrões observados no *score plot* possam ser interpretados a partir das direções apresentadas pelas variáveis. As variáveis mais importantes para o modelo estão dispostas na periferia do *loading plot* e as variáveis que influenciam menos o modelo são encontradas na origem do *loading plot* (Figura 14).

Outra forma de determinar as variáveis discriminantes é através do VIP, sendo que as variáveis com valores de VIP maiores que 1 são consideradas importantes para o modelo (Figura 15).

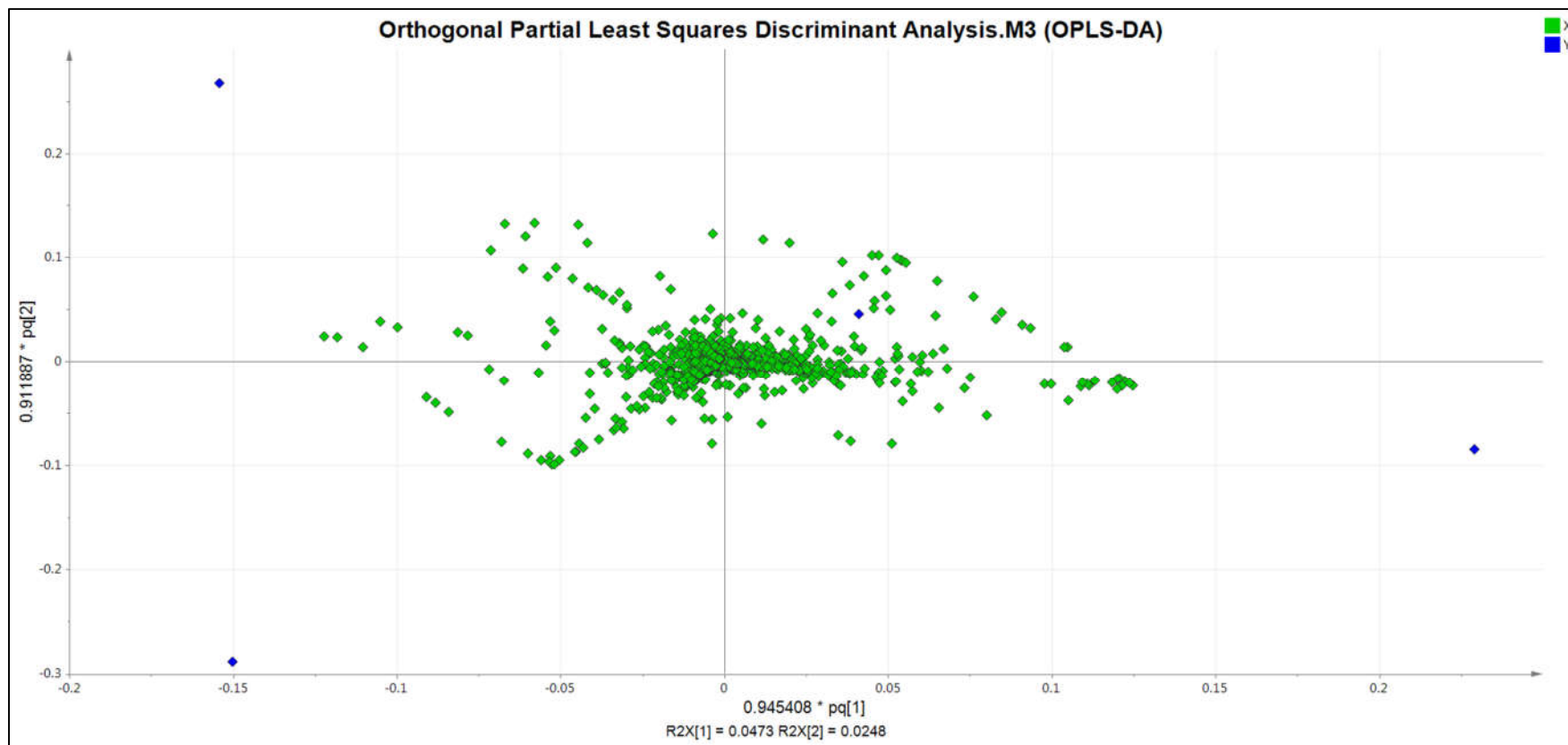


Figura 14: OPLS-DA *loading plot* das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS. Os pontos verdes representam as variáveis que formam o bloco X e os pontos azuis representam as classes definidas de acordo com a análise por HCA.

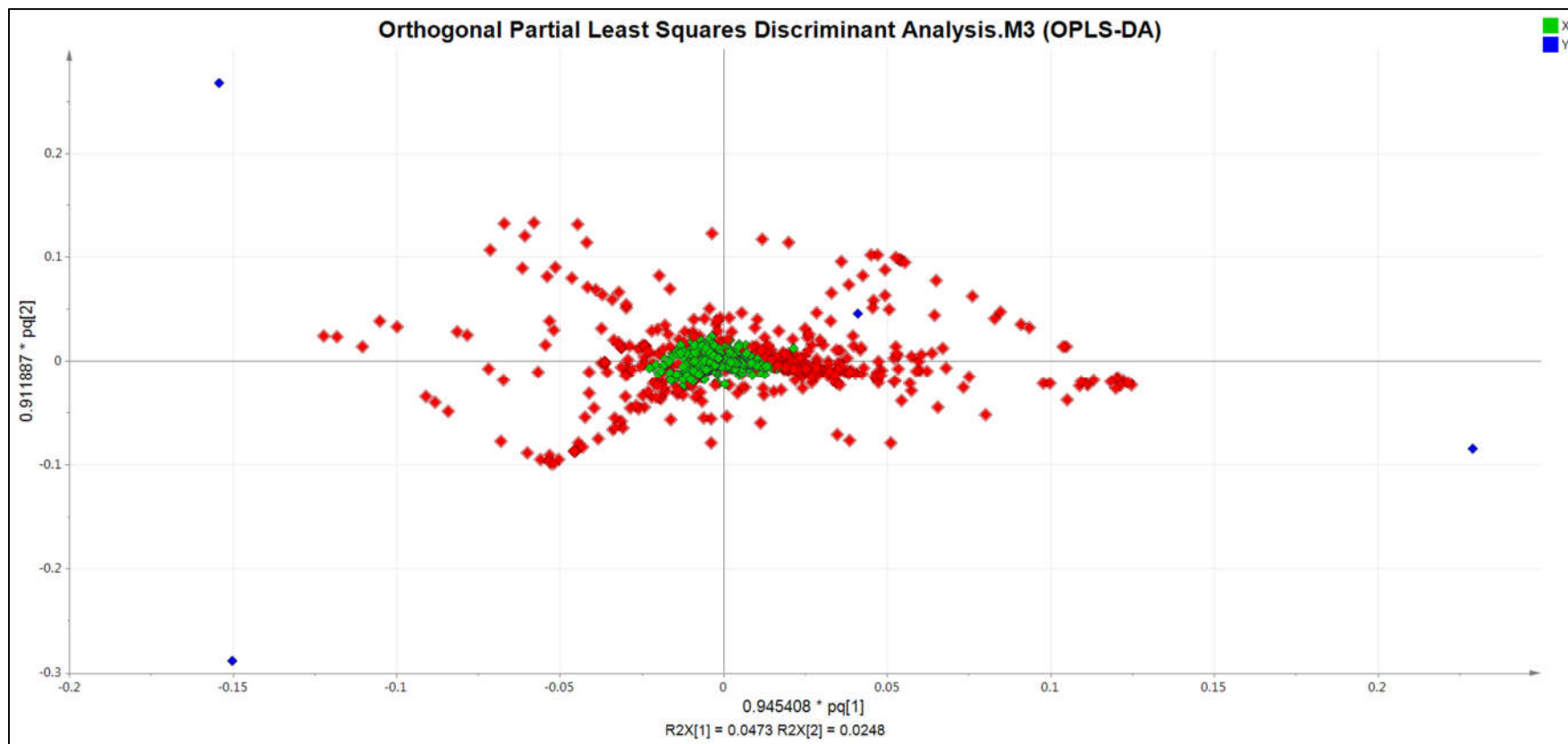


Figura 15: OPLS-DA *loading plot* das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS, destacando, em vermelho, as variáveis com valores de VIP maiores que 1.

4.3 Análise Qualitativa

4.3.1 Identificação de metabólitos previamente relatados em *Vernonia s.l.*

As impressões digitais metabólicas de cada espécie foram estudadas e as informações espectrométricas e espectroscópicas dos principais picos foram utilizadas na identificação dos metabólitos. Nas Figuras 16 a 23 são apresentados alguns exemplos das impressões digitais metabólicas obtidas.

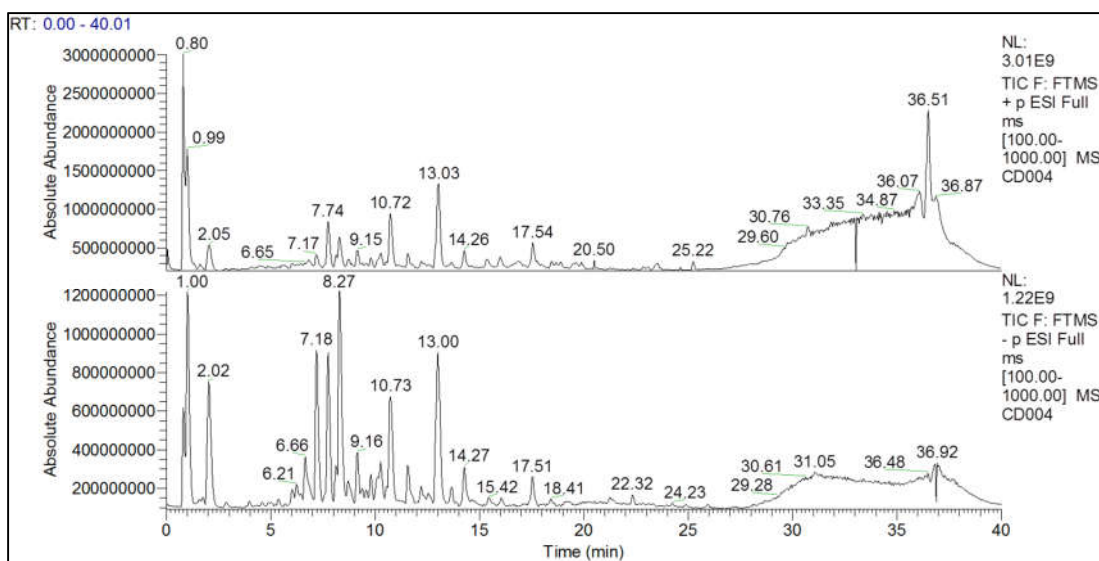


Figura 16: Impressão digital metabólica da espécie *Chrysolaina desertorum* (CD004) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

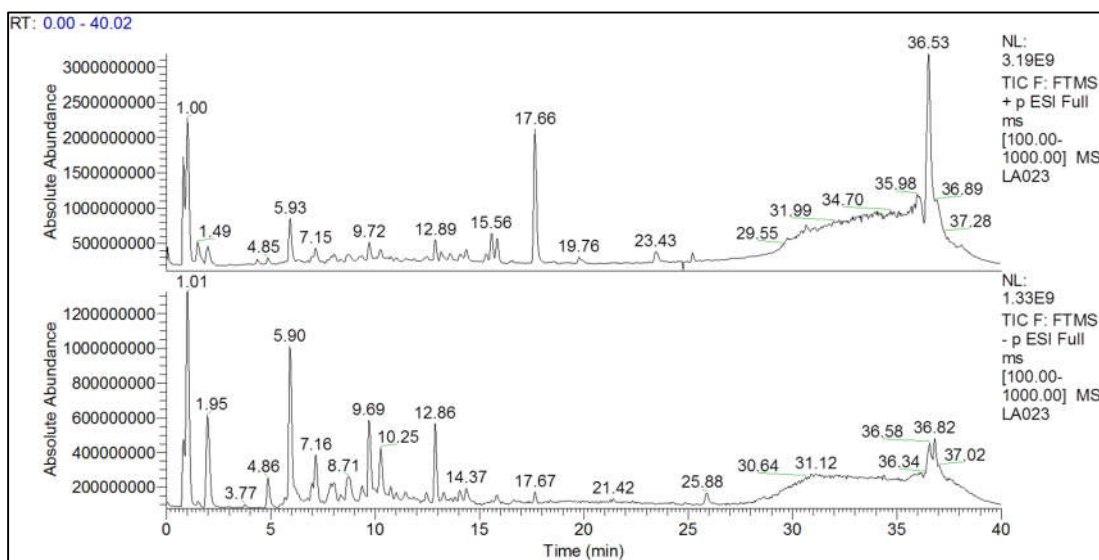


Figura 17: Impressão digital metabólica da espécie *Lepidaploa lilacina* (LA023) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

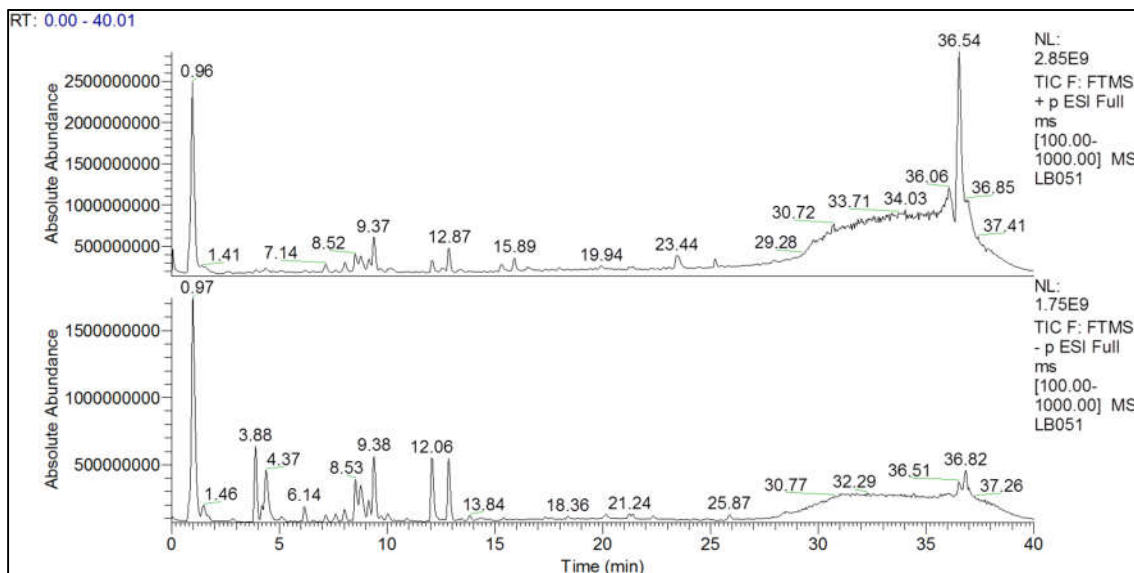


Figura 18: Impressão digital metabólica da espécie *Lessingianthus buddleiifolius* (LB051) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

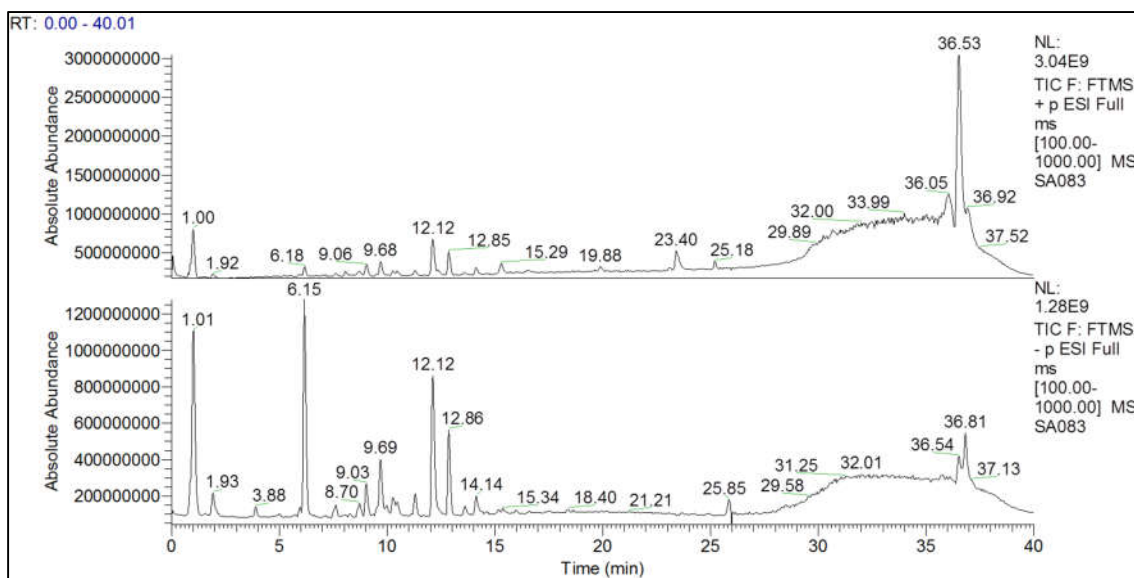


Figura 19: Impressão digital metabólica da espécie *Stenocephalum apiculatum* (SA083) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

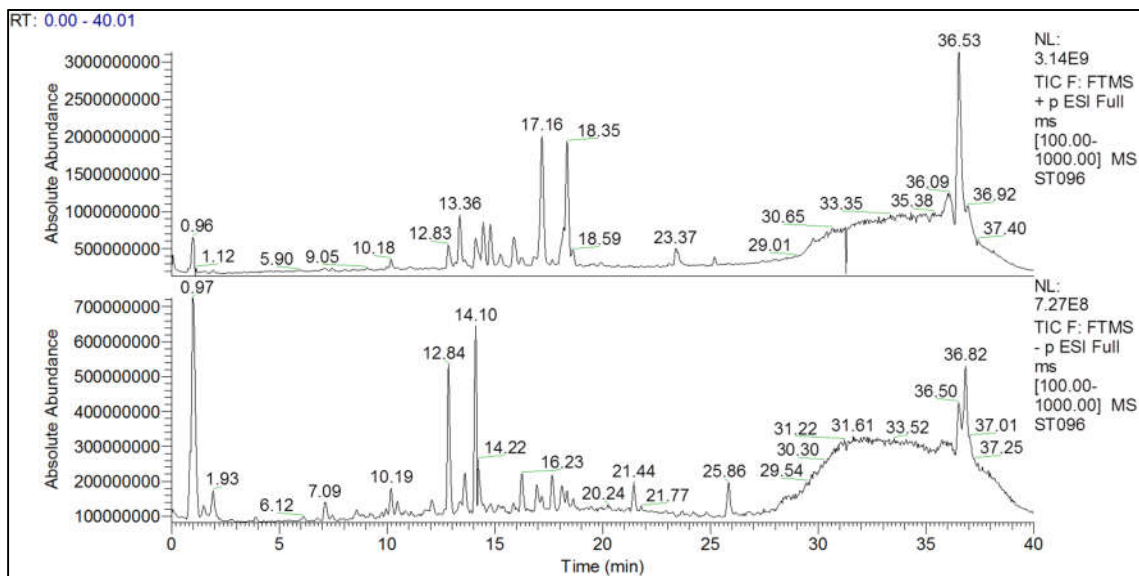


Figura 20: Impressão digital metabólica da espécie *Stilpnopappus tomentosus* (ST096) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

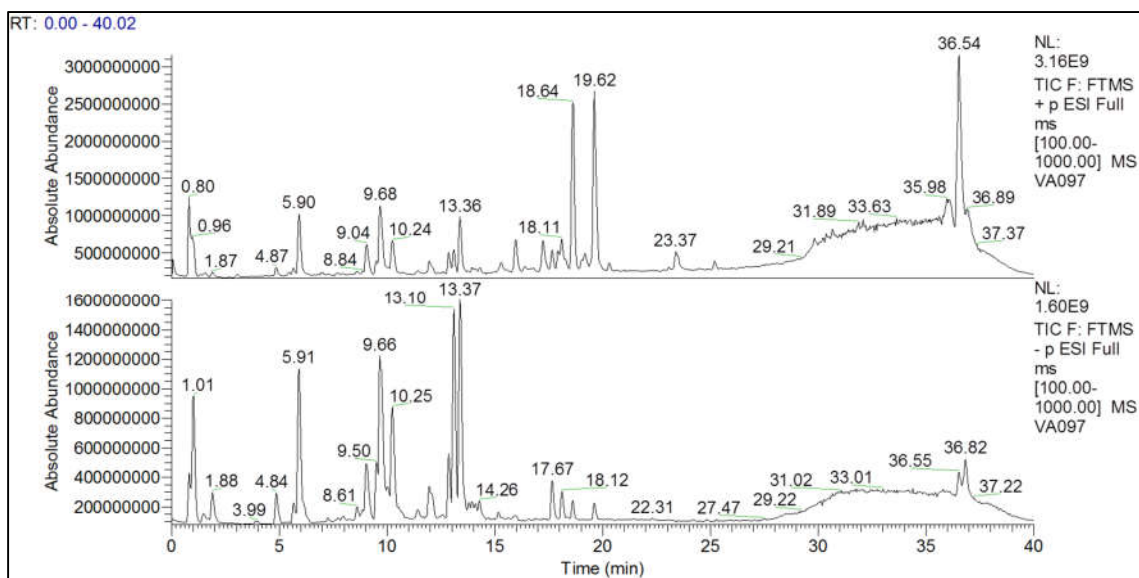


Figura 21: Impressão digital metabólica da espécie *Vernonanthura almedae* (VA097) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

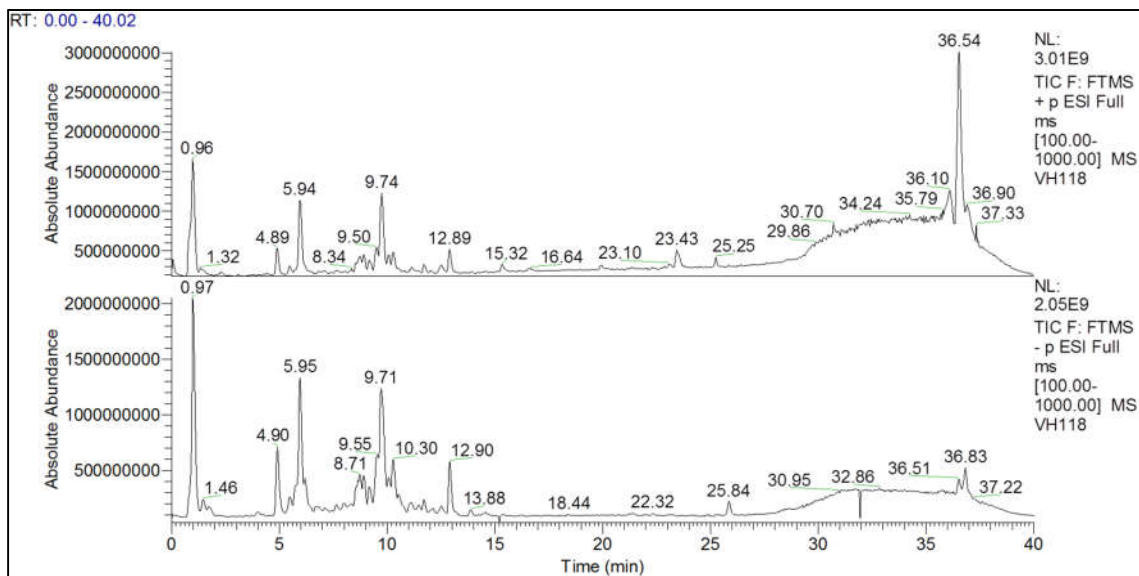


Figura 22: Impressão digital metabólica da espécie *Vernonanthur hilairiana* (VH118) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

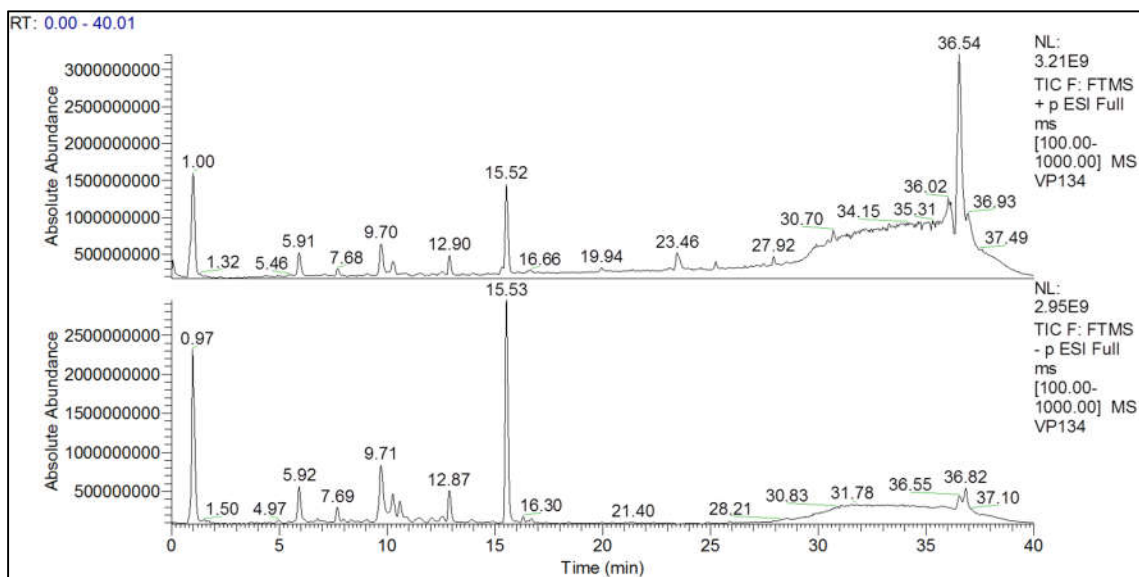


Figura 23: Impressão digital metabólica da espécie *Vernonanthur petiolaris* (VP134) nos modos de ionização positivo (acima) e negativo (abaixo).

Os metabólitos identificados nas espécies analisadas, bem como os dados de UV e MS e os padrões de fragmentação utilizados para a identificação dos compostos são apresentados na Tabela 10. Dentre os metabólitos identificados destacam-se ácidos clorogênicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. Nos Apêndices 12 a 19 são mostradas as ampliações dos cromatogramas anteriormente apresentados, destacando os picos identificados.

Tabela 10: Metabólitos identificados nas espécies analisadas através de comparação com dados da literatura

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
1*	4,88	ácido 3-O-cafeoilquínico (327-97-9)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ (354,0951)	[M+H] ⁺ 355,1020 bp; [(M+H) - AQ] ⁺ 163,0388	163,04	[M-H] ⁻ 353,0876 bp; [2M-H] ⁻ 707,1826	353,09; 191,06 bp; 179,03; 135,04	218, 244 sh, 296 sh e 324
2*	5,93	ácido 5-O-cafeoilquínico (906-33-2)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ (354,0951)	[M+H] ⁺ 355,1018 bp; [(M+H) - AQ] ⁺ 163,0388	163,04	[M-H] ⁻ 353,0876 bp; [2M-H] ⁻ 707,1824; [(M-H) - CAF] ⁻ 191,0550	353,09; 191,06 bp	218, 244 sh, 295 sh e 326
3	6,93	ácido 5- <i>p</i> - cumaroilquínico (32451-86-8)	C ₁₆ H ₁₈ O ₈ (338,1002)	[M+H] ⁺ 339,1073	163,04; 147,04 bp	[M-H] ⁻ 337,0930 bp; [2M-H] ⁻ 657,1935	657,19; 337,09; 191,06 bp; 173,04; 163,04	311
4	7,15	vicenina-2 (23666-13-9)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ (594,1585)	[M+H] ⁺ 595,1656	595,17; 577,16; 559,14; 541,13; 523,12; 475,10; 457,11 bp; 427,10; 355,08	[M-H] ⁻ 593,1516	593,15 bp; 575,14; 503,12; 473,11; 413,09; 383,08; 353,07	271 e 334
5	7,62	ácido 5-O-(<i>E</i>)- feruloilquínico (62929-69-5)	C ₁₇ H ₂₀ O ₉ (368,1107)	[M+H] ⁺ 369,1177	177,05 bp; 163,04	[M-H] ⁻ 367,1034	367,10; 191,05 bp	297 e 326

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
6	8,63	quercetina 3-O- rutinosídeo (153-18-4)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ (610,1534)	[M+H] ⁺ 611,1603 bp; [(M+H) - rhamnosil] ⁺ 465,1025; [(M+H) - rhamnosil-glicose] ⁺ 303,0495	303,05	[M-H] ⁻ 609,1461 bp	609,15 bp; 301,03	256, 266 sh e 355
7*	8,84	quercetina 3-O- glicosídeo (482-35-9)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ (464,0955)	[M+H] ⁺ 465,1024 bp; [(M+H) - glicosídeo] ⁺ 303,0494	303,05	[M-H] ⁻ 463,0883	463,09; 301,03 bp	255, 266 sh e 354
8*	9,01	luteolina 7-O- glicuronídeo (29741-10-4)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂ (462,0798)	[M+H] ⁺ 463,0867 bp; [(M+H) - glicuronil] ⁺ 287,0533	463,09; 287,05 bp	[M-H] ⁻ 461,0725 bp; [2M-H] ⁻ 923,1523	461,07; 285,04 bp	253, 267sh e 345
9*	9,07	kaempferol 3-O- rutinosídeo (17650-84-9)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ (594,1585)	[M+H] ⁺ 595,1652 bp; [(M+H) - rhamnosil] ⁺ 449,1075; [(M+H) - rhamnosil-glicose] ⁺ 287,0546	287,05	[M-H] ⁻ 593,1512	593,15 bp; 285,04	265, 296 sh e 344
10*	9,68	ácido 3,4-di-O- cafeoilquínico (89886-30-6)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ (516,1268)	[M+H] ⁺ 517,1340 bp; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 499,1229; [(M+H) - CAF] ⁺ 355,1022; [(M+H) - AQ-CAF] ⁺ 163,0387	163,04	[M-H] ⁻ 515,1191	515,12; 353,09; 335,08; 191,06; 179,03; 173,04 bp	219, 243 sh, 297 sh e 321
11*	9,71	ácido 3,5-di-O- cafeoilquínico (89919-62-0)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ (516,1268)	[M+H] ⁺ 517,1334 bp, [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 499,1228; [(M+H) - AQ- CAF] ⁺ 163,0385	163,04	[M-H] ⁻ 515,1189	515,12; 353,09; 191,06 bp; 179,03	221, 244 sh, 296 sh e 325

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
12*	9,73	7,3',5'-trihidroxi-4'- metoxi-3-O- glicosilflavona (925421-02-9)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂ (478,1111)	[M+H] ⁺ 479,1183	317,06	[M-H] ⁻ 477,1039	447,10; 314,04 bp	256, 268 sh, 342
13*	10,13	apigenina 7-O- glicuronídeo (29741-09-1)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ (446,0849)	[M+H] ⁺ 447,0919 bp; [(M+H) - glicuronil] ⁺ 271,0585	447,09; 271,06 bp	[M-H] ⁻ 445,0778	445,08; 269,05 bp	267 e 336
14	10,21	chrisoeriol 7-O- neohesperidosídeo (111133-90-5)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ (608,1741)	[M+H] ⁺ 609,1813	463,12; 301,07 bp	[M-H] ⁻ 607,1676	607,17; 299,06 bp	266, 290 sh e 343
15	10,27	ácido 4,5-di-O- cafeoilquiníco (89886-31-7)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ (516,1268)	[M+H] ⁺ 517,1335 bp; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 499,1228; [(M+H) - CAF] ⁺ 355,1019; [(M+H) -AQ] ⁺ 163,0387	163,04	[M-H] ⁻ 515,1191	515,12; 353,09; 191,06; 179,03; 173,04 bp	219, 244 sh, 299sh e 327
16	10,58	chrisoeriol 7-O- glicuronídeo (29741-07-9)	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂ (476,0,955)	[M+H] ⁺ 477,1022 bp; [2M+H] ⁺ 953,1973	477,10; 301,07 bp	[M-H] ⁻ 475,0879 bp; [2M-H] ⁻ 951,1837	951,18; 475,09 bp; 299,06	253, 266sh e 343
17	11,52	isoorientina 3'-O- glicosídeo (1092783-10-2)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ (610,1534)	[M+H] ⁺ 611,1391	287,05 bp; 163,04	[M-H] ⁻ 609,1249	609,12; 323,08; 285,04 bp	254, 269 sh, 336

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
18*	12,08	quercetina (117-39-5)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ (302,0426)	[M+H] ⁺ 303,0496	303,05; 257,04; 153,02 bp; 137,02	[M-H] ⁻ 301,0352 bp; [2M-H] ⁻ 603,0786	301,04; 179,00; 151,00 bp	254 e 371
19*	12,14	luteolina (491-70-3)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ (286,04774)	[M+H] ⁺ 287,0545	287,05 bp; 269,04; 241,05; 161,02; 153,02; 135,04	[M-H] ⁻ 285,0400; [2M-H] ⁻ 571,0879	285,04 bp; 217,05; 199,04; 175,04; 151,00; 133,03	253, 267 sh, 294 sh e 346
20*	12,20	acacetina 7-O- rutinosídeo (480-36-4)	480-36-4 (592,1792)	[M+H] ⁺ 593,1866	285,08	-	-	268 e 335
21	12,52	tilirosídeo (20316-62-5)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃ (594,1373)	[M+H] ⁺ 595,1445	287,06; 165,05 147,04 bp	[M-H] ⁻ 593,1302	593,13; 447,09 285,04 bp	267, 297 sh, 315 e 355sh
22	13,01	acacetina 7-O- glicuronídeo (38226-83-4)	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁ (460,1006)	[M+H] ⁺ 461,1072 bp; [2M+H] ⁺ 921,2075	461,11; 285,07 bp	[M-H] ⁻ 459,0933 bp; [2M-H] ⁻ 919,1942	919,09; 459,09; 283,06 bp	268 e 333
23	13,35	8-O-(2-metilpropenoil) hirsutinólido (188293-70-1)	C ₁₉ H ₂₄ O ₇ (364,1522)	[M+H] ⁺ 365,1592; [M+NH ₄] ⁺ 382, 1857; [M+Na] ⁺ 387,1409; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 347,1485 bp	387,14; 279,12; 261,11 bp	-	-	285

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
24*	13,63	apigenina (520-36-5)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ (270,0528)	[M+H] ⁺ 271,0598	271,06 bp; 153,02	[M-H] ⁻ 269,0455	269,05; 151,00; 117,03 bp	268 e 333
25	13,84	kaempferol (520-18-3)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ (286,0477)	[M+H] ⁺ 287,0548	287,05 bp; 258,05; 241,05; 231,06; 213,05; 165,02; 153,02	[M-H] ⁻ 285,0406	285,04 bp; 229,05; 163,00; 151,00	266 e 367
26*	14,22	chrisoeriol (491-71-4)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆ (300,0634)	[M+H] ⁺ 301,0703	301,07; 286,05 bp 258,05	[M-H] ⁻ 299,0559 bp; [2M-H] ⁻ 599,1201	299,06; 284,03 bp; 256,04; 151,00	268 e 345
27	14,37	provável hirsutinolido	C ₂₁ H ₂₆ O ₈ (406,1628)	[M+H] ⁺ 407,1697; [M+ NH ₄] ⁺ 424,1961 bp; [M+Na] ⁺ 429,1514; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 389,1591	429,15; 389,16; 261; 11 243.10 bp	-	-	287
28	14,69	8-tigloilóxi hirsutinolido (188257-41-2)	C ₂₀ H ₂₆ O ₇ (378,1678)	[M+H] ⁺ 379,1744; [M+NH ₄] ⁺ 396,2010; [M+Na] ⁺ 401,1562; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 361,1638 bp	401,16 bp; 279,12; 261,11	-	-	286
29	15,53	deacilcinaropicrina (31565-50-1)	C ₁₅ H ₁₈ O ₄ (262,1205)	[M+H] ⁺ 263, 1273; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 245,1167 bp	245,11 bp; 227,11	[M-H] ⁻ 261,1129 bp; [2M-H] ⁻ 523,2336	261,11 bp; 243,10; 217,12	206

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
30	15,79	piptocarphina A (76248-63-0)	C ₂₁ H ₂₆ O ₉ (422,1577)	[M+H] ⁺ 423,1645; [M+NH ₄] ⁺ 440,1912; [M+Na] ⁺ 445,1458 bp; [(M+H) - C ₂ H ₂ O - 2H ₂ O] 345,1329; [(M+H) - C ₄ H ₄ O - H ₂ O] ⁺ 337,1278; [(M+H) - C ₄ H ₄ O - 2H ₂ O] ⁺ 319,1169	445,15; 405,15; 345,13; 319,12; 301,07; 277,11; 259,09; 241,08; 231,10; 213,09 bp; 199,07; 189,09; 173,06	-	-	286
31*	15,90	glaucólido B (11091-27-3)	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀ (438,1526)	[M+H] ⁺ 439,1592 bp; [M+NH ₄] ⁺ 456,1856; [M+Na] ⁺ 461,1407	461,14; 439,16; 379,14; 337,13; 319,12; 277,11; 259,10; 241,09; 231,10; 213,09; 199,07; 189,05 bp; 171,08	-	-	219
32*	17,27	provável hirsutinólido	C ₂₁ H ₂₆ O ₈ (406,1628)	M+H] ⁺ 407,1692 bp; [M+NH ₄] ⁺ 424,1956; [M+Na] ⁺ 429,1543; [(M+H) - H ₂ O] ⁺ 389, 1591	429,15 bp; 407,17; 347,15; 321,13; 261,11	-	-	288

ID	t _R	Nome usual (Número CAS)	FM (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV _{max}
				TIC (m/z)	AIF	TIC (m/z)	AIF	
33*	17,62	genkwanina (437-64-9)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅ (284,0685)	[M+H] ⁺ 285,0753	285,08; 270,05; 242,06 bp	[M-H] ⁻ 283,0612	283,06; 268,04 bp; 240,04	268 e 336
34*	18,15	3',4'-dimetoxiluteolina (4712-12-3)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (314,0790)	[M+H] ⁺ 315,0858	315,09; 300,06 bp; 272,07; 257,04 243,10	[M-H] ⁻ 313,0718	313,07; 298,05; 283,02; 255,03 bp	268 e 342
35*	18,65	glaucólido A (11091-29-5)	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀ (464,1682)	[M+H] ⁺ 465,1746 bp; [M+NH ₄] ⁺ 482,2012; [M+Na] ⁺ 487,1564	487,16; 465,17; 405,15; 345,13; 259,09; 241,08; 213,09; 189,05 bp; 173,06	-	-	220
36*	19,63	8-tigloilóxiglaucólido A (105307-23-1)	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₀ (478,1839)	[M+H] ⁺ 479,1903 bp; [M+NH ₄] ⁺ 496, 2168; [M+Na] ⁺ 501, 1721; [(M+H) - C ₅ H ₆ O] ⁺ 397,1487; [(M+H) - C ₅ H ₆ O - H ₂ O] ⁺ 379,1486	501,17 bp; 379,14	-	-	223

Legenda: ID, identificação do pico; t_R, tempo de retenção em minutos; FM, fórmula molecular; Massa monoisot., massa monoisotópica; TIC, *Total Ion Chromatogram*; AIF, *All Ion Fragmentation*; UV_{max}, comprimento de absorção máximo na região do ultravioleta; sh (*shoulder*), ombro na absorção máxima nos espectros de UV; AQ, ácido quínico; bp (*base peak*), pico base; CAF, unidade cafeoil; * indica que o metabólito identificado foi indicado como discriminante pelo VIP.

4.3.1.1 Ácidos Clorogênicos

Os picos cromatográficos referentes aos ácidos 3-*O*-cafeoilquínico e 5-*O*-cafeoilquínico foram identificados nos tempos de retenção 4,88 e 5,93 minutos (picos 1 e 2, respectivamente). Ambos apresentaram comprimentos de absorção máxima no UV característicos para estes metabólitos (em cerca de 218 nm e 324 nm e ombros em 243 nm e 296 nm) (BELAY; GHOLAP, 2009; SAKAKIBARA et al., 2003). Além disso, apresentaram a molécula protonada m/z 355,1021 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 353,0876 $[M-H]^-$, sendo possível diferenciá-los pelo padrão de fragmentação obtido no modo de ionização negativo do AIF (CLIFFORD et al., 2003; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; LIN; HARNLY, 2007; MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV do ácido 3-*O*-cafeoilquínico e ácido 5-*O*-cafeoilquínico são apresentados nos Apêndices 20 a 23.

Os picos 10, 11 e 15 foram identificados como ácidos dicafeoilquínicos, sendo eles: ácido 3,4-*di-O*-cafeoilquínico (t_R = 9,68 min); ácido 3,5-*di-O*-cafeoilquínico (t_R = 9,71 min) e ácido 4,5-*di-O*-cafeoilquínico (t_R = 10,27 min). Tais metabólitos apresentaram comprimentos de absorção máxima característico dos ácidos clorogênicos, a molécula protonada m/z 517,1338 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 515,1191 $[M-H]^-$. A diferenciação entre os isômeros foi feita de acordo com o padrão de fragmentação obtido no modo de ionização negativo do AIF (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; LIN; HARNLY, 2007; SAKAKIBARA et al., 2003). Os espectros de massas e de UV dos picos 10, 11 e 15 são mostrados nos Apêndices 24 a 29.

O pico 3 foi identificado como ácido 5-*p*-cumaroilquínico, apresentando absorção máxima na região do UV em 311 nm, a molécula protonada m/z 339,1073 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 337,0930 $[M-H]^-$, conforme o relatado na literatura (CLIFFORD et al., 2003; MARTUCCI et al., 2014; SAKAKIBARA et al., 2003; SUN et al., 2007). Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 30 e 31.

O pico 5 foi identificado como ácido 5-*O*-(*E*)-feruloilquínico, apresentando absorção máxima no UV em 297 nm e 326 nm, a molécula protonada m/z 369,1177 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 367,1034 $[M-H]^-$, bem como os padrões de fragmentação conforme o descrito na literatura (CLIFFORD et al., 2003; GOBBO-

NETO; LOPES, 2008; MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 32 e 33.

4.3.1.2 Flavonoides

4.3.1.2.1 Flavonas

Os flavonoides do tipo flavona apresentam absorções máximas no UV em 250 nm a 280 nm (Banda II) e em 310 nm a 350 nm (Banda I) (MARKHAM, 1982). Nas espécies analisadas, foram identificadas as flavonas vicenina-2 ($t_R= 7,15$ min), luteolina 7-*O*-glicuronídeo ($t_R= 9,01$ min), apigenina 7-*O*-glicuronídeo ($t_R= 10,13$ min), chrisoeriol 7-*O*-neohesperidosídeo ($t_R= 10,21$ min), chrisoeriol 7-*O*-glicuronídeo ($t_R= 10,58$ min), isoorientina 3'-*O*-glicosídeo ($t_R= 11,52$ min), luteolina ($t_R= 12,14$ min), acacetina 7-*O*-rutinosídeo ($t_R= 12,20$ min), acacetina 7-*O*-glicuronídeo ($t_R= 13,01$ min), apigenina ($t_R= 13,63$ min), chrisoeriol ($t_R= 14,22$ min), genkwanina ($t_R= 17,62$ min) e 3',4'-dimetoxiluteolina ($t_R= 18,15$ min).

O pico 4, identificado como vicenina-2, apresentou absorção máxima no UV em 271 nm e 334 nm. No espectro de massas observou-se a molécula protonada m/z 595,1656 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 593,1516 $[M-H]^-$, conforme o descrito na literatura (GOBBO-NETO; LOPES, 2008; MARTUCCI et al., 2014; SILVA et al., 2014; WANG et al., 2008). Os espectros de massas e de UV da vicenina-2 são apresentados nos Apêndices 34 e 35.

O pico 8 foi identificado como luteolina 7-*O*-glicuronídeo, apresentando absorção máxima no UV em 253 nm e 345 nm e um ombro em 267 nm, além da molécula protonada m/z 463,0867 $[M+H]^+$ e da molécula desprotonada m/z 461,0725 $[M-H]^-$, no espectro de massas (MARTUCCI et al., 2014; SAKAKIBARA et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 36.

O pico 13 foi identificado como apigenina 7-*O*-glicuronídeo. No espectro de massas observou-se a molécula protonada m/z 447,0919 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 445,0778 $[M-H]^-$; o espectro de UV apresentou absorção máxima em 267 nm e 336 nm (MARTUCCI et al., 2014; SAKAKIBARA et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 37.

Chrisoeriol 7-O-neohesperidosídeo (pico 14) apresentou absorção máxima no UV em 266 nm e 343 nm e um ombro em 290 nm, a molécula protonada m/z 609,1813 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 607,1676 $[M-H]^-$; enquanto que chrisoeriol 7-O-glicuronídeo (pico 16) apresentou absorção máxima no UV em 253nm e 343nm e um ombro em 266 nm, a molécula protonada m/z 477,1022 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 475,0879 $[M-H]^-$. No espectro de massas obtido por AIF, observou-se a perda das unidades dos açúcares (neohesperidose e glicuronil, respectivamente) com a formação dos íons fragmentos m/z 301 no modo positivo e m/z 299 no modo negativo, referentes à aglicona chrisoeriol (BRITO et al., 2014; MARTUCCI et al., 2014). O pico 26, identificado como chrisoeriol, apresentou absorção máxima no UV em 268 nm e 345 nm, a molécula protonada m/z 301,0703 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 299,0559 $[M-H]^-$ (PLAZONIĆ et al., 2009; SAKAKIBARA et al., 2003; WOLFENDER et al., 2000). Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 38 a 40.

O pico 17 foi identificado como isoorientina 3'-O-glicosídeo por apresentar absorção máxima no UV em 254nm e 336nm e um ombro em 269nm, a molécula protonada m/z 611,1391 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 609,1249 $[M-H]^-$, como o descrito na literatura (MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 41.

Luteolina (pico 19) apresentou absorção máxima no UV em 253 nm e 346 nm e ombros em 267 nm e 294 nm, de forma similar ao observado na literatura. No espectro de massas observou-se a molécula protonada m/z 287,0545 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 285,0400 $[M-H]^-$ (BRITO et al., 2014; MARTUCCI et al., 2014; PLAZONIĆ et al., 2009; SAKAKIBARA et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003; WOLFENDER et al., 2000). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 42.

Acacetina 7-O-rutinosídeo (pico 20) apresentou absorção máxima no UV em 268 nm e 335 nm e a molécula protonada m/z 593,1866 $[M+H]^+$. Acacetina-7-O-glicuronídeo (pico 22) apresentou absorção máxima no UV em comprimentos de onda semelhantes (268nm e 333nm), a molécula protonada m/z 461,1072 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 459,0933 $[M-H]^-$. Ambas as moléculas apresentaram, no modo AIF, a perda das unidades dos açúcares (rutinose e glicuronil, respectivamente) com a formação do íon fragmento referente a aglicona acacetina com m/z 285 no

modo positivo (observado nos espectros de massa dos picos 20 e 22) e m/z 283 no modo negativo (observado somente no espectro de massas do pico 22) (MARTUCCI et al., 2014; SHI et al., 2011). Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 43 e 44.

O pico 24 foi identificado como apigenina, apresentando absorção máxima no UV em 268 nm e 333 nm, a molécula protonada m/z 271,0598 [M+H]⁺ e a molécula desprotonada m/z 269,0455 [M-H]⁻, conforme os dados da literatura (BRITO et al., 2014; PLAZONIC et al., 2009; SAKAKIBARA et al., 2003; WOLFENDER et al., 2000). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 45.

O pico 33, identificado como genkwanina, apresentou absorção máxima no UV em 268 nm e 336 nm, a molécula protonada m/z 285,0753 [M+H]⁺ e a molécula desprotonada m/z 283,0612 [M-H]⁻. A comparação dos dados de UV e MS obtidos com informações da literatura permitiram a identificação deste metabólito (FABRE et al., 2001; SAKAKIBARA et al., 2003; WEI et al., 2016). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 46.

A flavona 3',4'-dimetoxiluteolina (pico 34) foi identificada de acordo com os dados de UV e MS descritos na literatura. O pico 34 apresentou absorção máxima no UV em 268 nm e 342 nm (característico de 3',4'-dimetoxiflavonas), a molécula protonada m/z 315,0858 [M+H]⁺ e a molécula desprotonada m/z 313,0718 [M-H]⁻ (MARKHAM, 1982; MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 47.

4.3.1.2.2 Flavonóis

Os flavonoides do tipo flavonol com hidroxila livre na posição C-3 apresentam comprimento de absorção máximo no UV da Banda II em 250 nm a 280 nm e da Banda I em 350 nm a 385 nm (MARKHAM, 1982). Nas espécies analisadas, foram identificados quercetina (t_R = 12,08 min) e kaempferol (t_R = 13,84 min).

O pico 18 foi identificado como quercetina, apresentando absorção máxima no UV em 254 nm e 371 nm, típico de flavonol. Além disso, a molécula protonada m/z 303,0496 [M+H]⁺, a molécula desprotonada m/z 301,0352 [M-H]⁻ e os íons fragmentos característicos permitiram a identificação deste metabólito (LIN; HARNLY, 2007; SAKAKIBARA et al., 2003; SUN et al., 2007; WOLFENDER et al., 2000). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 48.

O pico 25 foi identificado como kaempferol por apresentar absorção máxima no UV em 266 nm e 367 nm, a molécula protonada m/z 287,0548 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 285,0406 $[M-H]^-$. Adicionalmente, os padrões de fragmentação auxiliaram na identificação deste metabólito (LIN; HARNLY, 2007; MARTUCCI et al., 2014; SAKAKIBARA et al., 2003; WOLFENDER et al., 2000). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 49.

4.3.1.2.3 Flavonóis O-glicosídicos

Flavonóis O-glicosídicos, ou seja, com hidroxila substituída na posição C-3, apresentam absorção máxima no UV em 250 nm a 280 nm (Banda II) e em 330 nm a 360 nm (Banda I) (MARKHAM, 1982). Dentre os flavonóis O-glicosídicos, foram identificados: quercetina 3-O-rutinosídeo (t_R = 8,63 min); quercetina 3-O-glicosídeo (t_R = 8,84 min); kaempferol 3-O-rutinosídeo (t_R = 9,07 min); 7,3',5'-trihidroxil-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona (t_R = 9,73 min) e tilirosídeo (t_R = 12,52 min).

Os picos 6 e 7 foram identificados como flavonóis-O-glicosídeos que possuem como aglicona a quercetina. Ambos apresentaram comprimentos de absorção máxima no UV semelhantes (em cerca de 256 nm e 350 nm e um ombro em 266 nm), sendo possível diferenciá-los pelos espectros de massas. Quercetina 3-O-rutinosídeo (pico 6) apresentou, no modo positivo, o íon precursor m/z 611,1603 $[M+H]^+$ e os íons fragmentos m/z 465 e m/z 303 formados após a perda das unidades rhamnosil e rhamnosil-glicose, respectivamente. Quercetina 3-O-glicosídeo (pico 7) apresentou, no modo positivo, o íon precursor m/z 465,1024 $[M+H]^+$ e o íon fragmento m/z 303 formado após a perda da unidade glicosil (BRITO et al., 2014; LIN; HARNLY, 2007; MARTUCCI et al., 2014; SAKAKIBARA et al., 2003; TERMENTZI; KEFALAS; KOKKALOU, 2008). Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 50 e 51.

O pico 9 foi identificado como kaempferol 3-O-rutinosídeo, apresentando absorção máxima no UV em 265 nm e 344 nm e um ombro em 296 nm. No modo de ionização positivo do MS, observou-se o íon precursor m/z 595,1652 $[M+H]^+$ e os íons fragmentos m/z 449 e m/z 287 formados após a perda das unidades rhamnosil e rhamnosil-glicose, respectivamente. No modo negativo do MS, observou-se a molécula desprotonada m/z 593,1512 $[M-H]^-$ (LIN; HARNLY, 2007; MARTUCCI et al.,

2014; SAKAKIBARA et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 52.

O pico 12, identificado como 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona, apresentou absorção máxima no UV em 256 nm e 342 nm e um ombro em 268 nm, a molécula protonada m/z 479,1183 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 447,1039 $[M-H]^-$ (MORALES-ESCOBAR et al., 2007). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 53.

O pico 21 foi identificado como tilirosídeo por apresentar absorção máxima no UV em 267 nm e 315 nm e ombros em 297 nm e 355 nm, a molécula protonada m/z 595,1445 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 593,1302 $[M-H]^-$ característicos para este metabólito (GOBBO-NETO; LOPES, 2008; MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 54.

4.3.1.3 Lactonas Sesquiterpênicas

As lactonas sesquiterpênicas identificadas pertencem principalmente às classes dos hirsutinolidos e dos glaucolidos. Os hirsutinolidos apresentam absorção máxima no UV em cerca de 280 nm a 290 nm, enquanto que os glaucolidos apresentam absorção máxima no UV em aproximadamente 210 nm a 220 nm (BARDÓN et al., 1990; GIRARDI et al., 2016; KOTOWICZ et al., 1998; WILLIAMS et al., 2005; YOUN et al., 2014). Os dados de UV e de MS, principalmente no modo positivo, foram utilizados na identificação das lactonas sesquiterpênicas.

O pico 23 foi identificado como 8-O-(2-metilpropenoil)-hirsutinolido ($t_R = 13,35$ min) por apresentar absorção máxima no UV em 285 nm, a molécula protonada m/z 365, 1592 $[M+H]^+$, a molécula sodiada m/z 387,1409 $[M+Na]^+$ e os íons fragmentos m/z 347, m/z 279 e m/z 261 formados após a perda de uma molécula de água, perda da cadeia lateral em C-8 e perda de uma molécula de água e da cadeia lateral, respectivamente; sendo que tais padrões de fragmentação são característicos para esta classe de metabólitos (GIRARDI et al., 2016). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 55.

O pico 28, identificado como 8-tigloilóxi-hirsutinolido ($t_R = 14,69$ min), apresentou absorção máxima no UV em 286 nm, a molécula protonada m/z 379,1744 $[M+H]^+$, a molécula sodiada m/z 401,1562 $[M+Na]^+$ e os íons fragmentos m/z 361

(perda de uma molécula de água), m/z 279 (perda da unidade tiglato) e m/z 261 (perda de uma molécula de água a partir de m/z 279), conforme o relatado na literatura (GIRARDI et al., 2016). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 56.

O pico 30 foi identificado como piptocarphina A ($t_R= 15,79$ min), apresentado absorção máxima no UV em 289 nm, a molécula protonada m/z 423,1645 $[M+H]^+$, a molécula sodiada m/z 445,1458 $[M+Na]^+$ e os íons fragmentos característicos deste metabólito (GIRARDI et al., 2016; MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 57.

Além disso, os picos 27 e 32 ($t_R=14,37$ min e $t_R= 17,27$ min) foram identificados como prováveis hirsutinolídeos por apresentarem absorção máxima no UV em 287nm e 288 nm, respectivamente. Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 58 e 59.

O pico 29 foi identificado como deacilcinaropicrina ($t_R= 15,53$ min), uma lactona sesquiterpênica do tipo guaianólido, por apresentar absorção máxima no UV em 206 nm (típico para esta classe de lactona sesquiterpênica), a molécula protonada m/z 263,1273 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 261,1129 $[M-H]^-$ (BARDON et al., 1988; CARTAGENA et al., 2000; KHAN et al., 2004). Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 60.

Os picos 31 e 35 foram identificados como glaucólido B ($t_R= 15,90$ min) e glaucólido A ($t_R= 18,65$ min), respectivamente, apresentando absorção máxima no UV característica para esta classe de substâncias (em 220 nm) (PADOLINA et al., 1973; WILLIAMS et al., 2005). No espectro de massas do glaucólido B, observou-se a molécula protonada m/z 439,1592 $[M+H]^+$ e a molécula sodiada m/z 461,1407 $[M+Na]^+$; para o glaucólido A, observou-se a molécula protonada m/z 465,1746 $[M+H]^+$ e a molécula sodiada m/z 487,1564 $[M+Na]^+$. Para ambos os metabólitos os padrões de fragmentação obtidos por AIF foram semelhantes aos descritos na literatura (MARTUCCI et al., 2014). Os espectros de massas e de UV são apresentados nos Apêndices 61 e 62.

O pico 36, identificado como 8-tigloilóxiglaucólido A, apresentou absorção máxima no UV em 223 nm, a molécula protonada m/z 479,1903 $[M+H]^+$, a molécula sodiada m/z 501,1721 $[M+Na]^+$ e os íons fragmentos m/z 397 e m/z 379 produzidos após a perda da unidade tiglato e após a perda de uma molécula de água a partir de

m/z 397, respectivamente. Os espectros de massas e de UV são apresentados no Apêndice 63.

Na Tabela 11 são apresentadas as espécies analisadas neste estudo em que foram identificados os metabólitos previamente descritos. Além disso, são apresentadas também as espécies em que tais metabólitos já haviam sido anteriormente identificados e/ou isolados.

Tabela 11: Espécies do gênero *Vernonia s.l.* em que foram identificados os metabólitos descritos. São apresentadas as espécies analisadas neste estudo e em estudos anteriores realizados por outros autores.

Nome do metabólito (ID _{pico})	Espécies analisadas em que foi identificado	Espécies em que foi anteriormente relatado (Autor)
ácido 3-O-cafeoilquínico (1)	CC013; CS016; LA023; LA027; VA097; VB102; VB103; VD104; VD105; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM123; VM124; VM126; VM127; VM128; VP135; VP136; VP140; VR146; VV151; VW152; VW153	<i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014)
ácido 5-O-cafeoilquínico (2)	CC002; CD004; C0005; C0006; CP007; CP008; CV012; CC013; CH014; CM015; CS016; CS017; EH019; EH020; ES021; ES022; LA023; LA024; LA026; LA027; LC029; LC030; LC031; LC032; LC033; LC034; LE035; LE036; LG039; LO041; LR042; LR043; LR045; LR046; LA047; LA048; LA049; LA050; LC052; LC053; LD055; LD056; LD057; LF059; LG060; LG061; LG062; LG063; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LO069; LP070; LP071; LR075; LR076; LS077; LV078; LZ079; RF080; RF081; SA083; SB084; SH085; SJ086; SM087; SM088; SM089; ST091; SP092; SF093; SS095; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD109; VD111; VD112; VD113; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VO130; VO131; VP132; VP134; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VR145; VR146; VR147; VT148; VT149; VV151; VW152; VW153; VW154	<i>Vernonia brasiliiana</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia discolor</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonanthura ferruginea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia glabrata</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia herbacea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico (3)	CC003; CO006; CP008; CS016; LA023; LA027; LR045; LR046; LG063; LP071; LZ079; SS095; VD114; VM123; VV151	<i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014)
vicenina-2 (4)	CS011; EH020; LA023; LR042; LR046; LP071; VL121; VO131	<i>Vernonia glabrata</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)

ácido 5- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloilquínico (5)	CO016; LA026; LC031; LC032; LO041; LG061; LG063; LL064; LO068; LO069; LP071; LZ079; VB101; VH118; VR145; VR146; VW153	<i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
quercetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo (6)	CC003; CP008; CV012; CS016; LA027; LC030; LC031; LC032; LC033; LC057; LR045; LR046; LA047; LB051; LD055; LD056; LD057; LF059; LG060; LG061; LG062; LG063; LL064; LL066; LO068; LO069; LP071; LZ079; SB084; VB098; VB099; VB101; VD114; VF116; VH117; VH118; VH120; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VP135; VP138; VP139; VP141; VR145; VR146; VV151	<i>Vernonia desertorum</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia lithospermifolia</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia platensis</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia verbascifolia</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia propinqua</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia herbacea</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia simplex</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia mapirensis</i> (MORALES-ESCOBAR et al., 2007); <i>Vernonia discolor</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonanthura ferrugínea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia glabrata</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia herbacea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo (7)	CP007; CP008; CV012; CS016; EH019; LA026; LA027; LC031; LC032; LC033; LO041; LA047; LA048; LB051; LC052; LC053; LD055; LD056; LF059; LG060; LG061; LG062; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LP070; LP071; LP073; LR075; LR076; LS077; LV078; LZ079; SS095; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD114; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM125; VM126; VM127; VM128; VO131; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VR145; VR146; VT148; VT149; VV151; VW153	<i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia brasiliiana</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia discolor</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonanthura ferrugínea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia herbácea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014)

luteolina 7-O-glicuronídeo (8)	CD004; CV012; CC013; CS016; LA026; LC030; LC031; LO041; LA047; LB051; LF059; LG061; LL065; LL066; LO068; LP070; LP073; LR076; LS077; LV078; RF080; SH085; SH087; SM088; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD109; VD111; VD112; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM125; VM127; VM128; VM129; VO130; VO131; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VT148; VT149; VT150; VW152; VW153	<i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014)
kaempferol 3-O-rutinosídeo (9)	LO069; VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VH117; VH119; VL121; VM122; VO131; VP135; VP137; VT148; VT149; VW151	<i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014)
ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico(10)	CD004; CO005; CC013; CH014; CM015; CS016; CS017; EH019; ES022; LA023; LA024; LA026; LA027; LC031; LC032; LC033; LC034; LG039; LO041; LR043; LR046; LA047; LA048; LA050; LC052; LC053; LD056; LF059; LG060; LG061; LG062; LG063; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LO069; LP070; LP071; LR075; LR076; LS077; LZ079; RF080; RF081; SA083; SH085; SJ086; SM087; SM088; SM089; ST090; ST091; SP092; SF093; SS095; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD109; VD111; VD112; VD113; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VO131; VP132; VP133; VP134; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VR145; VR146; VR147; VT148; VT149; VW152; VW153	<i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia brasiliiana</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia discolor</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonanthura ferrugínea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia glabrata</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia herbacea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (11)	CS016; LL064; LP071; VA097; VB102; VB103; VD104; VH117; VH118; VM124; VM128; VR146; VT148; VW151; VW152, VW153.	<i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia brasiliiana</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia discolor</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonanthura ferrugínea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia glabrata</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014);

		<i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia herbacea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona (12)	LA026; LA027; LA047; LC052; LC053; LC054; LG061; LG063; LL064; LO068; LP070; LP071; LP073; LR075; LR076; LS077; LV078; VA097; VB102; VB103; VD104; VD106; VD107; VD115; VH117; VH118; VM126; VM127; VM 128; VP134; VP136; VP137; VP140; VP141; VP142; VR146; VT149; VV151; VW152; VW153	<i>Vernonia mapirensis</i> (MORALES-ESCOBAR et al., 2007)
apigenina 7-O-glicuronídeo (13)	CD004; CC013; LE035; LO041; LD056; RF080; SM087; SM088; VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VD112; VH117; VH119; VL121; VM122; VM129; VO130; VP135; VP136; VP140; VP142; VP143; VT149; VW153	<i>Vernonia brasiliiana</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014)
chrisoeriol 7-O-neohesperidosídeo (14)	CS016; LC029; LC030	<i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (15)	CM015; CS016; CS017; EH019; LA023; LA024; LA027; LC034; LG039; LR046; LA050; LC052; LG060; LG061; LL065; LL066; LP070; LS077; LV078; LZ079; SM088; ST091; SP092; VB100; VH117; VH120; VL121; VM127 VM129; VO131; VP132; VP134; VP136; VP140; VR145; VR147; VV151	<i>Vernonia brasiliiana</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia discolor</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonanthura ferruginea</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia glabrata</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia linearifolia</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
chrisoeriol 7-O-glicuronídeo (16)	CD004; LR042; SM087; VD112; VD114; VL121; VM129; VO130	<i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014)

isoorietina 3'-O-glicosídeo (17)	LC052; LO069; SA083; SM089; SS095; VB102; VD114; VH117; VP142; VW153	<i>Vernonia onopordioides</i> (MARTUCCI et al., 2014)
quercetina (18)	CS011; CH014; LA026; LA027; LB028; LG040; LR045; LR046; LA050; LB051; LC054; LL066; LP070; LP072; LP073; LP074; LS077; LV078; SF093	<i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013); <i>Vernonia patens</i> (WAGNER et al., 1972); <i>Vernonia mapirensis</i> (MORALES-ESCOBAR et al., 2007)
luteolina (19)	CD004; CC013; CH014; CM015; CS018; ES021; LE038; LG039; LR045; LR046; SA082; SA083; SH085; SJ086; SM087; SM089; ST090; ST091; SP092; VA097; VB098; VB100; VB101; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD110; VD111; VD112; VD113; VD114; VD115; VH117; VH119; VL121; VM122; VM123; VM125; VM126; VM127; VM129; VO130; VO131; VP135; VP136; VP137; VP143; VR147; VT148; VT149; VT150; VW153	<i>Vernonia desertorum</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia lithospermifolia</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia flexuosa</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia herbacea</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia simplex</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia scorpioides</i> (BUSKUHL et al., 2010; MACHADO et al., 2013); <i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013); <i>Vernonia nitidula</i> (BARDON et al., 1988); <i>Vernonia patens</i> (WAGNER et al., 1972); <i>Vernonia platensis</i> (KING; JONES, 1982; MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
acacetina 7-O-rutinosídeo (20)	CC002; CC003; CD004; CM015; CS016; CS017; LA025; LC030; LC034; LE038	<i>Vernonia mapirensis</i> (MORALES-ESCOBAR et al., 2007)
tilirosídeo (21)	CC003; CD004; CV012; EH020; ES021; LG039; LG040; VD109	<i>Lepidaploa cotoneaster</i> (DOS SANTOS et al., 2012); <i>Vernonia platensis</i> (MARTUCCI et al., 2014)
acacetina 7-O-glicuronídeo (22)	CD004; VD112; VO130	<i>Vernonia polyanthes</i> (MARTUCCI et al., 2014)
8-O-(2-metilpropenoil) hirsutinólido (23)	SP092; ST096	<i>Vernonanthura pinguis</i> (BORKOSKY et al., 1997)

apigenina(24)	CD004; CC013; CS017; LE035; LE038; LG040; LR045; LR046; SA083; SJ086; SF093; ST096; VA097; VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VD113; VH119; VL121; VM122; VM123; VM125; VM127; VM129; VO130; VO131; VP135; VP137; VP143; VT150.	<i>Vernonia desertorum</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia lithospermifolia</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia flexuosa</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia platensis</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia herbacea</i> KING; JONES, 1982); <i>Vernonia simplex</i> (KING; JONES, 1982); <i>Vernonia nudiflora</i> (BARDON et al., 1992); <i>Chrysolaena verbascifolia</i> (BARDON et al., 1992); <i>Vernonia scorpioides</i> (BUSKUHL et al., 2010); <i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013); <i>Vernonia nitidula</i> (BARDÓN et al., 1988)
kaempferol (25)	LG039; LG040; LR045; LR046; LB051; LC054; LP070; LP074; VH118; VM125; VM127	<i>Vernonia patens</i> (WAGNER et al., 1972) <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
chrisoeriol (26)	CD004; CP009; CS011; CM015; CS018; LE038; LR045; RF080; RF081; SA083; SM087; ST090; SP092; SF093; SS095; ST096; VA097; VB098 VB100; VD106; VL121; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM129; VO130; VO131; VP143; VP146; VP140; VT148	<i>Vernonia nudiflora</i> (BARDON et al., 1992); <i>Vernonia chamaedrys</i> (CATALÁN et al., 1988)
provável hirsutinolido (27)	ST096	---
8-tigloilóxi hirsutinolido (28)	VD108; VD110	<i>Vernonanthura pinguis</i> (BORKOSKY et al., 1997)
deacilcinaropicrina (29)	VP132; VP133; VP134	<i>Vernonia nitidula</i> (BARDÓN et al., 1988)

piptocarphina A (30)	LA023; LA024; LC032; LC033; VM123; VM126; VP136	<i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia ervendbergii</i> (DOMÍNGUEZ et al., 1986); <i>Vernonanthura squamulosa</i> (CATALÁN et al., 1986; KOTOWICZ et al., 1998); <i>Vernonia brasiliana</i> (MARTUCCI et al., 2014)
glaucolido B (31)	CC001; CC003; CP007; CP008; CP009; CS011; CH014; LA026; LA027; LE036; LG040; LR042; LR044; LR045; LR046; LA049; LP070; LV078	<i>Vernonia cognata</i> (BARDON et al., 1988); <i>Chrysolaena propinqua</i> (BARDON et al., 1992); <i>Vernonia nudiflora</i> (BARDON et al., 1992); <i>Lepidaploa remotiflora</i> (VALDÉS et al., 1998); <i>Vernonia fruticulosa</i> (BAZON et al., 1997); <i>Cyrtocymura cincta</i> (BORKOSKY et al., 1996); <i>Eirmocephala megaphylla</i> (BORKOSKY et al., 1996); <i>Vernonia chalybaea</i> (BOHLMANN et al., 1982); <i>Vernonia eremophila</i> (ALARCON; CALLEGARI LOPES; HERZ, 1990); <i>Vernonia fulva</i> (CATALÁN et al., 1985); <i>Vernonia baldwinii</i> (PADOLINA et al., 1973); <i>Vernonia rufogrisea</i> (MARTUCCI et al., 2014)
provável hirsutinolido (32)	LA023; LC032; SP092; SF093; SS094; ST096; VM126	---
genkwanina (33)	CD004; CM015; CS016; CS017; CS018; LA025; LC034; LE038; SB084; SP092; ST096; VA097; VD104; VM123; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VP136; VP140; VP142; VP143; VT150	<i>Vernonia nudiflora</i> (BARDON et al., 1992)

3',4'-dimetoxiluteolina (34)	ST096; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD107; VL121; VM123; VM124; VM126; VM128; VM129; VO131; VP136; VP140; VP142	<i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014)
glaucólido A (35)	SF093; SS095; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD106; VD107; VM123; VM128; VM129; VP136; VP137; VP140; VP141; VT150	<i>Vernonia gigantea</i> (BOHLMANN et al., 1981); <i>Vernonia nudiflora</i> (BOHLMANN et al., 1981); <i>Vernonia chamaedrys</i> (CATALÁN et al., 1988); <i>Vernonia polyanthes</i> (IGUAL et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014); <i>Vernonia ervendbergii</i> (DOMINGUEZ et al., 1986); <i>Vernonia glauca</i> (PADOLINA et al., 1973); <i>Vernonanthura squamulosa</i> (CATALÁN et al., 1986; KOTOWICZ et al., 1998); <i>Vernonia incana</i> (BARDÓN et al., 1990); <i>Vernonanthura pinguis</i> (BORKOSKY et al., 1997)
8-tigloilóxi-glaucólido A (36)	SF093; SS095; VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD105; VD106; VD107; VM123; VM126; VP136; VP137; VP140; VP142; VT148; VT150	<i>Vernonia nudiflora</i> (BARDON et al., 1992); <i>Vernonia ervendbergii</i> (DOMINGUEZ et al., 1986)

Legenda: ID_{pico}, identificação do pico cromatográfico de acordo com a Tabela 10. As informações espectroscópicas e espectrométricas utilizadas para a identificação dos metabólitos são apresentadas na Tabela 10. Os códigos das espécies analisadas são fornecidos na Tabela 2.

4.3.2 Identificação dos metabólitos discriminantes

O VIP *plot* descreve quais X-variáveis caracterizam o bloco X e estão, ao mesmo tempo, relacionadas com Y (grupos definidos a partir da análise por HCA), ou seja, o VIP resume a contribuição geral de cada variável para o modelo, levando em consideração tanto o bloco X, quanto a resposta Y. As variáveis são organizadas em ordem crescente de importância, sendo que valores maiores que 1 são considerados “importantes” e valores menores que 0,5 são considerados “não importantes”. As variáveis que apresentam valores entre 1 e 0,5 constituem a “região cinza”, sendo que a importância destas depende do tamanho do conjunto de dados (ERIKSSON et al., 2013). Os metabólitos discriminantes indicados pelo VIP são apresentados no Apêndice 64.

De acordo com o VIP *plot*, foram determinadas 436 variáveis com valores de VIP maiores que 1, sendo estas responsáveis pela separação entre os quatro grupos produzidos pela análise por HCA. As variáveis indicadas pelo VIP referem-se aos metabólitos no modo de ionização negativo e/ou positivo, bem como possíveis fragmentos destes. Assim, as 436 variáveis indicadas não representam 436 metabólitos diferentes, já que o mesmo metabólito pode ter sido indicado mais de uma vez. A Figura 24 apresenta o VIP *plot* obtido a partir da análise por OPLS-DA.

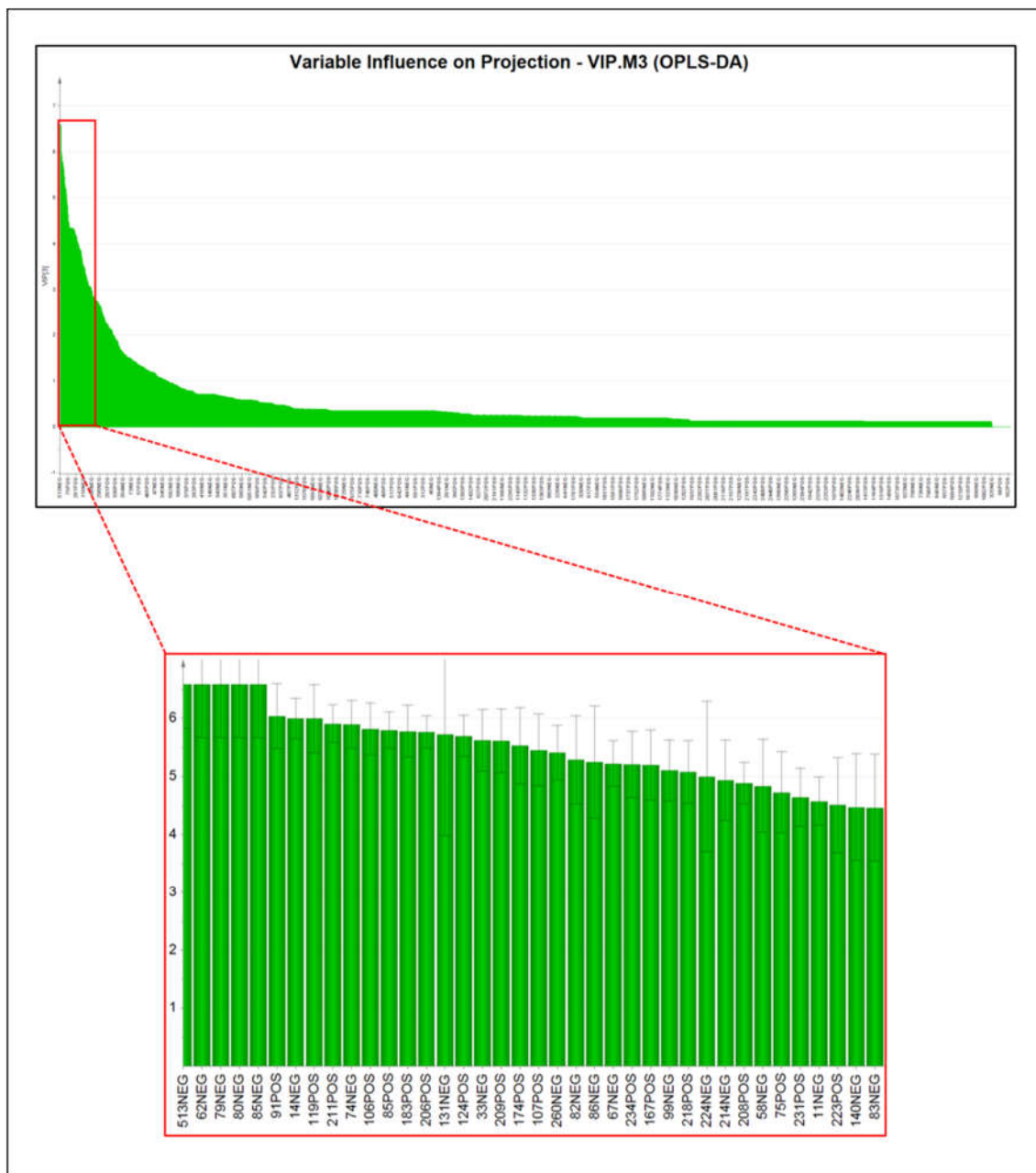
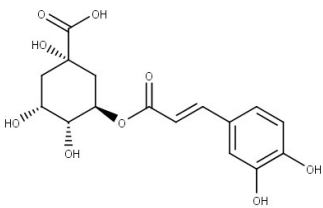
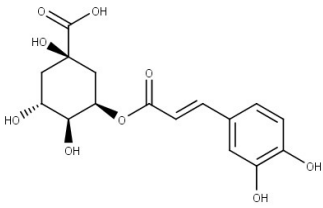
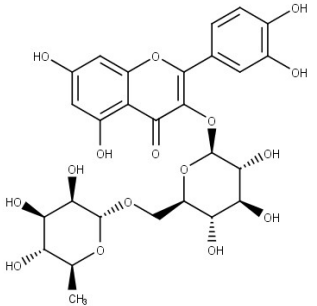


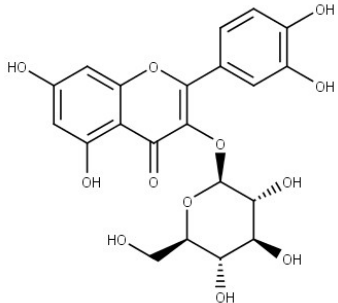
Figura 24: VIP plot obtido a partir da análise por OPLS-DA. Em destaque é mostrado a ampliação da parte inicial do VIP plot.

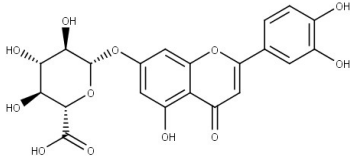
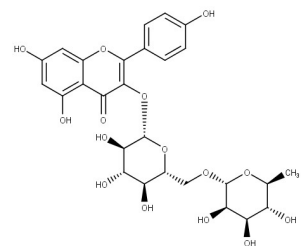
A partir das variáveis com valores de VIP maiores que 1 e utilizando a biblioteca de dados previamente construída, bem como as informações espectroscópicas e espectrométricas de cada pico, foram identificados 21 metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos. Os metabólitos identificados como discriminantes são apresentados na Tabela 12.

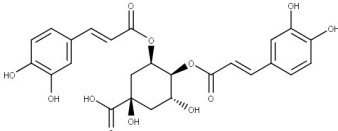
Tabela 12: Metabólitos identificados como discriminantes para as espécies analisadas de acordo com os grupos definidos na análise por HCA.

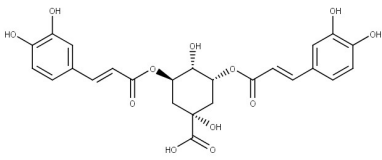
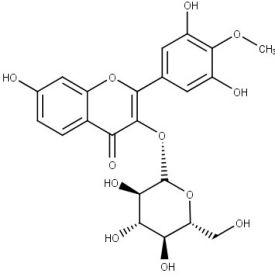
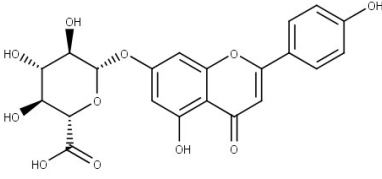
ID _{pico}	Estrutura, nome e classe do metabólito	ID _{discriminante}	Indicado como discriminante em	Anteriormente relatado em
1	 <p>ácido 3-O-cafeoilquínico Ácido clorogênico</p>	565NEG (VIP= 2,09) <i>m/z</i> 353,0879 <i>t_R</i> = 4,88	Grupo 2: VA097; VB102; VB103; VD104; VD105; VH118; VH119; VH120; VL121; VM123; VM124; VM127; VM128; VP135; VP136; VP140; VW152; VW153 Grupo 3: CC013; CS016 Grupo 4: LA023; LA027	<i>Vernonia polyanthes</i> ; <i>Vernonia linearifolia</i> ; <i>Vernonia onopordioides</i> ; <i>Vernonia platensis</i>
		825POS (VIP=1,20) <i>m/z</i> 355,1017 <i>t_R</i> = 4,90	Grupo 2: VB102; VH117; VH118; VM124; VM126; VM127; VM128; VR146; VV151; VW153	
2	 <p>ácido 5-O-cafeoilquínico Ácido clorogênico</p>	21NEG (VIP=1.07) <i>m/z</i> 353,0879 <i>t_R</i> = 5,93	Grupo 1: LS077; LV078; LZ079; RF080; RF081; SA083; SB084; SH085; SJ086; SM087; SM088; SM089; ST091; SP092; SF093; SS095; Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD109; VD111; VD112; VD113; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VO130; VO131; VP132; VP134; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VR145; VR146; VR147; VT148; VT149; VV151; VW152; VW153; VW154 Grupo 3: CC002; CD004; C0005; C0006; CP007; CP008; CV012; CC013; CH014; CM015; CS016; CS017; EH019; EH020; ES021; ES022 Grupo 4: LA023; LA024; LA026; LA027; LC029; LC030; LC031; LC032; LC033; LC034; LE035; LE036; LG039; LO041; LR042; LR043; LR045; LR046; LA047;	<i>Vernonia brasiliana</i> ; <i>Vernonia discolor</i> ; <i>Vernonanthura ferruginea</i> ; <i>Vernonia polyanthes</i> ; <i>Vernonia glabrata</i> ; <i>Vernonia linearifolia</i> ; <i>Vernonia onopordioides</i> ; <i>Vernonia herbacea</i> ; <i>Vernonia platensis</i> ; <i>Vernonia rufogrisea</i>

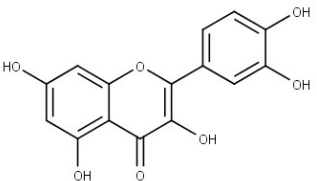
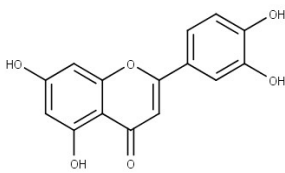
			LA048; LA049; LA050; LC052; LC053; LD055; LD056; LD057; LF059; LG060; LG061; LG062; LG063; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LO069; LP070; LP071; LR075; LR076	
		192POS (VIP= 5,92) m/z 355,1018 t_R = 5,92	Grupo 1: LR075; LR076; LS077; LV078; LZ079; RF080; RF081; SB084; SM087; SM088; SM089; ST091 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD112; VD114; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VO131; VP134; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VR145; VR146; VT148; VT149; VV151; VW152; VW153 Grupo 3: CD004; CC013; CS016; CS017; EH019 Grupo 4: LA023; LA024; LA026; LA027; LC030; LC031; LC032; LC033; LC034; LE035; LG039; LO041; LR042; LR043; LR045; LR046; LA047; LA048; LC052; LC053; LD056; LF059; LG060; LG061; LG062; LG063; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LO069; LP071	
6	 <p>quercetina 3-O-rutinosídeo (Flavonol O-glicosídico)</p>	264NEG (VIP= 2,53) m/z 609,1462 t_R = 8,63	Grupo 1: LZ079; SB084 Grupo 2: VB098; VB099; VB101; VD114; VF116; VH117; VH118; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VP135; VP138; VP139; VP141; VR145; VR146; VV151 Grupo 3: CC003; CP008; CV012; CS016 Grupo 4: LA027; LC030; LC031; LC032; LC033; LC057; LR045; LR046; LA047; LB051; LD055; LD056; LD057; LF059; LG060; LG061; LG062; LG063; LL064; LL066; LO068; LO069; LP071	<i>Vernonia desertorum</i> ; <i>Vernonia lithospermifolia</i> ; <i>Vernonia platensis</i> ; <i>Vernonia verbascifolia</i> ; <i>Vernonia propinqua</i> ; <i>Vernonia herbácea</i> ; <i>Vernonia simplex</i> ; <i>Vernonia mapirensis</i> ; <i>Vernonia discolor</i> ; <i>Vernonanthura ferruginea</i> ; <i>Vernonia glabrata</i> ;

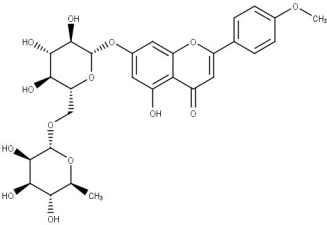
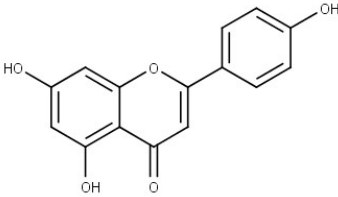
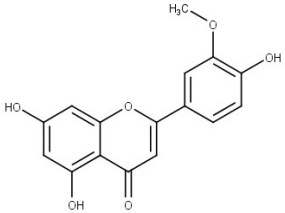
		<p>394POS (VIP= 2,28) <i>m/z</i> 611,1598 <i>t_R</i>=8,63</p>	<p>Grupo 1: LZ079 Grupo 2: VB098; VB101; VD114; VF116; VH118; VH120; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VP138; VP141; VR145; VR146; VV151 Grupo 3: CP008; CS016 Grupo 4: LA027; LC031; LC032; LC057; LR045; LR046; LB051; LD055; LD056; LF059; LG060; LG061; LG062; LL064; LL066; LO068; LO069; LP071</p>	<p><i>Vernonia linearifolia</i>; <i>Vernonia onopordioides</i>; <i>Vernonia herbácea</i>; <i>Vernonia platensis</i>; <i>Vernonia rufogrisea</i></p>
7	 <p>quercetina 3-O-glicosídeo (Flavonoide O-glicosídico)</p>	<p>6NEG (VIP= 2,66) <i>m/z</i> 463,0884 <i>t_R</i>= 8,85</p>	<p>Grupo 1: LR075; LR076; LS077; LV078; LZ079; SS095 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD114; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM125; VM126; VM127; VM128; VO131; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VR146; VT148; VT149; VV151; VW153 Grupo 3: CP007; CP008; CV012; CS016; EH019 Grupo 4: LA026; LA027; LC031; LC032; LC033; LO041; LA047; LA048; LB051; LC052; LC053; LD056; LF059; LG061; LG062; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LP070; LP073</p>	<p><i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia brasiliiana</i>; <i>Vernonia discolor</i>; <i>Vernonanthura ferruginea</i>; <i>Vernonia herbacea</i>; <i>Vernonia platensis</i></p>
		<p>185POS (VIP= 2,78) <i>m/z</i> 465,1021 <i>t_R</i>= 8,83</p>	<p>Grupo 1: LR075; LR076; LS077; LV078; LZ079 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB101; VD104; VD105; VD106; VD107; VD114; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VR145; VR146; VT148; VT149; VV15 Grupo 3: CV012; CS016; EH019 Grupo 4: LA026; LC031; LC032; LC033; LA047; LA048; LB051; LC052; LC053; LD055; LD056; LF059; LG060; LG061; LG062; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LP070; LP071; LP073</p>	

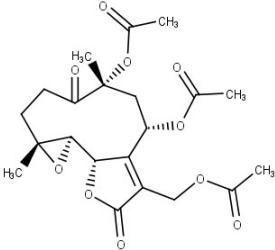
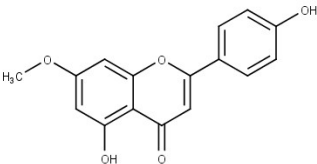
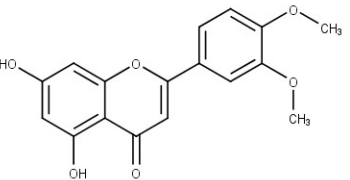
8	 <p>luteolina 7-O-glicuronídeo (Flavona)</p>	<p>90NEG (VIP= 3,37) <i>m/z</i> 461,0730 <i>t_R</i>=9,00</p>	<p>Grupo 1: LR076; LS077; LV078; RF080; SH085; SH087; SM088</p> <p>Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD109; VD111; VD112; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM125; VM127; VM128; VM129; VO130; VO131; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VT148; VT149; VT150; VW152; VW153</p> <p>Grupo 3: CD004; CV012; CC013; CS016</p> <p>Grupo 4: LA026; LC030; LC031; LO041; LA047; LB051; LF059; LG061; LL065; LL066; LO068; LP070; LP073</p>	<p><i>Vernonia polyanthes</i></p>
9	 <p>kaempferol 3-O-rutinosídeo (Flavonoide O-glicosídico)</p>	<p>787POS* (Fragmento) (VIP= 1,78) <i>m/z</i> 287,0541 <i>t_R</i>= 9,07</p>	<p>Grupo 2: VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VH117; VH119; VL121; VM122; VO131; VP135; VP137; VT148; VT149; VV151</p> <p>Grupo 4: LO069</p>	<p><i>Vernonia onopordioides</i></p>

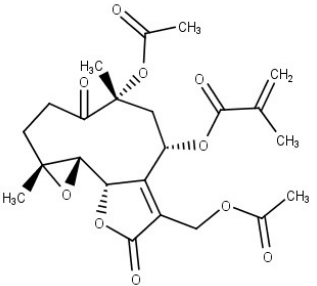
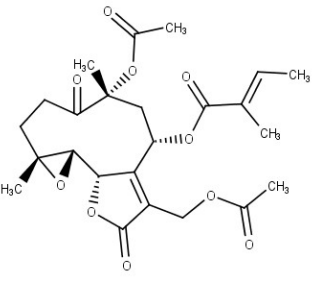
10	 <p>ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico (Ácido clorogênico)</p>	<p>4NEG (VIP= 2,16) m/z 515,1195 t_R= 9,68</p>	<p>Grupo 1: LR075; LR076; LS077; LZ079; RF080; RF081; SA083; SH085; SJ086; SM087; SM088; SM089; ST090; ST091; SP092; SF093; SS095</p> <p>Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD109; VD111; VD112; VD113; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VO131; VP132; VP133; VP134; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VR145; VR146; VR147; VT148; VT149; VW152; VW153</p> <p>Grupo 3: CD004; CO005; CC013; CH014; CM015; CS016; CS017; EH019; ES022</p> <p>Grupo 4: LA023; LA024; LA026; LA027; LC031; LC032; LC033; LC034; LO041; LR043; LR046; LA047; LA048; LA050; LC053; LD056; LF059; LG062; LG063; LL064; LL065; LL066; LO067; LO068; LO069; LP070; LP071</p>	<p><i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia brasiliana</i>; <i>Vernonia discolor</i>; <i>Vernonanthura ferruginea</i>; <i>Vernonia glabrata</i>; <i>Vernonia linearifolia</i>; <i>Vernonia onopordioides</i>; <i>Vernonia herbacea</i></p>
	<p>280POS (VIP= 2,64) m/z 517,1334 t_R= 9,68</p>	<p>Grupo 1: LR075; LZ079; RF080; RF081; SA083; SH085; SM087; SM088; SM089; ST091</p> <p>Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VB102; VB103; VD104; VD105; VD106; VD107; VD112; VD114; VD115; VF116; VH117; VH118; VH119; VH120; VL121; VM122; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VO131; VP132; VP134; VP135; VP136; VP137; VP138; VP139; VP140; VP141; VP142; VP143; VP144; VR145; VR146; VT148; VT149; VW152; VW153</p> <p>Grupo 3: CC013; CM015; CS016; CS017; EH019</p> <p>Grupo 4: LA023; LA027; LC031; LG039; LO041; LR046; LA047; LA048; LC052; LC053; LG060; LG061; LV078; LG062; LG063; LL064; LL065; LO067; LO068; LO069; LP071</p>		

11	 <p>ácido 3,5-di-O-caffeoilquínico (Ácido clorogênico)</p>	<p>573NEG* (VIP= 1,51) <i>m/z</i> 353,0871 <i>t_R</i>= 9,71</p>	<p>Grupo 2: VA097; VB102; VB103; VD104; VH117; VH118; VM124; VM128; VR146; VT148; VV151; VW152, VW153</p> <p>Grupo 3: CS016</p> <p>Grupo 4: LL064; LP071</p>	<p><i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia brasiliiana</i>; <i>Vernonia discolor</i>; <i>Vernonanthura ferruginea</i>; <i>Vernonia glabrata</i>; <i>Vernonia linearifolia</i>; <i>Vernonia onopordioides</i>; <i>Vernonia herbacea</i>; <i>Vernonia platensis</i>; <i>Vernonia rufogrisea</i></p>
12	 <p>7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona (Flavonoide O-glicosídico)</p>	<p>56NEG (VIP= 1,88) <i>m/z</i> 477,1039 <i>t_R</i>= 9,72</p>	<p>Grupo 1: LR075; LR076; LS077; LV078</p> <p>Grupo 2: VA097; VB102; VB103; VD104; VD106; VD107; VD115; VH117; VH118; VM126; VM127; VM128; VP134; VP136; VP137; VP140; VP141; VP142; VR146; VT149; VV151; VW152; VW153</p> <p>Grupo 4: LA026; LA027; LA047; LC052; LC053; LC054; LG061; LG063; LL064; LO068; LP070; LP071; LP073</p>	<p><i>Vernonia mapirensis</i></p>
13	 <p>apigenina 7-O-glicuronídeo (Flavona)</p>	<p>354NEG (VIP= 1,63) <i>m/z</i> 445,0778 <i>t_R</i>= 10,13</p>	<p>Grupo 1: RF080; SM087; SM088</p> <p>Grupo 2: VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VD112; VH117; VH119; VL121; VM122; VM129; VO130; VP135; VP136; VP140; VP142; VP143; VT149; VW153</p> <p>Grupo 3: CD004; CC013</p> <p>Grupo 4: LE035; LO041; LD056</p>	<p><i>Vernonia brasiliiana</i>; <i>Vernonia polyanthes</i></p>

		<p>486POS (VIP= 1,86) <i>m/z</i> 447,0914 <i>t_R</i>= 10,14</p>	<p>Grupo 1: RF080; SM087; SM088 Grupo 2: VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VD112; VH117; VH119; VL121; VM122; VM129; VO130; VP135; VP136; VP140; VP142; VP143; VT149; VW153 Grupo 3: CD004; CC013 Grupo 4: LE035; LO041</p>	
18	 <p>quercetina (Flavonol)</p>	<p>154NEG (VIP= 1,46) <i>m/z</i> 301.0355 <i>t_R</i>= 12.08</p>	<p>Grupo 1: LS077; LV078; SF093 Grupo 3: CS011; CH014 Grupo 4: LA026; LA027; LB028; LG040; LR045; LR046; LA050; LB051; LC054; LL066; LP070; LP072; LP073; LP074</p>	<p><i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia patens</i>; <i>Vernonia mapirensis</i></p>
19	 <p>luteolina (Flavona)</p>	<p>298NEG (VIP= 2,67) <i>m/z</i> 285,0406 <i>t_R</i>= 12,14</p>	<p>Grupo 1: SA082; SA083; SH085; SJ086; SM087; SM089; ST090; ST091; SP092 Grupo 2: VA097; VB098; VB100; VB101; VD104; VD105; VD106; VD107; VD108; VD110; VD111; VD112; VD113; VD114; VD115; VH117; VH119; VL121; VM122; VM123; VM125; VM126; VM127; VM129; VO130; VO131; VP135; VP136; VP137; VP143; VR147; VT148; VT149; VT150; VW153 Grupo 3: CD004; CC013; CH014; CM015; CS018; ES021 Grupo 4: LE038; LG039; LR045; LR046</p>	<p><i>Vernonia desertorum</i>; <i>Vernonia lithospermifolia</i>; <i>Vernonia flexuosa</i>; <i>Vernonia herbacea</i>; <i>Vernonia simplex</i>; <i>Vernonia scorpioides</i>; <i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia nitidula</i>; <i>Vernonia patens</i>; <i>Vernonia platensis</i>; <i>Vernonia rufogrisea</i></p>
		<p>457POS (VIP= 1,59) <i>m/z</i> 287,0545 <i>t_R</i>= 12,14</p>	<p>Grupo 1: SA082; SA083; SJ086; SM087; SM089; SP092 Grupo 2: VA097; VB100; VD104; VD106; VD107; VD108; VD110; VD112; VD113; VD115; VH119; VL121; VM122; VM127; VM129; VO130; VO131; VP137; VP143; VT148; VT150 Grupo 3: CC013 Grupo 4: LE038; LR045; LR046</p>	

20	 <p>acacetina 7-O-rutinosídeo (Flavona)</p>	<p>419POS (VIP= 1,03) <i>m/z</i> 593,1856 <i>t_R</i>= 12,20</p>	<p>Grupo 3: CC002; CC003; CD004; CM015; CS016; CS017 Grupo 4: LA025; LC030; LC034; LE038</p>	<p><i>Vernonia mapirensis</i></p>
24	 <p>apigenina (Flavona)</p>	<p>385NEG (VIP= 1,35) <i>m/z</i> 269,0456 <i>t_R</i>= 13,63</p>	<p>Grupo 1: SA083; SJ086; SF093; ST096 Grupo 2: VA097; VB100; VD104; VD105; VD106; VD107; VD113; VH119; VL121; VM122; VM123; VM125; VM127; VM129; VO130; VO131; VP135; VP137; VP143; VT150 Grupo 3: CD004; CC013; CS017 Grupo 4: LE035; LE038; LG040; LR045; LR046</p>	<p><i>Vernonia desertorum</i>; <i>Vernonia lithospermifolia</i>; <i>Vernonia flexuosa</i>; <i>Vernonia platensis</i>; <i>Vernonia herbacea</i>; <i>Vernonia simplex</i>; <i>Vernonia nudiflora</i>; <i>Chrysolaena verbascifolia</i>; <i>Vernonia scorpioides</i>; <i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia nitidula</i></p>
26	 <p>chrisoeriol (Flavona)</p>	<p>357NEG (VIP= 2,20) <i>m/z</i> 299,0562 <i>t_R</i>= 14,22</p> <p>467POS (VIP= 1,89) <i>m/z</i> 301,0702 <i>t_R</i>= 14,24</p>	<p>Grupo 1: RF080; SA083; ST090; SP092; SF093; ST096 Grupo 2: VA097; VB100; VL121; VM125; VM127; VM129; VP143 Grupo 3: CD004; CP009; CS011; CM015; CS018; Grupo 1: RF080; RF081; SA083; SM087; ST090; SP092; SF093; SS095; ST096 Grupo 2: VA097; VB098; VB100; VD106; VL121; VM123; VM124; VM125; VM126; VM127; VM129; VO130; VO131; VP143; VP146; VP140; VT148 Grupo 3: CD004; CP009; CS011; CM015; CS018 Grupo 4: LE038; LR045</p>	<p><i>Vernonia nudiflora</i>; <i>Vernonia chamaedrys</i></p>

31	 <p style="text-align: center;">glaucolido B (Lactona Sesquiterpênica – Glaucolido)</p>	<p>241POS (VIP= 1,24) <i>m/z</i> 439,1591 <i>t_R</i>= 15,90</p>	<p>Grupo 1: LV078 Grupo 3: CC001; CC003; CP007; CP008; CP009; CS011; CH014 Grupo 4: LA026; LA027; LE036; LG040; LR042; LR044; LR045; LR046; LA049; LP070</p>	<p><i>Vernonia cognata</i>; <i>Chrysolaena propinqua</i>; <i>Vernonia nudiflora</i>; <i>Lepidaploa remotiflora</i>; <i>Vernonia fruticulosa</i>; <i>Cyrtocymura cincta</i>; <i>Eirmocephala megaphylla</i>; <i>Vernonia chalybaea</i>; <i>Vernonia eremophila</i>; <i>Vernonia fulta</i>; <i>Vernonia baldwinii</i>; <i>Vernonia rufogrisea</i></p>
32	<p style="text-align: center;">provável hirsutinolido</p>	<p>537POS (VIP= 1,24) <i>m/z</i> 407,1694 <i>t_R</i>= 17,26</p>	<p>Grupo 1: SP092; SF093; SS094; ST096 Grupo 2: VM126 Grupo 4: LA023; LC032</p>	
33	 <p style="text-align: center;">genkwanina (Flavona)</p>	<p>371NEG (VIP= 1,03) <i>m/z</i> 283,0613 <i>t_R</i>= 17,62</p>	<p>Grupo 1: SB084; SP092; ST096 Grupo 2: VA097; VD104; VM123; VM125; VM126; VM127; VM128; VM129; VP136; VP140; VP142; VP143; VT150 Grupo 3: CD004; CM015; CS016; CS017; CS018 Grupo 4: LA025; LC034; LE038</p>	<p><i>Vernonia nudiflora</i></p>
34	 <p style="text-align: center;">3',4'-dimetoxiluteolina (Flavona)</p>	<p>404NEG (VIP= 1,81) <i>m/z</i> 313,0719 <i>t_R</i>= 18,15</p> <p>584POS (VIP= 1,93) <i>m/z</i> 315,0857 <i>t_R</i>= 18,15</p>	<p>Grupo 1: ST096 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD107; VL121; VM123; VM124; VM126; VM128; VM129; VO131; VP136; VP140; VP142</p> <p>Grupo 1: ST096 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD107; VL121; VM123; VM124; VM126; VM128; VM129; VO131; VP136; VP140; VP142; VT150</p>	<p><i>Vernonia polyanthes</i></p>

35	 <p style="text-align: center;">glaucolido A (Lactona Sesquiterpênica – Glaucólido)</p>	<p>547POS (VIP= 1,64) <i>m/z</i> 465,1748 <i>t_R</i>= 18,65</p>	<p>Grupo 1: SF093; SS095 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD106; VD107; VM123; VM128; VM129; VP136; VP137; VP140; VP141; VT150</p>	<p><i>Vernonia gigantea</i>; <i>Vernonia nudiflora</i>; <i>Vernonia chamaedrys</i>; <i>Vernonia polyanthes</i>; <i>Vernonia ervendbergii</i>; <i>Vernonia glauca</i>; <i>Vernonanthura squamulosa</i>; <i>Vernonia incana</i>; <i>Vernonanthura pinguis</i></p>
36	 <p style="text-align: center;">8-tigloilóxiglaucólido A (Lactona Sesquiterpênica – Glaucólido)</p>	<p>550POS (VIP= 1,41) <i>m/z</i> 479,1905 <i>t_R</i>= 19,63</p>	<p>Grupo 1: SF093; SS095 Grupo 2: VA097; VB098; VB099; VB100; VB101; VD104; VD105; VD106; VD107; VM123; VM126; VP136; VP137; VP140; VP142; VT148; VT150</p>	<p><i>Vernonia nudiflora</i>; <i>Vernonia ervendbergii</i></p>

Legenda: ID_{pico}, identificação do pico cromatográfico de acordo com a Tabela 10; ID_{discriminante}, identificação do discriminante (POS representa que o discriminante foi indicado no modo de ionização positivo e NEG representa que o discriminante foi encontrado no modo de ionização negativo); * representa que um fragmento do metabólito foi indicado como discriminante); VIP, valor do VIP de cada variável; *m/z*, razão massa/carga; *t_R*, tempo de retenção, em minutos. As informações espectroscópicas e espectrométricas utilizadas para a identificação dos metabólitos são apresentadas na Tabela 10. Os códigos das espécies analisadas são fornecidos na Tabela 2.

Analisando os metabólitos identificados como discriminantes foi possível observar que, em relação aos ácidos clorogênicos, o ácido 3-O-cafeoilquínico (1) foi indicado como discriminante para espécies do gênero *Vernonanthura*, *Cyrtocymura* e *Lepidaploa* (pertencentes aos Grupos 2, 3 e 4 obtidos na análise por HCA). O ácido 5-O-cafeoilquínico (2) e o ácido 3,4 di-O-cafeoilquínico (10) foram identificados em todos os gêneros analisados; enquanto que o ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (11) foi indicado como discriminante em algumas espécies de *Vernonanthura*, em uma população de *Cyrtocymura scorpiodes* e em duas espécies de *Lessingianthus* (Grupos 2, 3 e 4, respectivamente).

Quercetina (18) foi o único flavonol com hidroxila livre indicado como discriminante, tendo sido identificado em uma população de *Chrysolaena propinqua* e em *Cyrtocymura harley* (pertencentes ao Grupo 3), em *Stilpnopappus ferrugineus* (Grupo 1) e principalmente em espécies dos gêneros *Lepidaploa* e *Lessingianthus* (Grupo 4). As espécies *Lessingianthus secundus* e *L. vepretorum* classificadas no Grupo 1 de acordo com a análise por HCA, apresentaram quercetina como discriminante, assim como as demais espécies do gênero *Lessingianthus* que foram classificadas no Grupo 4.

Flavonóis 3-O-glicosídicos foram encontrados principalmente nos gêneros *Vernonanthura* e *Lessingianthus* (pertencentes aos Grupos 2 e 4, respectivamente); entretanto não foram indicados como discriminantes para as espécies dos gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus* (pertencentes ao Grupo 1) e foram encontrados em poucas espécies do Grupo 3. Quercetina 3-O-rutinosídeo (6) e quercetina 3-O-glicosídeo (7) foram identificados somente em algumas espécies dos gêneros *Chrysolaena*, *Cyrtocymura*, *Echinocoryne* e *Lepidaploa* e na maioria das espécies dos gêneros *Lessingianthus* e *Vernonanthura*. Kaempferol 3-O-rutinosídeo (9), apontado através de seu fragmento m/z 287,05, foi indicado como discriminante em espécies do gênero *Vernonanthura* (Grupo 2) e somente em uma espécie do gênero *Lessingianthus* (*L. onopordioides*, pertencente ao Grupo 4), na qual já havia sido anteriormente relatado (MARTUCCI et al., 2014). O flavonoide 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona (12) foi identificado nas populações de *Lepidaploa aurea* e em espécies dos gêneros *Lessingianthus* e *Vernonanthura*. Assim, pode-se concluir que flavonóis 3-O-glicosídicos foram indicados como discriminantes para o Grupo 2 e para parte do Grupo 4 (espécies do gênero *Lessingianthus*).

De modo geral, as flavonas foram indicadas como discriminantes com maior frequência para espécies dos Grupos 1 e 2; entretanto também foram encontradas em algumas espécies dos Grupos 3 e 4. Para as espécies do gênero *Lessingianthus* (Grupo 4), somente as flavonas luteolina-7-O-glicuronídeo e apigenina 7-O-glicuronídeo foram indicadas como discriminantes, sendo que as demais flavonas não foram identificadas neste gênero. Na espécie *Chrysolaena desertorum* (Grupo 3) todas as flavonas, como exceção de 3',4'-dimetoxiluteolina, foram indicadas como discriminantes, porém, de maneira geral, as flavonas não foram indicadas como discriminantes nas espécies do gênero *Chrysolaena*, tendo sido encontradas somente em algumas espécies (luteolina 7-O-glicuronídeo, em *Chrysolaena verbascifolia*; acacetina 7-O-rutinosídeo, em *C. cognata* e *C. cristobaliana*; chrisoeriol, em *C. platensis*).

Em relação às lactonas sesquiterpênicas, glaucolido B (31) foi indicado como discriminantes em *Cyrtocymura harleyi* e em espécies dos gêneros *Chrysolaena*, *Lepidaploa* e *Lessingianthus* (pertencentes aos Grupos 3 e 4) e em uma espécie de *Lessingianthus* (LV078) pertencente ao Grupo 1. Glaucolido A (35) e 8-tigloilóxi-glaucolido A (36) foram identificados em *Stilpnopappus ferrugineus*, *Stilpnopappus speciosus* e em espécies do gênero *Vernonanthura* (pertencentes aos Grupos 1 e 2). Além disso, uma lactona sesquiterpênica do tipo hirsutinolido (32) foi indicada como discriminante para as espécies de *Stilpnopappus*, duas espécies do gênero *Lepidaploa* e uma espécie do gênero *Vernonanthura*.

A flavona 3',4'-dimetoxiluteolina e as lactonas sesquiterpênicas glaucolido A e 8-tigloilóxi-glaucolido A foram indicadas como discriminantes para as espécies do Grupo 1 e 2, que constituem o primeiro ramo do dendograma. De maneira similar, a flavona acacetina 7-O-rutinosídeo e a lactona sesquiterpênica glaucolido B foram indicadas como discriminantes para as espécies do Grupo 3 e 4, constituintes do segundo ramo do dendograma. Assim, estes metabólitos se mostraram importantes como marcadores quimiotaxonômicos especialmente em relação à divisão principal do dendograma, na qual as espécies dos Grupos 1 e 2 (gêneros *Stenocephalum*, *Stilpnopappus* e *Vernonanthura*) são separadas das espécies dos Grupos 3 e 4 (gêneros *Chrysolaena*, *Cyrtocymura*, *Echinocoryne*, *Lepidaploa* e *Lessingianthus*).

Na Figura 25 são apresentados os principais metabólitos que contribuíram para a diferenciação entre os grupos obtidos na análise por HCA.

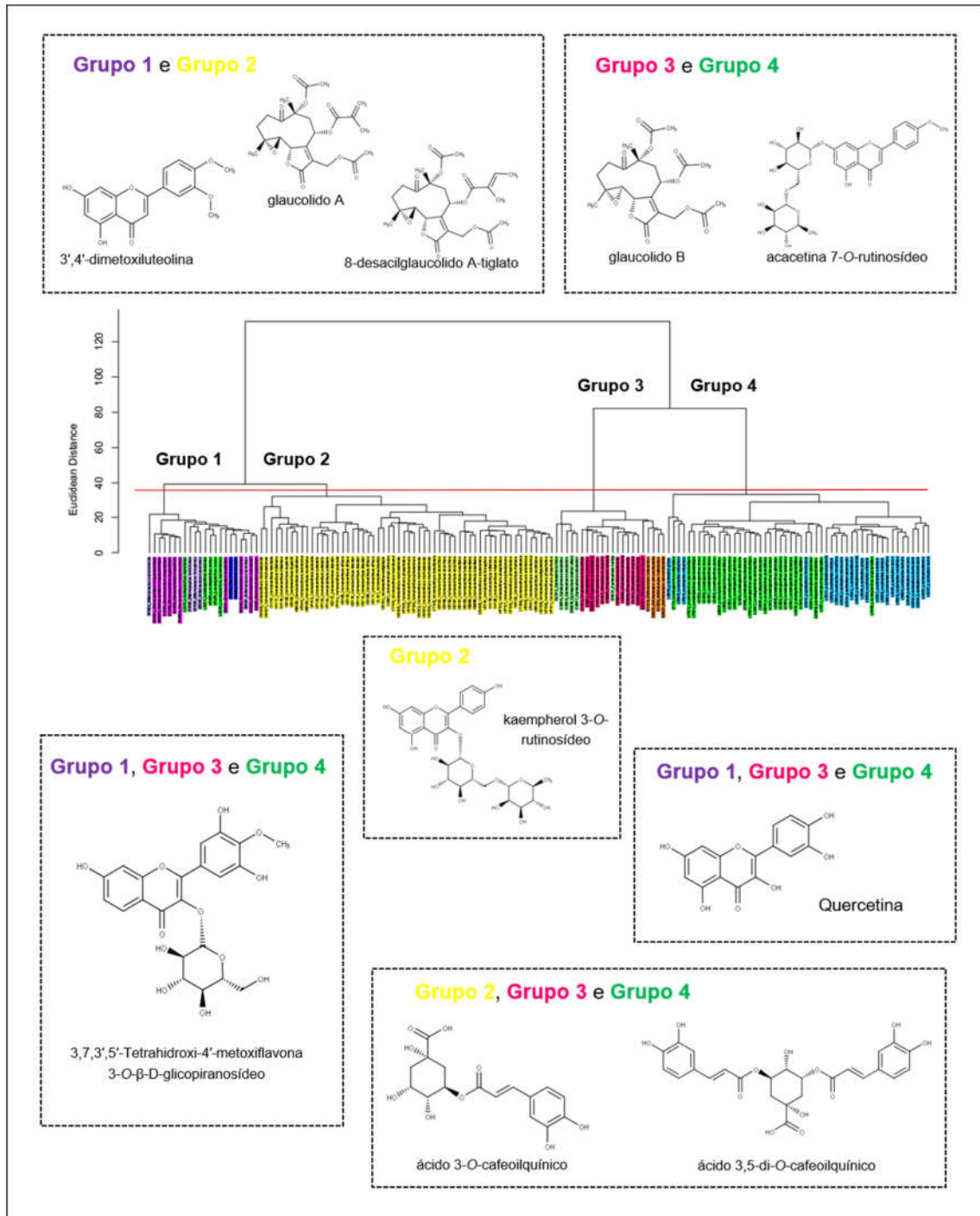


Figura 25: Principais metabólitos indicados como discriminantes para os grupos definidos a partir da análise por HCA. A composição de cada grupo é apresentada na Figura 6.

A partir dos discriminantes indicados, foi possível observar as tendências apresentadas por cada grupo em relação ao tipo de metabólitos identificados. O

Grupo 1 foi caracterizado pela ausência de ácido 3-O-cafeoilquínico e 3,5-di-O-cafeoilquínico; enquanto que, tais metabólitos e os ácidos 5-O-cafeoilquínico e 3,4 di-O-cafeoilquínico foram identificados nos demais grupos. As espécies do **Grupo 2** (gênero *Vernonanthura*) foram caracterizadas pela ausência de quercetina (flavonol com hidroxila livre), a qual foi identificada nos demais grupos. Além disso, apresentaram quase que exclusivamente o flavonoide kaempferol 3-O-rutinosídeo, já que este flavonoide foi identificado somente em uma espécie que não pertence ao gênero *Vernonanthura*. O **Grupo 3** foi o único grupo que não apresentou o flavonoide 7,3',5'-trihidroxí-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona. Além disso, nas espécies deste grupo não foi identificada a lactona sesquiterpênica do tipo hirsutinólido (pico 32), a qual foi indicada como discriminante nas espécies dos demais grupos, especialmente para as espécies do gênero *Stilpnopappus*. Nas espécies do **Grupo 4**, principalmente para as espécies do gênero *Lessingianthus*, não foram identificados flavonoides do tipo flavona com frequência. Assim, este grupo caracterizou-se por apresentar baixa prevalência de flavonas.

5 CONCLUSÕES

As análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas (HCA e PCA) realizadas a partir das impressões digitais metabólicas das espécies analisadas indicaram que é possível estabelecer uma separação entre as espécies do gênero *Vernonia s.l.* A análise por PCA apresentou o espalhamento das espécies, indicando que há tendência de formação de grupos. Na análise por HCA foram obtidos quatro grupos principais, sendo que as espécies do mesmo gênero estão, de modo geral, agrupadas, assim como as diferentes populações de uma mesma espécie. Dessa maneira, o **Grupo 1** foi constituído principalmente pelos gêneros *Stenocephalum* e *Stilpnopappus*; o **Grupo 2**, pelo gênero *Vernonanthura*; o **Grupo 3**, pelos gêneros *Chrysolaena*, *Cyrtocymura* e *Echinocoryne* e o **Grupo 4**, pelos gêneros *Lepidaploa* e *Lessingianthus*.

Os agrupamentos obtidos na análise por HCA são condizentes com a classificação taxonômica proposta por Robinson (1999a, 1999b), já que as espécies apresentaram uma tendência em se agruparem de acordo com os gêneros propostos por ele para *Vernonia s.l.*. Estes resultados também sugerem que a classificação de Robinson (1999a, 1999b), na qual o gênero *Vernonia s.l.* foi dividido em vários novos gêneros, representa melhor as semelhanças e diferenças entre essas espécies do que a classificação de Baker (1873), na qual o gênero *Vernonia s.l.* é constituído por mais de 1000 espécies. Em relação às subtribos, os resultados obtidos na análise por HCA foram congruentes com estudos filogenéticos anteriormente realizados, os quais indicaram que as subtribos Vernoniinae e Lepidaploinae seriam parafiléticas.

A partir das impressões digitais, foram identificados ácidos clorogênicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas nas espécies analisadas, sendo eles: ácido 3-O-cafeoilquínico; ácido 5-O-cafeoilquínico; ácido 5-*p*-cumaroilquínico; ácido 5-O-(*E*)-feruloilquínico; ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico; ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico; vicenina-2; quercetina 3-O-rutinosídeo; quercetina 3-O-glicosídeo; luteolina 7-O-glicuronídeo; kaempferol 3-O-rutinosídeo; 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona; apigenina 7-O-glicuronídeo; chrisoeriol 7-O-neohesperidosídeo; chrisoeriol 7-O-glicuronídeo; isoorientina 3'-O-glicosídeo; quercetina; luteolina; acacetina 7-O-rutinosídeo; tilirosídeo; acacetina 7-O-glicuronídeo; apigenina; kaempferol; chrisoeriol; genkwanina; 3',4'-dimetoxiluteolina ;

8-O-(2-metilpropenoil) hirsutinolido; 8-tigloilóxi hirsutinolido; deacilcinaropicrina; piptocarphina A; glaucolido B; glaucolido A e 8-tigloilóxiglaucolido A.

A análise por OPLS-DA associada a análise do VIP *plot* possibilitou a determinação dos metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos obtidos na análise por HCA. Foram identificados 21 metabólitos discriminantes, sendo estes pertencentes às classes dos ácidos clorogênicos (ácidos cafeoilquínico e di-cafeoilquínico), dos flavonoides (flavonas, flavonóis e flavonóis O-glicosídeos) e das lactonas sesquiterpênicas (glaucolidos e hirsutinolidos). As espécies do **Grupo 1** foram caracterizadas pela ausência de ácido 3-O-cafeoilquínico e 3,5-di-O-cafeoilquínico; o **Grupo 2** foi caracterizado pela ausência de quercetina (flavonol com hidroxila livre) e presença do flavonoide kaempferol 3-O-rutinosídeo; o **Grupo 3** foi o único grupo no qual não foi identificado o flavonoide 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona e as espécies do **Grupo 4**, principalmente as espécies do gênero *Lessingianthus*, caracterizaram-se por apresentarem baixa prevalência de flavonas. Além disso, foi possível estabelecer os metabólitos responsáveis pela discriminação entre os ramos principais do dendograma; a flavona 3',4'-dimetoxiluteolina e as lactonas sesquiterpênicas glaucolido A e 8-tigloilóxiglaucolido A foram indicadas como discriminantes para as espécies do **Grupo 1 e 2**, enquanto que a flavona acacetina 7-O-rutinosídeo e a lactona sesquiterpênica glaucolido B foram indicadas como discriminantes para as espécies do **Grupo 3 e 4**.

Diversas espécies da tribo Vernoninaea foram analisadas, com enfoque nas subtribos Vernoniinae e Lepidaploinae. Dessa maneira, as análises metabolômicas em conjunto com análises estatísticas multivariadas auxiliaram no esclarecimento da classificação taxonômica de espécies do gênero *Vernonia s.l.*, destacando o potencial da metabolômica como ferramenta quimiotaxonômica. Além disso, possibilitou a identificação de diversos metabólitos como potenciais marcadores quimiotaxonômicos para os grupos de espécies estudadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON, M. C. B. V.; CALLEGARI LOPES, J. L.; HERZ, W. Glaucolide B, A molluscicidal sesquiterpene lactone, and other constituents of *Vernonia eremophila*. **Planta Medica**, v. 56, n. 3, p. 271–273, 1990.
- ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 33–47, 2010.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1–20, 2015.
- ALVARENGA, S. A. V et al. 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.
- ALVES, T.L.S.; **Perfil químico micromolecular e análise quimiotaxonômica dos gêneros *Stevia Cav.* e *Mikania Willd.* (Asteraceae, Eupatorieae)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 87p., 2009.
- ANDERBERG, A. . et al. Compositae. In: **The families and genera of vascular Plants**. Berlin: Springer, 2007. p. 61–575.
- ANGULO, M. B.; DEMATTEIS, M. Cytotaxonomy of some species of the South American genus *Lessingianthus* (Asteraceae, Vernonieae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 277–285, 2012.
- BAKER, J.G. Compositae I. Vernoniaceae. In: Von Martius CFP, **Flora Brasiliensis**: Munich. p. 5-180, 1873.
- BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. Technical problems and practical operations in plant metabolomics. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, n. 3, p. 300–304, 2006.
- BANERJEE, P. et al. Super Natural II: a database of natural products. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D935–D939, 2015.
- BARDON, A. et al. Guaianolides and other constituents from *Vernonia nitidula*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2691–2694, 1988.
- BARDON, A. et al. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia nudiflora* and *Chrysolaena propinqua*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 609–613, 1992.
- BARDÓN, A. et al. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia incana*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 313–315, 1990.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v. 2 ed. Viçosa: Universitária, 1991.
- BAZON, J. N. et al. Cadinanolides and other constituents from *Vernonia fruticulosa* and *Vernonanthura discolor*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1535–1536, 1997.
- BELAY, A.; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and**

- Applied Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 234–240, 2009.
- BENTHAM, G. Notes on the classification, history, and geographical distribution of Compositae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 13, p. 335–577, 1873.
- BOHLMANN, F. et al. Hirsutinolides from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2233–2237, 1981.
- BOHLMANN, F. et al. Hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 695–699, 1982.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the Vernonieae (Compositae). **Plant Systematics and Evolution Supplementum**, v. 4, p. 3–43, 1990.
- BOHLMANN, F.; WALLMEYER, M.; JAKUPOVIC, J. Glaucolide from *Vernonia staeheleinoides*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1445–1447, 1982.
- BORKOSKY, S. et al. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eirmocephala megaphylla* and *Cyrtocymura cincta*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1637–1639, 1996.
- BORKOSKY, S. et al. Glaucolides, hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from *Vernonanthura pinguis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 465–470, 1997.
- BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 1994. 752p.
- BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400–17421, 2014.
- BUSKUHL, H. et al. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1539–1544, 2010.
- CABRERA, A. L. Vernonieas Argentinas (Compositae). **Darwiniana**, v. 6, n. 3, p. 265–379, 1994.
- CARRIJO, T. T. et al. Palinotaxonomia de espécies de *Stilpnopappus* Mart. ex DC. e *Strophopappus* DC. (Compositae). **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 259–268, 2005.
- CARTAGENA, E. et al. Germacranolides and a new type of guaianolide from *Acanthospermum hispidum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1323–1328, 2000.
- CASTILLO, S. et al. Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 108, p. 23–32, 2011.
- CATALÁN, C. A. N. et al. Glaucolides from *Vernonia fulva*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 2113–2115, 1985.
- CATALÁN, C. A. N. et al. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 351–353, 1986.
- CATALÁN, C. A. N. et al. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia chamaedrys*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 197–202, 1988.
- CHAGAS-PAULA, D. et al. A Metabolomic approach to target compounds from the

- Asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites**, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015.
- CHEN, W. L. Chemoinformatics: past, present, and future. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 6, p. 2230–2255, 2006.
- CLARK, B. R. et al. Chemotaxonomy of *Hawaiian anthurium* cultivars based on multivariate analysis of phenolic metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11323–11334, 2014.
- CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.
- CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821–3832, 2005.
- COBLE, J. B.; FRAGA, C. G. Comparative evaluation of preprocessing freeware on chromatography / mass spectrometry data for signature discovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 155–164, 2014.
- COX, D. G. et al. The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 3460–3474, 2014.
- CROTTI, A. E. M. et al. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, v. 661, n. 2, p. 99–141, 2006.
- DA COSTA, F. B.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 66, p. 345–353, 2005.
- DE MELO, M. R. C. S.; PEREIRA, R. DE C. DE A. Revisão histórica da tribo Vernoniaceae Cass. (família Asteraceae) para o Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 12, p. 172–192, 2015.
- DE OLIVEIRA, V. M.; FORNI-MARTINS, E. R.; SEMIR, J. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernoniaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 154, p. 99–108, 2007.
- DEMATTEIS, M. Taxonomic notes on the genus *Chrysolaena* (Vernoniaceae, Asteraceae), including a new species endemic to Paraguay. **Annales Botanici Fennici**, v. 44, p. 56–64, 2007.
- DEMATTEIS, M. Revisión taxonómica del género sudamericano *Chrysolaena* (Vernoniaceae, Asteraceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 44, n. (1-2), p. 103–170, 2009.
- DEVORE, M. L.; STUESSY, T. F. The place and time of origin of the Asteraceae, with additional comments on the Calyceraceae and Goodeniaceae. In: HIND, D. J. N.; JEFFREY, C.; POPE, G. V. (Eds.). **Advances in Compositae systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 23–40.
- DOMÍNGUEZ, X. A. et al. A new glaucolide from *Vernonia erdverbengii*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 704–705, 1986.
- DOS SANTOS, E. O. et al. Isolation and characterization of new ceramides from aerial parts of *Lepidaploa cotoneaster*. **Natural Product Communications**, v. 7, n.

6, p. 781–783, 2012.

EMERENCIANO, V. P. et al. A chemosystematic analysis of tribes of Asteraceae involving sesquiterpene lactones and flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3103–3115, 1987.

EMERENCIANO, V. P. et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947–957, 2001.

EMERENCIANO, V. P. et al. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 891–899, 2007.

ERIKSSON, L. et al. **Multi- and Megavariate Data Analysis: Basic principles and applications**. 3 ed. Sweden: MKS Umetrics AB, 2013. 490p.

ESTEVES, R. L.; GONÇALVES-ESTEVES, V. Redelimitação de *Stilpnopappus* Mart. ex DC. (Vernonieae-asteraceae). **Herbarium Bradeanum**, v. IX, n. 14, p. 77–92, 2003.

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, p. 707–715, 2001.

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

FERREIRA, M. J. P. et al. Neural networks in chemosystematic studies of asteraceae: a classification based on a dichotomic approach. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, p. 633–644, 2005.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceito, métodos e aplicações**. Campinas: Editora da Unicamp, 2015. 493p.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, p. 155–168, 2001.

FUNK, V. A. et al. Everywhere but Antarctica : using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, v. 55, p. 343–374, 2005.

FUNK, V. A. et al. Classification of Compositae. In: FUNK, V.A. et.al. **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. Viena: International Association for Plant Taxonomy, 2009. cap. 11, p. 171-189.

GANDARA, A.; ALVES, M.; ROQUE, N. Flora da Bahia: Asteraceae – tribo Millerieae. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 16, p. 1–14, 2016.

GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 200–209, 2006.

GIRARDI, C. et al. Analysis and fragmentation mechanisms of hirsutinolide-type sesquiterpene lactones by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, p. 569–580, 2016.

- GLEASON, H. A. Evolution and Geographical Distribution of the genus *Vernonia* in North America. **American Journal of Botany**, v. 10, n. 4, p. 187–202, 1923.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193–1204, 2008.
- IGILE, G. et al. Vernoniosides D and E, Two Novel Saponins from *Vernonia amygdalina*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1438–1443, 1995.
- IGUAL, M. O. et al. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 94–97, 2013.
- JEFFREY, C. The Vernonieae in East Tropical Africa : notes on Compositae. **Kew Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 195–277, 1988.
- JONES, S. . Vernonieae: systematic review. In: **The Biology and Chemistry of the Compositae**. London: Academic Press, 1977. p. 503–521.
- JONES, S. B. Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the New World. **Rhodora**, v. 81, n. 828, p. 425–447, 1979.
- JONES, S. B. Revision of *Vernonia* series Flexuosae (Compositae : Vernonieae). **Brittonia**, v. 33, n. 2, p. 214–224, 1981.
- KEELEY, S. C.; FORSMAN, Z. H.; CHAN, R. A phylogeny of the “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (trnL-F, ndhF, ITS). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 89–103, 2007.
- KEELEY, S. C.; JONES, S. B. Taxonomic implications of external pollen morphology to *Vernonia* (Compositae) in the West Indies. **American Journal of Botany**, v. 64, n. 5, p. 576–584, 1977.
- KEELEY, S. C.; ROBINSON, H. Vernonieae. In: **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. Viena: International Association for Plant Taxonomy, 2009. p. 439–469.
- KEURENTJES, J. J. B. et al. The genetics of plant metabolism. **Nature genetics**, v. 38, n. 7, p. 842–849, 2006.
- KHAN, S. B. et al. Structure determination of ramosine, a guaianolide, by NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 42, p. 1063–1065, 2004.
- KIM, H. G. et al. Molecular evidence for an African origin of the Hawaiian endemic *Hesperomannia* (Asteraceae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15440–15445, 1998.
- KING, B. L.; JONES, S. B. Chemosystematics of *Vernonia* series Flexuosae (Vernonieae: Compositae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 109, n. 3, p. 279–286, 1982.
- KOTOWICZ, C. et al. Glaucolides and hirsutinolides from *Vernonanthura squamulosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 425–428, 1998.

- LEITÃO-FILHO, H.F. **Contribuição ao conhecimento taxonômico da tribo Vernonieae no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 215p., 1972.
- LIN, L.-Z.; HARNLY, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1084–1096, 2007.
- LOEUILLE, B.; KEELEY, S. C.; PIRANI, J. R. Systematics and evolution of syncephaly in American Vernonieae (Asteraceae) with emphasis on the Brazilian subtribe Lychnophorinae. **Systematic Botany**, v. 40, n. 1, p. 286–298, 2015.
- LOMMEN, A. MetAlign : interface-driven , versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3079–3086, 2009.
- LOPES, J.L.C. Sesquiterpenes lactones from *Vernonia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, suppl. II, p.227-230, 1991.
- MABRY, T. J. et al. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 185–192, 1975.
- MACHADO, A. L. et al. Constituintes químicos de *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. (Asteraceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 540–543, 2013.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.
- MARTUCCI, M. E. P. et al. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- MORALES-ESCOBAR, L. et al. New phenolic derivatives from *Vernonia mapirensis* Gleason. **ARKIVOC**, vii, p. 349–358, 2007.
- MOREIRA, G. L.; TELES, A. M. A tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae) na Serra Dourada , Goiás , Brasil. **IHERINGIA**, v. 69, n. 2, p. 357–385, 2014.
- NAKAJIMA, J.N. et al. *Asteraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB101557>>. Acesso em: 04 de abr. De 2017
- NAKAJIMA, J. N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 471–478, 2001.
- PADILLA-GONZÁLES, G. F. **Impressão digital metabólica do gênero *Espeletia* (Asteraceae) e sua correlação com dados filogenéticos e biogeográficos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 104f., 2014.
- PADOLINA, W. G. et al. Glaucolide A and B, new germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Vernonia* (Compositae). **Tetrahedron**, v. 30, p. 1161–1170, 1973.
- PANERO, J. L. et al. Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 80, p. 43–53, 2014.

- PANERO, J. L.; CROZIER, B. S. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 99, p. 116–132, 2016.
- PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies : major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 757–782, 2008.
- PERRY, N. B. et al. Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: helenalin and dihydrohelenalin chemotypes in Spain. **Planta Medica**, v. 75, n. 6, p. 660–666, 2009.
- PLAZONÍĆ, A. et al. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, p. 2466–2490, 2009.
- POLLORA, G. C. et al. Elephantopus-type sesquiterpene lactones from a *Vernonanthura* species, *Vernonanthura nebularum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 4, p. 397–405, 2003.
- PUGIALLI, H. R. L.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. Quimiotaxonomia da superordem Zingiberiflorae (sensu Dahlgren) I: flavonoides como marcadores quimiossistemáticos. **Acta Botanica Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 135–148, 1993.
- RIVERA, V.L. **Estudos fitogeográficos em *Vernonia* Schreb. sensu lato (Asteraceae) no bioma Cerrado**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 119p., 2006.
- ROBINSON, H. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). I. The genus *Stenocephalum* Sch. Bip. **Proceedings of the Biological Soc**, v. 100, n. 3, p. 578–583, 1987a.
- ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). II. A new genus, *Echinocoryne*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 100, n. 3, p. 584–589, 1987b.
- ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae, Asteraceae). III. Two new genera, *Cyrtocymura* and *Eirmocephala*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 100, n. 4, p. 844–855, 1987c.
- ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). V. The genus *Chrysolaena*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 101, n. 4, p. 952–958, 1988a.
- ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). IV. The new genus, *Lessingianthus*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 101, n. 4, p. 929–951, 1988b.
- ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). VII. The genus *Lepidaploa*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 103, n. 2, p. 464–498, 1990.
- ROBINSON, H. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). **Phytologia**, v. 73, n. 2, p. 65–76, 1992.
- ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contributions to Botany**, n. 89, p. 1–116, 1999a.
- ROBINSON, H. Two new subtribes, Stokesiinae and Pacourininae, of the Vernonieae

- (Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 112, n. 1, p. 216–219, 1999b.
- ROBINSON, H. Revisions in paleotropical Vernoniae (Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 112, n. 1, p. 220–247, 1999c.
- ROBINSON, H. Tribe Vernoniae Cass. In: **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin: Springer, 2007. p. 149–174.
- SAKAKIBARA, H. et al. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 571–581, 2003.
- SAKAMOTO, H. T. et al. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1396–1401, 2005.
- SÁNCHEZ-RABANEDA, F. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 35–42, 2003.
- SCHAUER, N.; ZAMIR, D.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 297–307, 2005.
- SCHMITTMANN, T.; ROTSCHEIDT, K.; BREITMAIER, E. Three new steroid saponins from *Vernonia amygdalina* (Compositae). **Journal fuer Praktische Chemie**, v. 336, p. 225–232, 1994.
- SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, n. 2, p. 121–594, 1982.
- SEAMAN, F. C.; FUNK, V. A. Cladistic analysis of complex natural products: developing transformation series from sesquiterpene lactone data. **Taxon**, v. 32, n. 1, p. 1–27, 1983.
- SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniae, Compositae)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 1991.
- SHI, P. et al. Systematic characterisation of secondary metabolites from *Ixeris sonchifolia* by the combined use of HPLC-TOFMS and HPLC-ITMS. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 66–73, 2011.
- SILVA, D. B. et al. Mass spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. **Scientific reports**, v. 4, n. 4309, p. 1–8, 2014.
- SIMPSON, B. B. Economic importance of Compositae. In: **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. Viena: International Association for Plant Taxonomy, 2009. p. 45–58.
- SMITH, C. A. et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 6, p. 747–751, 2005.
- STUTTS, J. G. Taxonomic revision of *Vernonia* subsect. Chamaedrys (Compositae). **New England Botanical Club**, v. 90, n. 861, p. 37–99, 1988.
- SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817–

836, 2003.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679–693, 2007.

TANK, D. C. et al. Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. **New Phytologist**, v. 207, p. 454–467, 2015.

TERMENTZI, A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E. LC-DAD-MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1234–1245, 2008.

TIKUNOV, Y. M. et al. MSClust : a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v. 8, p. 714–718, 2012.

TURNER, B. L.; BEAMAN, J. H.; ROCK, H. F. L. Chromosome numbers in the Compositae V. Mexican and Gautemalan species. **Rhodora**, v. 63, n. 749, p. 121–129, 1961.

VALDÉS, D. A. et al. Glaucolides, piptocarphins and cadinanolides from *Lepidaploa remotiflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 685–689, 1998.

VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, v. 7, n. 142, 2006.

VASSALLO, A. et al. Steroids with anti-inflammatory activity from *Vernonia nigritiana* Oliv. & Hiern. **Phytochemistry**, v. 96, p. 288–298, 2013.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613–646, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. **Metabolome analysis**: an introduction. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.

WAGNER, H. et al. Flavonoids in *Vernonia artem*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 3086–3087, 1972.

WANG, Y. et al. Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 22, p. 1767–1778, 2008.

WANG, Y. et al. MIDAS: a database-searching algorithm for metabolite identification in metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 9496–9503, 2014.

WEI, L. et al. An UPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of two coumarins and two flavonoids in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of *Wikstroemia indica* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 1008, p. 139–145, 2016.

WILLIAMS, R. B. et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia pachyclada* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 9, p. 1371–1374, 2005.

WOLFENDER, J.-L. et al. Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavanoids and related compounds in crude plant extracts.

Analisis, v. 28, n. 10, p. 895–906, 2000.

WOLFENDER, J.-L. et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, p. 92–107, 2013.

YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics : a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17–34, 2016.

YOUN, U. J. et al. Bioactive sesquiterpene lactones and other compounds isolated from *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia**, v. 93, p. 194–200, 2014.

ZHANG, L. et al. Guaianolides and elemanolides from *Vernonia anthelmintica*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 14–18, 2014.

ZUPAN, J.; GASTEIGER, J. Neural networks: a new method for solving chemical problems or just a passing phase? **Analytica Chimica Acta**, v. 248, p. 1–30, 1991.

APÊNDICES

Apêndice 1: Sinonímias utilizadas para as espécies analisadas

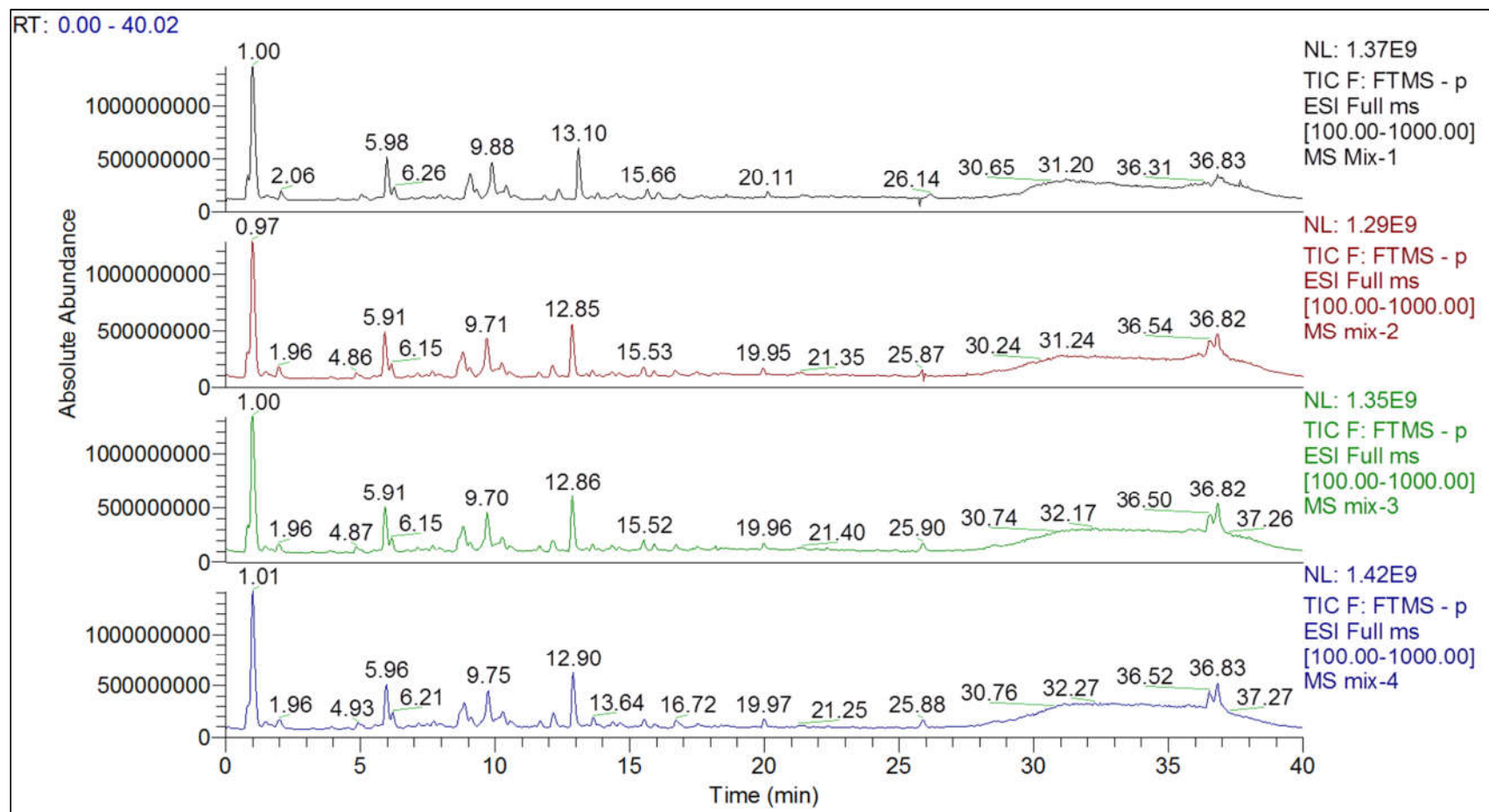
Nomenclatura (<i>sensu</i> Robinson e posterior)	Sinônimos
<i>Chrysolaena cognata</i> (Less.) M. Dematt.	<i>Vernonia cognata</i> Less./ <i>Cacalia cognata</i> (Less.) Kuntze
<i>Chrysolaena cristobaliana</i> Dematt.	—
<i>Chrysolaena desertorum</i> (Mart. ex DC.) M. Dematt.	<i>Vernonia desertorum</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia desertorum</i> var. <i>longipes</i> Baker/ <i>Lessingianthus desertorum</i> (Mart. ex DC.) H. Rob./ <i>Cacalia desertorum</i> (Mart. ex DC.) Kuntze
<i>Chrysolaena obovata</i> (Less.) M. Dematt.	<i>Vernonia obovata</i> Less./ <i>Vernonia obovata</i> var. <i>angustior</i> (DC.) Baker/ <i>Vernonia obovata</i> var. <i>chrysophylla</i> (Gardner) Baker/ <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby/ <i>Vernonia chrysophylla</i> Gardner/ <i>Vernonia densevillosa</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia densevillosa</i> var. <i>angustior</i> DC./ <i>Vernonia paucifolia</i> Rusby/ <i>Vernonia quindecimflora</i> Sch. Bip./ <i>Cacalia obovata</i> (Less.) Kuntze/ <i>Chrysocoma herbacea</i> Vell./ <i>Chrysolaena herbacea</i> (Vell.) H. Rob.
<i>Chrysolaena platensis</i> (Spreng.) H. Rob.	<i>Vernonia platensis</i> (Spreng.) Less./ <i>Vernonia cognata</i> Less./ <i>Vernonia cognata</i> var. <i>sceptrum</i> (Chodat) Cabrera/ <i>Vernonia sceptrum</i> Chodat/ <i>Vernonia senecionea</i> Mart. ex DC./ <i>Cacalia cognata</i> (Less.) Kuntze/ <i>Cacalia platensis</i> (Spreng.) Kuntze
<i>Chrysolaena propinqua</i> (Hieron.) H. Rob.	<i>Vernonia propinqua</i> Hieron./ <i>Vernonia propinqua</i> var. <i>canescens</i> (Chodat) Dematt./ <i>Vernonia lepidifera</i> Chodat/ <i>Vernonia lepidifera</i> var. <i>canescens</i> Chodat
<i>Chrysolaena verbascifolia</i> (Less.) H. Rob.	<i>Vernonia verbascifolia</i> Less./ <i>Cacalia verbascifolia</i> (Less.) Kuntze
<i>Cyrtocymura cincta</i> (Griseb.) H. Rob.	<i>Vernonia cincta</i> Griseb./ <i>Vernonia scorpioides</i> var. <i>cincta</i> (Griseb.) Cabrera/ <i>Cacalia cincta</i> (Griseb.) Kuntze
<i>Cyrtocymura harleyi</i> (H. Rob.) H. Rob.	<i>Vernonia harleyi</i> H. Rob.
<i>Cyrtocymura mattos-silvae</i> (H. Rob.) H. Rob.	<i>Vernonia mattos-silvae</i> H. Rob.
<i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.	<i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers./ <i>Vernonia scorpioides</i> var. <i>centriflora</i> DC./ <i>Vernonia scorpioides</i> var. <i>longeracemosa</i> DC./ <i>Vernonia scorpioides</i> var. <i>longifolia</i> DC./ <i>Vernonia scorpioides</i> var. <i>subrepanda</i> (Pers.) DC./ <i>Vernonia scorpioides</i> var. <i>subtomentosa</i> DC./ <i>Vernonia subrepanda</i> Pers./ <i>Vernonia tournefortioides</i> Kunth/ <i>Vernonia longeracemosa</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia flavescens</i> Less./ <i>Vernonia centriflora</i> Link & Otto/ <i>Vernonia breviramosa</i> Rusby/ <i>Vernonia arborescens</i> var. <i>corrientensis</i> Hieron./ <i>Stahelina solidaginoides</i> Willd. ex Less./ <i>Lepidaploa yuruanensis</i> V.M. Badillo/ <i>Lepidaploa scorpioides</i> (Lam.) Cass./ <i>Conyza scorpioides</i> Lam./ <i>Chrysocoma repanda</i> Vell./ <i>Cacalia tournefortioides</i> (Kunth) Kuntze/ <i>Cacalia scorpioides</i> (Lam.) Kuntze/ <i>Cacalia scorpioides</i> var. <i>glabriuscula</i> Kuntze/ <i>Cacalia scorpioides</i> var. <i>tomentosa</i> Kuntze
<i>Echinocoryne holosericea</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Vernonia holosericea</i> Mart. ex DC./ <i>Cacalia holosericea</i> (Mart.) Kuntze
<i>Echinocoryne schwenkiaefolia</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Vernonia schwenkiaefolia</i> Mart. ex DC./ <i>Cacalia schwenkiaefolia</i> (Mart. ex DC.) Kuntze

<i>Lepidaploa lilacina</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia adamantia</i> (Gardner) Kuntze/ <i>Cacalia lilacina</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia adamantium</i> Gardner/ <i>Vernonia lilacina</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia linarifolia</i> DC./ <i>Vernonia sancti-antonii</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Lepidaploa araripensis</i> (Gardn.) H. Rob.	<i>Cacalia araripensis</i> (Gardner) Kuntze/ <i>Vernonia araripensis</i> Gardn/ <i>Vernonia tricholepis</i> Griseb.
<i>Lepidaploa aurea</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia aurea</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia aurea</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia oligocephala</i> Gardner
<i>Lepidaploa barbata</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia barbata</i> (Less.) Kuntze/ <i>Cacalia lessingiana</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Cacalia lessingioides</i> (Sch. Bip.) Kuntze/ <i>Vernonia barbata</i> Less./ <i>Vernonia lessingiana</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia lessingioides</i> Sch. Bip./ <i>Vernonia senescens</i> Mart. ex DC.
<i>Lepidaploa canescens</i> (Kunth) H. Rob.	<i>Cacalia bullata</i> (Benth.) Kuntze/ <i>Cacalia canescens</i> (Kunth) Kuntze/ <i>Cacalia geminata</i> Kuntze/ <i>Cacalia mollis</i> (Kunth) Kuntze/ <i>Lepidaploa arborescens</i> (L.) H. Rob./ <i>Vernonia arborescens</i> (L.) Sw./ <i>Vernonia arborescens</i> var. <i>cuneifolia</i> Britton/ <i>Vernonia bullata</i> Benth./ <i>Vernonia canescens</i> Kunth/ <i>Vernonia cordifolia</i> Kunth/ <i>Vernonia cuneifolia</i> (Britton) Gleason/ <i>Vernonia geminata</i> Kunth/ <i>Vernonia hirsutivena</i> Gleason/ <i>Vernonia medialis</i> Standl. & Steyerl./ <i>Vernonia micrantha</i> Kunth/ <i>Vernonia mollis</i> Kunth/ <i>Vernonia patuliflora</i> Rusby/ <i>Vernonia polypleura</i> S.F. Blake/ <i>Vernonia pseudomollis</i> Gleason/ <i>Vernonia purpusii</i> Brandegeel/ <i>Vernonia rusbyi</i> Gleason/ <i>Vernonia sodiroi</i> Hieron./ <i>Vernonia spiritus-sancti</i> Cuatrec./ <i>Vernonia unillensis</i> Cuatrec./ <i>Vernonia volubilis</i> Hieron.
<i>Lepidaploa chamissonis</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia chamissonis</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia chamissonis</i> Less./ <i>Vernonia parodii</i> Cabrera
<i>Lepidaploa cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) H. Rob.	<i>Cacalia cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) Kuntze/ <i>Cacalia debilis</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Conyza cotoneaster</i> Willd. ex Spreng./ <i>Vernonia axilliflora</i> Mart. ex Less./ <i>Vernonia cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) Less./ <i>Vernonia debilis</i> Mart. ex DC.
<i>Lepidaploa eriolepis</i> (Gardn.) H. Rob.	<i>Cacalia eriolepis</i> (Gardner) Kuntze/ <i>Cacalia riedelii</i> (Sch. Bip. ex Baker) Kuntze/ <i>Vernonia eriolepis</i> Gardner/ <i>Vernonia riedelii</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Lepidaploa grisea</i> (Baker) H. Rob.	<i>Cacalia grisea</i> (Baker) Kuntze/ <i>Vernonia grisea</i> Baker
<i>Lepidaploa opposita</i> A. Teles, Sobral & J.N. Nakaj	—
<i>Lepidaploa remotiflora</i> (L.C. Rich.) H. Rob.	<i>Cacalia hirtiflora</i> (Sch. Bip. ex Baker) Kuntze/ <i>Cacalia lithospermoides</i> (Baker) Kuntze/ <i>Cacalia remotiflora</i> (Rich.) Kuntze/ <i>Lepidaploa trinitatis</i> (Ekman) H. Rob./ <i>Vernonia acilepis</i> Benth./ <i>Vernonia hirtiflora</i> Sch. Bip. ex Baker/ <i>Vernonia leonensis</i> Cabrera/ <i>Vernonia lithospermoides</i> Baker/ <i>Vernonia patula</i> Mart. ex Baker/ <i>Vernonia remotiflora</i> Rich./ <i>Vernonia remotiflora</i> var. <i>aristifera</i> Cabrera/ <i>Vernonia remotiflora</i> var. <i>tricholepis</i> (DC.) Baker/ <i>Vernonia sessiliflora</i> Willd. ex Less./ <i>Vernonia setosquamosa</i> Hieron./ <i>Vernonia tricholepis</i> DC.
<i>Lepidaploa rufogrisea</i> (A. St.-Hil.) H. Rob.	<i>Cacalia eremophila</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Cacalia fruticulosa</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Cacalia saxicola</i> (Sch. Bip. ex Baker) Kuntze/ <i>Cacalia tricephala</i> (Gardner) Kuntze/ <i>Vernonia eremophila</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia fruticulosa</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia oreophila</i> Malme/ <i>Vernonia resinosa</i>

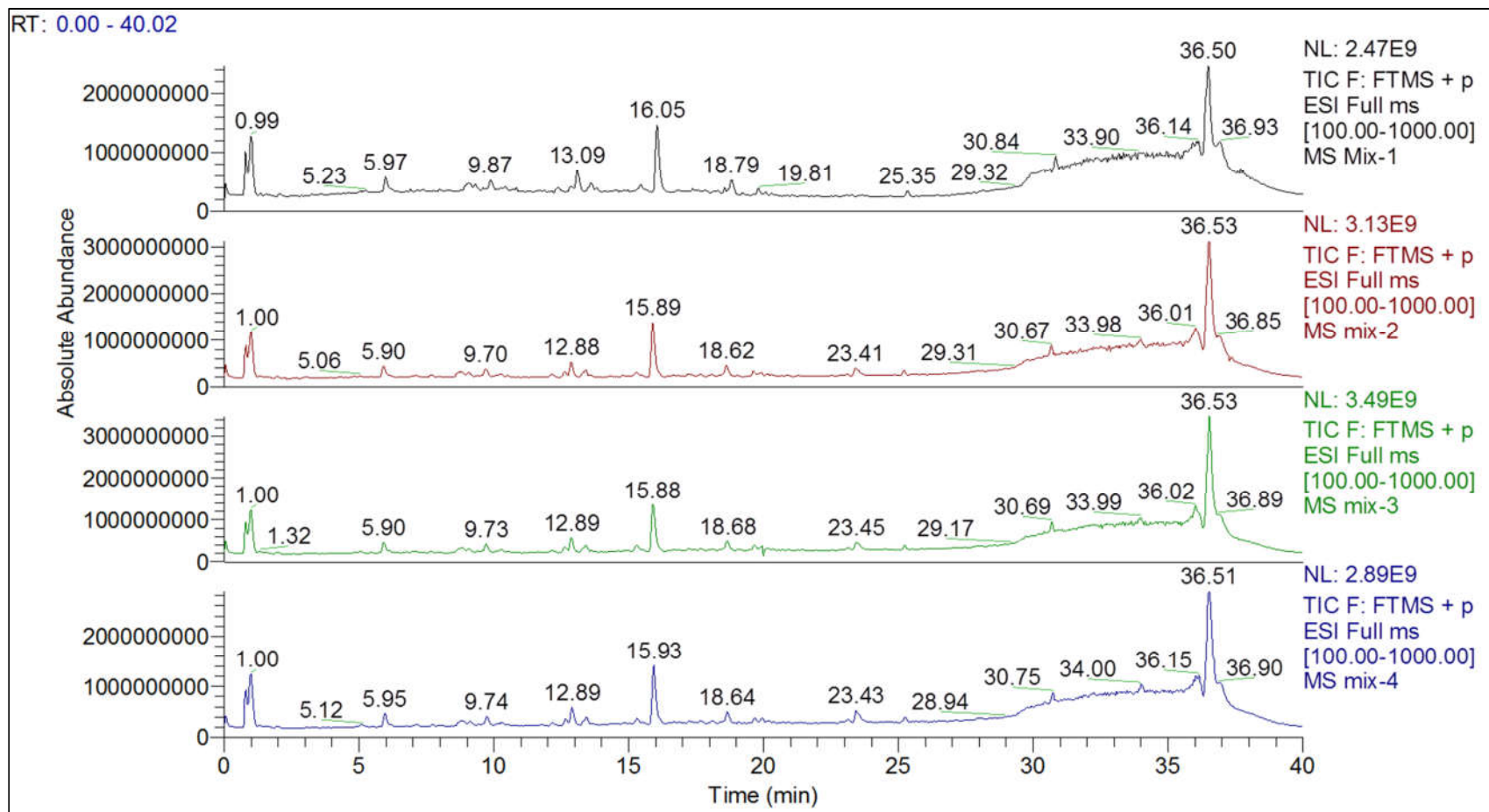
	Gardner/ <i>Vernonia rufogrisea</i> A. St.-Hil./ <i>Vernonia saxicola</i> Sch. Bip. ex Baker/ <i>Vernonia tricephala</i> Gardner
<i>Lessingianthus ammophilus</i> (Gardner) H. Rob.	<i>Cacalia ammophila</i> (Gardner) Kuntze/ <i>Vernonia ammophila</i> Gardn.
<i>Lessingianthus argyrophyllus</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia argyrophylla</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia argyrophylla</i> Less./ <i>Vernonia ariafolia</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia latifolia</i> Lem.
<i>Lessingianthus asteriflorus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia asteriflora</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Cacalia kuntzei</i> (Hieron.) Kuntze/ <i>Vernonia asteriflora</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia asterifolia</i> Baker/ <i>Vernonia centaurosidea</i> Hieron./ <i>Vernonia kuntzei</i> Hieron.
<i>Lessingianthus buddleiifolius</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia buddleiaefolia</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia buddleiifolia</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia squamosa</i> Gardner
<i>Lessingianthus coriaceus</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia coriacea</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia coriacea</i> Less./ <i>Vernonia hecatantha</i> DC.
<i>Lessingianthus durus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia araneosa</i> (Baker) Kuntze/ <i>Cacalia dura</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia araneosa</i> Baker/ <i>Vernonia dura</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia firmula</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia macedoi</i> G.M. Barrosol/ <i>Vernonia subsessilis</i> Walp.
<i>Lessingianthus floccosus</i> (Gardner) H. Rob.	<i>Cacalia floccosa</i> (Gardner) Kuntze/ <i>Vernonia floccosa</i> Gardner/ <i>Vernonia robusta</i> Glaz.
<i>Lessingianthus glabratus</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia glabrata</i> (Less.) Kuntze/ <i>Cacalia radula</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia callicephalia</i> Sch. Bip. ex Baker/ <i>Vernonia ensifolia</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia glabrata</i> Less./ <i>Vernonia glabrata</i> var. <i>angustifolia</i> Cabreral/ <i>Vernonia glabrata</i> var. <i>bracteata</i> Chodat/ <i>Vernonia glabrata</i> var. <i>cuneifolia</i> Chodat/ <i>Vernonia glabrata</i> var. <i>serrata</i> Chodat/ <i>Vernonia oxydonta</i> Malmel/ <i>Vernonia oxydonta</i> Malmel/ <i>Vernonia radula</i> Mart. ex DC.
<i>Lessingianthus grandiflorus</i> (Less.) H. Rob.	<i>Vernonia grandiflora</i> Less.
<i>Lessingianthus lacunosus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia lacunosa</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia lacunosa</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia marrubiastrum</i> Mart. ex Baker
<i>Lessingianthus ligulifolius</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia ligulifolia</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia cotaniensis</i> Hieron./ <i>Vernonia ligulifolia</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia schlechtendaliana</i> Mart. ex Baker
<i>Lessingianthus linearis</i> (Spreng.) H. Rob.	<i>Cacalia linearis</i> (Spreng.) Kuntze/ <i>Vernonia arcuata</i> Gardner/ <i>Vernonia extraxillaris</i> DC./ <i>Vernonia linearis</i> Spreng./ <i>Vernonia staeheleinoides</i> Mart. ex Baker
<i>Lessingianthus obscurus</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia obscura</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia aurifodinarum</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia davalliifolia</i> Gardner/ <i>Vernonia obscura</i> Less.
<i>Lessingianthus obtusatus</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia obtusata</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia obtusata</i> Less./ <i>Vernonia subacuminata</i> Hieron.
<i>Lessingianthus onopordioides</i> (Baker) H. Rob.	<i>Cacalia onoporoides</i> (Baker) Kuntze/ <i>Vernonia onopordioides</i> Baker
<i>Lessingianthus polyphyllus</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	<i>Vernonia glabrata</i> var. <i>linearifolia</i> Chodat/ <i>Vernonia polyphylla</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Lessingianthus pycnostachyus</i> (DC.) H. Rob.	<i>Cacalia pycnostachya</i> (DC.) Kuntze/ <i>Cacalia tomentella</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Lessingianthus tomentellus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob./ <i>Vernonia decussata</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia pycnostachya</i> DC./ <i>Vernonia tomentella</i> Mart. ex DC.
<i>Lessingianthus roseus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia rosea</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia rosea</i> Mart. ex DC.

<i>Lessingianthus secundus</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	<i>Cacalia secunda</i> (Sch. Bip. ex Baker) Kuntze/ <i>Vernonia secunda</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Lessingianthus vepretorum</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia vepretorum</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia vepretorum</i> Mart. ex DC.
<i>Lessingianthus zuccarinianus</i> (Mart. ex DC.) H. Rob.	<i>Cacalia zuccariniana</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Vernonia zuccariniana</i> Mart. ex DC.
<i>Rolandra fruticosa</i> (L.) Kuntze	<i>Echinops fruticosus</i> L./ <i>Echinops nodiflorus</i> Lam./ <i>Rolandra argentea</i> Rottb./ <i>Rolandra diacantha</i> Cass./ <i>Rolandra monacantha</i> Cass.
<i>Stenocephalum apiculatum</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	<i>Cacalia apiculata</i> (Mart. ex DC.) Kuntze/ <i>Stenocephalum monticola</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip./ <i>Vernonia apiculata</i> Mart. ex DC./ <i>Vernonia monticola</i> Mart. ex DC.
<i>Stenocephalum brevifolium</i> (DC.) Sch. Bip.	<i>Stenocephalum megapotamicum</i> (Spreng.) Sch. Bip. (Accepted name)
<i>Stenocephalum hexanthum</i> Sch. Bip.	<i>Stenocephalum megapotamicum</i> (Spreng.) Sch. Bip./ <i>Vernonia hexantha</i> var. <i>paraguariensis</i> Chodat (Accepted name)
<i>Stenocephalum jucundum</i> (Gleason) H. Rob.	<i>Vernonia jucunda</i> Gleason/ <i>Vernonia llanorum</i> V.M. Badillo/ <i>Vernonia spinulosa</i> Gleason
<i>Stenocephalum megapotamicum</i> (Spreng.) Sch. Bip.	<i>Cacalia hexantha</i> (Sch. Bip.) Kuntze/ <i>Stenocephalum brevifolium</i> (DC.) Sch. Bip./ <i>Stenocephalum hexanthum</i> Sch. Bip./ <i>Stenocephalum melanotrichium</i> (DC.) Sch. Bip./ <i>Stenocephalum penicillatum</i> Sch. Bip./ <i>Vernonia carbonaria</i> Sch. Bip. ex Baker/ <i>Vernonia hexantha</i> (Sch. Bip.) Baker/ <i>Vernonia hexantha</i> var. <i>nivea</i> Chodat/ <i>Vernonia megapotamica</i> Spreng./ <i>Vernonia megapotamica</i> var. <i>argentina</i> Hieron./ <i>Vernonia megapotamica</i> var. <i>brevifolia</i> DC./ <i>Vernonia megapotamica</i> var. <i>melanotrichia</i> DC./ <i>Vernonia melanopappa</i> Sch. Bip. ex Baker/ <i>Vernonia nigrescens</i> Mart. ex Baker
<i>Stenocephalum tragiaefolium</i> (DC.) Sch. Bip.	<i>Cacalia interjecta</i> (Baker) Kuntze/ <i>Cacalia tragiaefolia</i> (DC.) Kuntze/ <i>Vernonia interjecta</i> Baker/ <i>Vernonia tragiaefolia</i> DC.
<i>Stilpnopappus pantanalensis</i> H. Rob.	—
<i>Stilpnopappus ferrugineus</i> Baker	<i>Strophopappus ferrugineus</i> (Baker) R. Esteves
<i>Stilpnopappus speciosus</i> (Less.) Baker	<i>Stilpnopappus patulus</i> Mart./ <i>Stilpnopappus rufulus</i> Mart. ex Baker/ <i>Strophopappus speciosus</i> (Less.) R. Esteves/ <i>Vernonia speciosa</i> Less.
<i>Stilpnopappus speciosus</i> (Less.) Baker	<i>Vernonia speciosa</i> Less.
<i>Stilpnopappus tomentosus</i> Gardn.	<i>Stilpnopappus pratensis</i> Mart. ex DC.
<i>Vernonanthura almedae</i> (H. Rob.) H. Rob.	<i>Vernonia almedae</i> H. Rob.
<i>Vernonanthura brasiliiana</i> (L.) H. Rob.	<i>Baccharis brasiliiana</i> L./ <i>Conyza amoena</i> Mart. ex Baker/ <i>Conyza clethraefolia</i> Willd. ex Baker/ <i>Eupatorium obovatum</i> Willd. ex Baker/ <i>Vernonia assans</i> Mart./ <i>Vernonia brasiliiana</i> (L.) Druce/ <i>Vernonia odoratissima</i> Kunth/ <i>Vernonia odoratissima</i> var. <i>caracasana</i> Sch. Bip./ <i>Vernonia odoratissima</i> var. <i>guianensis</i> Sch. Bip./ <i>Vernonia salviaefolia</i> Chodat/ <i>Vernonia scabra</i> Pers.
<i>Vernonanthura beyrichii</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia beyrichii</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia beyrichii</i> Less./ <i>Vernonia denticulata</i> A. DC.

<i>Vernonanthura beyrichii</i> (Less.) H. Rob.	<i>Vernonia beyrichii</i> Less.
<i>Vernonanthura densiflora</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	<i>Vernonia densiflora</i> Gardner
<i>Vernonanthura diffusa</i> (Less.) H. Rob.	<i>Vernonia diffusa</i> Less.
<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	<i>Eupatorium discolor</i> Spreng./ <i>Vanillosma cinerea</i> Mart. ex Baker/ <i>Vernonia discolor</i> (Spreng.) Less.
<i>Vernonanthura ferruginea</i> (Less.) H. Rob.	<i>Vernonia crenata</i> Gardner/ <i>Vernonia ferruginea</i> Less./ <i>Vernonia griseola</i> Baker ex Warm./ <i>Vernonia polycephala</i> A. DC.
<i>Vernonanthura hilariana</i> (Gardner) A.J. Vega & M. Dematt.	<i>Vernonia hilariana</i> Gardn.
<i>Vernonanthura lucida</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia lucida</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia lucida</i> Less.
<i>Vernonanthura mariana</i> (Mart. ex Baker) H. Rob.	<i>Cacalia mariana</i> (Mart. ex Baker) Kuntze/ <i>Vernonia mariana</i> Mart. ex Baker/ <i>Vernonia sordida</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H. Rob.	<i>Baccharis montevidensis</i> Spreng./ <i>Cacalia montevidensis</i> (Spreng.) Kuntze/ <i>Chrysocoma singularis</i> Vell./ <i>Piptocarpha nitidula</i> (Less.) Griseb./ <i>Vernonia arechavaletae</i> André/ <i>Vernonia florida</i> Gardner/ <i>Vernonia gochnatioides</i> Hook. & Arn. ex A. DC./ <i>Vernonia nitidula</i> Less./ <i>Vernonia nitidula</i> var. <i>acutifolia</i> Griseb./ <i>Vernonia nitidula</i> var. <i>florida</i> (Gardner) Baker
<i>Vernonanthura mucronulata</i> (Less.) H. Rob.	<i>Vernonia collina</i> Gardner/ <i>Vernonia moquinioides</i> Mart. ex Baker/ <i>Vernonia mucronulata</i> Less.
<i>Vernonanthura oligactoides</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia oligactoides</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia conyzoides</i> Chodat/ <i>Vernonia oligactoides</i> Less./ <i>Vernonia sorocabae</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Vernonanthura oligolepis</i> (Sch. Bip. ex Baker) H. Rob.	<i>Vernonia oligolepis</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Vernonanthura petiolaris</i> (DC.) H. Rob.	<i>Vernonia petiolaris</i> DC.
<i>Vernonanthura phaeoneura</i> (Toledo) H. Rob.	<i>Vernonia phaeoneura</i> Toledo
<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	<i>Cacalia polyanthes</i> (Less.) Kuntze/ <i>Chrysocoma arborea</i> Vell./ <i>Chrysocoma phosphorica</i> Vell./ <i>Eupatorium polyanthes</i> Spreng./ <i>Vernonia corcovadensis</i> Gardner/ <i>Vernonia polyanthes</i> (Spreng.) Less./ <i>Vernonia psittacorum</i> A. DC.
<i>Vernonanthura puberula</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia puberula</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia elaeachroma</i> Klatt/ <i>Vernonia estrellensis</i> Gardner/ <i>Vernonia puberula</i> Less./ <i>Vernonia puberula</i> var. <i>salicifolia</i> Ekman ex Malme/ <i>Vernonia puberula</i> var. <i>serrulata</i> Hieron./ <i>Vernonia serrulata</i> Sch. Bip. ex Baker
<i>Vernonanthura rubriramea</i> (Mart. ex DC.) Loeuille & P.N. Soares	<i>Vernonia rubriramea</i> Mart. ex DC.
<i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	<i>Vernonia tweedieana</i> Baker
<i>Vernonanthura viscidula</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia viscidula</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia corymbulosa</i> Mart. ex Baker/ <i>Vernonia viscidula</i> Less.
<i>Vernonanthura westiniana</i> (Less.) H. Rob.	<i>Cacalia westiniana</i> (Less.) Kuntze/ <i>Vernonia hebeclada</i> A. DC./ <i>Vernonia westiniana</i> Less.

Apêndice 2: Cromatogramas obtidos no modo de ionização negativo do MS para as amostras "pool".

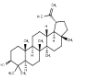
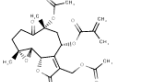
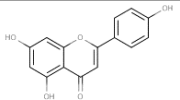
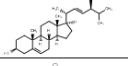
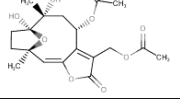
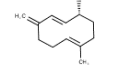
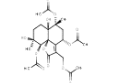
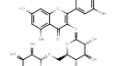
Apêndice 3: Cromatogramas obtidos no modo de ionização positivo do MS para as amostras "pool".



Apêndice 4: Parte da planilha de dados resultante do levantamento bibliográfico realizado para o gênero *Vernonia sensu lato*, exemplificando as informações coletadas de cada metabólito para a construção da biblioteca de dados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Family	Tribe	Subtribe	Specie	Country of Origin	Country of Collection	Locality of Collection	Voucher	Plant Organ	Compound Subclass	Type of Skeleton	Struture
2	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Vernonanthura</i>)	<i>Vernonia nudiflora</i> Less.	Argentina, Brazil, Uruguay ¹	Argentina	San Luis	Del Vitto n° 4293	Aerial parts	Triterpene	Lupeol derivative	
3	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Vernonanthura</i>)	<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	Brazil ¹	Brazil	Albertina	LG 026	Leaves	Sesquiterpene lactone	Glaucolide derivate	
4	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Cyrtocymura</i>)	<i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers.	Mexico, Central America, Colombia, venezuela, Trinidad, south to Brazil, Argentina ¹	Brazil	Pico Alto, Guaramiranga	M. Biavatti 11	Flowers and leaves	Flavonoid	Flavone	
5	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Lessingianthus</i>)	<i>Vernonia staehelinoides</i> Mart. ex Baker	Brazil	South Africa	Transvaal	81/22	Roots	Steroid	Phytosterol	
6	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Lepidaploa</i>)	<i>Lepidaploa remotiflora</i> (L.C. Rich.)	Argentina, Bolivia, Brazil, Cayenne, Guyana, Paraguay, Venezuela ¹	Bolivia	Montero	Lil #595749	Aerial parts	Sesquiterpene lactone	Hirsutinolide derivate	
7	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Vernonanthura</i>)	<i>Vernonia brasilliana</i> (L.) Druce	South America ¹	Brazil	Sobral, Ceará	n° 30.120	Leaves	Sesquiterpene	Monocyclic	
8	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Lessingianthus</i>)	<i>Lessingianthus rubricaulis</i> (Humb. & Bonpl.)	Argentina, Brazil, Colombia,Paraguay, Peru ¹	Argentina	Corrientos Province	P. R. Legname n° 9273.	Aerial parts	Sesquiterpene lactone	Cadinanolide derivate	
	Asteraceae	Vernoninea	Vernoniae (genus <i>Lepidaploa</i>)	<i>Vernonia mapirensii</i> Gleason	Bolivia, Peru ¹	Bolivia	Cotapata	n° 2991 HNB	Aerial parts	Flavonoid	Flavonol O-glycoside	

Apêndice 4: Continuação...

L	M	N	O	P	Q	R	S
Structure	Usual Name	Sistematic Name (SciFinder)	Molecular Formula	CAS number	Monoisotopic Mass	Molecular Mass	Phytochemical Reference
	(+)-Lupeol	Lup-20(29)-en-3-ol, (3β)-	C ₃₀ H ₅₀ O	545-47-1	426.386145	426.7174	BARDON et al., 1992; ¹ ROBINSON, 1999
	Glaucolide A	2-Propenoic acid, 2-methyl-, (1aR,5R,7S,10aS,10bR)-5-(acetyloxy)-8-[(acetyloxy)methyl]-1a,2,3,4,5,6,7,9,10a,10b-decahydro-1a,5-dimethyl-4,9-dioxoxireno[9,10]cyclodeca[1,2-b]furan-7-yl ester	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	11091-29-5	464.1682388	464.46242	IGUAL et al., 2013; ¹ ROBINSON, 1999
	Apigenin	4H-1-Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	520-36-5	270.052821	270.2369	BUSKUHL et al., 2010; ¹ ROBINSON, 1999
	Stigmasterol	Stigmasta-5,22-dien-3-ol, (3β,22E)-	C ₂₉ H ₄₈ O	83-48-7	412.3704958	412.69082	BOHLMANN et al., 1982a; ¹ ROBINSON, 1999
	7,10-Epoxy-7,10-dihydro-6,7-dimethyl-4,9-dioxoxireno[9,10]cyclodeca[1,2-b]furan-2(4H)-one, 4-(acetyloxy)-3-[(acetyloxy)methyl]-5,6,7,8,9,10-hexahydro-6,7-dihydroxy-6,10-dimethyl-, (4S,6R,7S,10R,11E)-	7,10-Epoxy-7,10-dihydro-6,7-dimethyl-4,9-dioxoxireno[9,10]cyclodeca[1,2-b]furan-2(4H)-one, 4-(acetyloxy)-3-[(acetyloxy)methyl]-5,6,7,8,9,10-hexahydro-6,7-dihydroxy-6,10-dimethyl-, (4S,6R,7S,10R,11E)-	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	101628-29-9	396.1420254	396.38846	VALDES et al., 1998; ¹ ROBINSON, 1999
	Germacrene D	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, (1E,6E,8S)-	C ₁₅ H ₂₄	23986-74-5	204.1877904	204.35106	MAIA et al., 2010; ¹ ROBINSON, 1999
	NIA	2H-Naphtho[8a,1-b]furan-2-one, 4,6,10-tris(acetyloxy)-3-[(acetyloxy)methyl]-4,5,6,6a,7,8,9,10-octahydro-6a,9-dihydroxy-6,9-dimethyl-, (4S,6R,6aS,9S,10S,10aS)-	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₂	151593-36-1	498.173718	498.4771	BARDON et al., 1993; ¹ ROBINSON, 1999
	Quercetin 3-O-rutinoside	4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[[6-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	153-18-4	610.153378	610.5175	MORALES-ESCOBAR et al., 2007; ¹ ROBINSON, 1999

Apêndice 5: Parâmetros utilizados no software *MetAlign*TM para o pré-tratamento dos dados obtidos nas análises em UHPLC-UV-MS (OrbitrapTM).

Part A: PROGRAM CONFIGURATION, DATA SET SELECTION AND BASELINE CORRECTION

Program configuration:	Input format: mzXML
	Output format: Xcalibur
	Number of processors to use: 1
Mass resolution (Accurate mass data)	Mass resolution: 70000
	Amplitude range for accurate mass determination: from 100 to 1000
	<i>"Echo" suppression:</i> Interval around mass peak: 0.45 Percentage of amplitude of mass peak: 5
	<i>"Forest" suppression:</i> Interval around mass peak: 6 Percentage of amplitude of mass peak: 3 Interval offset from mass peak: 0.5
Retention Begin (scan nr): 1	
Retention End (scan nr): 3500	
Maximum Amplitude: 700000000	
Peak Slope Factor (x Noise): 1	
Peak Threshold Factor (x Noise): 2	
Peak Threshold (Abs Value): 1000000	
Average Peak Width at Half Height (Scans): 20	

PART B: SCALING AND ALIGNING DATA SETS

Scaling Options: no scaling

Initial Peak Search Criteria	Scan nr	Max shift
Begin of 1st region	0	40
End of 1st region	3500	40

Tuning Alignment Options and Criteria: No pre-align processing (Rough)

DETAILED ASCII OUTPUT / EXCEL COMPATIBLE OUTPUT / DIFFERENTIAL RETENTION DISPLAY

Output Options: Multivariate Compatible Output

Mass: from 2 to 1000

Retention: from 2 to 40

Peak Threshold Factor (x Noise): 2

Apêndice 6: Parâmetros utilizados no software *MSClust*TM após pré-tratamento pelo software *MetAlign*TM.

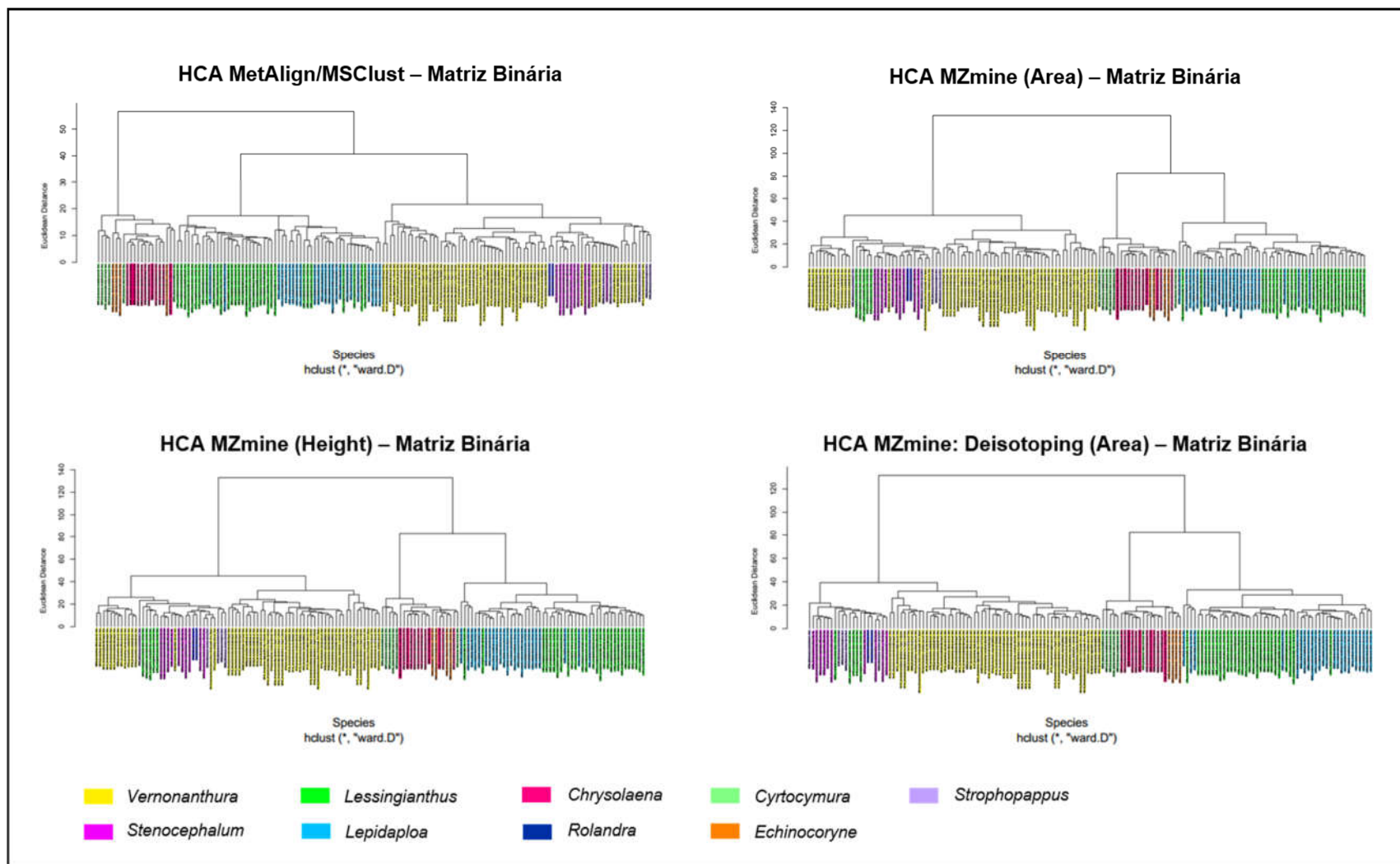
Parâmetros	Valores
Effective peaks	100
Peak Width, scans ou r. time	20
P.W. Margin Softness	4
Correlation thershold (0.0 - 1.0)	0.8
C.T. Margin Softness	0.02
PD Reduction (0.0 - 1.0)	0.8
PD Reduction Softness	0.01
Stop Criterion	2

Apêndice 7: Parâmetros utilizados no software *Mzmine*TM para o pré-tratamento dos dados obtidos nas análises em UHPLC-UV-MS (OrbitrapTM).

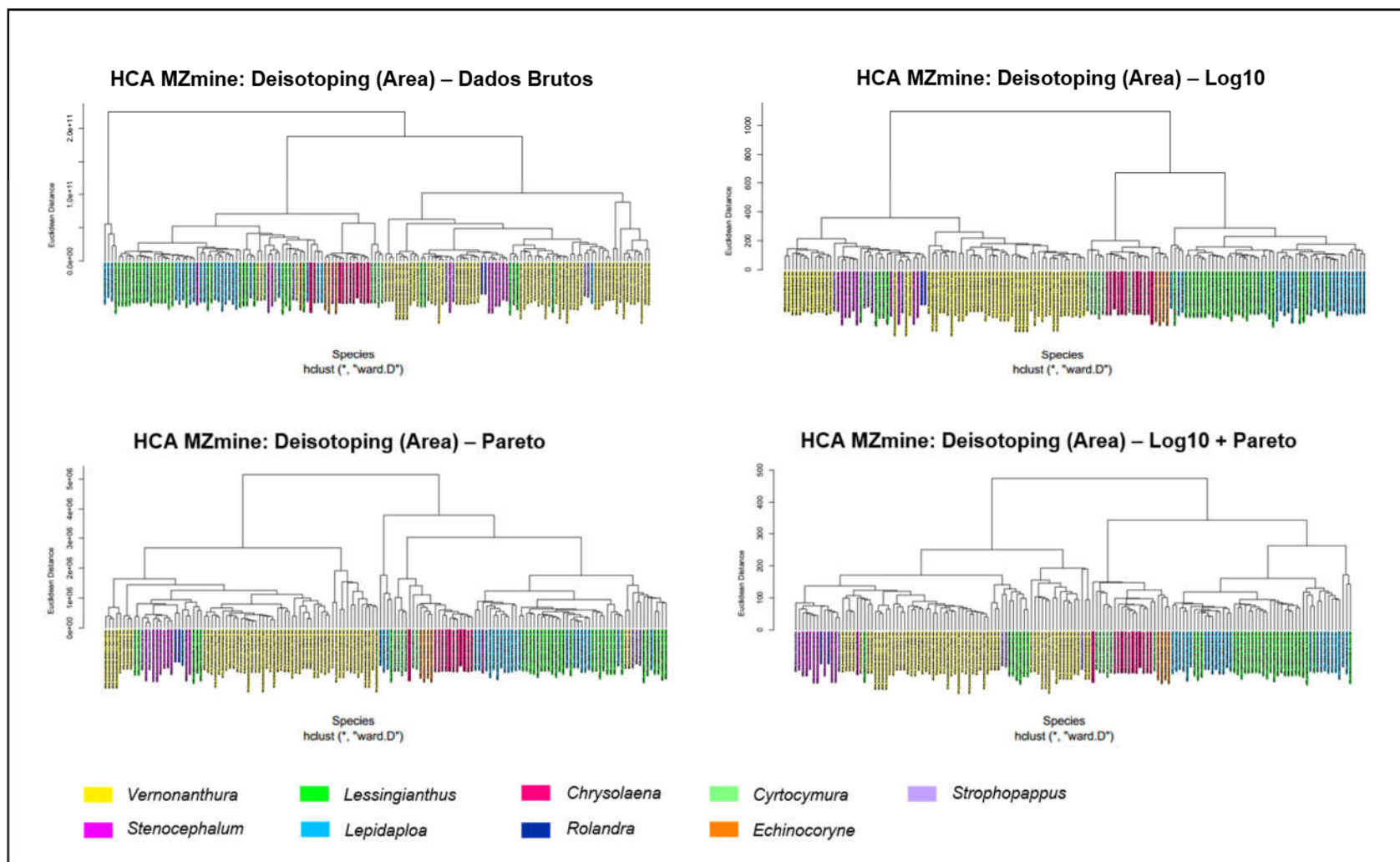
<i>Raw data methods/</i>	<u>Mass detection</u> : Noise level=1.0E6
<i>Peak detection</i>	<u>Chromatogram builder</u> : Minimum time span (min)= 0.2; Minimum height= 3.0E6; <i>m/z</i> tolerance= 0.001 <i>m/z</i> ou 5.0 ppm
<i>Peak list methods</i>	<u>Chromatogram decovolution</u> - Baseline cut-off: Minimum peak height= 3.0E6; peak duration= 0.3 a 5.0; baseline level= 1.0E6 <u>Alignment</u> - Join aligner: <i>m/z</i> tolerance= 0.001 <i>m/z</i> ou 5 ppm; Weight for <i>m/z</i> = 20; Retention time tolerance= 5%; weight for RT= 20

Legenda: min= minutos; *m/z*= massa carga; ppm= partes por milhão.

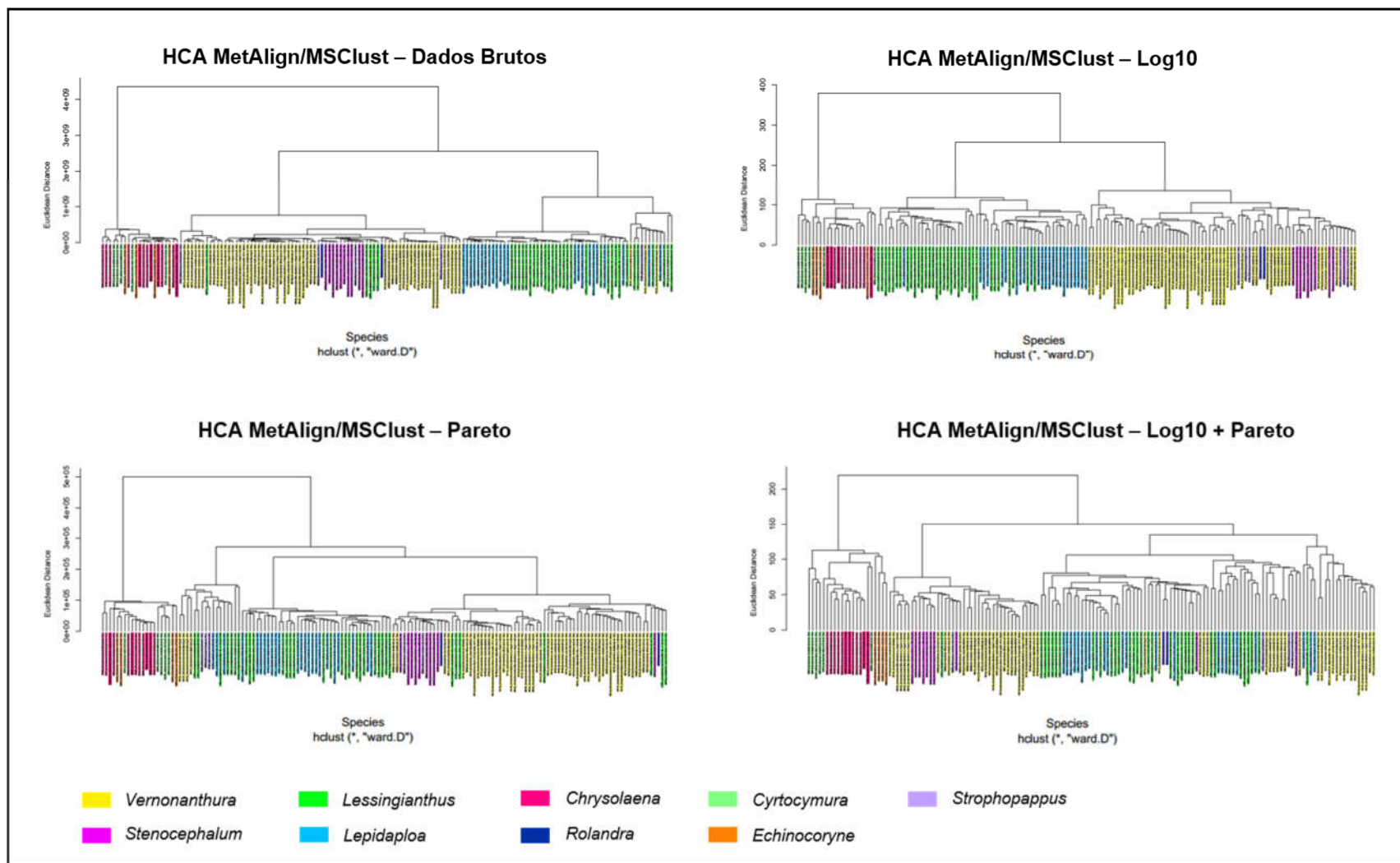
Apêndice 8: Comparação entre os dendogramas obtidos após o pré-processamento dos dados com os softwares *MetAlign/ MScIust* e *MzMine* (com dado final em função da área e da altura), utilizando a matriz binária dos dados.



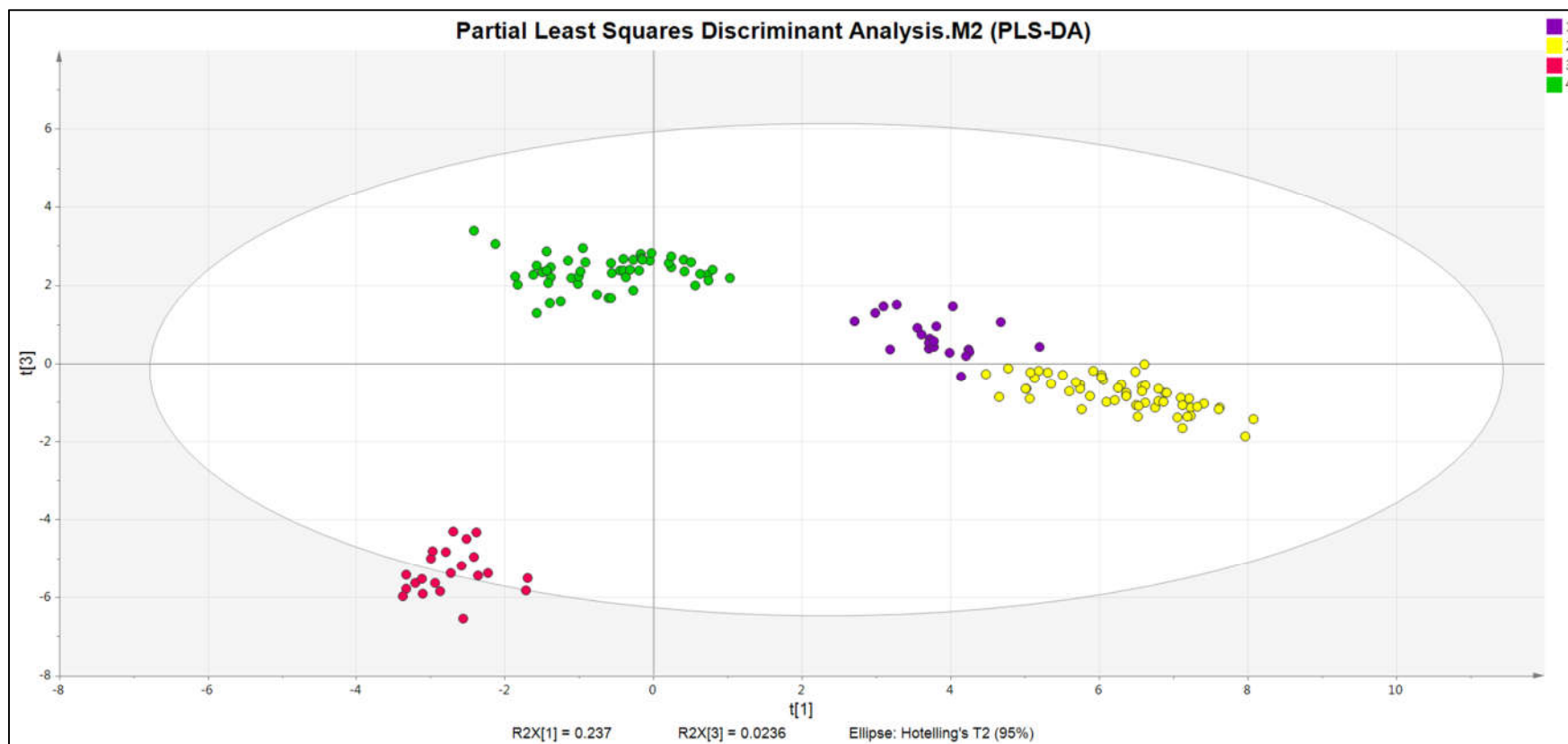
Apêndice 9: Análise por HCA dos dados pré-processados com o software *MzMine*, comparando os tratamentos realizados (escalonamento por Pareto, transformação por Log 10 e transformação por Log10 seguido por escalonamento por Pareto).



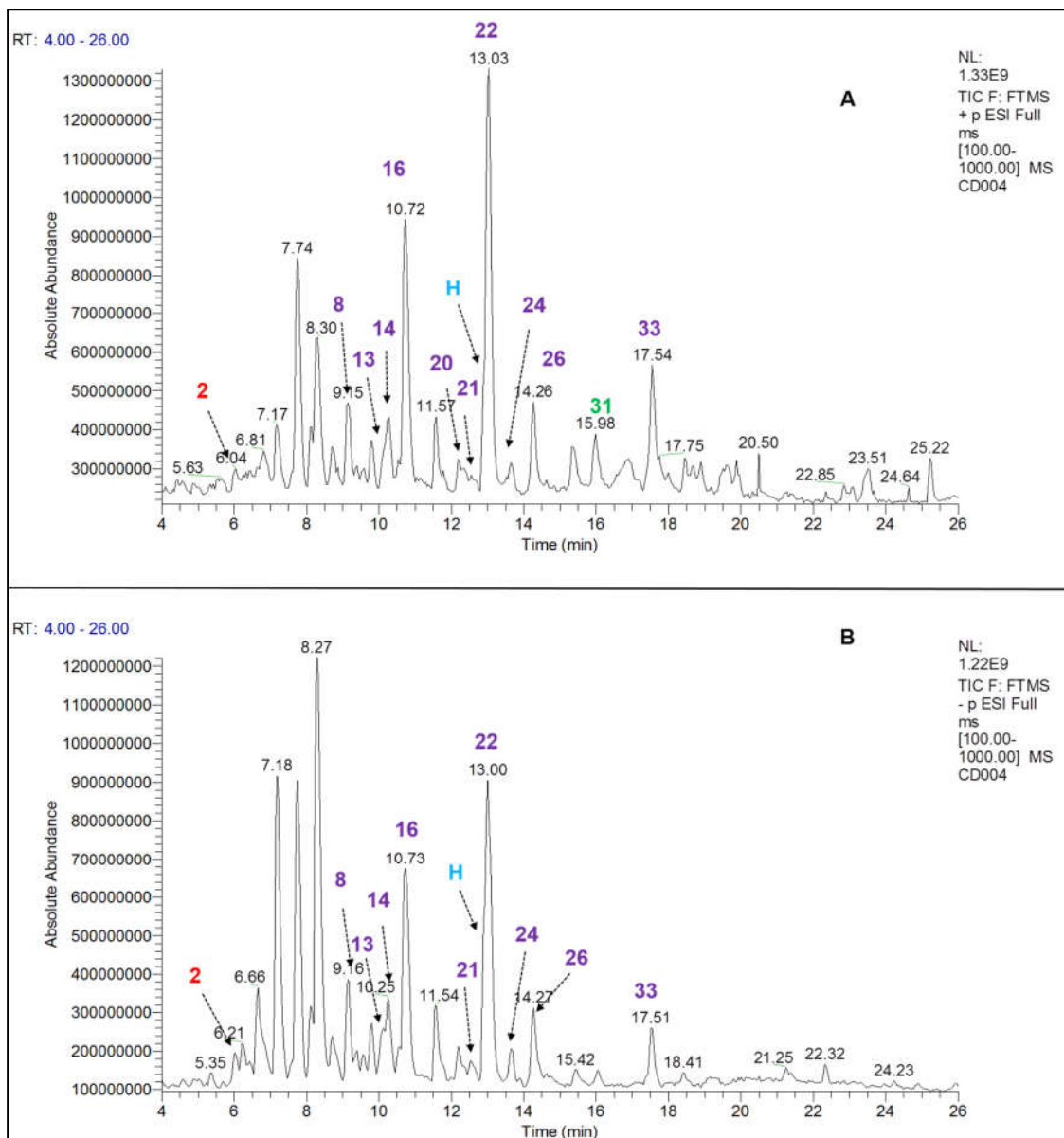
Apêndice 10: Análise por HCA dos dados pré-processados com o software *MetAlign/MSClust*, comparando os tratamentos realizados (escalonamento por Pareto, transformação por Log10 e transformação por Log10 seguido por escalonamento por Pareto).



Apêndice 11: PLS-DA score plot das espécies analisadas por UHPLC-UV-MS utilizando como classes os grupos obtidos na análise por HCA. Grupo 1 (roxo), Grupo 2 (amarelo), Grupo 3 (rosa) e Grupo 4 (verde).

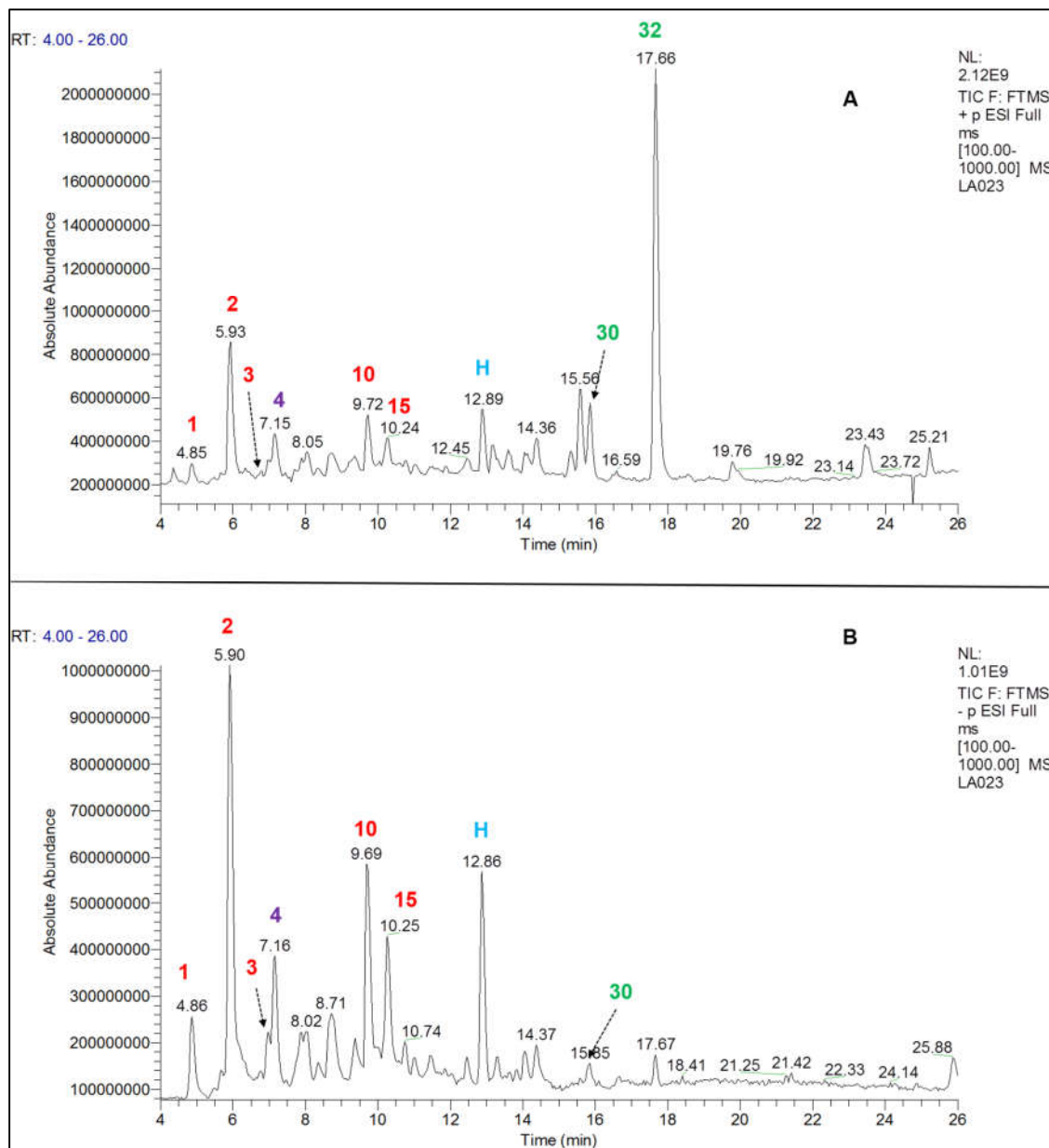


Apêndice 12: Cromatograma obtido para *Chrysolea desertorum* (CD004) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



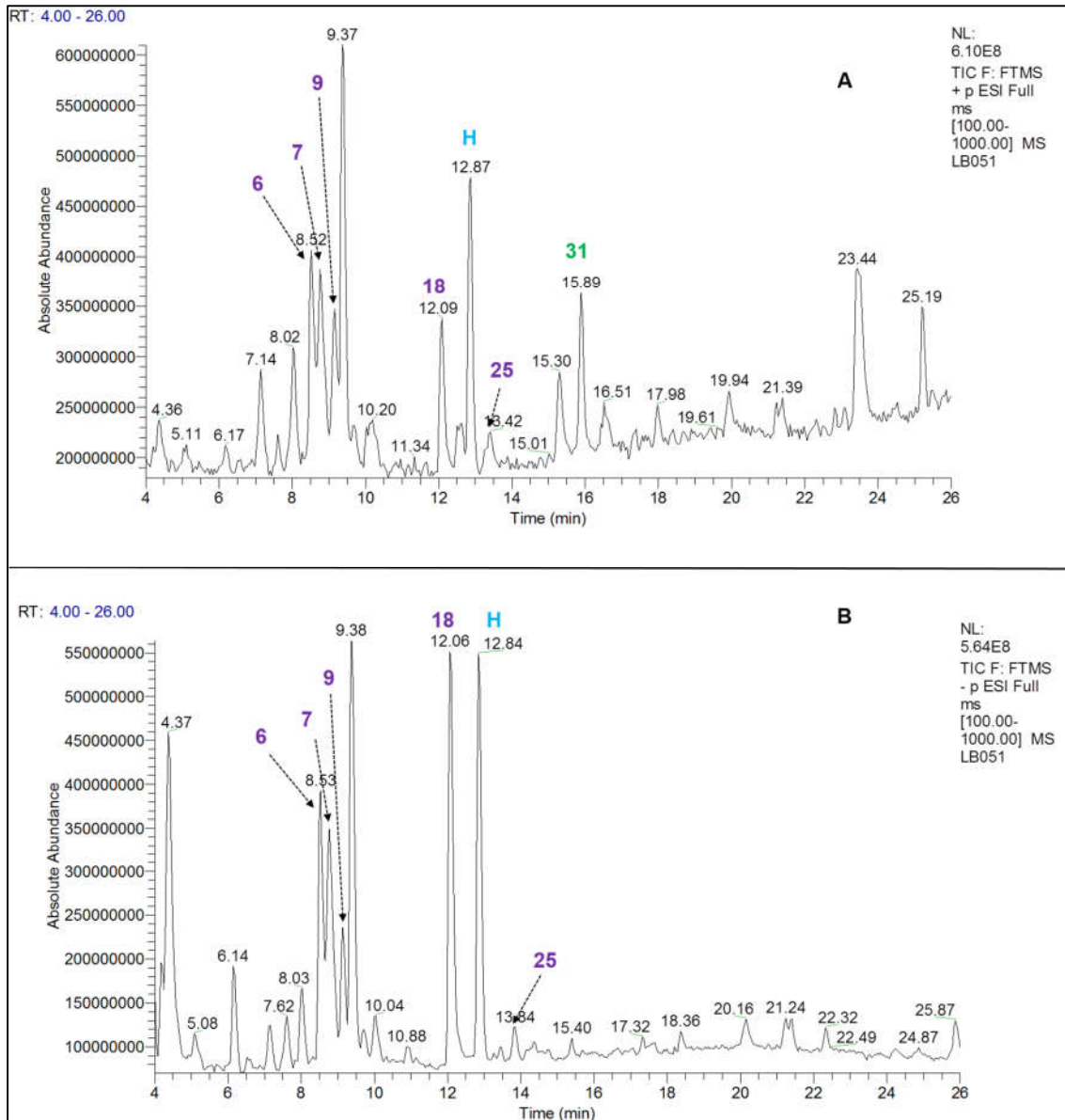
Legenda: 2: ácido 5-O-cafeoilquínico; 8: luteolina 7-O-glicuronídeo; 13: apigenina 7-O-glicuronídeo; 14: chrisoeriol 7-O-neohesperidosídeo; 16: chrisoeriol 7-O-glicuronídeo; 21: tilirosídeo; 22: acetina 7-O-glicuronídeo; 24: apigenina; 26: chrisoeriol; 31: glaucolido B; 33: genkwanina; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 13: Cromatograma obtido para *Lepidaploa lilacina* (LA023) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



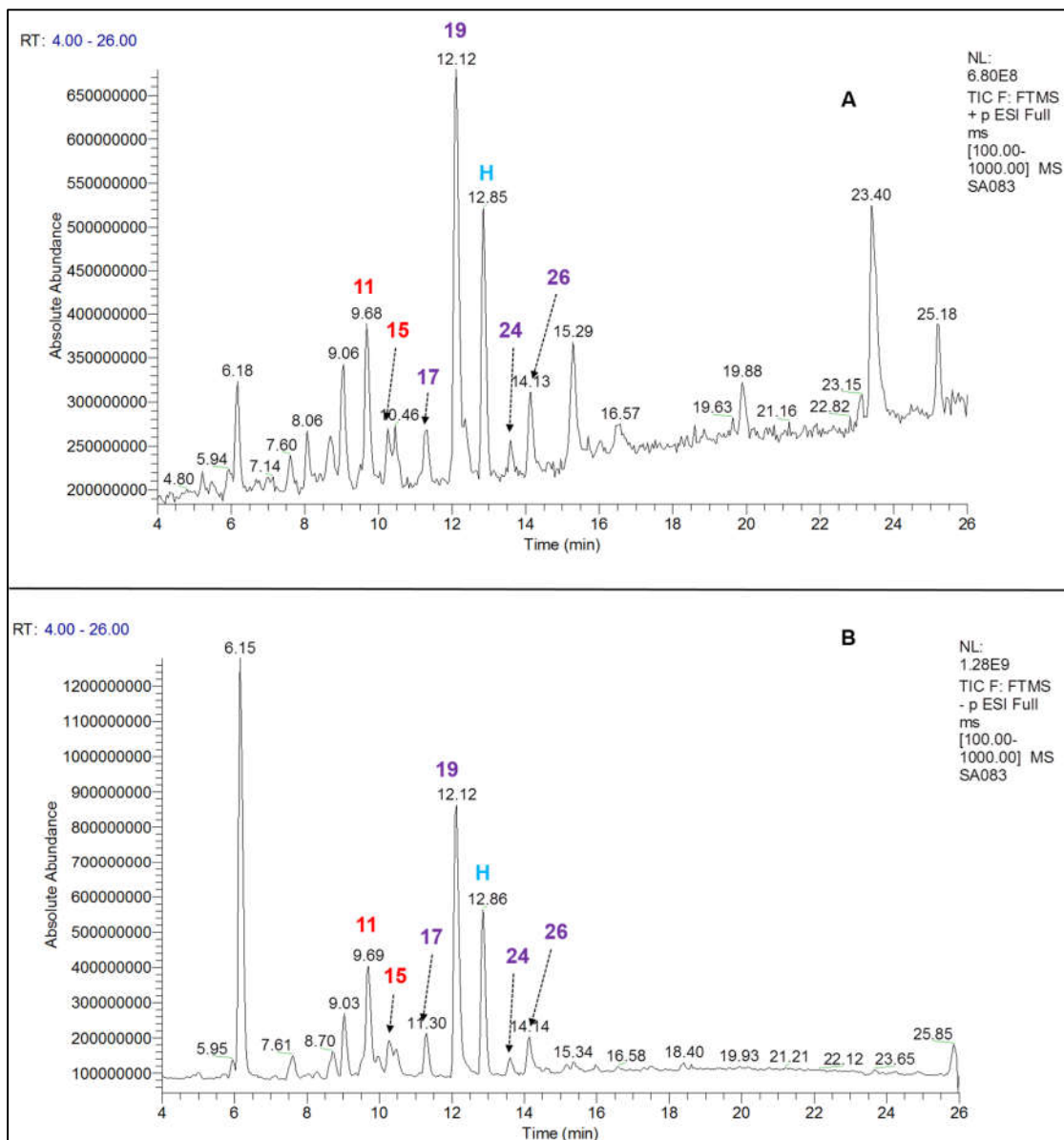
Legenda: 1: ácido 3-*O*-cafeoilquínico; 2: ácido 5-*O*-cafeoilquínico; 3: ácido 5-*p*-cumaroilquínico; 4: vicenina-2; 10: ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico; 15: ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico; 30: piptocarphina A; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 14: Cromatograma obtido para *Lessingianthus buddleifolius* (LB051) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



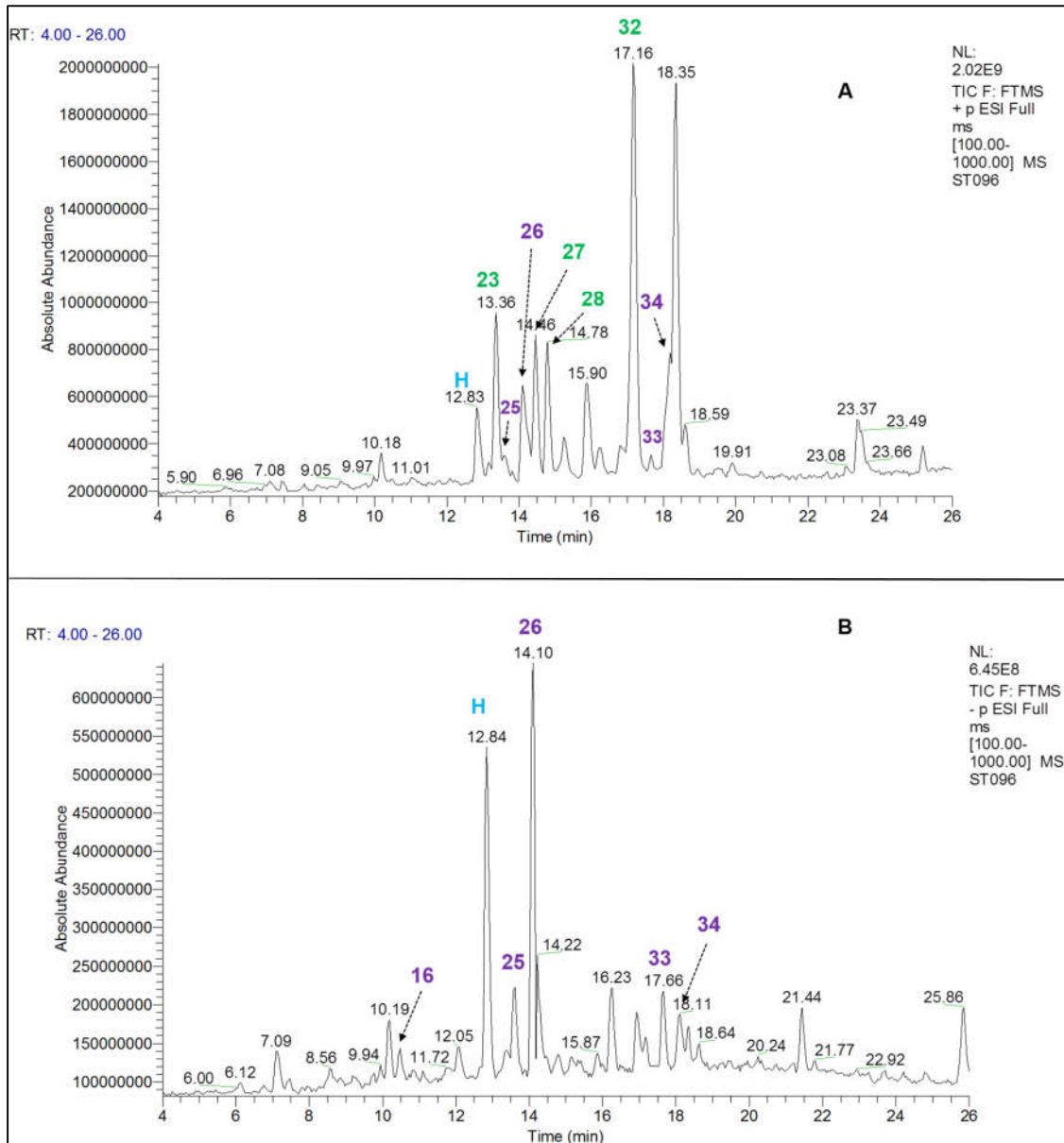
Legenda: 6: quercetina 3-O-rutinosídeo; 7: quercetina 3-O-glicosídeo; 9: kaempferol 3-O-rutinosídeo
18: quercetina; 25: kaempferol; 31: glaucolido B; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 15: Cromatograma obtido para *Stenocephalum apiculatum* (SA083) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



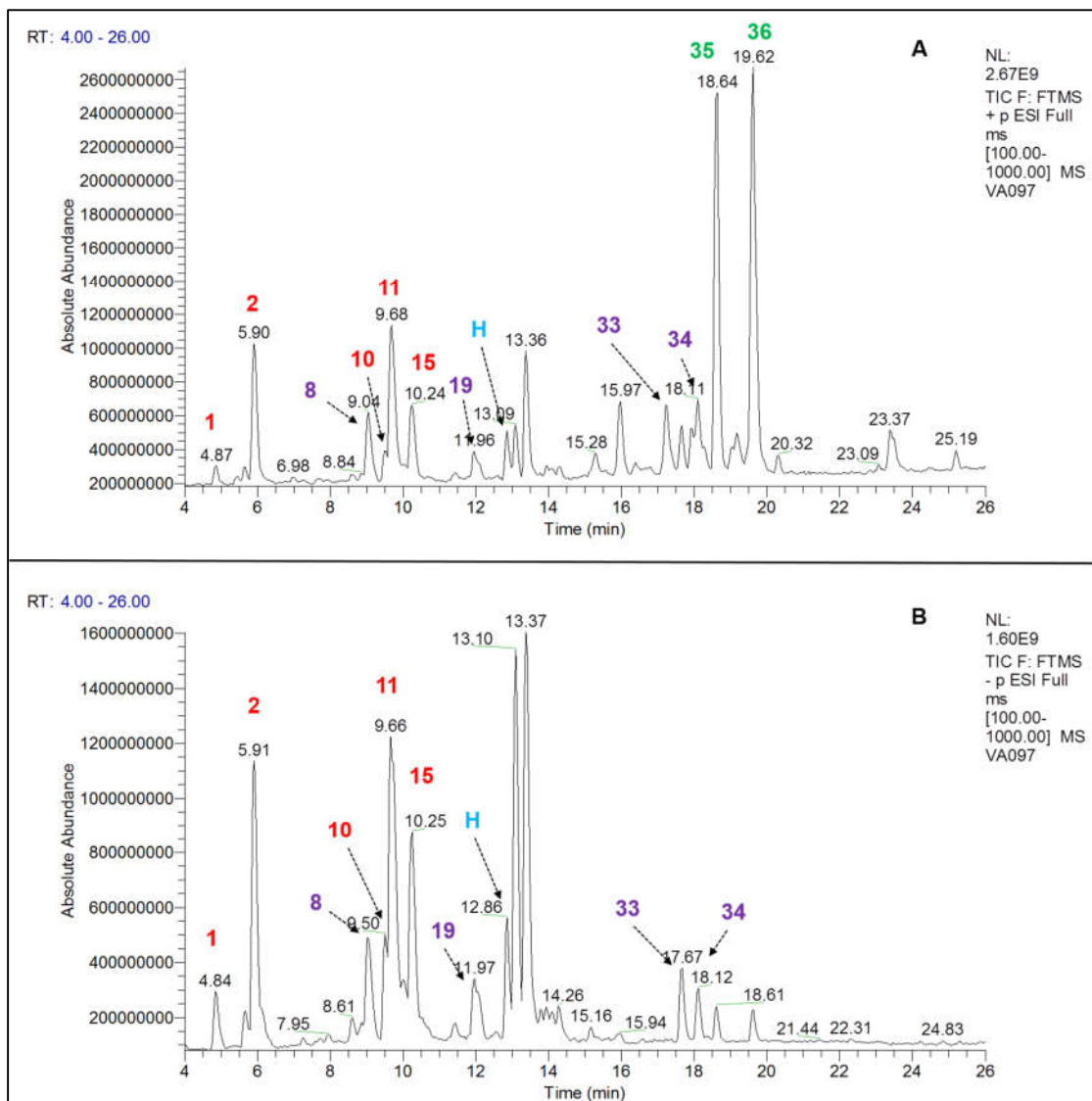
Legenda: 11: ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; 15: ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico; 17: isoorientina 3'-O-glicosídeo; 19: luteolina; 24: apigenina; 26: chrisoeriol; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 16: Cromatograma obtido para *Stilpnopappus tomentosus* (ST096) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



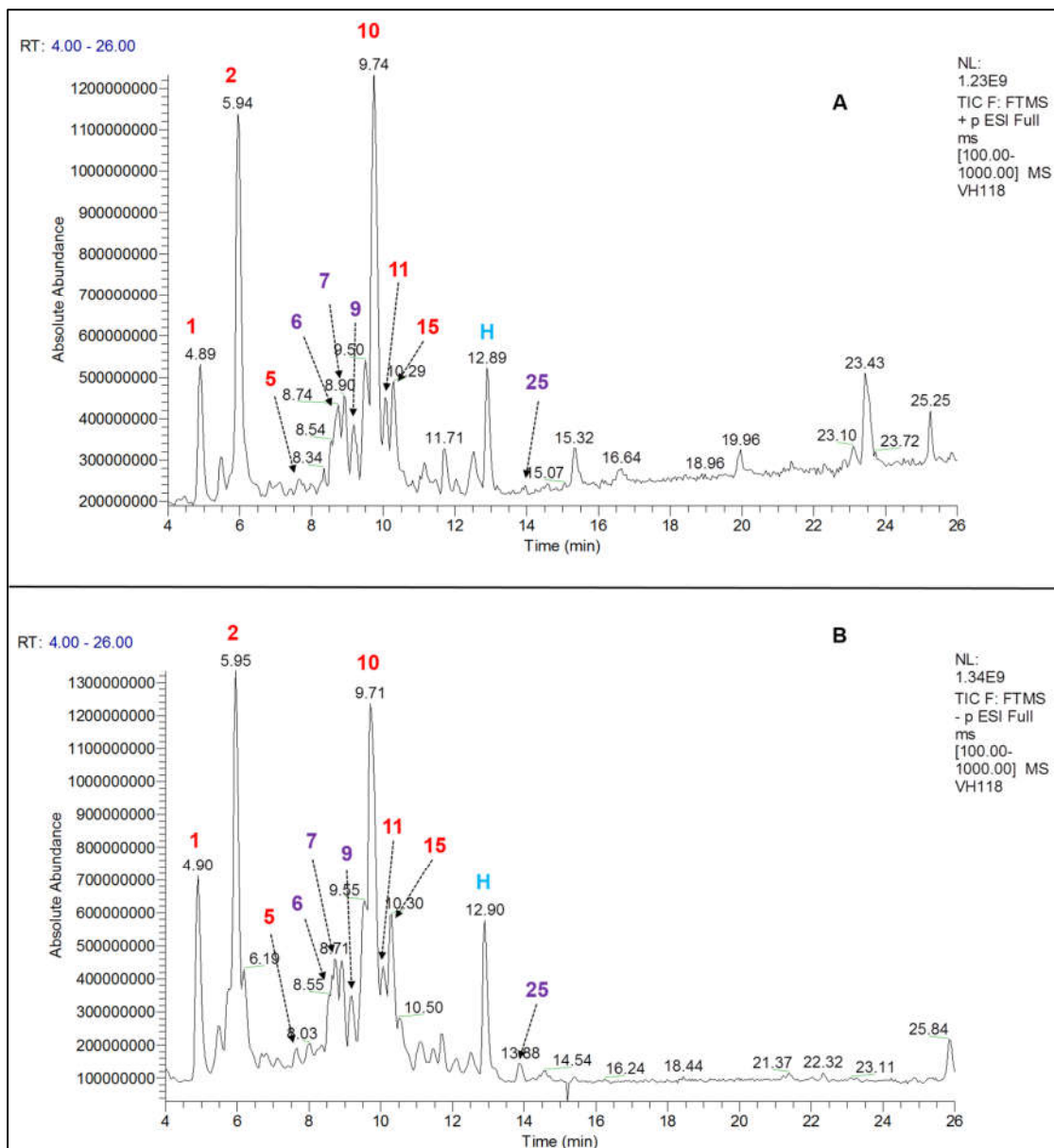
Legenda: 16: chrisoeriol 7-O-glicuronídeo; 23: 8-O-(2-metilpropenoil) hirsutinolido; 25: kaempferol; 26: chrisoeriol; 27: provável hirsutinolido; 28: 8-tigloilóxi hirsutinolido; 32: provável hirsutinolido; 33: genkwanina; 34: 3',4'-dimetoxiluteolina; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 17: Cromatograma obtido para *Vernonanthura almedae* (VA097) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



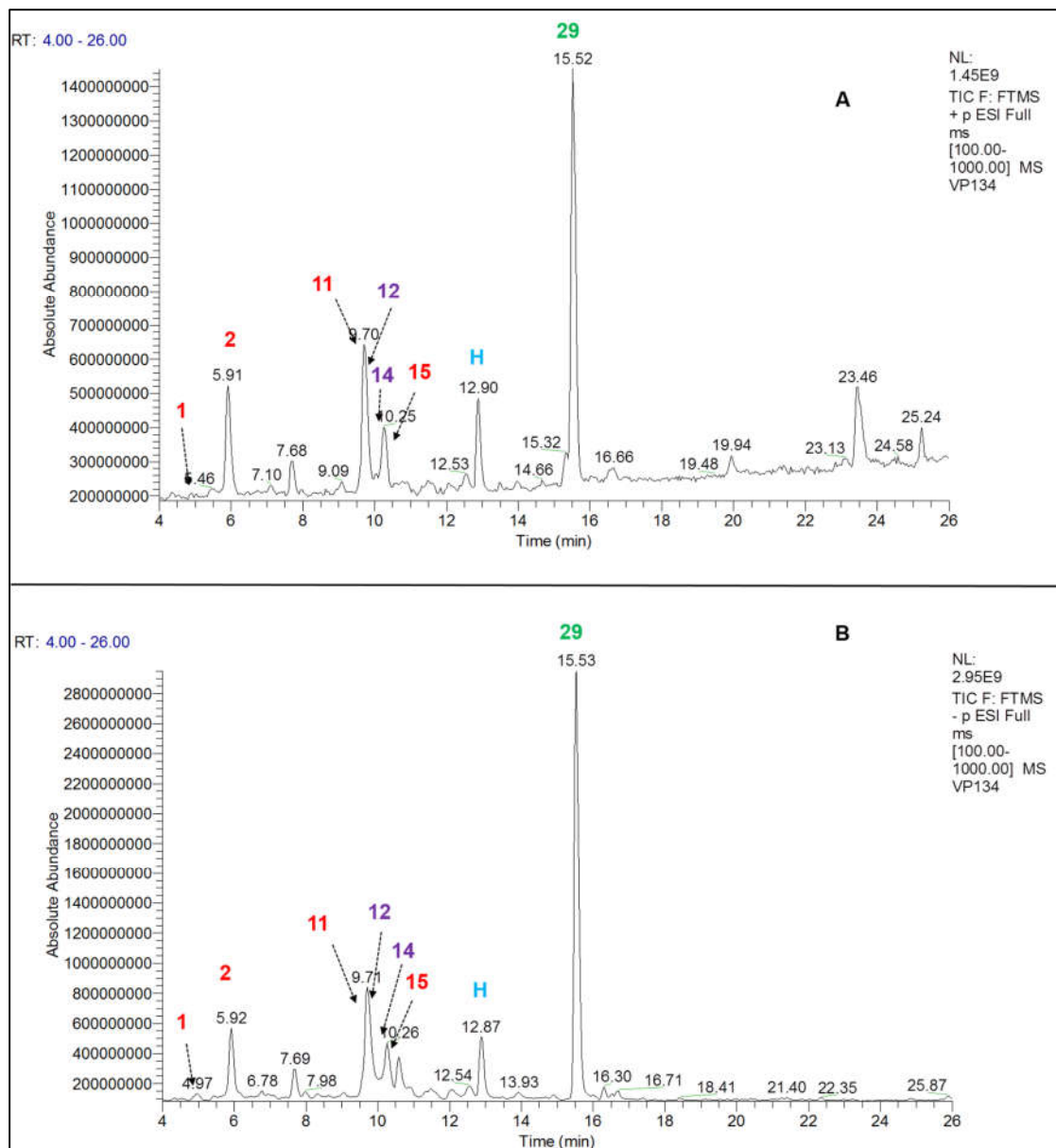
Legenda: 1: ácido 3-O-cafeoilquínico; 2: ácido 5-O-cafeoilquínico; 8: luteolina 7-O-glicuronídeo; 10: ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico; 11: ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; 15: ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico; 19: luteolina; 33: genkwanina; 34: 3',4'-dimetoxiluteolina; 35: glaucólido A; 36: 8-tigloilóxi-glaucólido A; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 18: Cromatograma obtido para *Vernonanthura hilairiana* (VH118) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



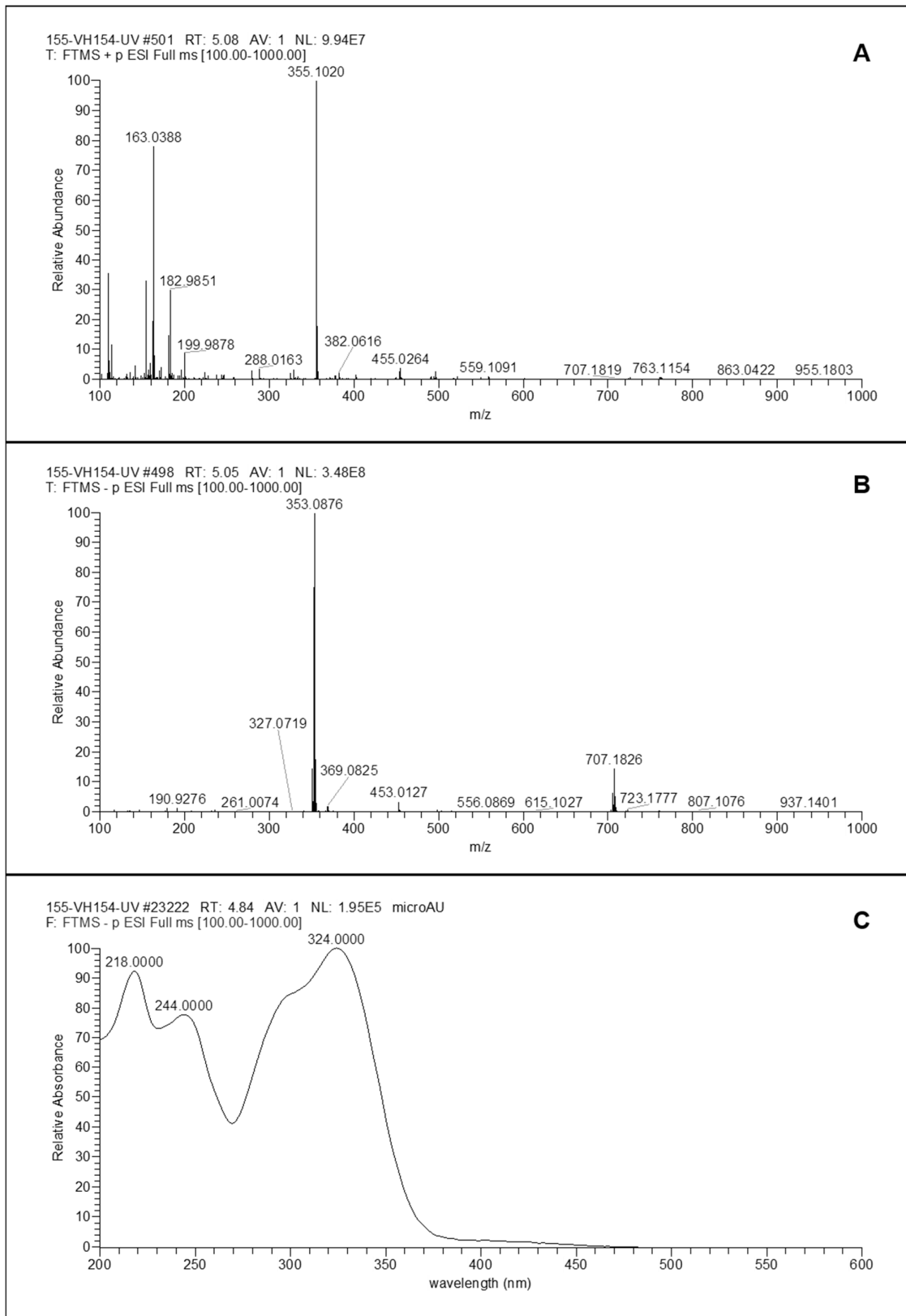
Legenda: 1: ácido 3-O-cafeoilquínico; 2: ácido 5-O-cafeoilquínico; 5: ácido 5-O-(E)-feruloilquínico; 6: quercetina 3-O-rutinosídeo; 7: quercetina 3-O-glicosídeo; 9: kaempferol 3-O-rutinosídeo; 10: ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico; 11: ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; 15: ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico; 25: kaempferol; H: hidrocortisona (10µg/mL).

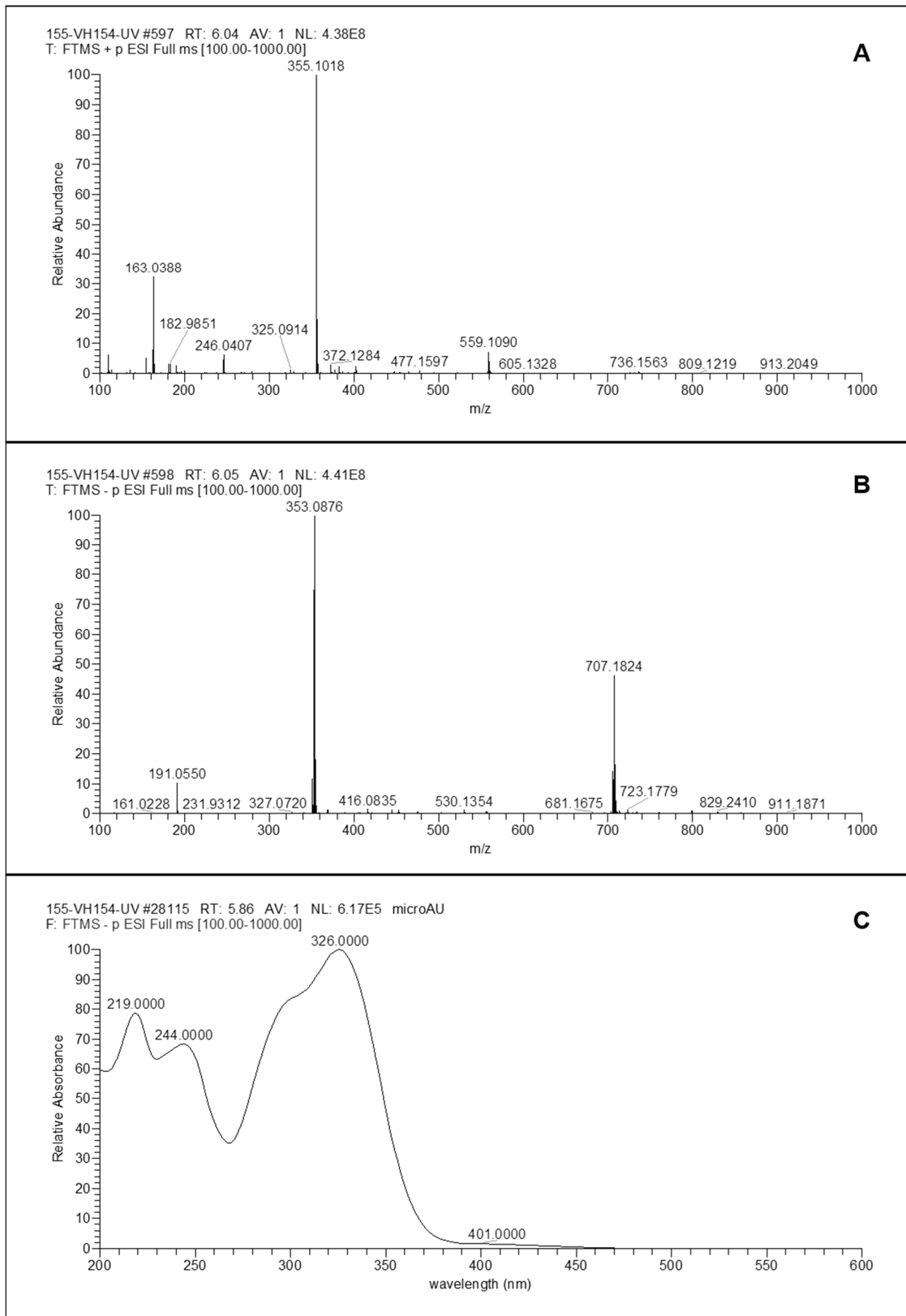
Apêndice 19: Cromatograma obtido para *Vernonanthura petiolaris* (VP134) no modo de ionização positivo (A) e negativo (B), na região de 4 a 26 minutos, destacando os ácidos clorogênicos (vermelho), flavonoides (roxo) e lactonas sesquiterpênicas (verde) identificados.



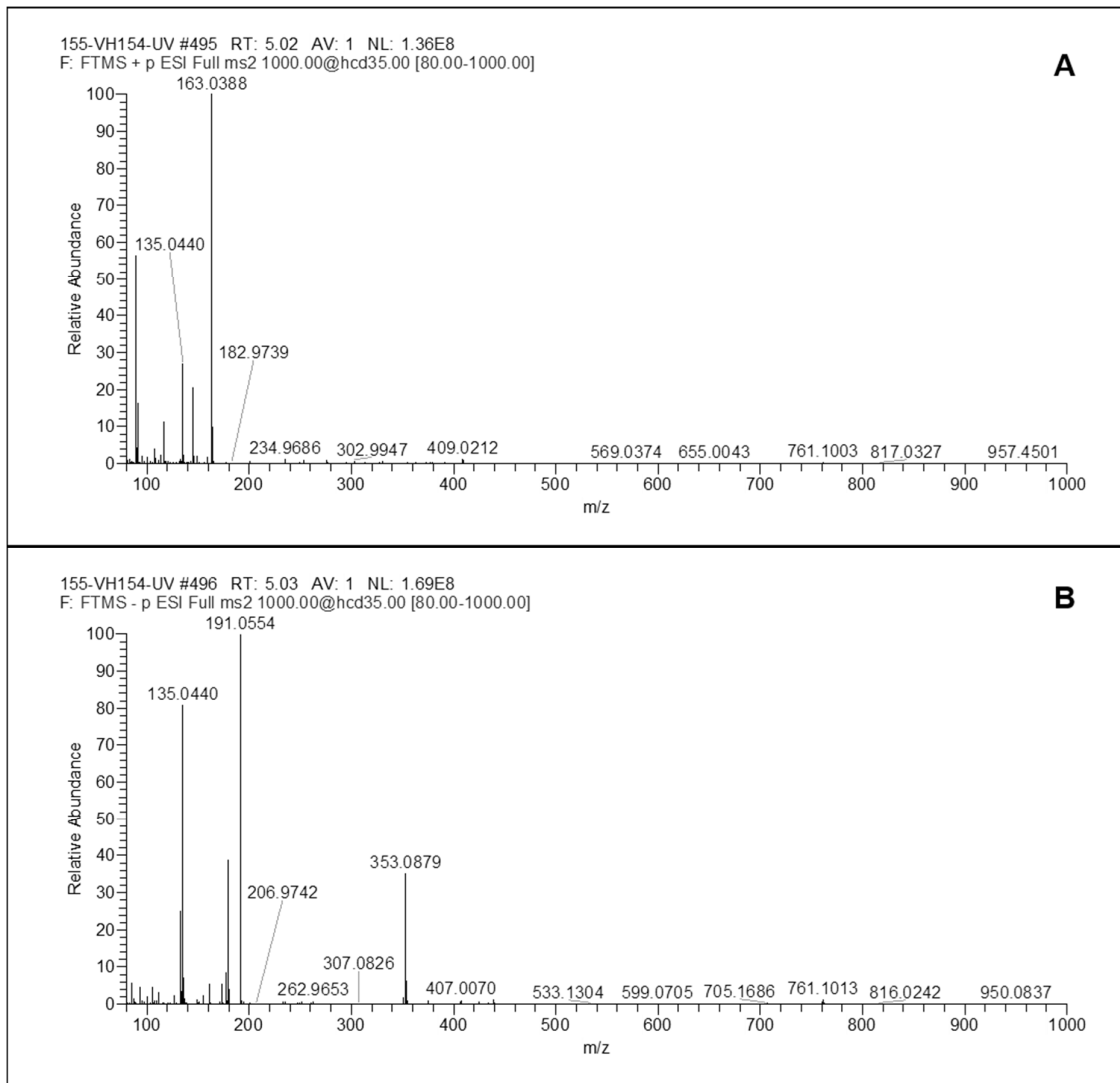
Legenda: 1: ácido 3-O-cafeoilquínico; 2: ácido 5-O-cafeoilquínico; 11: ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; 12: 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona; 14: chrisoeriol 7-O-neohesperidosídeo; 15: ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico; 29: deacilcinaropicrina; H: hidrocortisona (10µg/mL).

Apêndice 20: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 1, identificado como ácido 3-O-cafeoilquínico.

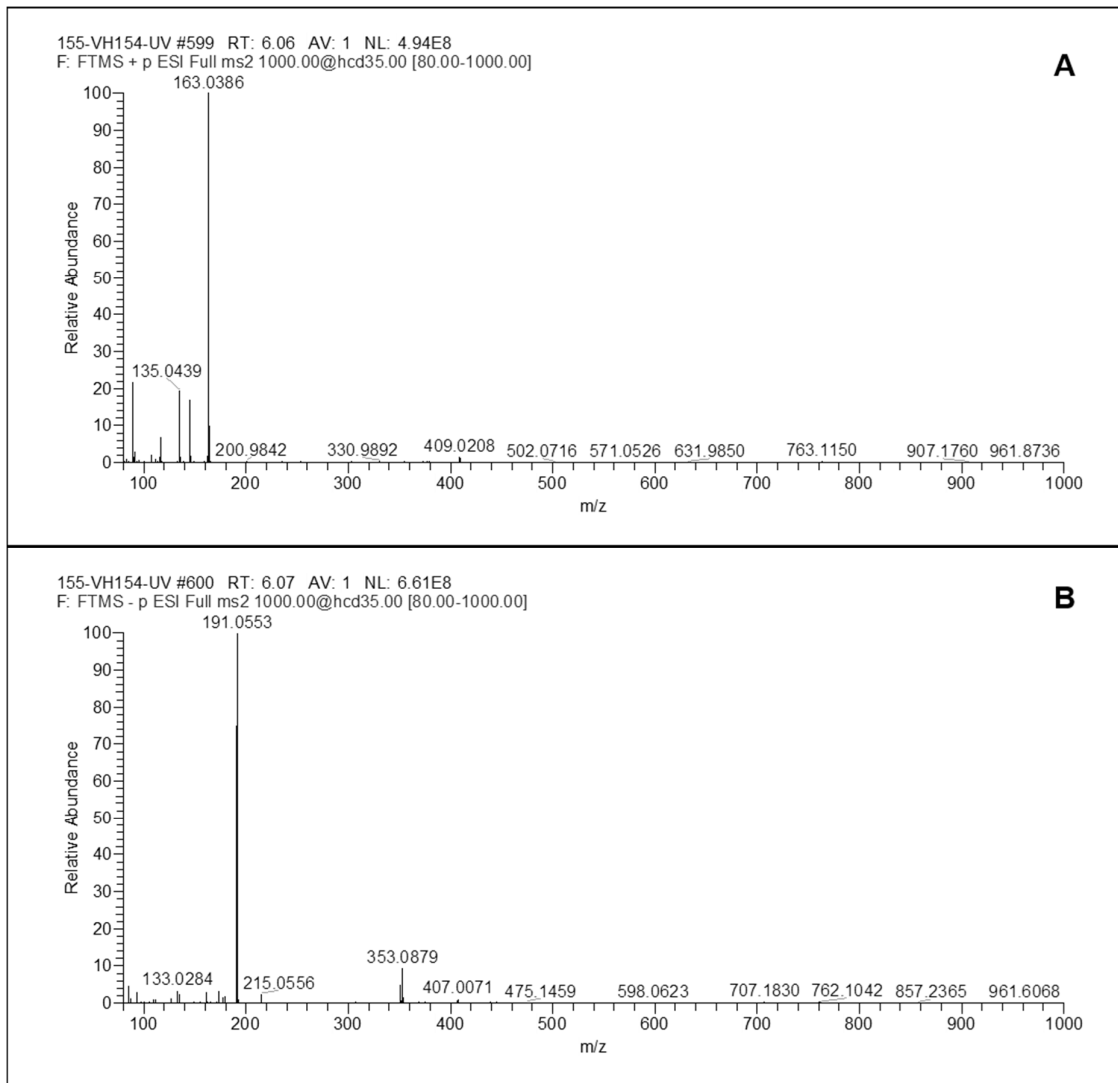


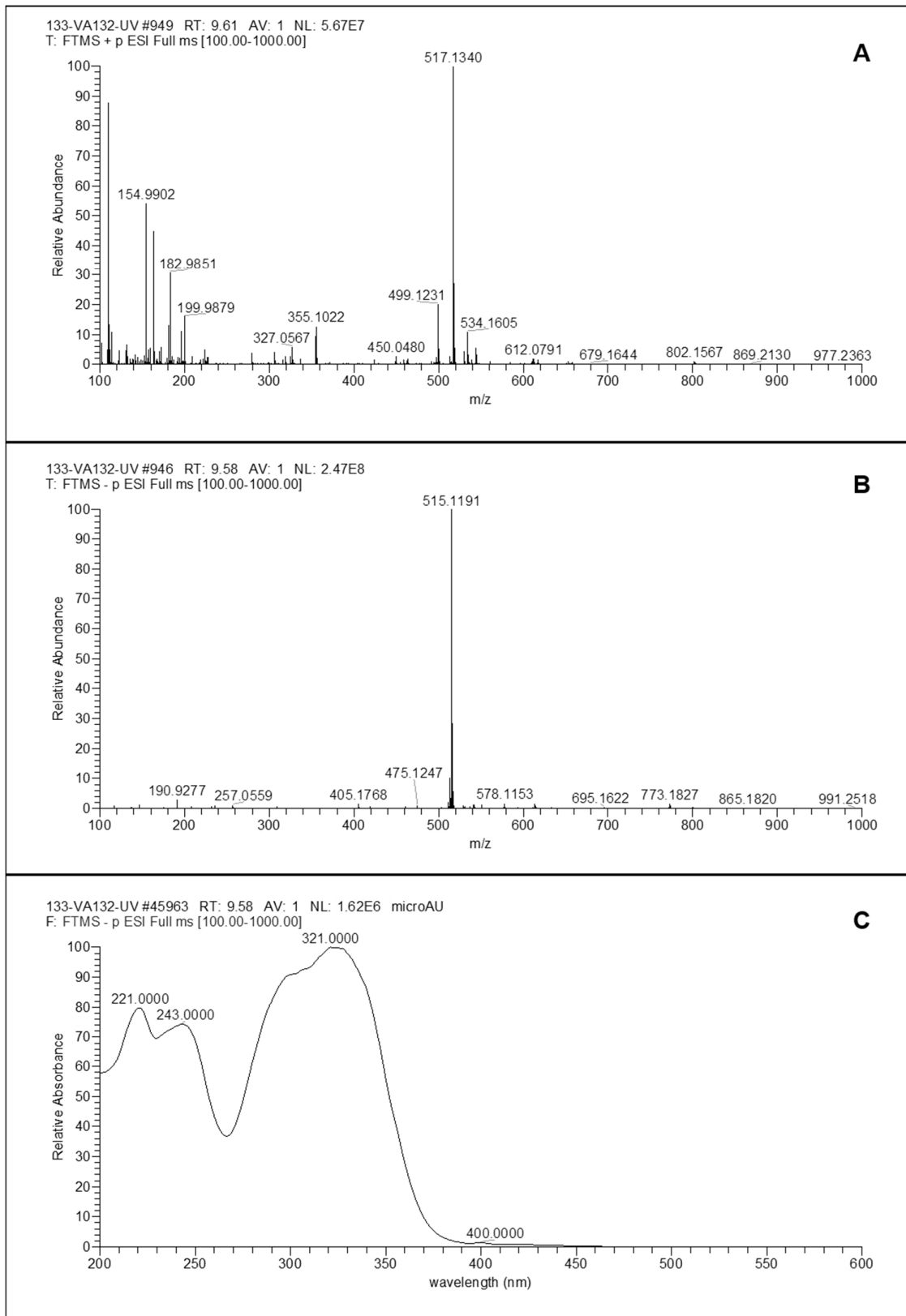
Apêndice 21: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 2, identificado como ácido 5-O-cafeoilquínico.

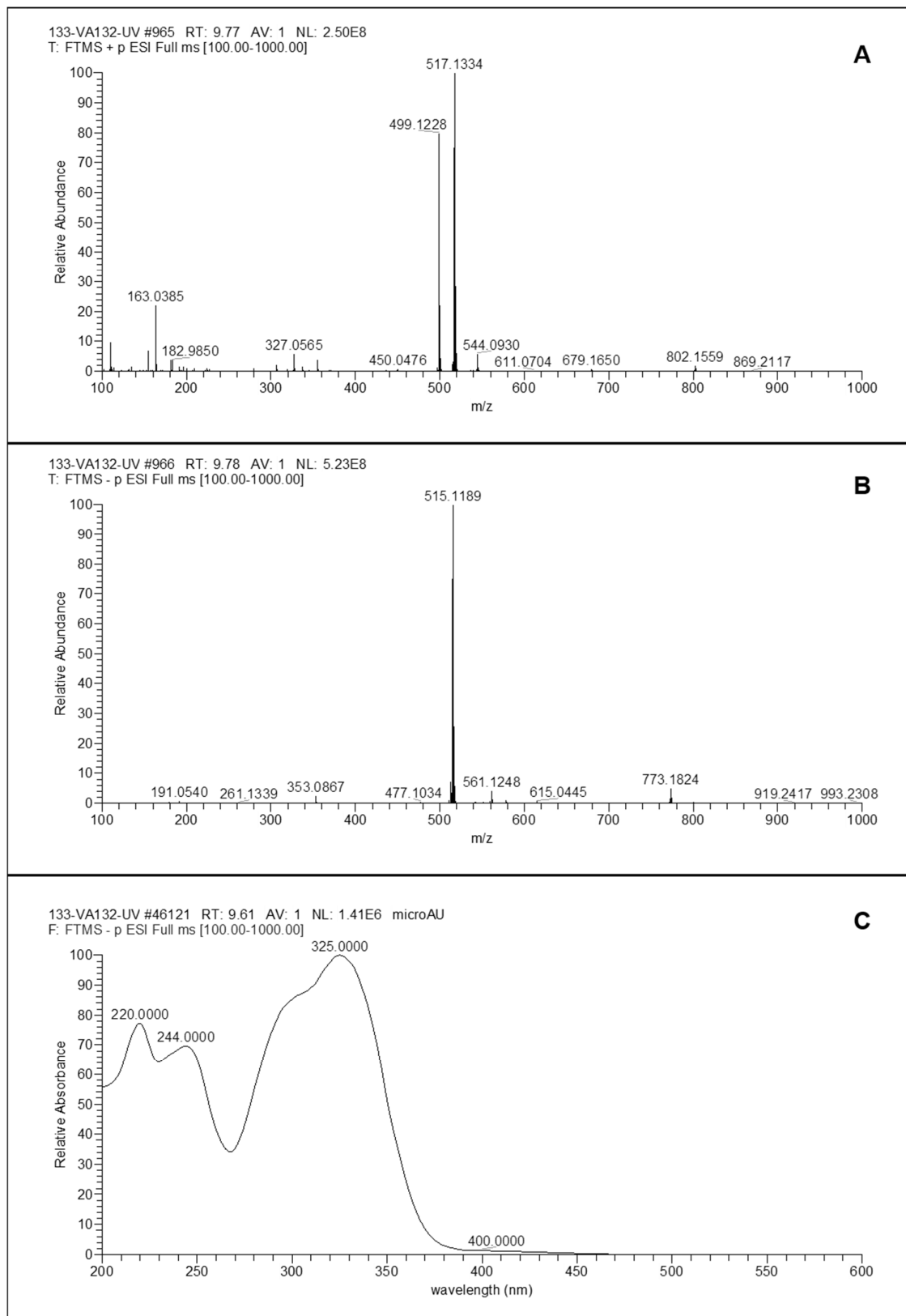
Apêndice 22: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 1, identificado como ácido 3-O-cafeoilquínico.



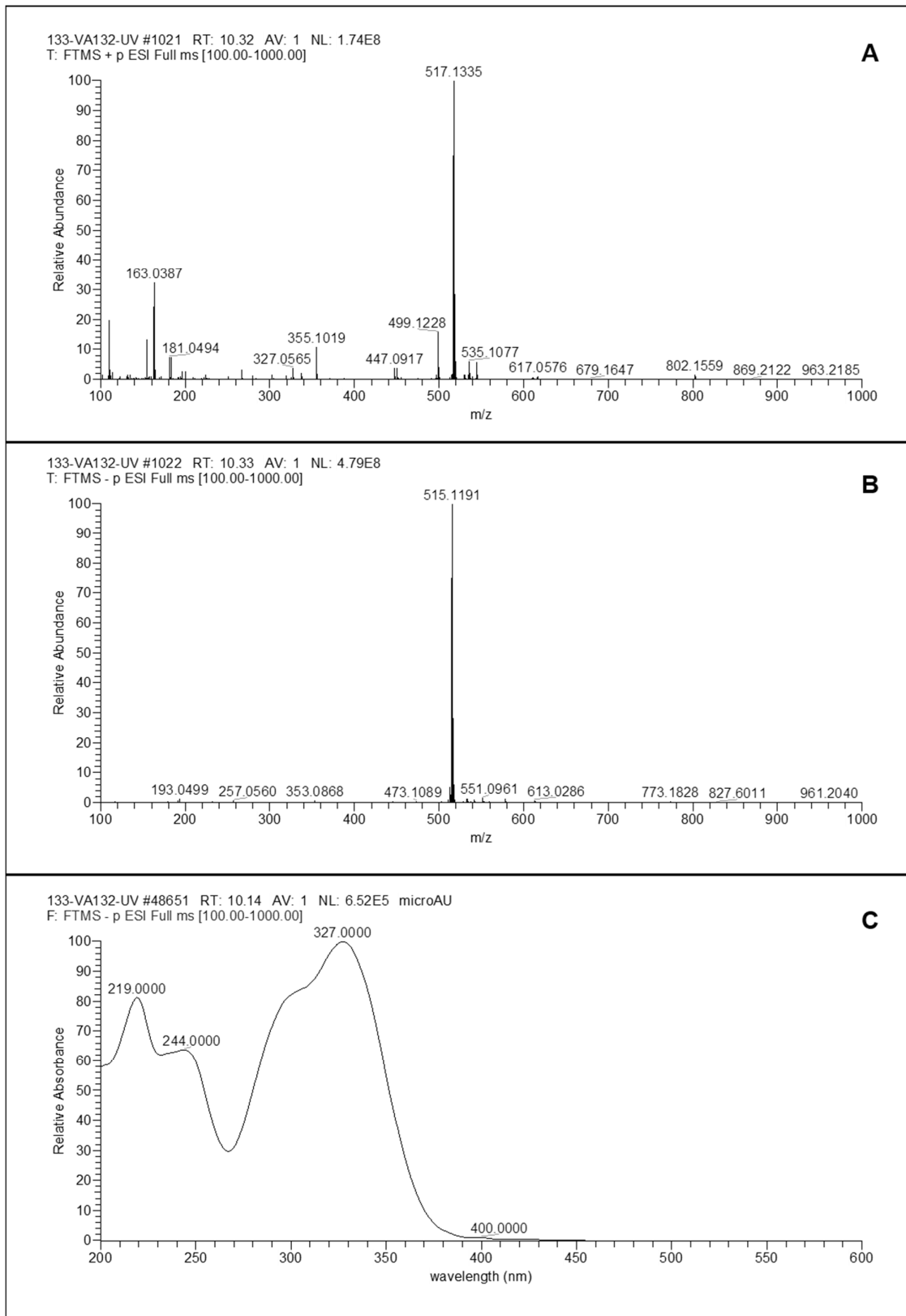
Apêndice 23: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 2, identificado como ácido 5-O-cafeoilquínico.



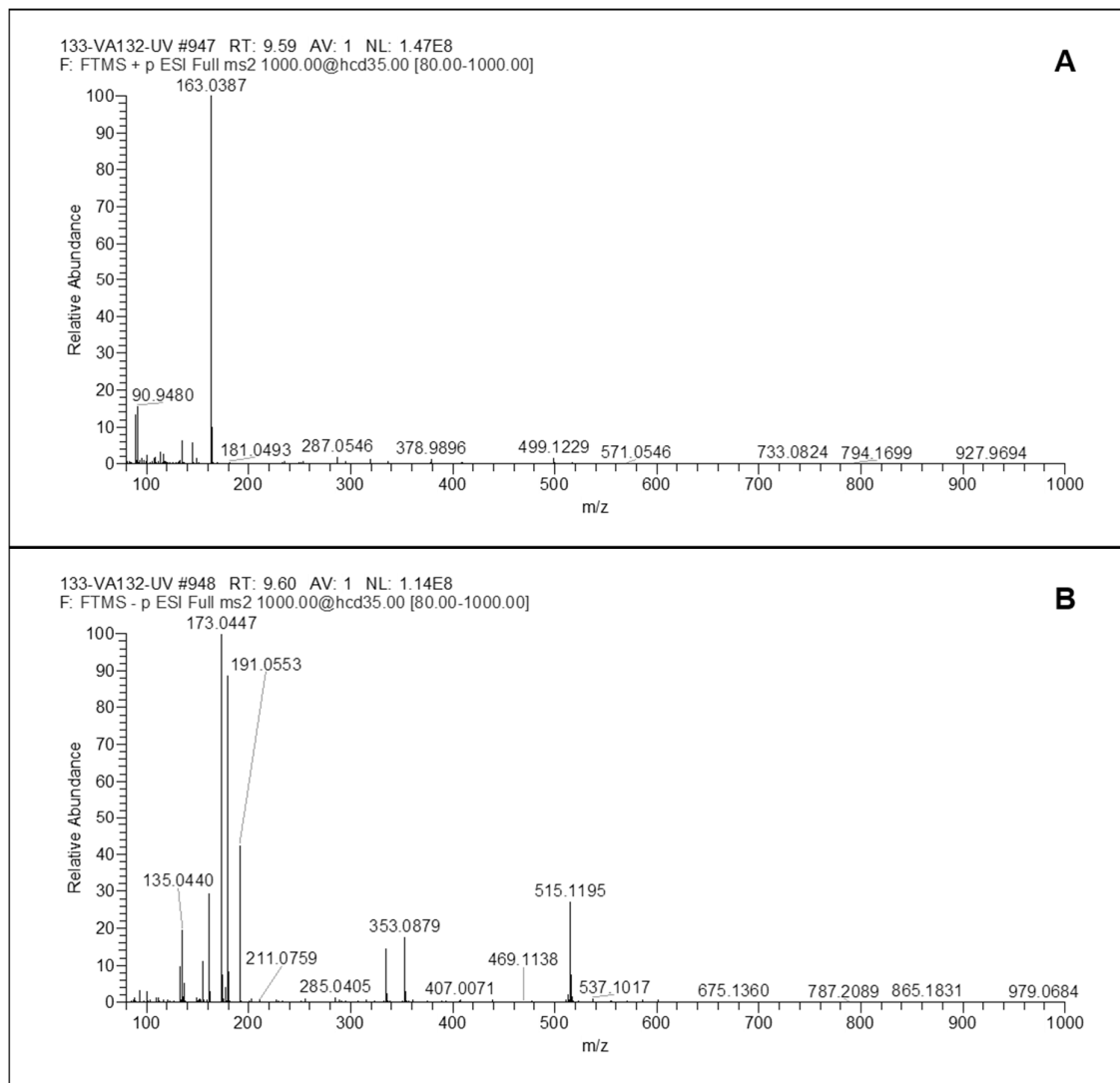
Apêndice 24: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 10, identificado como ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico.

Apêndice 25: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 11, identificado como ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico.

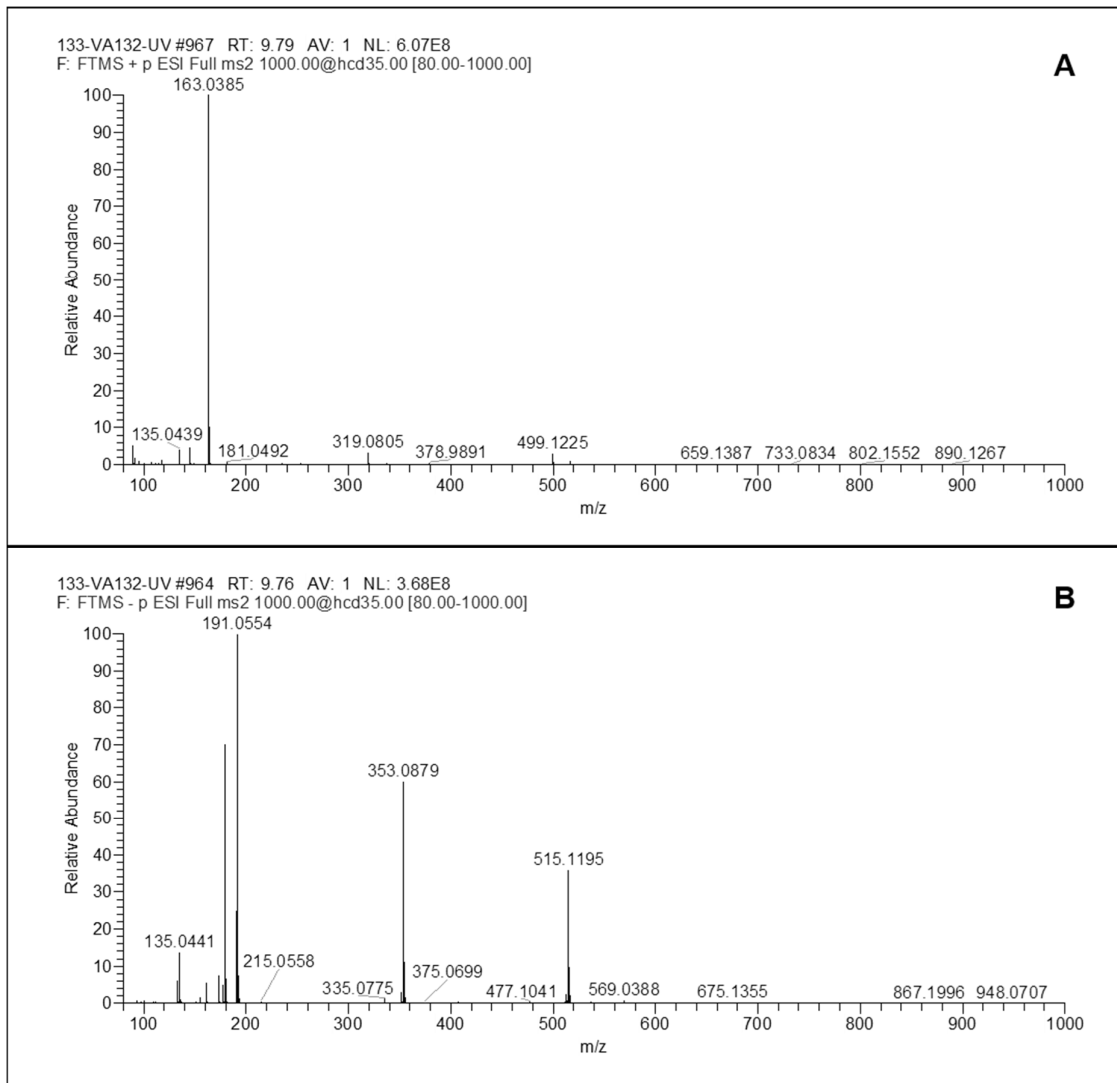
Apêndice 26: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 15, identificado como ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico.



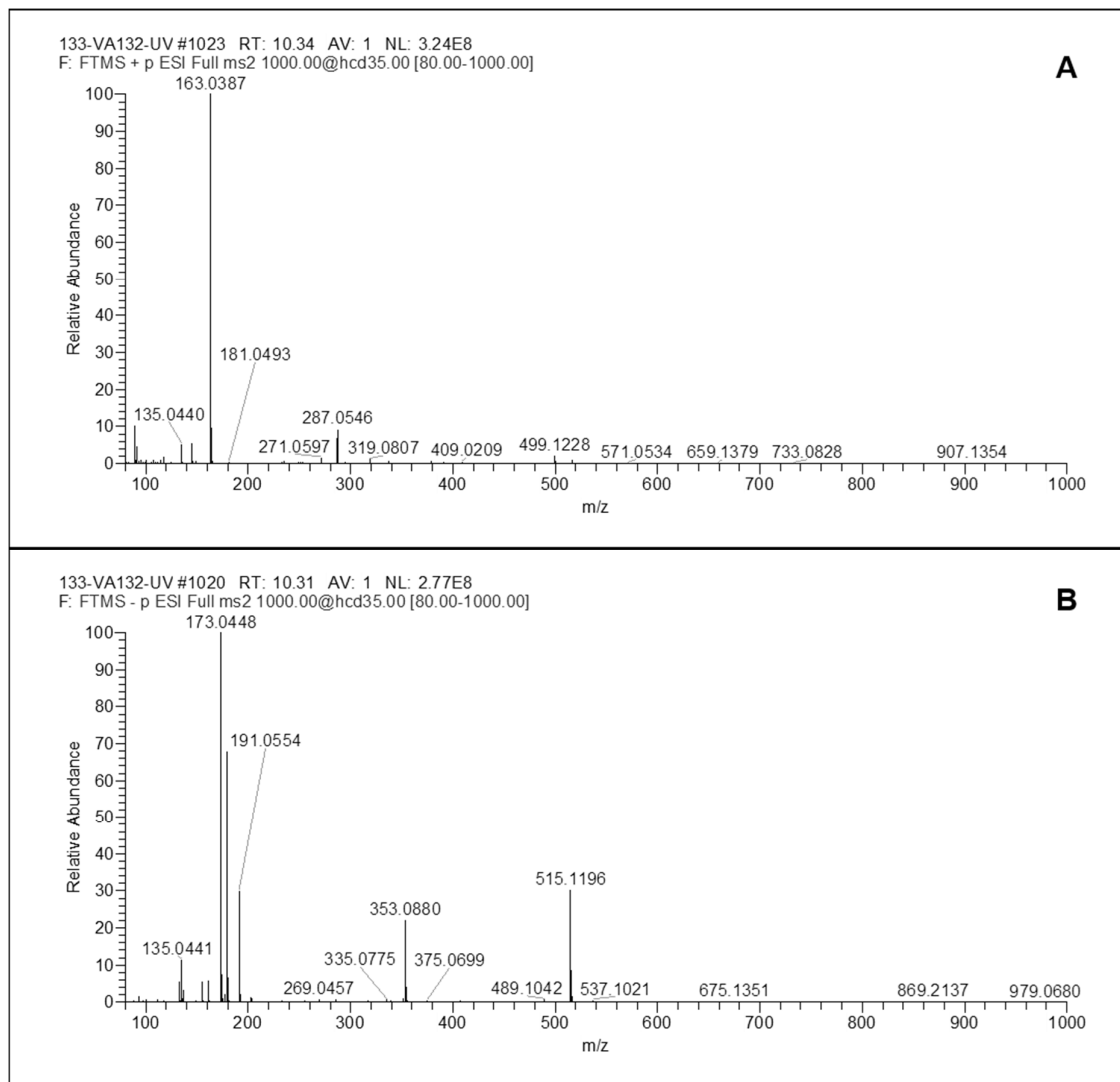
Apêndice 27: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 10, identificado como ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico.

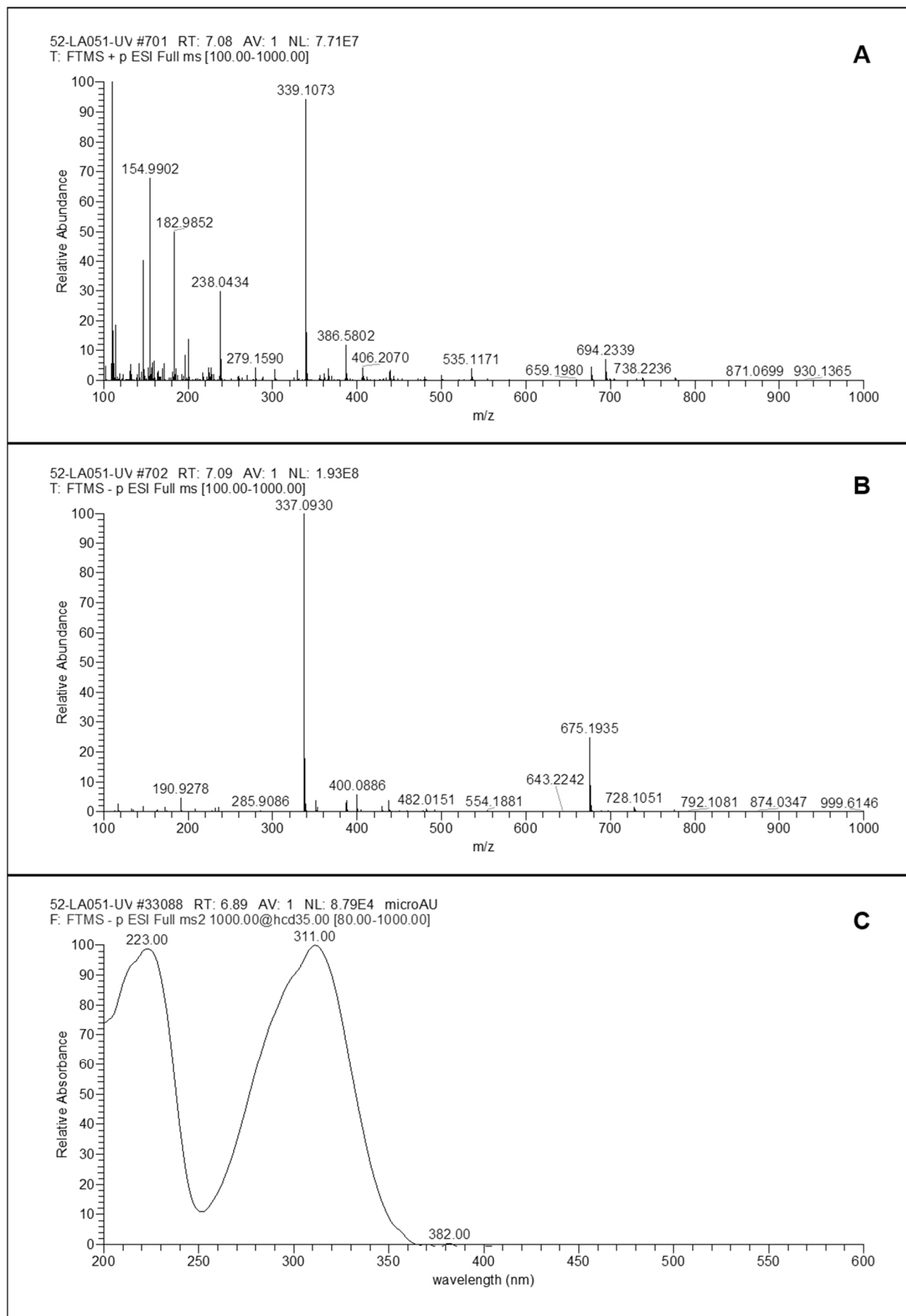


Apêndice 28: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 11, identificado como ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico.

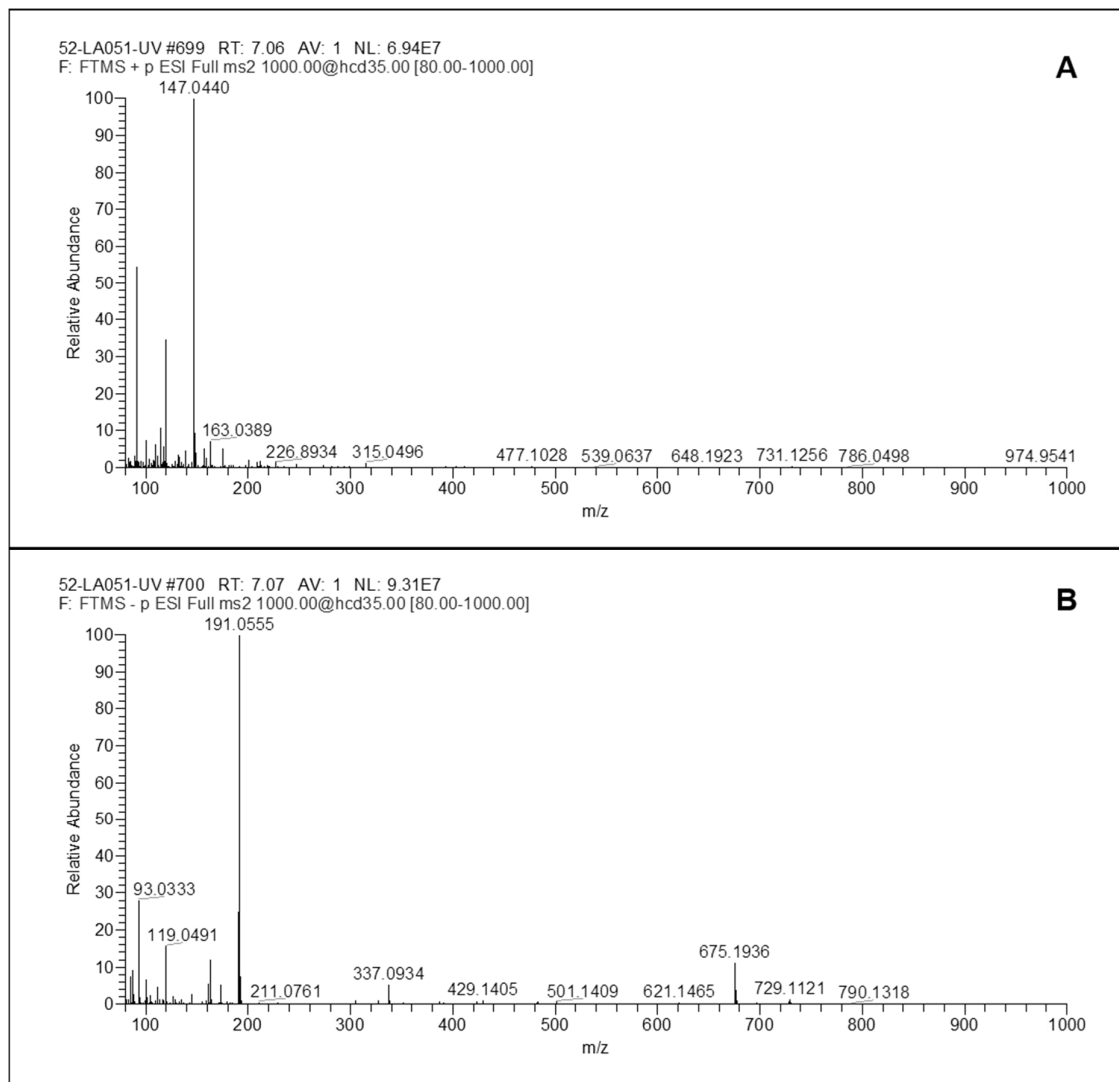


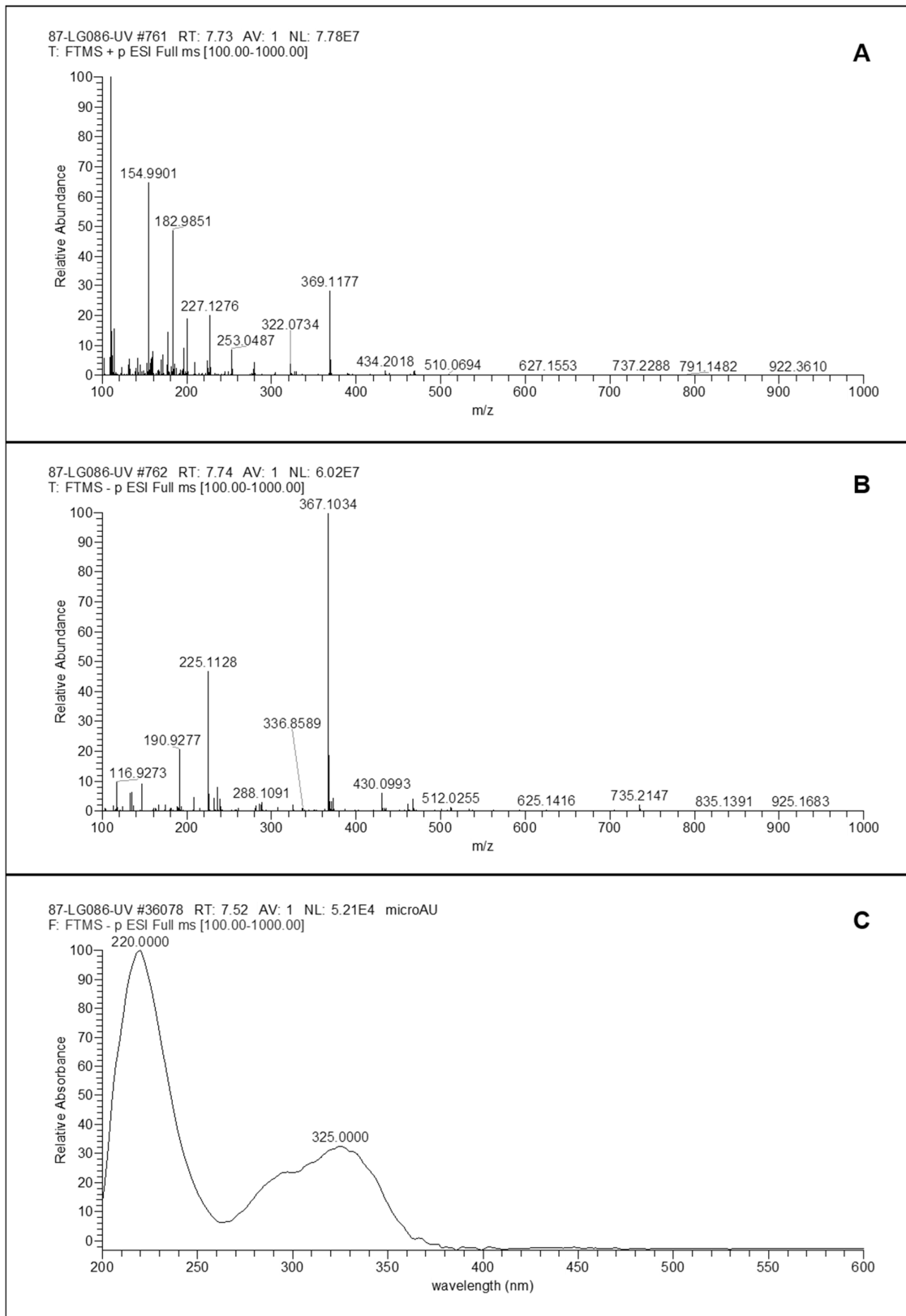
Apêndice 29: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 15, identificado como ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico.



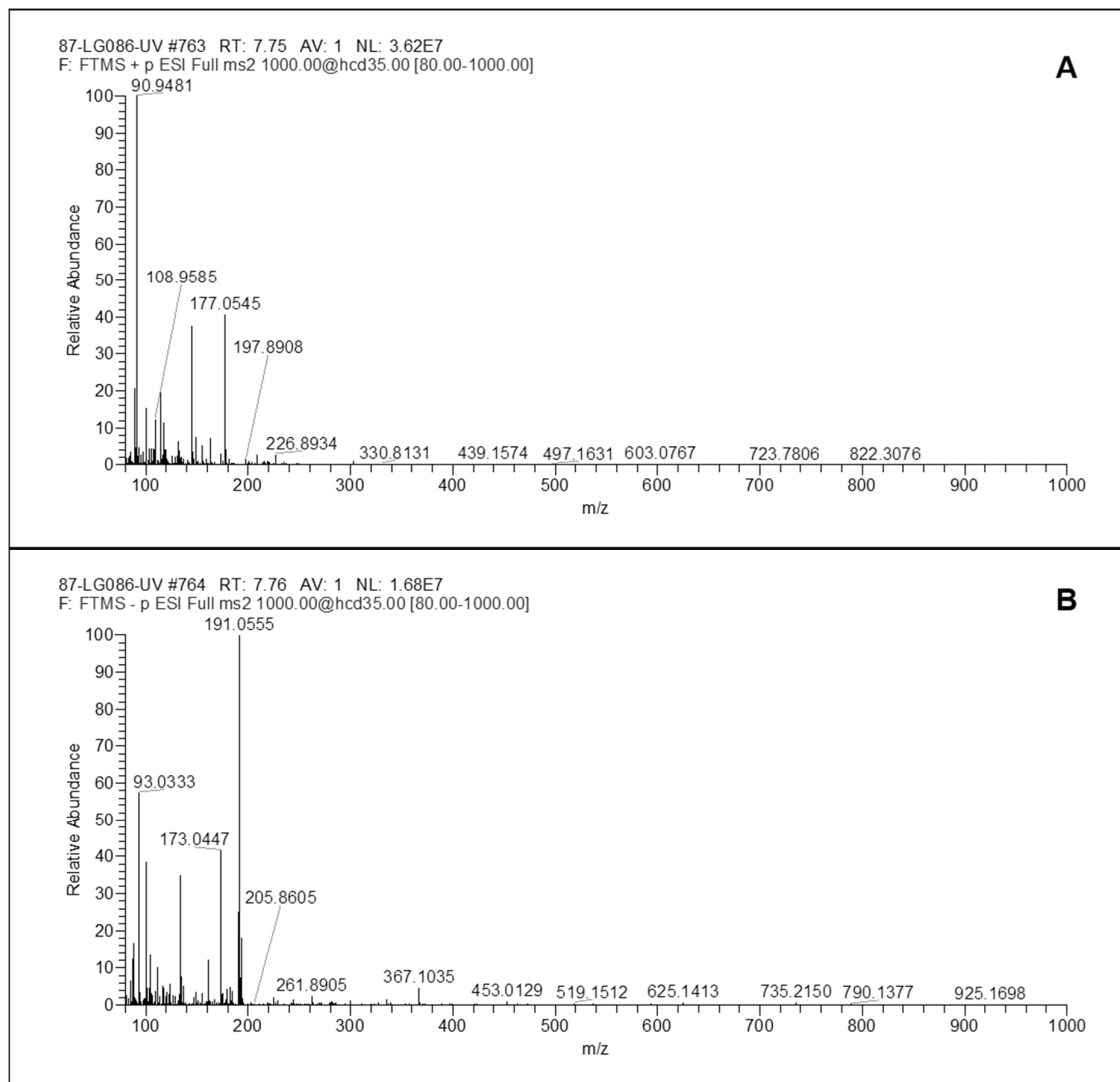
Apêndice 30: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 3, identificado como ácido 5-*p*-cumaroilquínico.

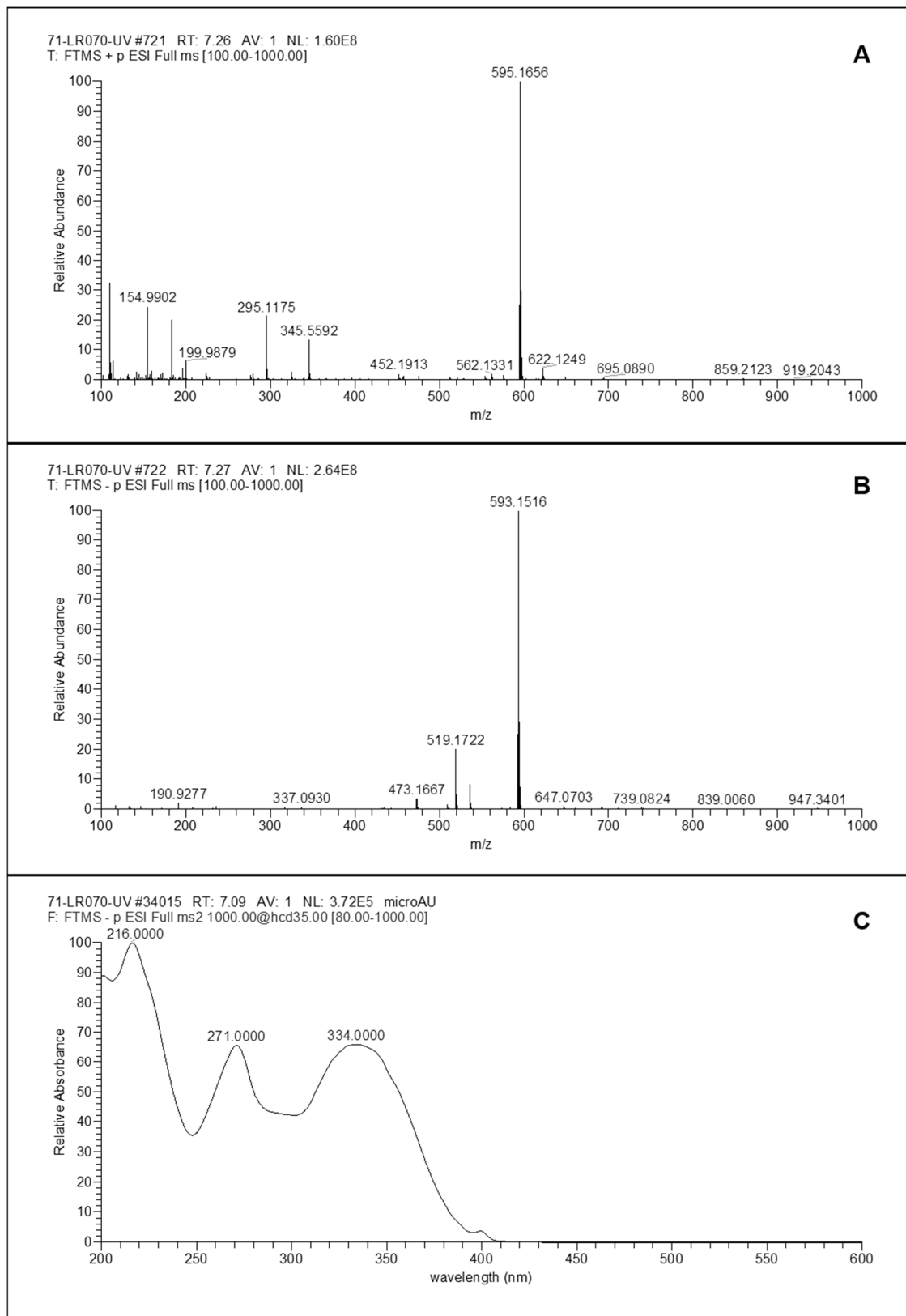
Apêndice 31: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 3, identificado como ácido 5-*p*-cumaroilquinico.



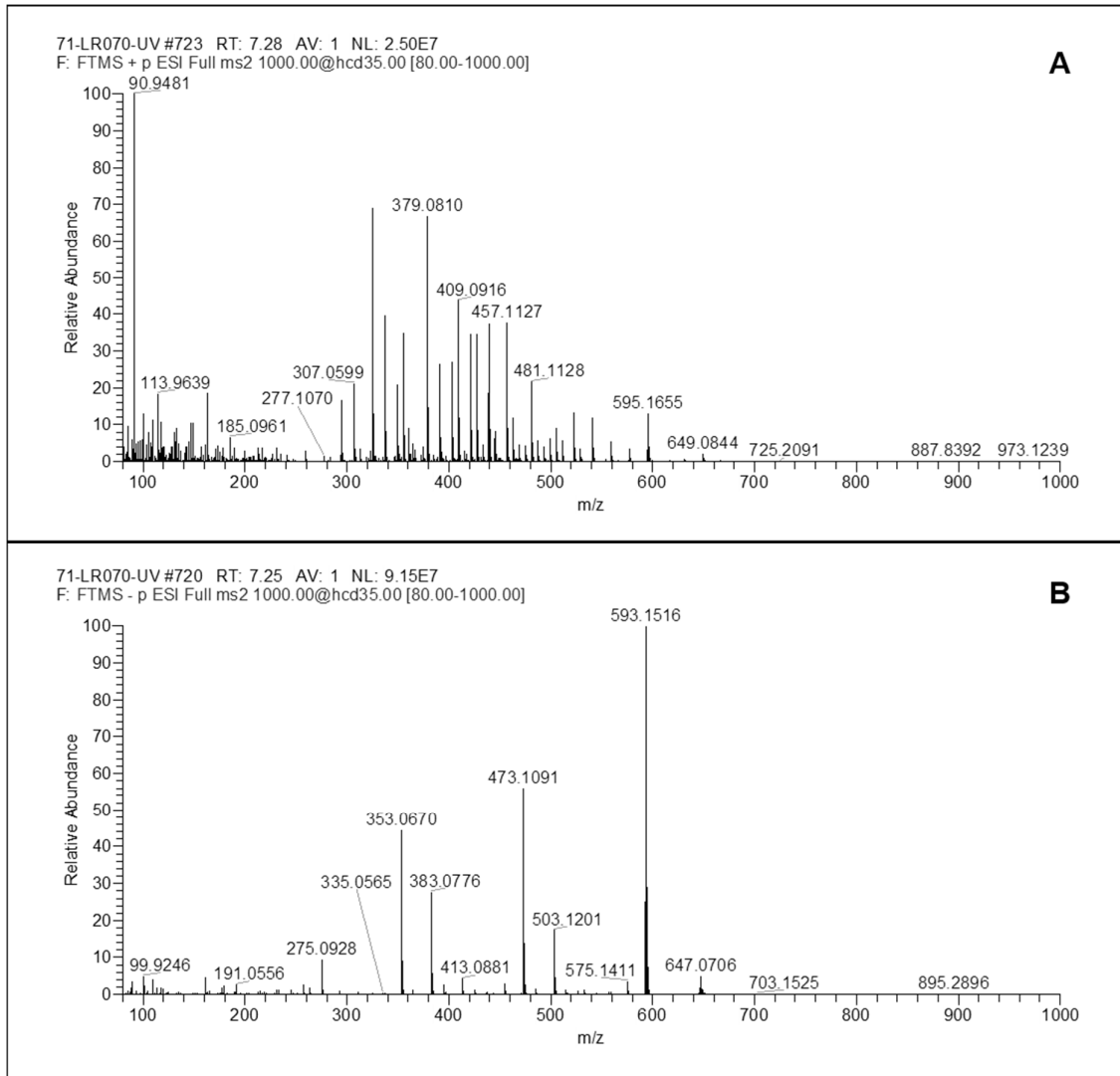
Apêndice 32: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 5, identificado como ácido 5-*O*-(*E*)-feruloilquínico.

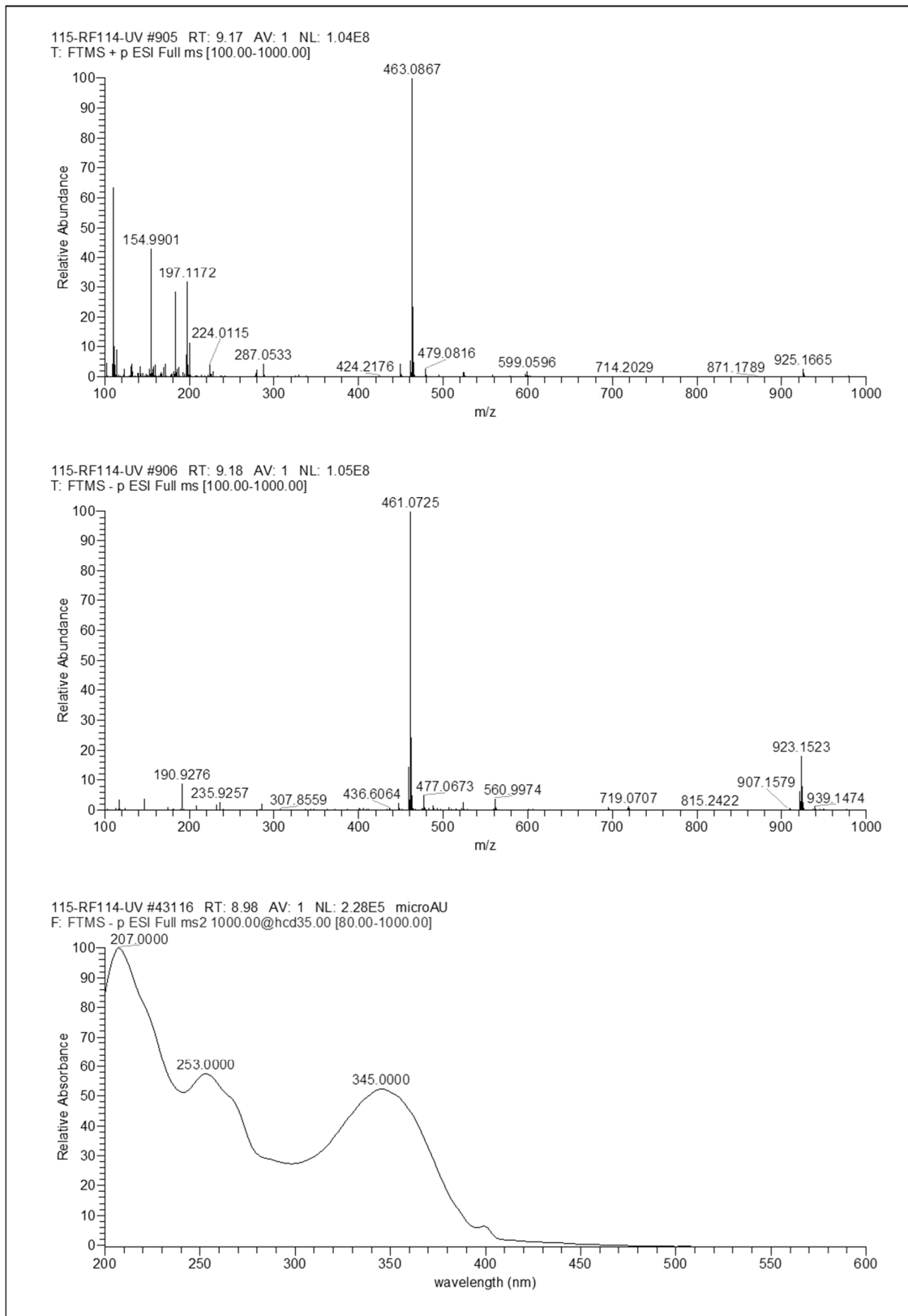
Apêndice 33: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 5, identificado como ácido 5-O-(*E*)-feruloilquínico.

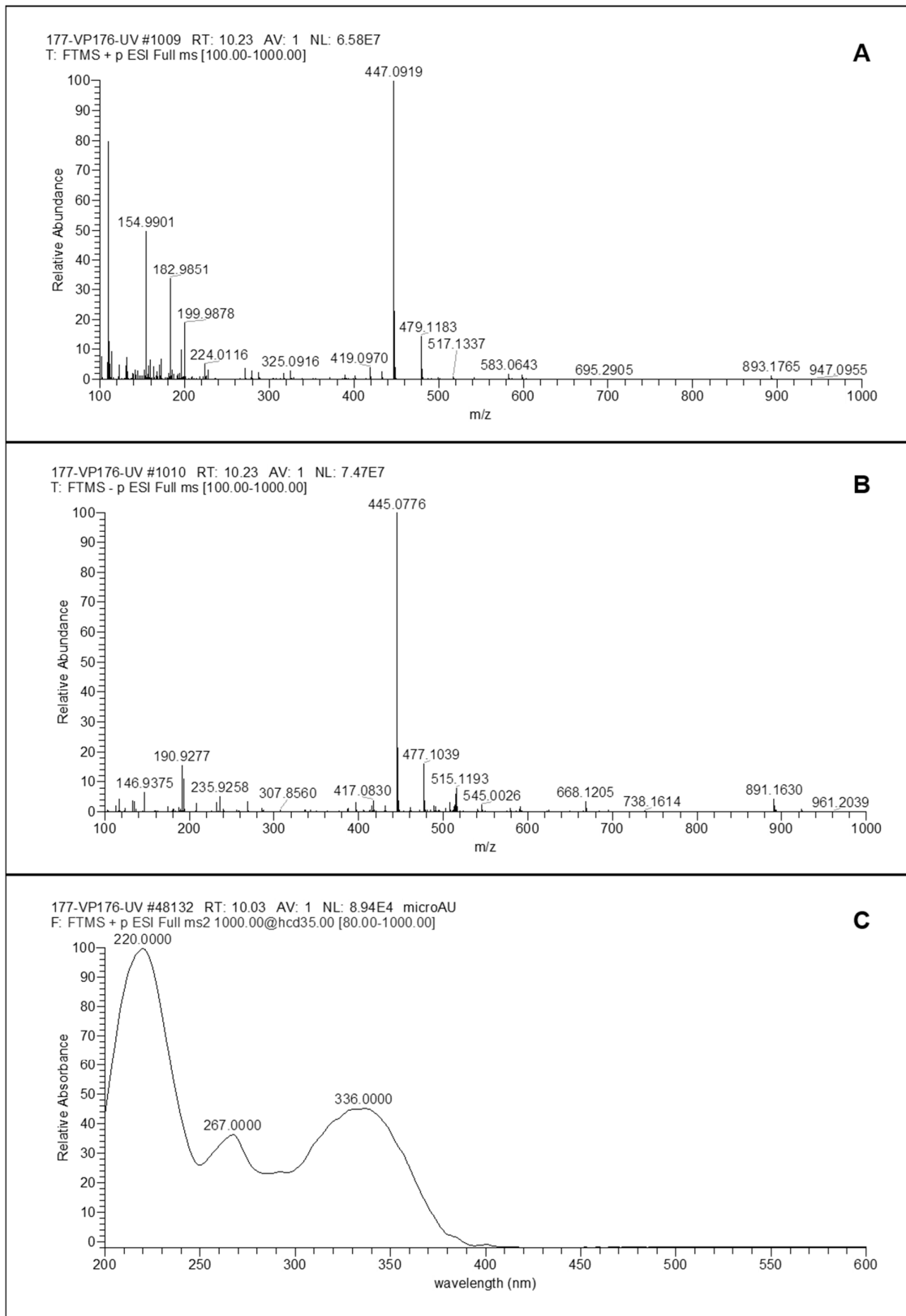


Apêndice 34: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 4, identificado como vicenina-2.

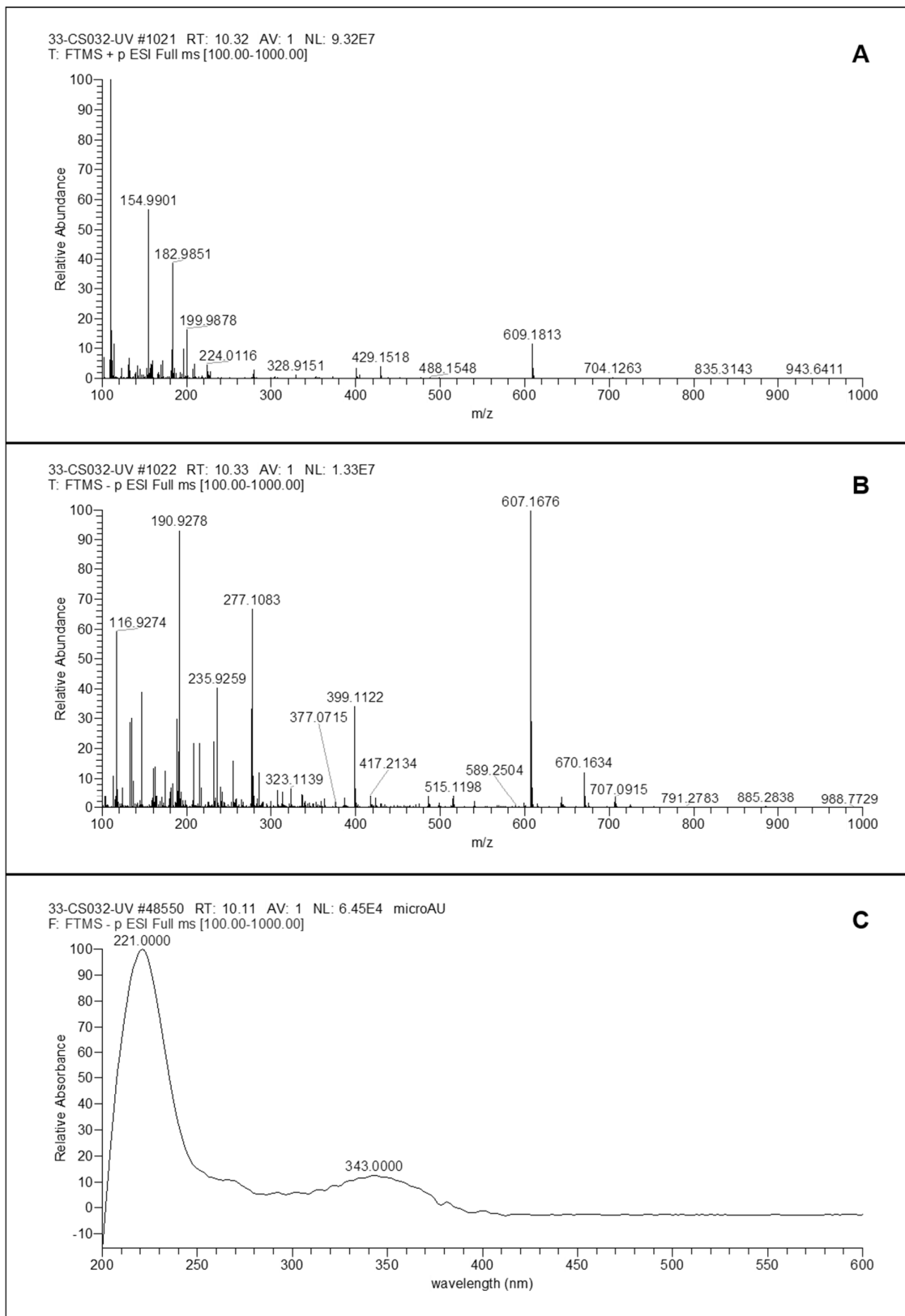
Apêndice 35: Espectros de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) para o pico 4, identificado como vicenina-2.

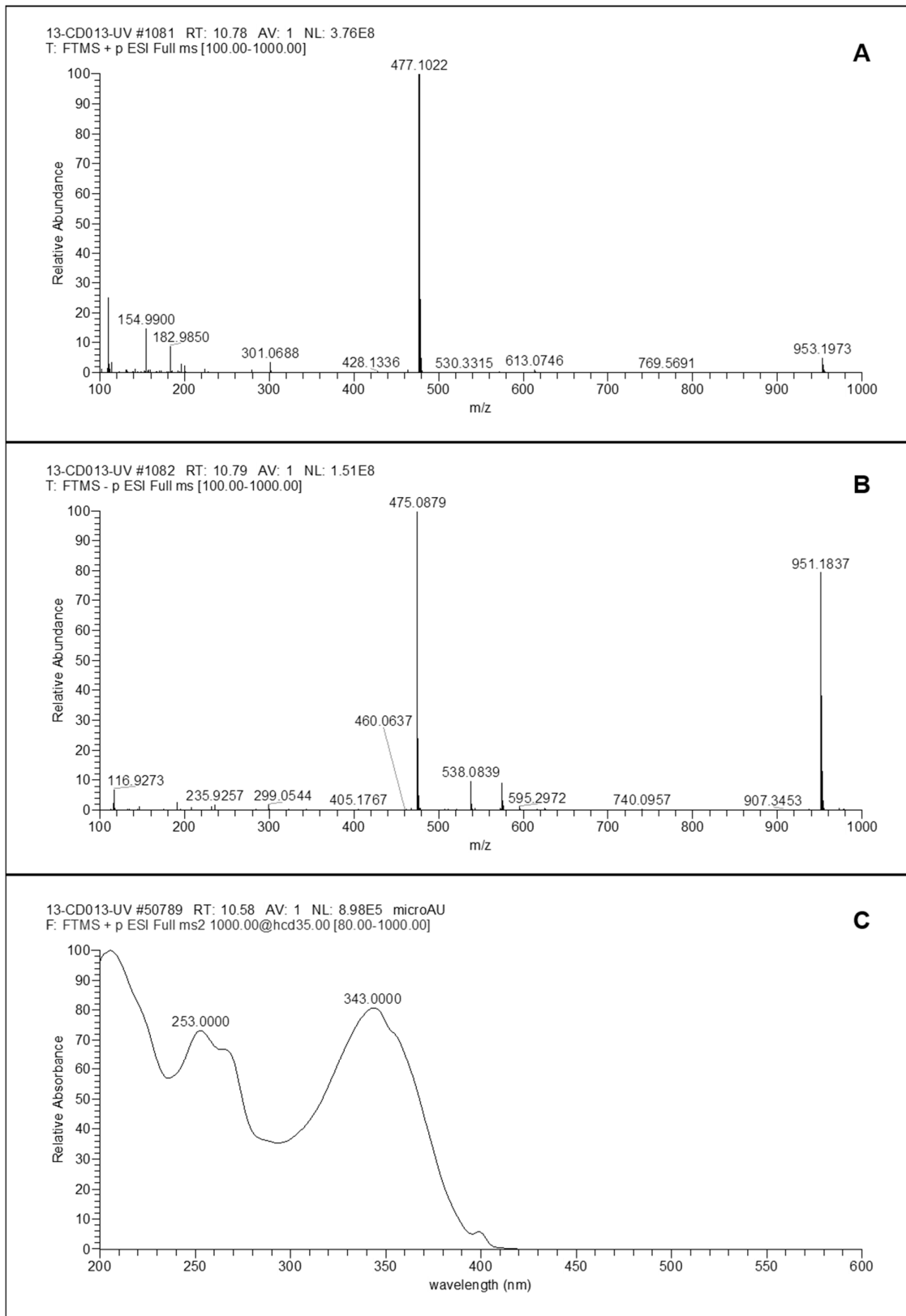


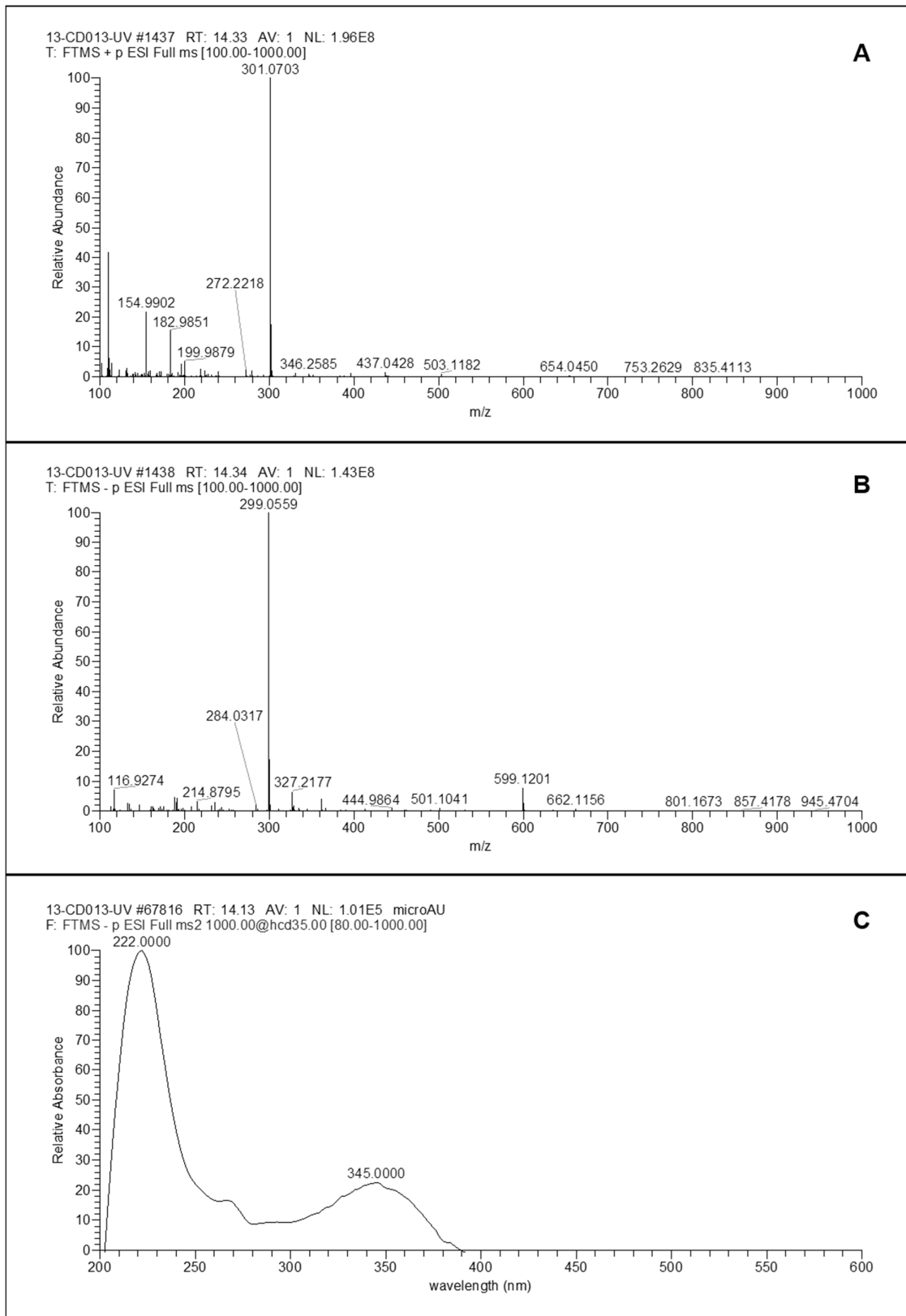
Apêndice 36: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 8, identificado como luteolina 7-O-glicuronídeo.

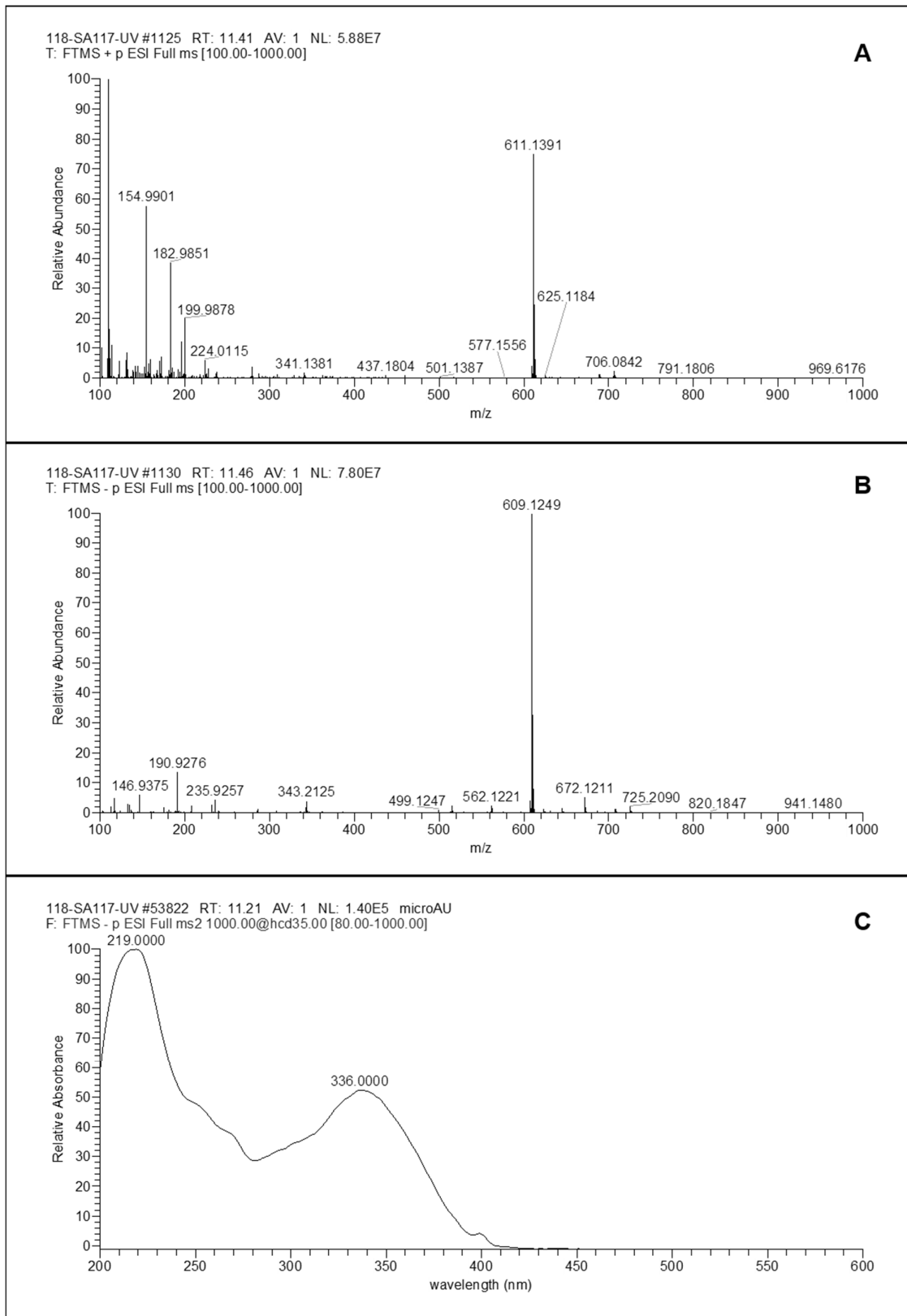
Apêndice 37: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 13, identificado como apigenina 7-O-glicuronídeo.

Apêndice 38: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 14, identificado como chrisoeriol 7-O-neohesperidosídeo.

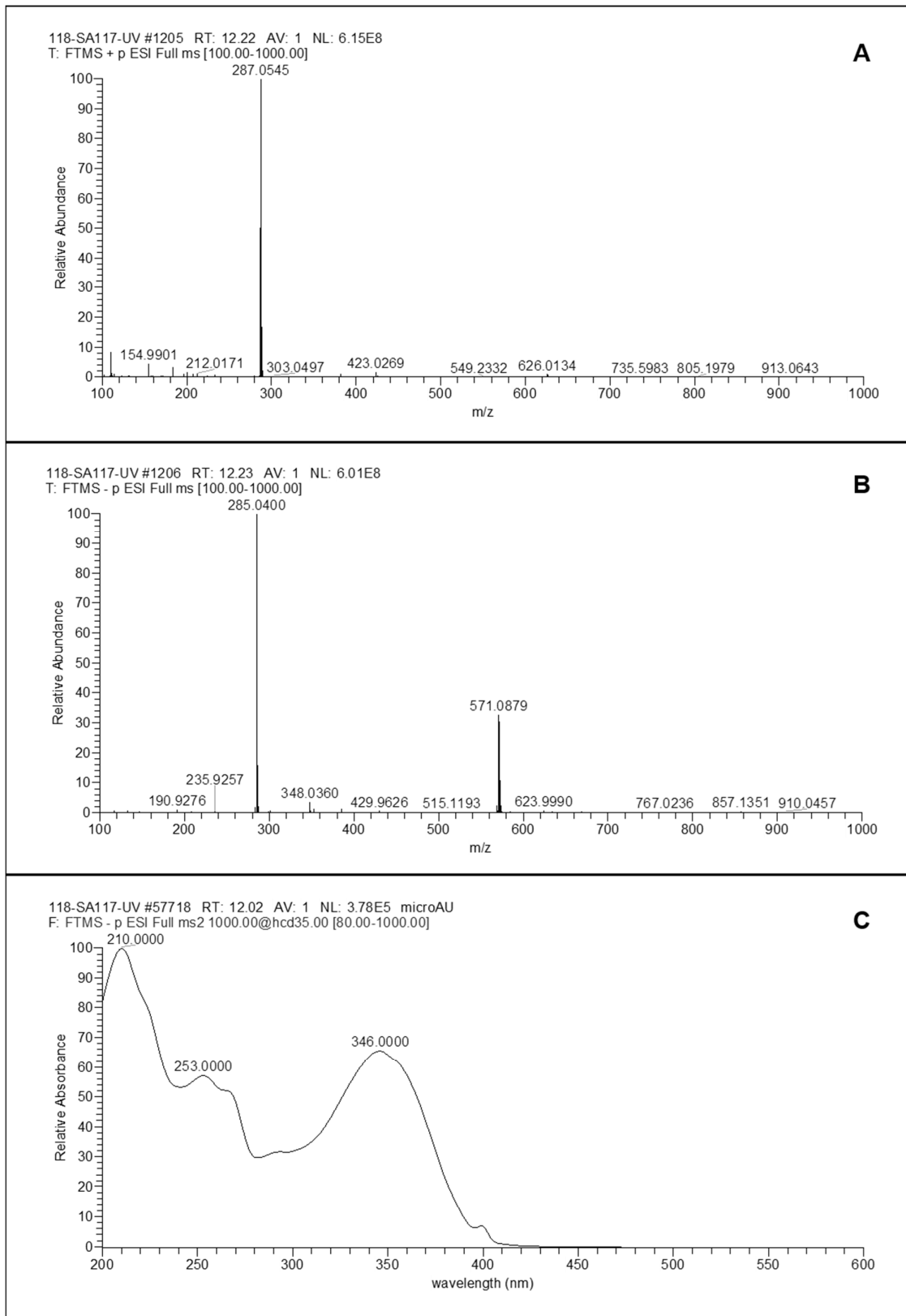


Apêndice 39: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 16, identificado como chrisoeriol 7-O-glicuronídeo.

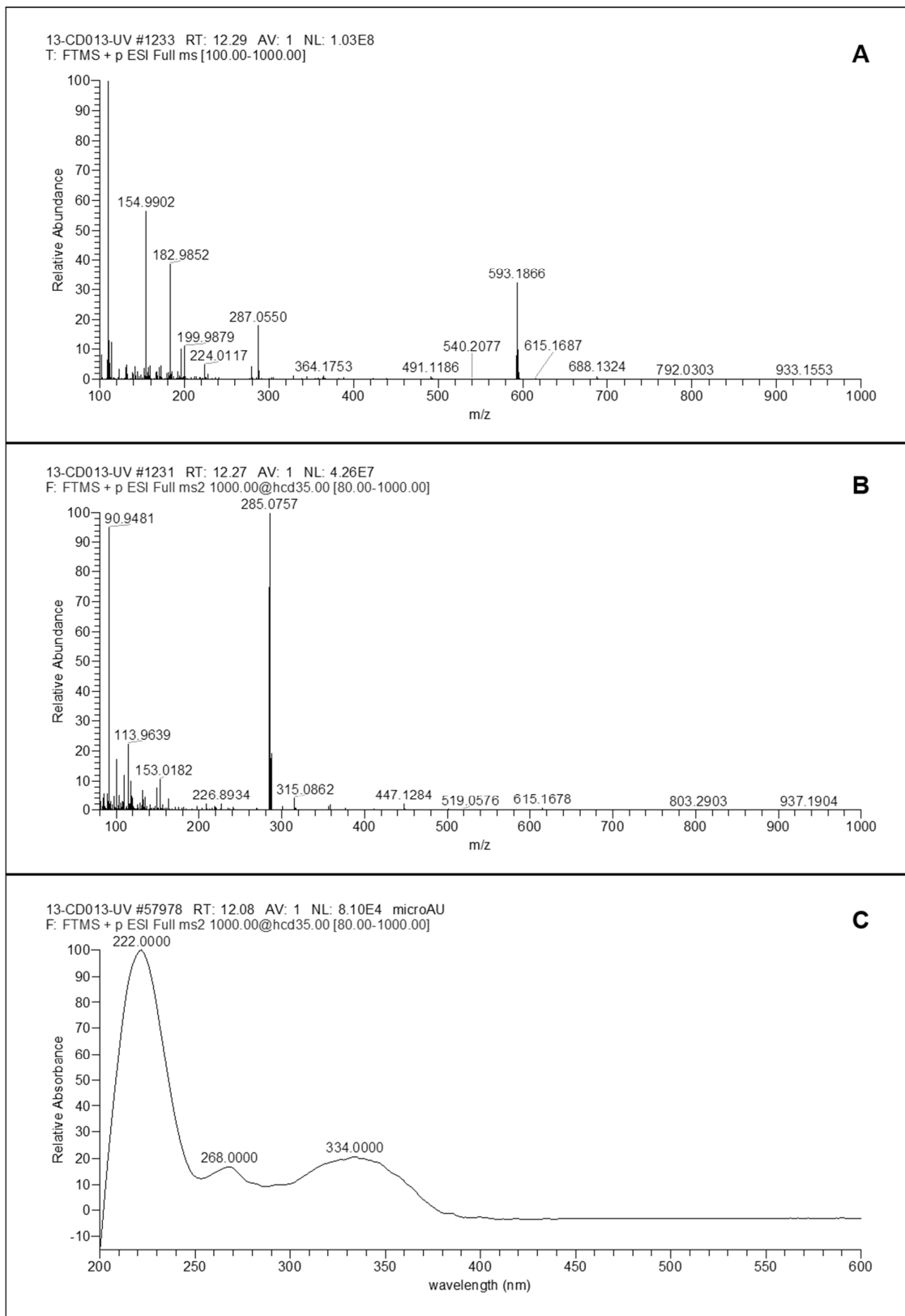
Apêndice 40: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 26, identificado como chrisoeriol.

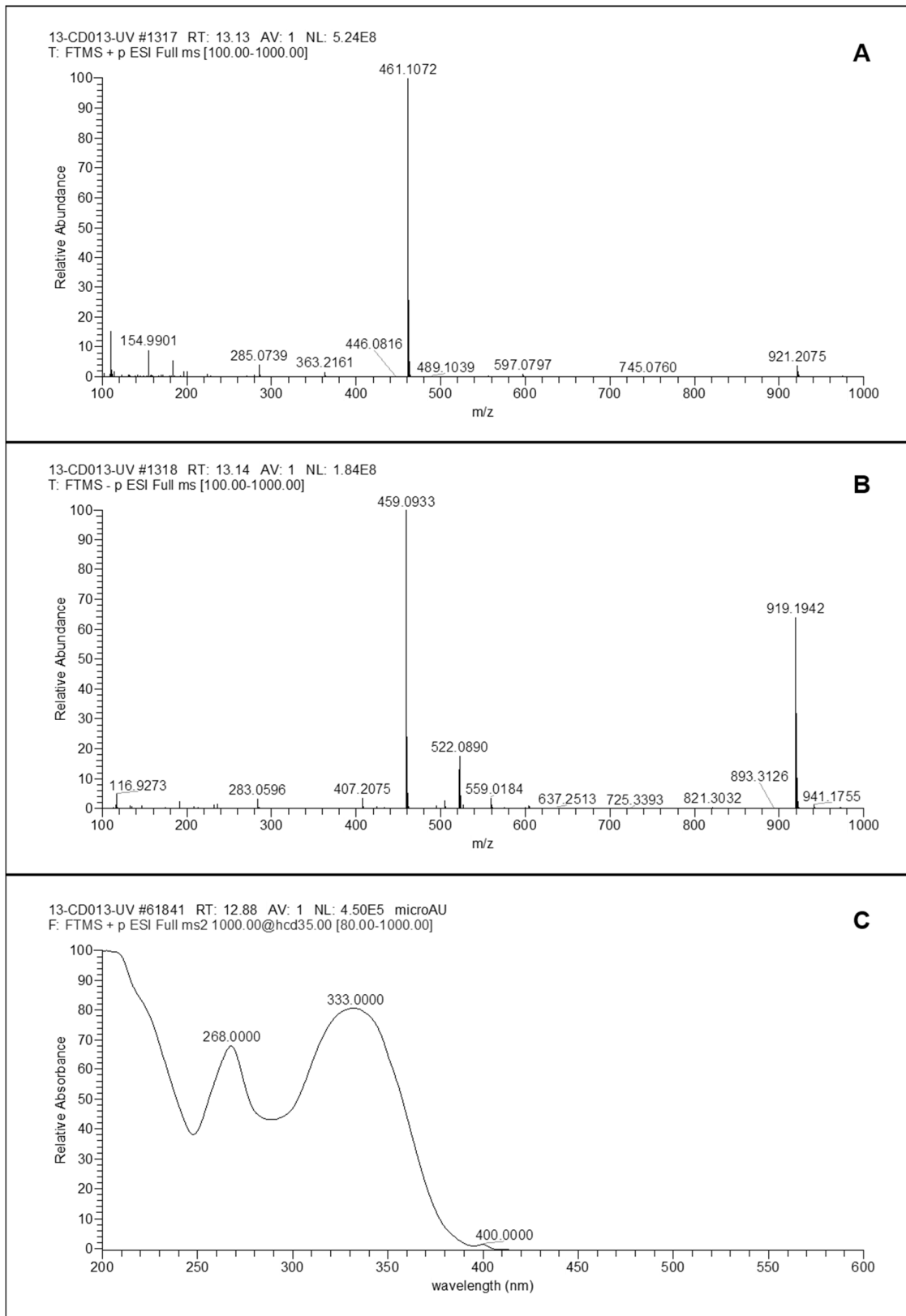
Apêndice 41: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 17, identificado como isoorientina 3'-O-glicosídeo.

Apêndice 42: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 19, identificado como luteolina.

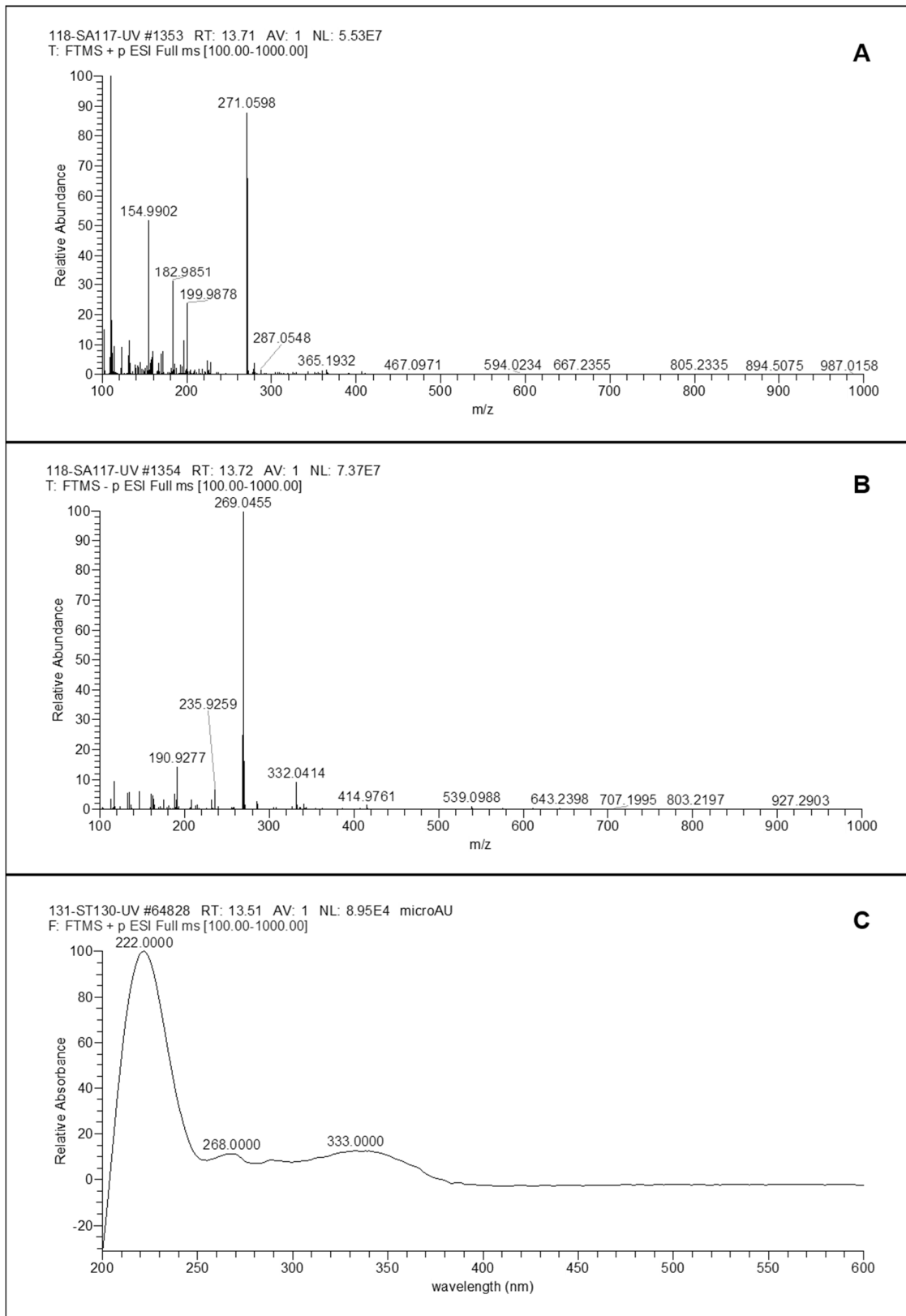


Apêndice 43: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 20, identificado como acacetina 7-O-rutinosídeo.

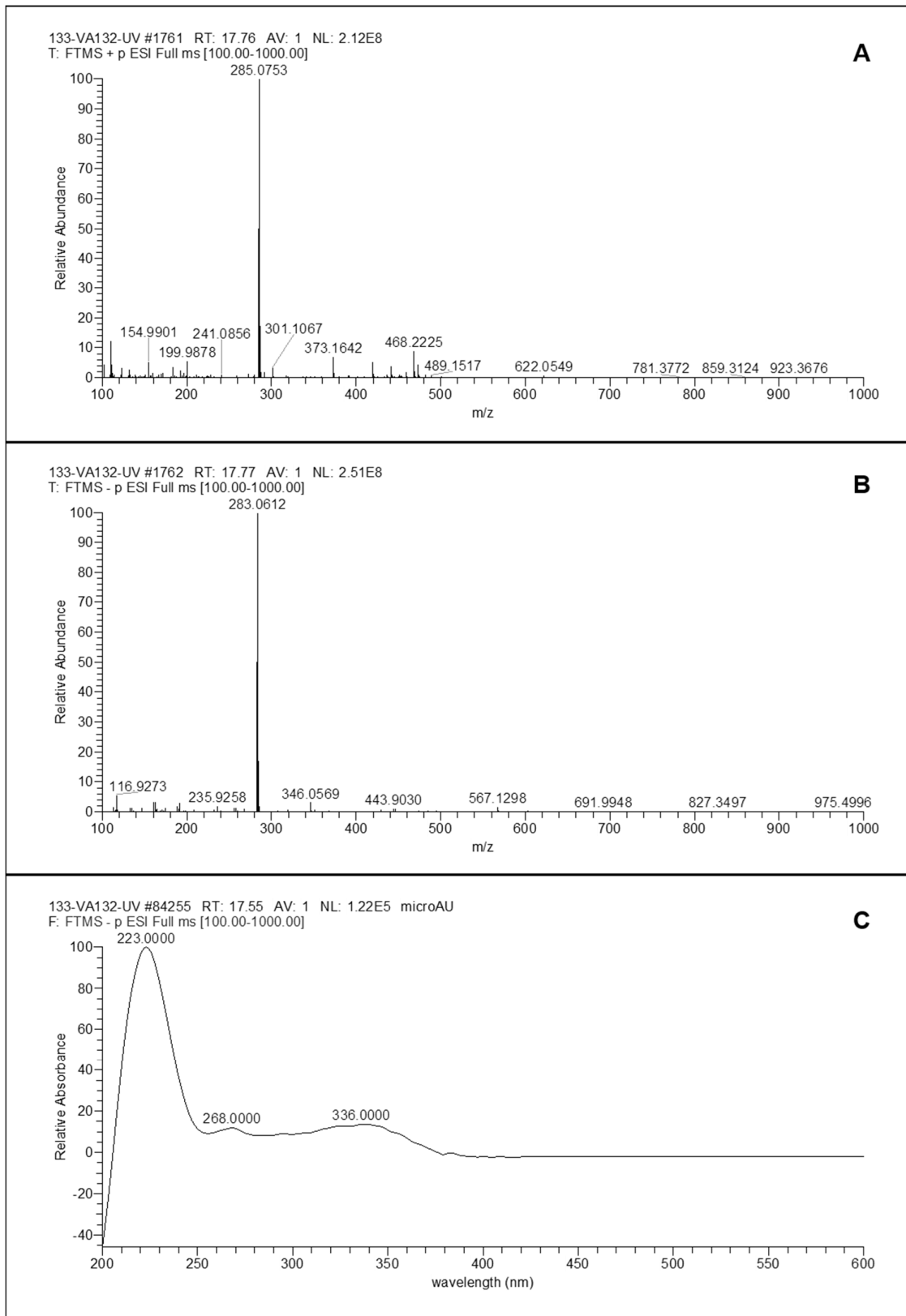


Apêndice 44: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 22, identificado como acetina 7-O-glicuronídeo.

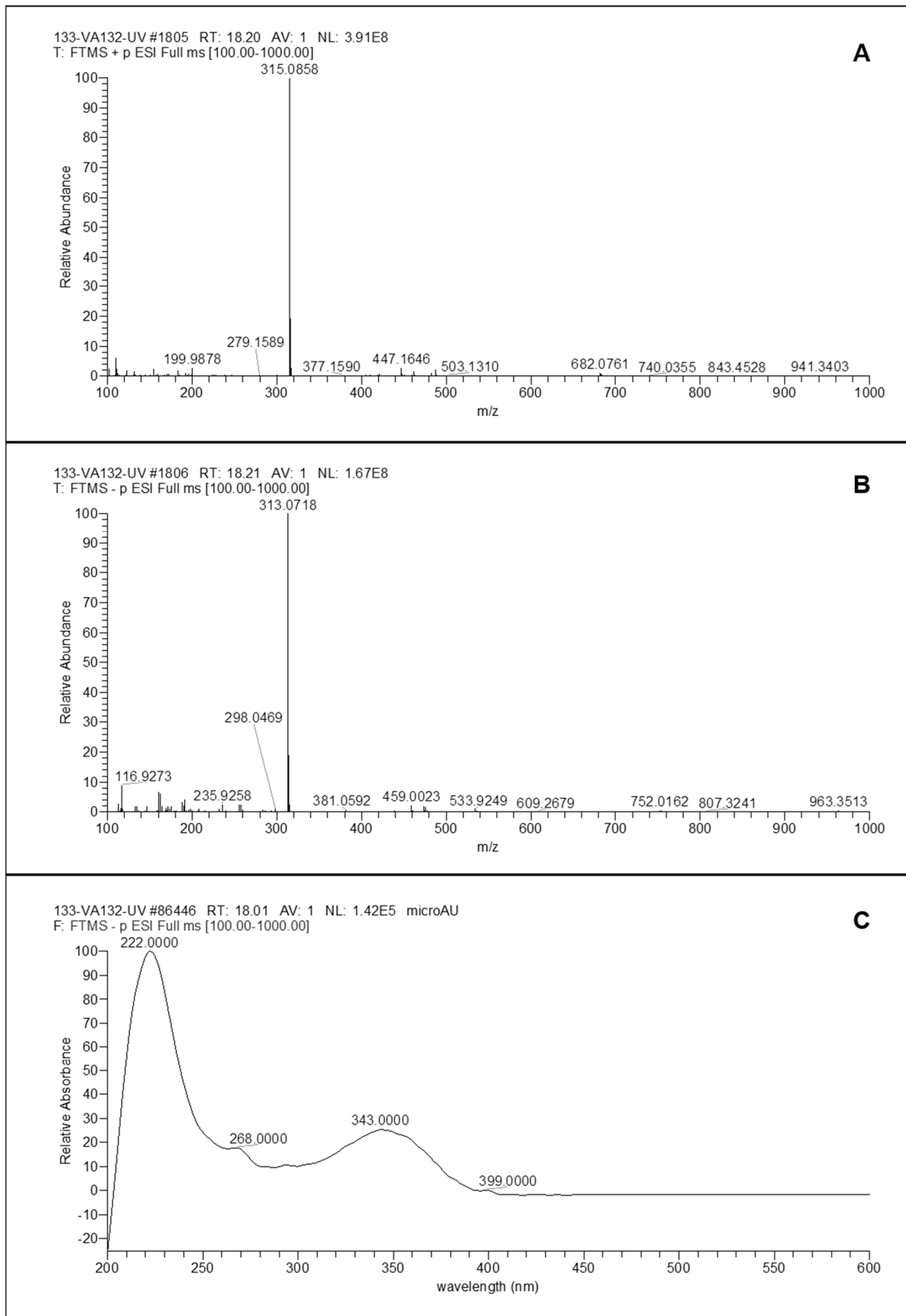
Apêndice 45: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 24, identificado como apigenina.



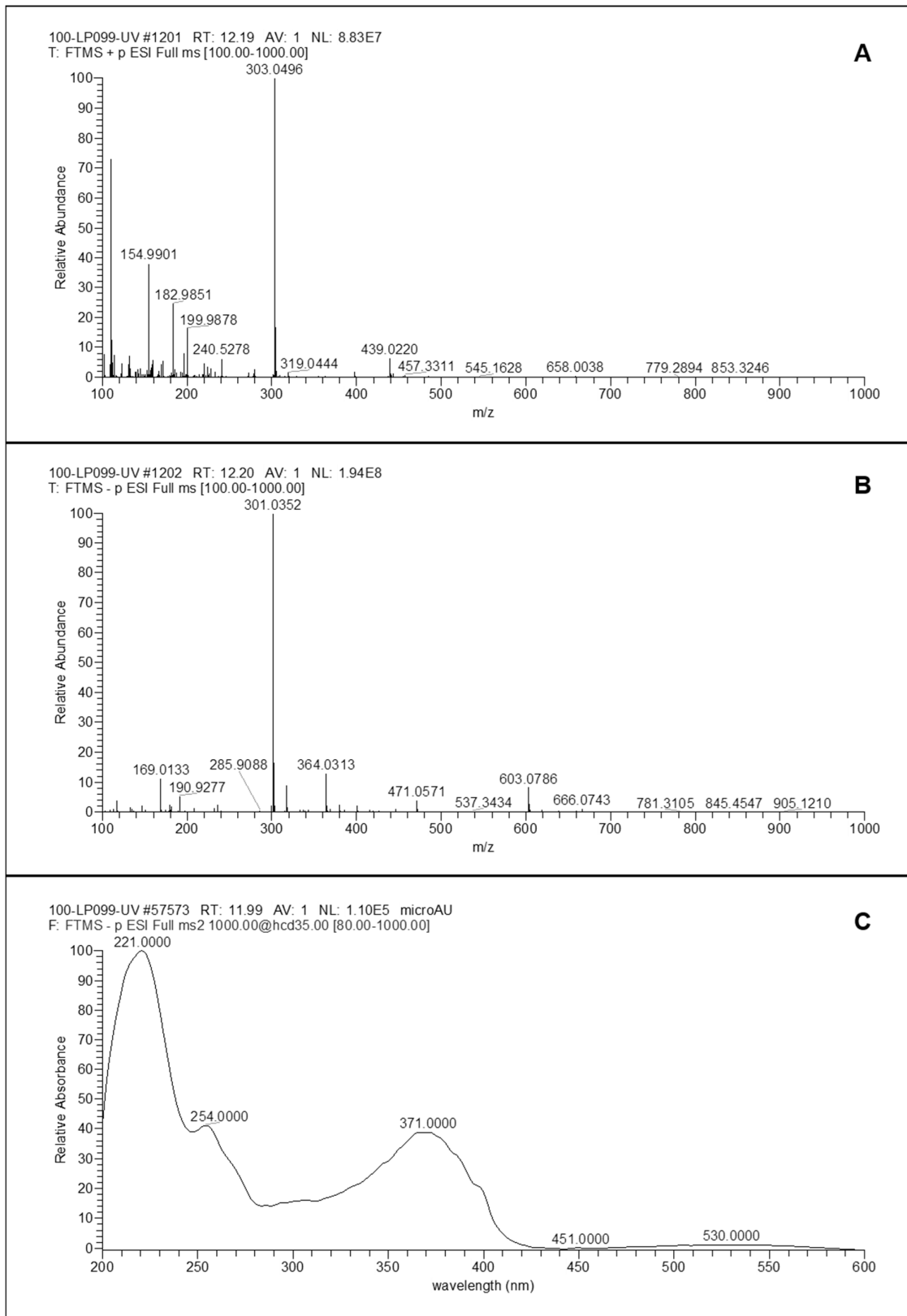
Apêndice 46: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 33, identificado como genkwantina.



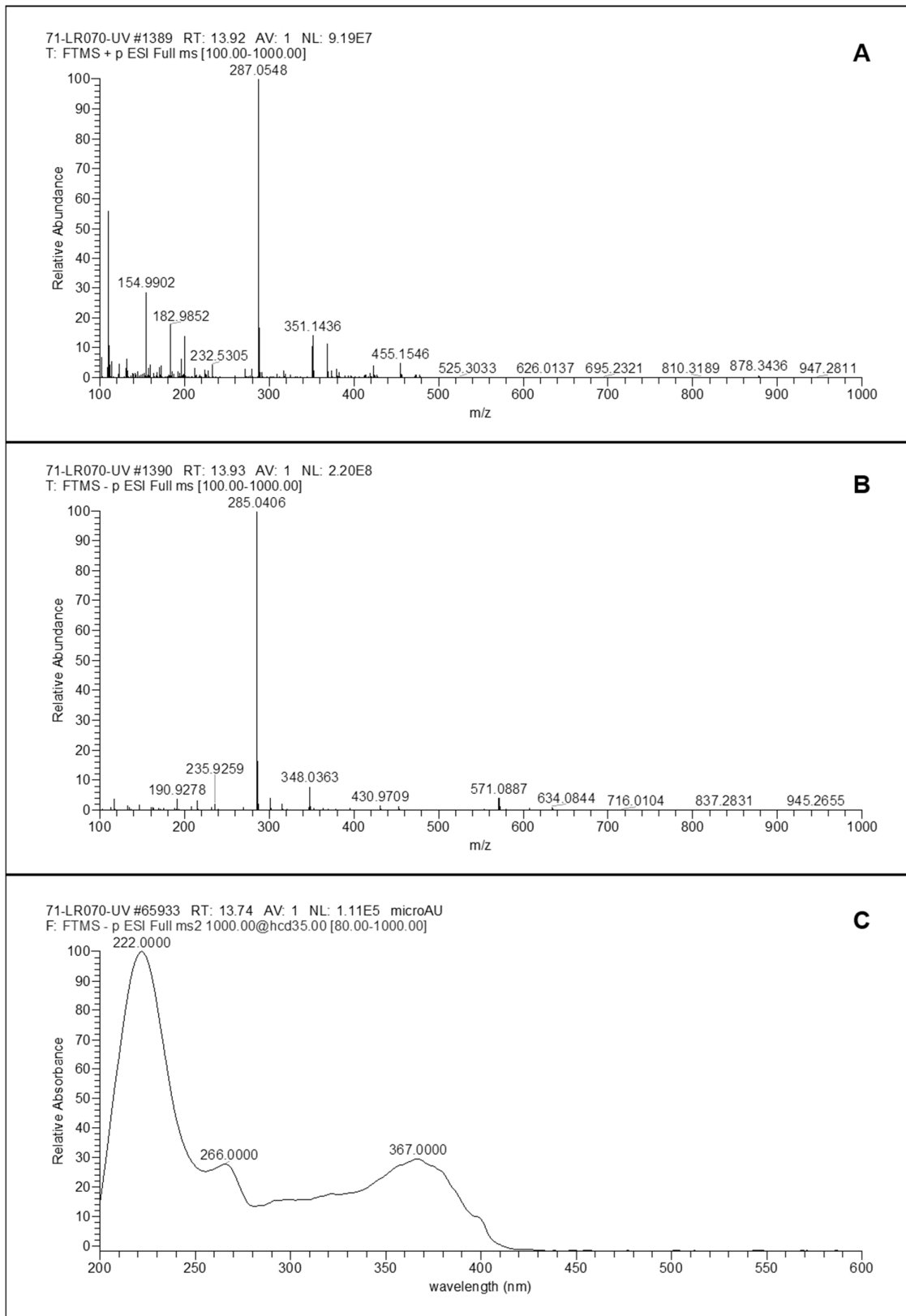
Apêndice 47: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 34, identificado como 3',4'-dimetoxiluteolina.

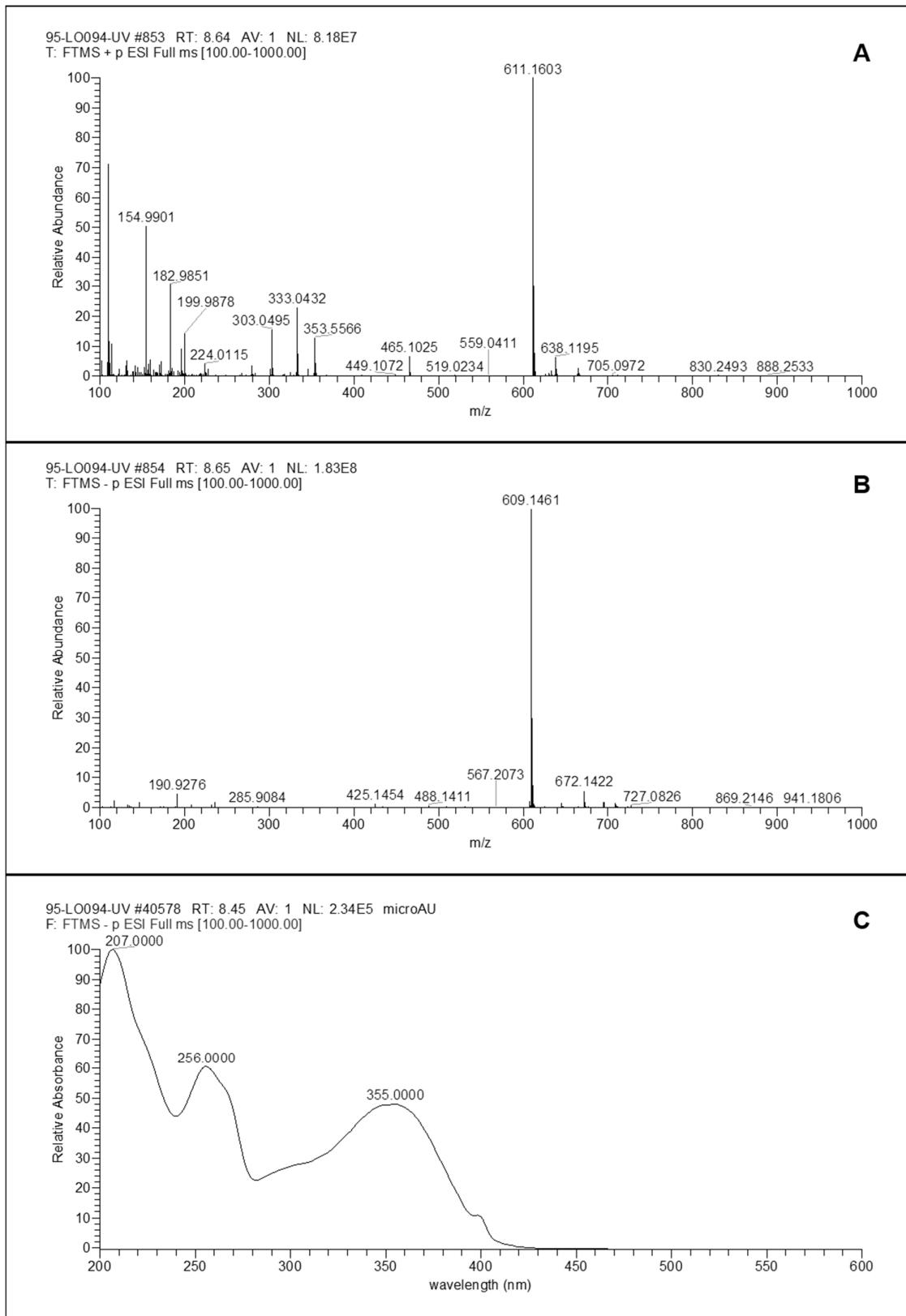


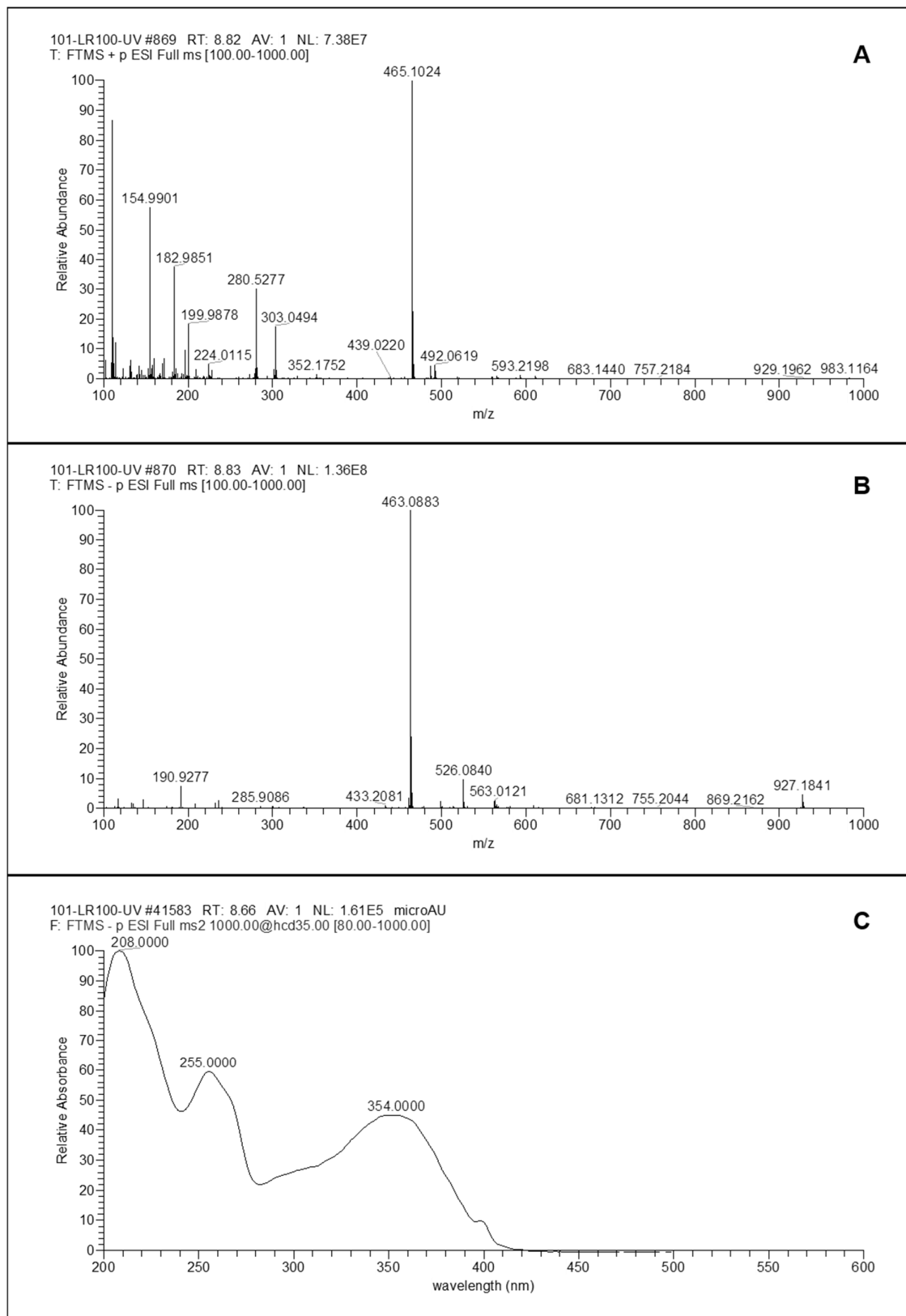
Apêndice 48: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 18, identificado como quercetina.

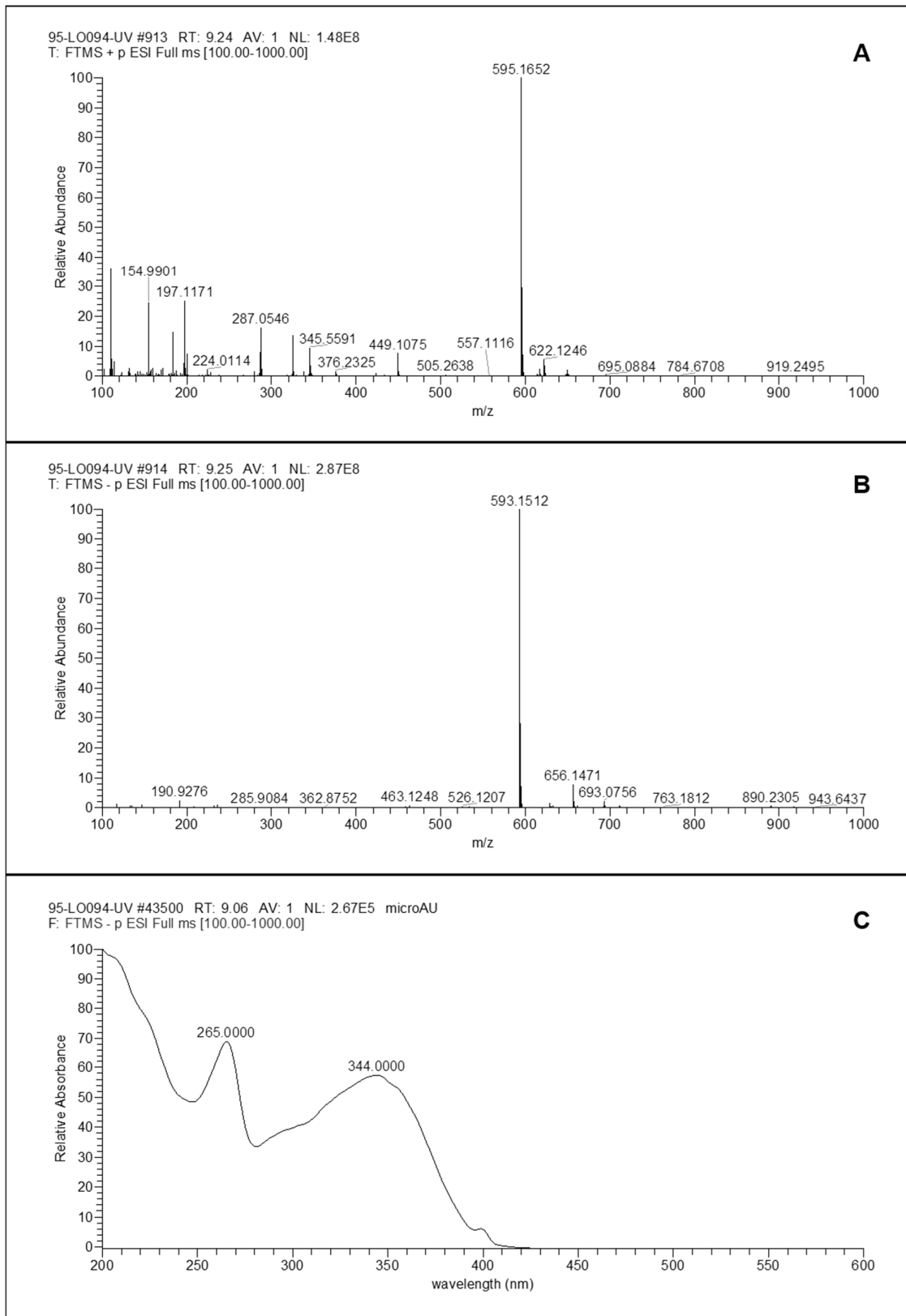


Apêndice 49: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 25, identificado como kaempferol.

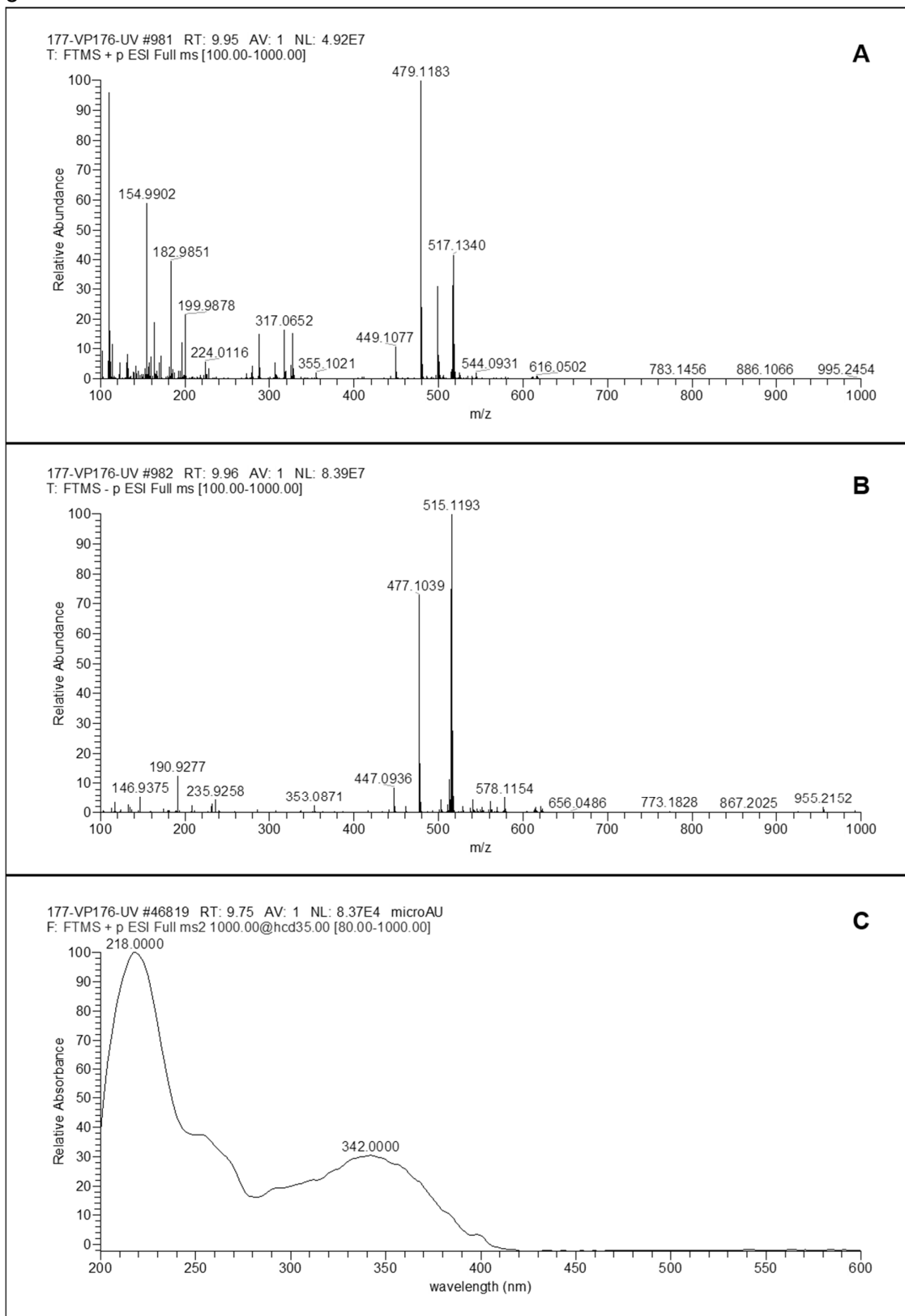


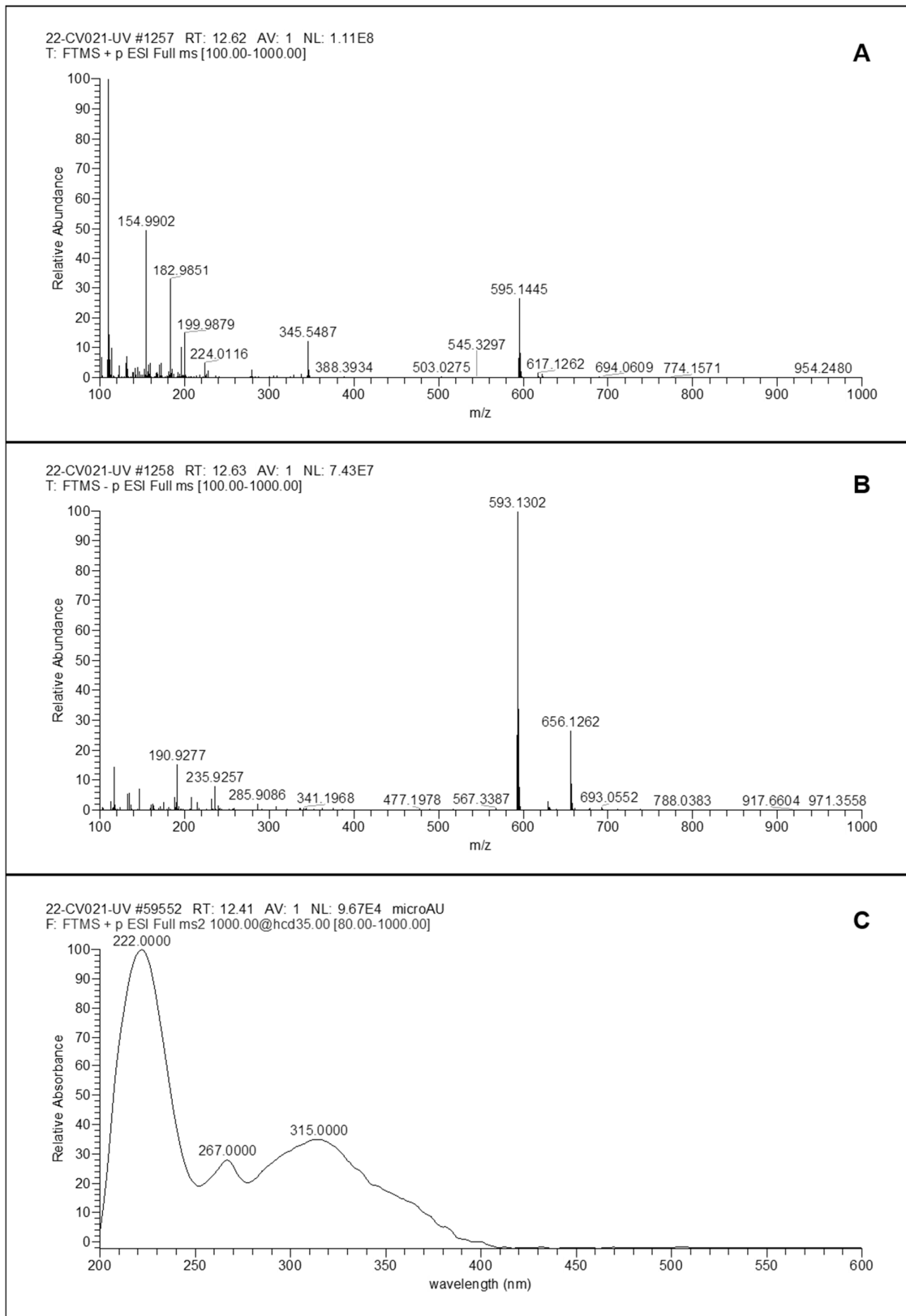
Apêndice 50: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 6, identificado como quercetina 3-O-rutinosídeo.

Apêndice 51: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 7, identificado como quercetina 3-O-glicosídeo.

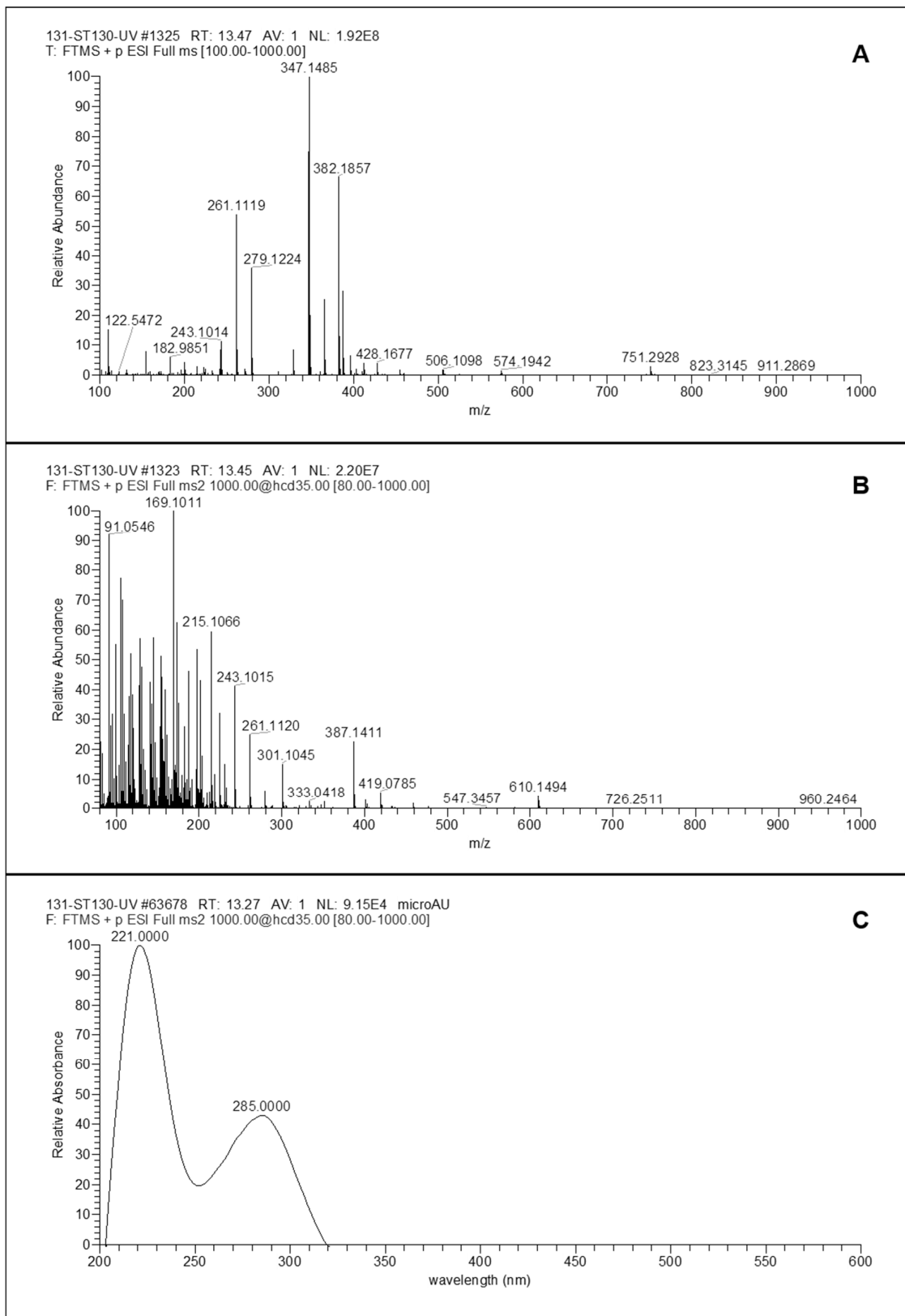
Apêndice 52: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 9, identificado como kaempferol 3-O-rutinosídeo.

Apêndice 53: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 12, identificado como 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-O-glicosilflavona.

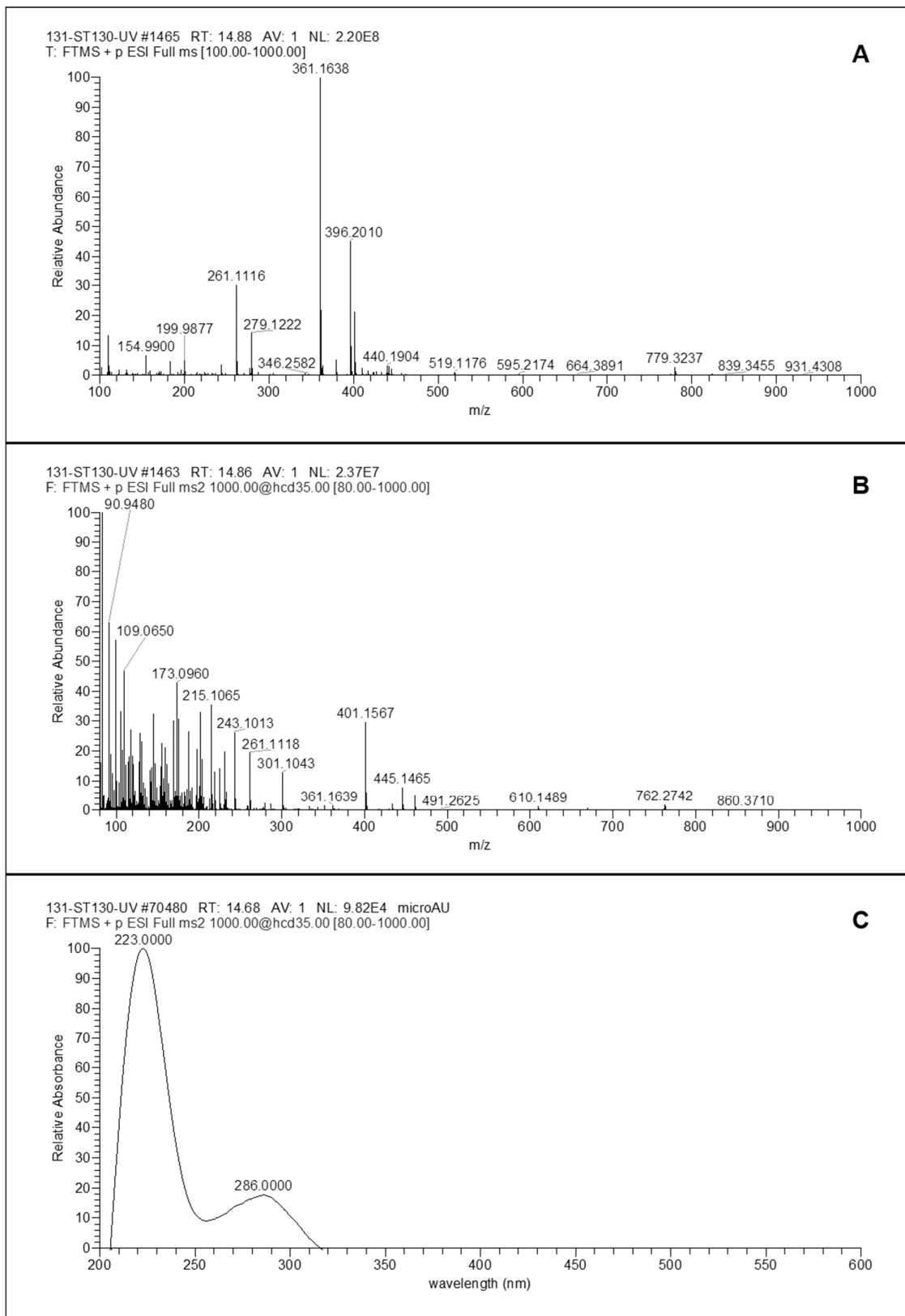


Apêndice 54: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 21, identificado como tilirosídeo.

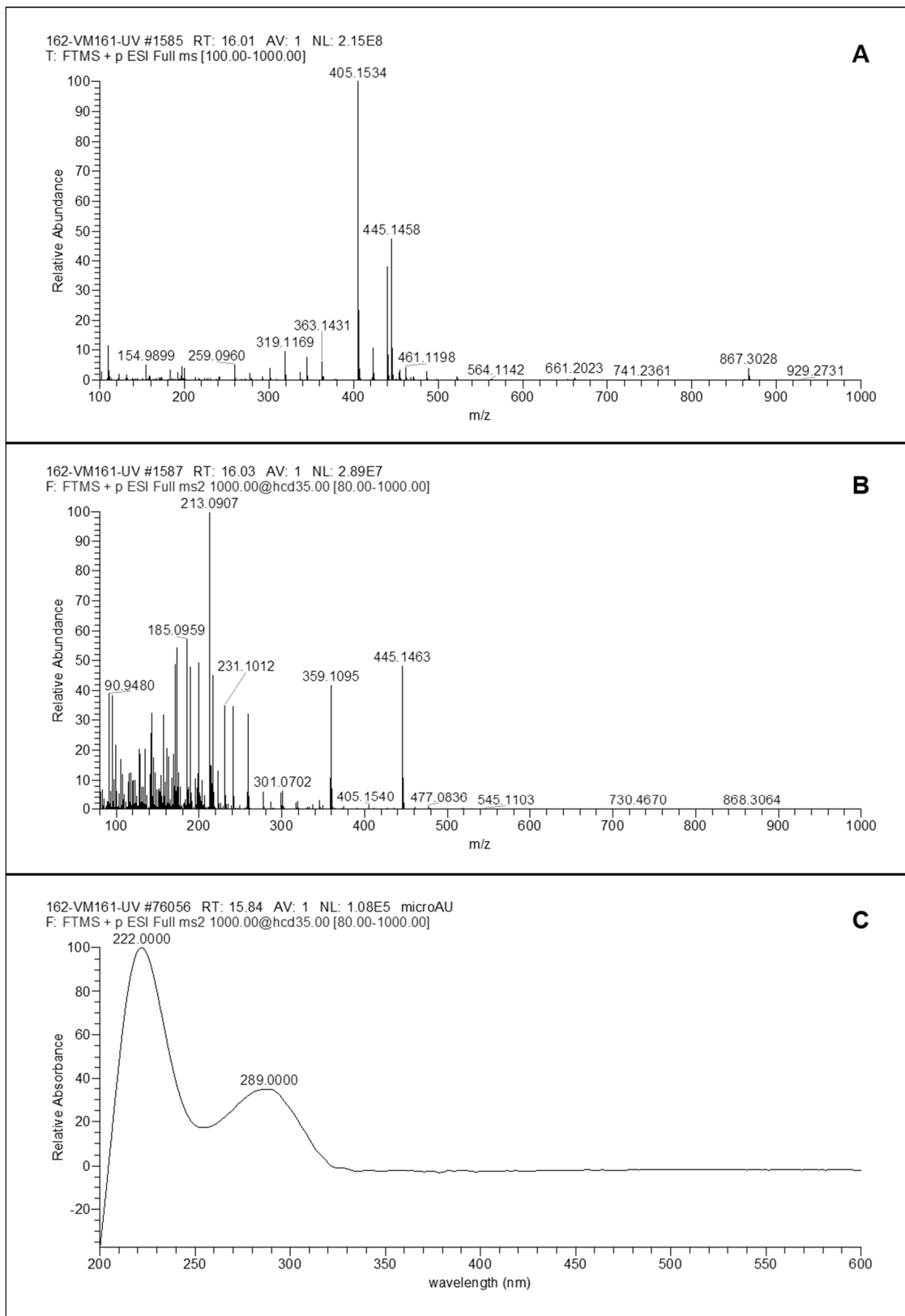
Apêndice 55: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 23, identificado como 8-O-(2-metilpropenoil) hirsutinolido.



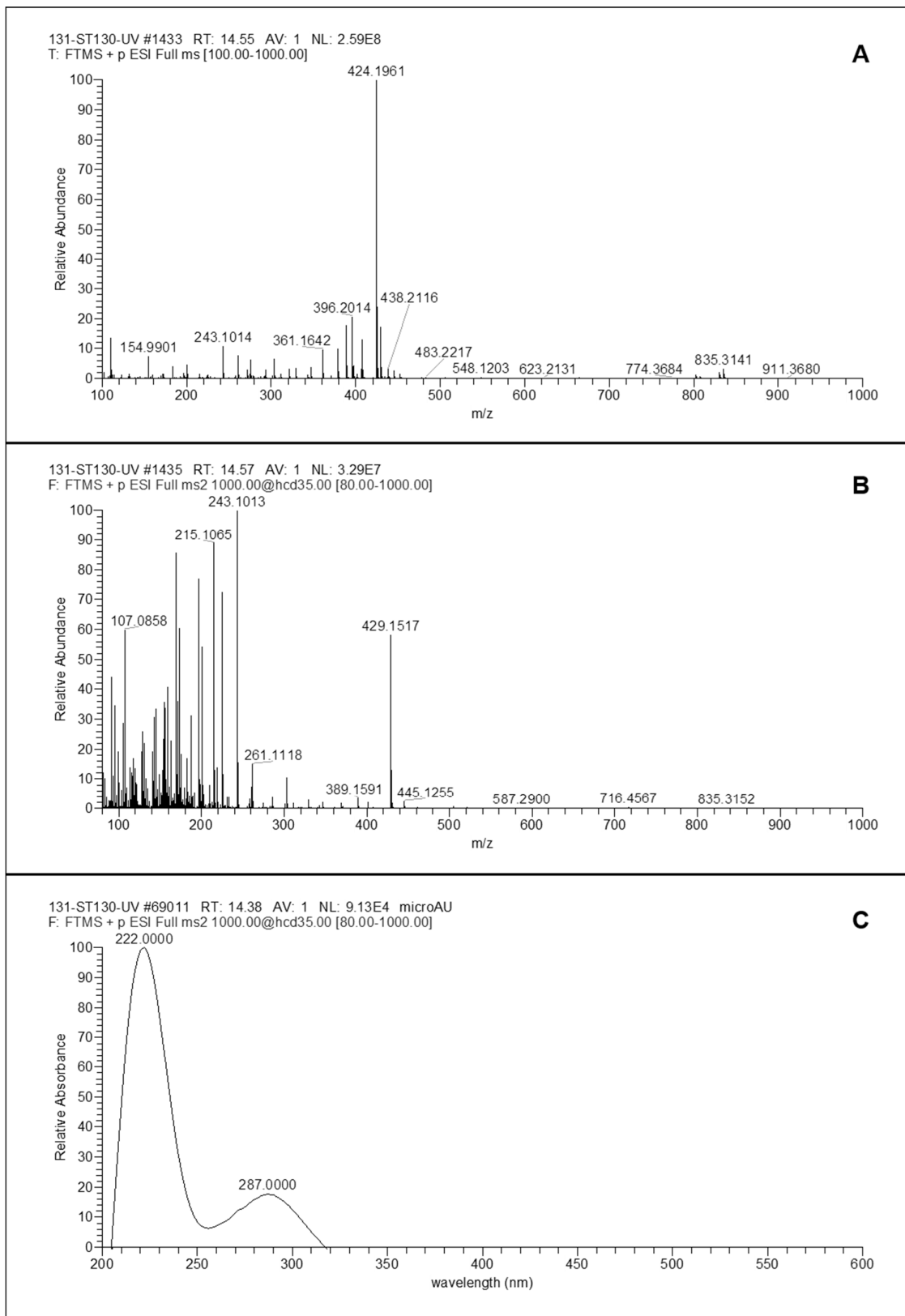
Apêndice 56: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 28, identificado como 8-tigloilóxi hirsutinolido.



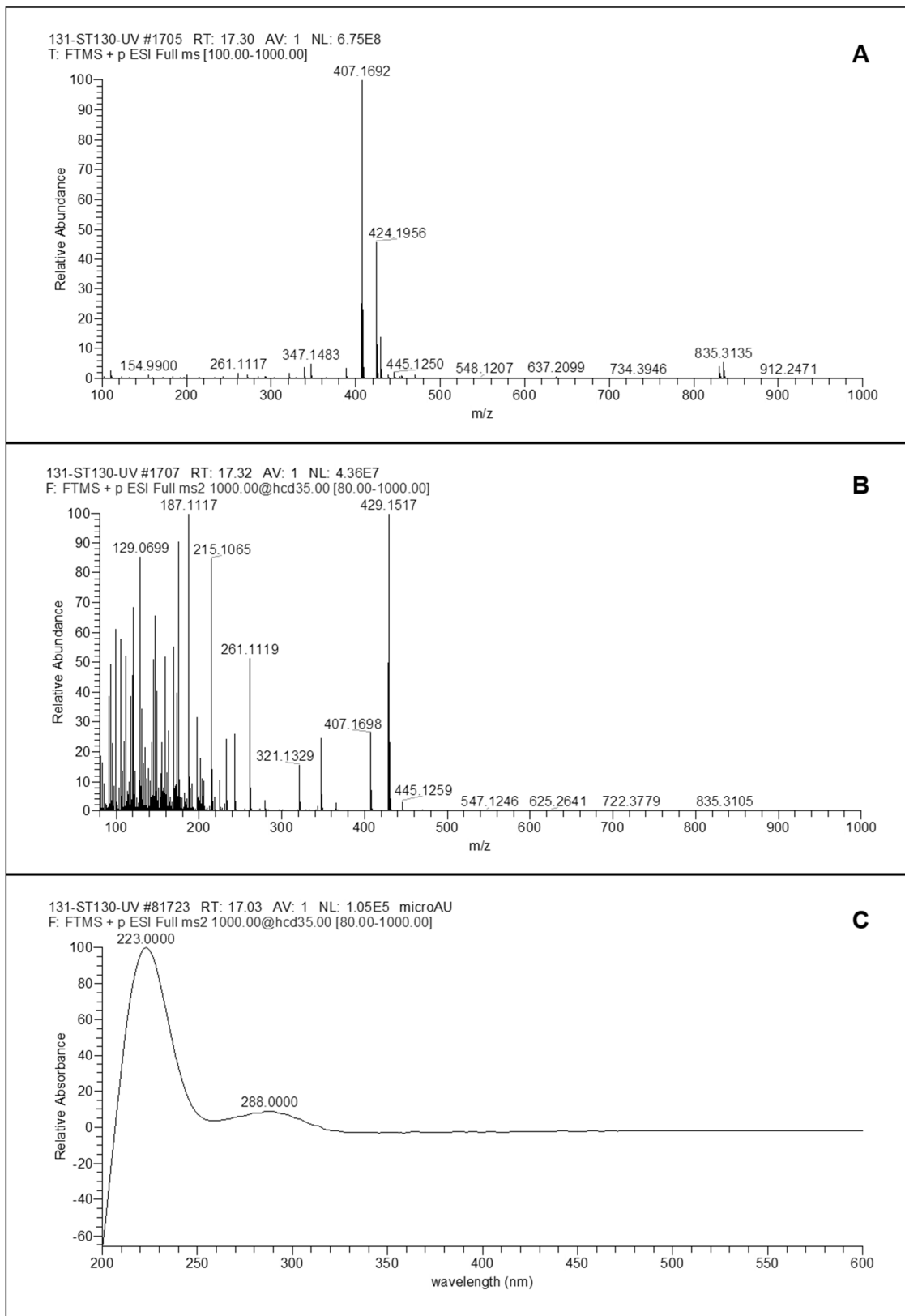
Apêndice 57: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 30, identificado como piptocarphina A.

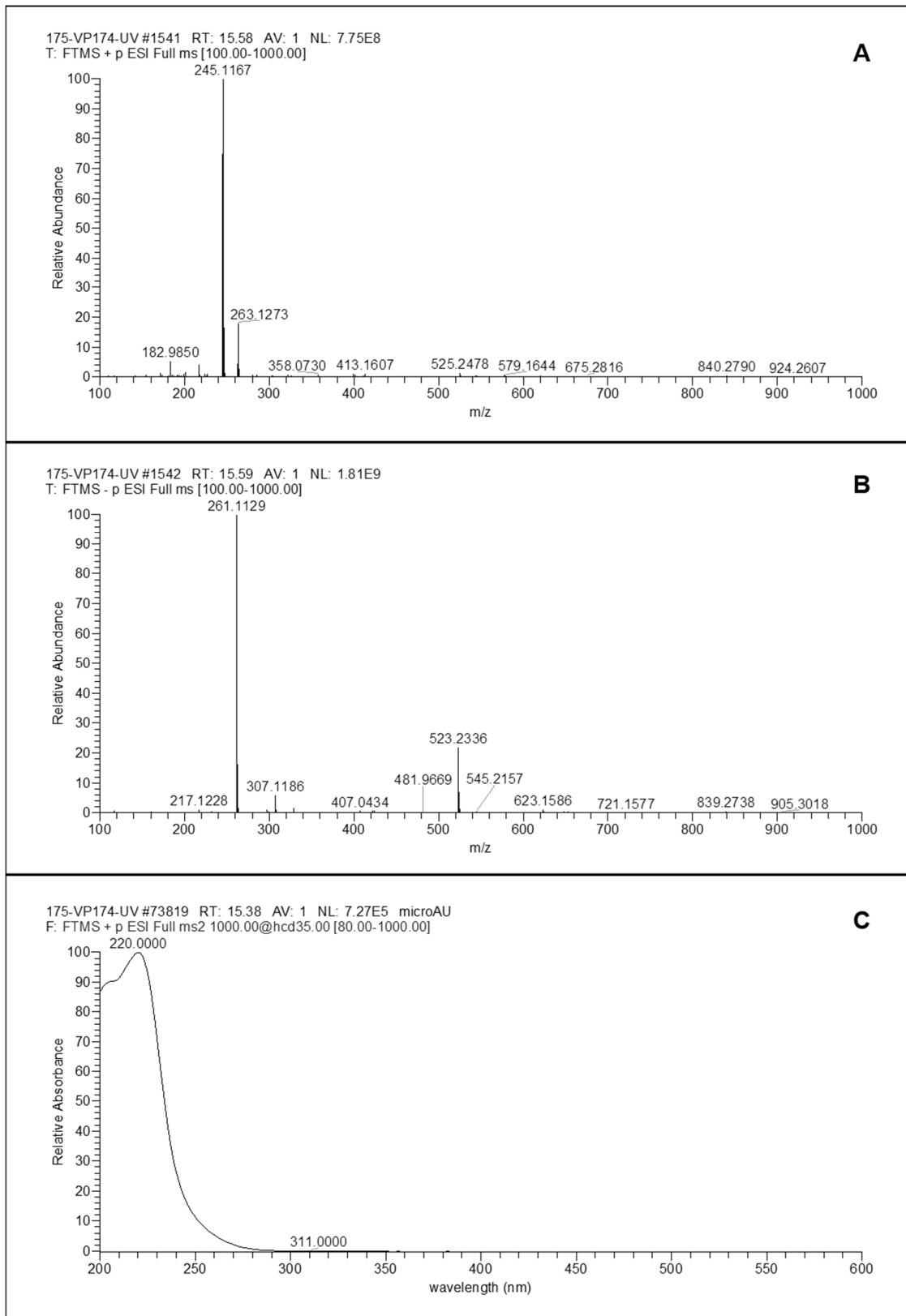


Apêndice 58: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 27, identificado como um provável hirsutinolido.

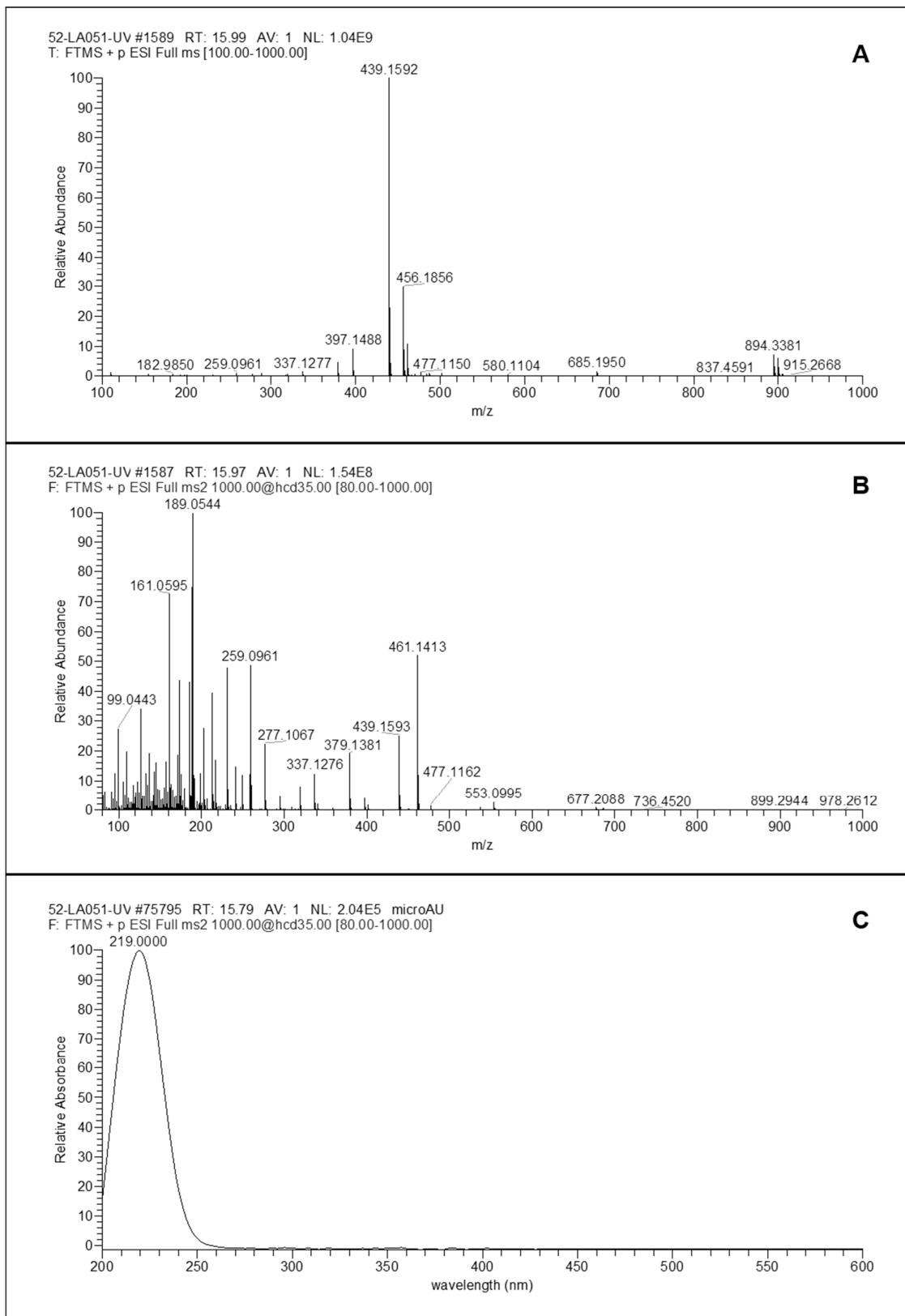


Apêndice 59: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 32, identificado como um provável hirsutinolido.

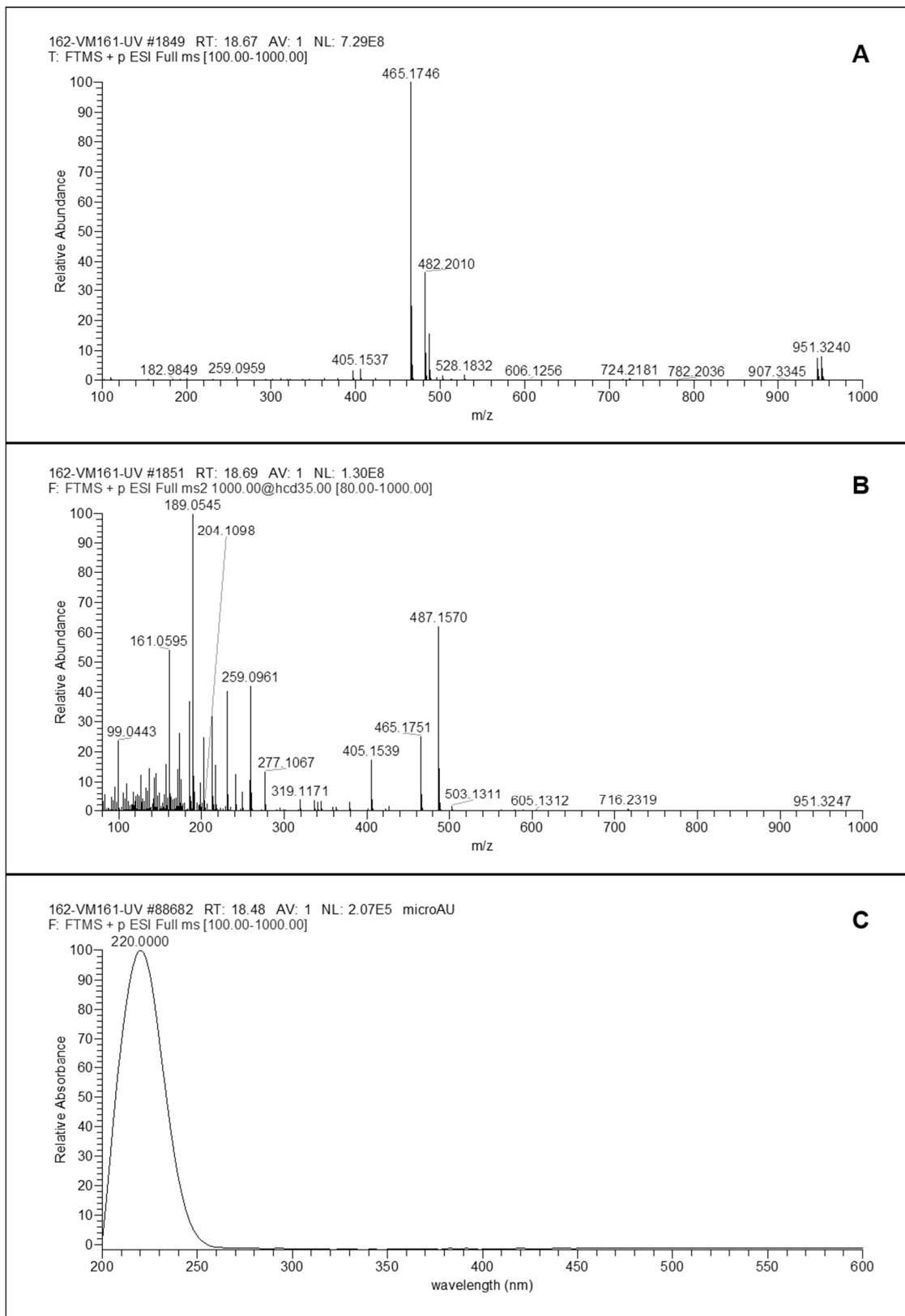


Apêndice 60: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A) e negativo (B) e espectro de UV (C) para o pico 29, identificado como deacilcinaropirina..

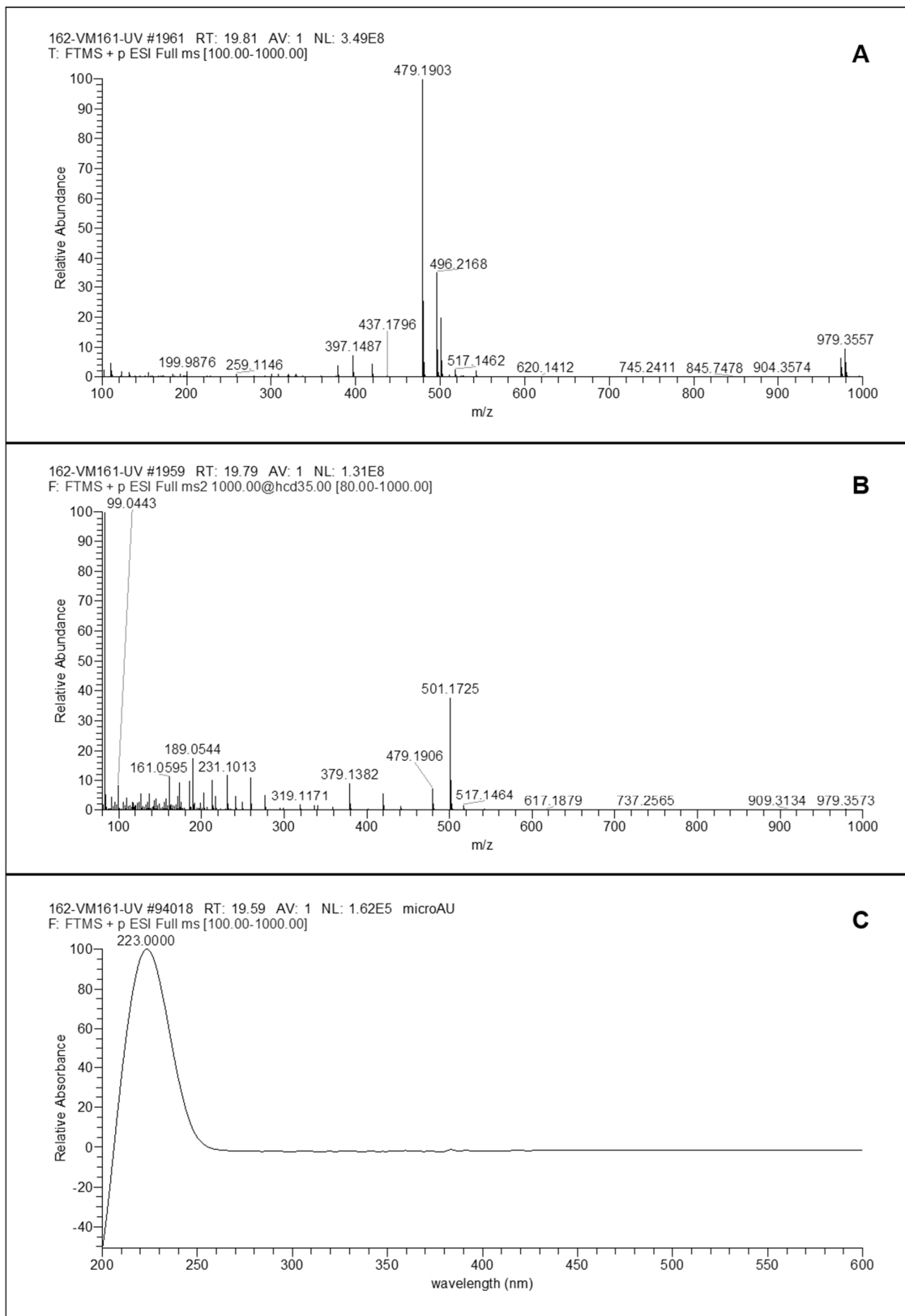
Apêndice 61: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 31, identificado como glaucolide B.



Apêndice 62: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 35, identificado como glaucolide A.



Apêndice 63: Espectros de massas no modo de ionização positivo (A); espectro de massas obtido por AIF no modo de ionização positivo (B) e espectro de UV (C) para o pico 36, identificado como 8-tigloilóxi glaucolido A.



Apêndice 64: Lista dos discriminantes indicados pelo VIP a partir da análise por OPLS-DA.

ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP	ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP
513NEG	239.903	38.0447	6.58956	73POS	125.038	36.4455	4.34865
62NEG	215.868	37.9015	6.58919	94POS	154.005	36.5305	4.34865
79NEG	217.865	37.9098	6.58919	108POS	280.162	23.4214	4.34865
80NEG	225.897	37.8865	6.58919	109POS	180.044	36.548	4.34865
85NEG	352.854	37.866	6.58919	137POS	150.026	23.4254	4.34865
91POS	194.975	36.5994	6.03776	156POS	180.95	36.6452	4.34865
14NEG	199.804	36.8255	5.99688	25NEG	172.83	36.6533	4.34865
119POS	162.984	36.617	5.99449	27NEG	160.841	36.8299	4.34865
211POS	399.25	23.1218	5.90929	28NEG	168.835	36.6533	4.34865
74NEG	164.926	36.7101	5.89634	30NEG	162.838	36.8305	4.34865
106POS	102.509	36.6009	5.81871	31NEG	158.978	36.4644	4.34865
85POS	153.033	36.4528	5.79742	37NEG	232.764	37.0023	4.34865
183POS	303.883	37.8253	5.78065	48NEG	234.761	37.0037	4.34865
206POS	114.558	36.4295	5.76537	64NEG	230.766	37.0037	4.34865
131NEG	236.759	36.9513	5.73034	43POS	371.315	30.4073	4.31465
124POS	102.533	36.5316	5.69959	233NEG	225.061	0.927768	4.31093
33NEG	158.978	0.793029	5.62661	171POS	182.947	36.6424	4.30993
209POS	192.062	36.4497	5.61227	87POS	104.03	36.5292	4.28656
174POS	205.017	36.7518	5.53184	182POS	215.983	36.5038	4.28554
107POS	116.015	36.5937	5.45747	109NEG	132.867	36.6803	4.27303
260NEG	125.928	35.7617	5.41572	169POS	224.011	36.9497	4.26277
82NEG	157.871	36.5981	5.28948	78NEG	223.798	36.1452	4.2271
86NEG	187.941	36.5116	5.24793	261POS	111.969	0.043475	4.22562
67NEG	325.184	30.8766	5.22304	108NEG	134.864	36.6719	4.21195
234POS	587.547	32.0094	5.20915	226NEG	221.8	36.1471	4.18539
167POS	161.05	37.0692	5.19683	198POS	128.019	0.801528	4.17601
99NEG	230.766	36.7138	5.10408	294POS	171.985	36.5954	4.15173
218POS	166.064	36.4428	5.08193	258POS	328.915	36.9817	4.1507
224NEG	257.768	36.9808	5.00099	83POS	124.041	36.4434	4.13277
214NEG	134.893	35.6167	4.9339	259POS	172.977	37.9347	4.06849
208POS	152.036	36.4533	4.88857	76NEG	136.891	35.2536	4.03652
58NEG	146.96	36.5465	4.84008	127NEG	307.856	37.2622	4.03636
75POS	115.016	36.6026	4.72858	265POS	180.99	36.9569	4.02959
231POS	174.956	36.5182	4.6473	172POS	281.936	36.0226	3.99146
11NEG	195.81	36.8231	4.57409	302POS	171.005	36.5395	3.98705
223POS	143.997	0.801941	4.50809	155POS	266.151	16.5784	3.98092
140NEG	224.803	37.042	4.4758	252POS	159.969	39.9932	3.9538
83NEG	248.96	36.0796	4.46671	65NEG	136.862	37.0717	3.91125
222POS	167.013	0.801938	4.46578	1135NEG	134.893	36.4593	3.90703
65POS	393.297	30.4089	4.44768	225POS	174.953	36.8397	3.90057
264POS	214.003	37.695	4.34892	153POS	522.596	32.1716	3.88671
271POS	131.974	39.9458	4.34892	262POS	276.896	0.043446	3.87468

ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP	ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP
87NEG	253.772	36.9888	3.86806	122NEG	293.212	21.3534	2.99576
254POS	354.931	36.4683	3.85947	298POS	213.011	36.5962	2.98553
81NEG	293.18	28.4698	3.85851	261NEG	134.864	0.096079	2.96892
8NEG	197.807	36.8221	3.78731	348NEG	164.835	36.8373	2.8994
269POS	111.984	37.6839	3.757	865POS	298.557	9.65811	2.87805
130NEG	192.928	36.5205	3.75539	1304POS	391.283	30.3785	2.87604
227POS	421.232	23.1314	3.69828	245NEG	341.088	5.8063	2.87161
337NEG	297.153	26.382	3.66167	121POS	631.112	36.0345	2.8593
473POS	319.07	9.6941	3.637	451POS	463.086	9.09098	2.84034
84NEG	178.977	0.05406	3.58584	551NEG	174.955	0.814353	2.83863
23NEG	170.832	36.6515	3.5596	32NEG	511.089	9.72734	2.82192
137NEG	336.859	36.9406	3.55848	117NEG	307.192	17.3606	2.79888
119NEG	178.814	36.2103	3.54261	301POS	684.201	33.8817	2.79741
1077NEG	180.899	36.8872	3.51565	101NEG	195.81	1.09929	2.78331
299POS	103.508	36.5919	3.50206	185POS	465.102	8.83264	2.77643
267POS	224.988	36.4868	3.49744	352NEG	225.795	36.1505	2.77065
49NEG	174.955	0.77726	3.49051	138NEG	197.807	0.012624	2.77011
814POS	102.034	0.786818	3.4785	103POS	205.086	23.5192	2.76914
164POS	550.628	34.4486	3.46408	266POS	299.912	37.0903	2.76719
75NEG	234.761	36.7054	3.40047	317POS	138.055	1.00072	2.76437
90NEG	461.073	8.99794	3.3734	124NEG	744.954	29.8563	2.76016
221NEG	203.939	36.1502	3.32818	233POS	228.007	36.5154	2.73879
125NEG	794.951	30.9535	3.32565	375POS	303.049	8.74685	2.73222
199POS	151.035	0.801493	3.31443	207NEG	179.055	0.930911	2.72628
67POS	136.062	1.02569	3.28949	17NEG	513.104	9.70471	2.72236
669NEG	325.184	36.3563	3.23674	63POS	132.102	1.63568	2.71603
801POS	301.14	23.4326	3.23467	366NEG	215.868	0.733526	2.7102
521NEG	132.867	0.096312	3.22623	55POS	203.052	0.95824	2.70695
288POS	499.123	9.69976	3.1996	272NEG	191.055	5.92489	2.68331
171NEG	178.977	0.797438	3.18356	102NEG	199.804	1.08741	2.67394
111POS	190.05	23.4293	3.16303	249POS	200.972	0.800749	2.669
129NEG	457.372	32.8352	3.16277	298NEG	285.041	12.1453	2.66764
180POS	149.023	39.7719	3.13153	6NEG	463.088	8.84857	2.66032
238POS	115.964	0.043775	3.10831	279POS	255.149	5.37356	2.64668
99POS	125.986	0.80281	3.08463	280POS	517.133	9.68464	2.64241
178POS	200.972	0.043612	3.08217	450POS	185.008	1.8981	2.63369
1012POS	550.627	34.2087	3.07832	329NEG	139.003	1.88594	2.62813
230POS	291.195	17.3627	3.07322	451NEG	103.002	1.28648	2.6233
276NEG	537.101	9.73123	3.07073	356POS	238.054	5.94788	2.60243
84POS	277.216	21.3528	3.06941	168POS	145.035	36.9458	2.59257
103NEG	129.018	1.97895	3.06902	428POS	216.159	13.6121	2.56903
104NEG	173.008	2.00773	3.06902	264NEG	609.146	8.63271	2.53339
151NEG	209.066	1.00898	3.06754	517NEG	459.151	6.41247	2.5024
100NEG	197.807	1.08003	3.05441	519NEG	153.018	8.5408	2.50097
68NEG	112.984	37.4037	3.01012	514NEG	397.179	12.8889	2.49811

ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP	ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP
827POS	164.042	9.69927	2.49159	70POS	158.961	0.001934	2.00005
364NEG	243.124	10.4691	2.45375	138POS	169.977	0.001933	1.98467
94NEG	235.926	0.054338	2.42972	442POS	338.341	28.5399	1.97563
328NEG	182.993	1.87346	2.41447	576NEG	421.075	5.94797	1.97319
19POS	116.071	0.998531	2.40552	833POS	181.049	5.92729	1.96789
69NEG	160.841	1.09921	2.39713	339POS	268.104	2.27513	1.95915
330NEG	204.975	1.91423	2.37645	584POS	315.086	18.1468	1.93182
88NEG	205.839	0.012483	2.36881	358NEG	459.057	9.10539	1.90694
192POS	355.102	5.92298	2.36224	191NEG	343.213	11.2934	1.90355
832POS	181.049	9.65218	2.33964	575NEG	547.219	11.5361	1.89617
100POS	130.086	1.02279	2.32165	902POS	169.977	0.001999	1.88993
136NEG	207.836	0.012523	2.28997	906POS	199.988	0.001999	1.88955
34NEG	191.019	1.46315	2.28289	909POS	130.966	0.001999	1.88955
394POS	611.16	8.63188	2.27979	467POS	301.07	14.2435	1.8872
488POS	539.115	9.69033	2.2672	56NEG	477.104	9.72319	1.88015
805POS	496.339	23.1267	2.26391	121NEG	272.934	1.94605	1.86357
207POS	163.039	9.66336	2.25944	486POS	447.091	10.1411	1.8595
179POS	198.017	36.5619	2.25362	823POS	164.042	5.91396	1.8458
201POS	162.112	0.983296	2.2471	404NEG	313.072	18.1498	1.81264
117POS	171.993	0.001934	2.22743	787POS	287.054	9.06759	1.78339
125POS	148.977	0.001934	2.22743	173NEG	134.864	5.26466	1.77055
152POS	176.972	0.001933	2.22743	371POS	139.988	0.043714	1.7641
129POS	199.988	0.001933	2.2272	834POS	325.091	5.84747	1.73981
357NEG	299.056	14.2167	2.20363	338NEG	134.864	0.138083	1.73908
239POS	247.943	36.9757	2.18311	196POS	163.039	5.94754	1.73841
95NEG	207.931	0.054326	2.16924	398POS	381.079	0.95927	1.70322
4NEG	515.119	9.68432	2.16489	438POS	133.53	36.5085	1.69461
93NEG	116.927	0.013079	2.16133	37POS	182.985	0.04368	1.68151
331NEG	220.949	1.9046	2.15602	510NEG	287.056	11.6547	1.68068
133POS	130.966	0.001935	2.1423	427POS	225.979	2.03432	1.68043
351POS	294.154	2.09177	2.13284	885POS	158.961	0.001997	1.67865
820POS	377.084	5.92719	2.12908	892POS	128.951	0.001995	1.67819
347NEG	553.075	9.73081	2.12602	42NEG	149.044	0.999774	1.66309
135NEG	844.947	32.2956	2.12474	614NEG	351.072	4.88123	1.66127
166POS	102.128	1.0233	2.12123	547POS	465.175	18.6463	1.63973
480POS	141.958	39.9843	2.11004	71POS	192.976	36.6068	1.63839
131POS	141.958	36.9734	2.10977	223NEG	112.984	0.871562	1.63152
416POS	325.091	11.4903	2.10763	354NEG	445.078	10.1289	1.6276
44NEG	116.927	0.012523	2.10067	240POS	114.091	5.10277	1.61612
565NEG	353.088	4.88069	2.09112	283NEG	289.937	1.4474	1.61553
589NEG	132.867	0.138126	2.0416	457POS	287.055	12.1405	1.58846
800POS	613.181	36.1139	2.04088	266NEG	499.125	10.6744	1.58763
897POS	171.993	0.001998	2.00745	350NEG	132.867	7.18926	1.58228
903POS	148.977	0.001997	2.00745	272POS	225.196	7.26719	1.58169
916POS	176.972	0.001997	2.00745	434POS	223.988	0.797427	1.58026

ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP	ID_{disc.}	m/z	t_R	M3.VIP
1065POS	522.596	32.285	1.58021	196NEG	207.836	0.013012	1.40596
333NEG	327.916	1.92091	1.57966	938POS	163.039	4.86639	1.40406
472POS	151.035	0.762989	1.57818	603NEG	341.109	0.972535	1.40303
46NEG	155.873	37.0491	1.56503	111NEG	201.801	1.08819	1.3941
170POS	227.982	37.6251	1.55874	354POS	277.216	22.8749	1.39007
1291POS	217.979	36.7735	1.55651	53NEG	205.839	37.0399	1.38212
651NEG	375.07	6.10283	1.54979	54NEG	207.836	37.0391	1.38212
382POS	130.966	0.043786	1.53934	366POS	276.144	2.07873	1.36044
245POS	203.179	22.5175	1.53253	381POS	171.993	0.044053	1.36043
311NEG	205.839	1.17316	1.52149	17POS	236.149	1.03811	1.35545
463POS	130.966	3.07127	1.5212	49POS	154.99	0.043649	1.35464
330POS	163.039	10.2541	1.51839	57POS	159.969	0.043676	1.3546
984POS	186.956	0.001862	1.51818	385NEG	269.046	13.6308	1.35208
194NEG	235.926	1.80707	1.51194	309NEG	207.836	1.18304	1.35196
179NEG	111.007	2.00706	1.51157	286NEG	355.093	5.9317	1.35076
973POS	171.993	0.001858	1.50959	252NEG	207.05	1.34321	1.34396
975POS	199.988	0.001858	1.50959	643POS	487.157	18.6524	1.34178
977POS	148.977	0.001858	1.50959	188POS	257.164	6.13472	1.33286
978POS	130.966	0.001858	1.50959	332NEG	282.919	1.88173	1.33189
979POS	169.977	0.001858	1.50959	474POS	125.986	0.765113	1.32686
980POS	176.972	0.001858	1.50959	7POS	104.107	0.922002	1.32328
573NEG	353.087	9.71148	1.50672	1076NEG	205.839	38.2578	1.32325
822POS	355.102	9.64505	1.50416	287NEG	369.082	5.94859	1.31953
340NEG	447.094	9.03943	1.4913	588NEG	540.331	23.1318	1.31888
73NEG	162.838	1.10253	1.49012	1052POS	257.164	7.00443	1.31648
155NEG	387.115	0.974317	1.48828	810POS	487.157	17.9767	1.31601
568NEG	475.146	5.70483	1.48481	811POS	503.131	17.9767	1.31601
294NEG	134.864	9.36892	1.48141	389POS	167.013	0.763248	1.31531
154NEG	301.035	12.0762	1.4592	295NEG	132.867	9.40502	1.30908
187NEG	433.208	7.33794	1.45807	10NEG	555.285	25.8756	1.30876
421POS	139.002	2.02149	1.4571	548POS	503.13	18.6524	1.30423
497POS	199.988	0.044071	1.45013	830POS	135.044	9.69999	1.30325
808POS	461.12	15.9157	1.44971	246POS	401.156	9.20964	1.30233
659NEG	317.055	1.04944	1.44703	154POS	295.226	23.0219	1.29655
1056POS	195.031	36.5348	1.44033	110NEG	327.218	14.3994	1.2881
1305POS	110.009	36.459	1.43579	571POS	141.958	0.043674	1.28178
1807POS	164.981	36.5934	1.43528	368NEG	447.093	9.8445	1.27986
798POS	220.596	23.4745	1.43528	970POS	158.961	0.001859	1.27787
175POS	242.925	36.0716	1.43056	249NEG	290.088	1.56416	1.27463
522NEG	299.056	15.9008	1.42938	1078NEG	207.836	38.2867	1.27434
220NEG	155.873	36.5689	1.42856	304POS	159.969	1.93447	1.26185
177POS	186.956	0.001953	1.42214	193NEG	205.839	0.013039	1.25487
779NEG	316.948	36.0835	1.42046	183NEG	387.166	6.92234	1.25351
112POS	128.951	0.001918	1.41742	465POS	449.107	9.04159	1.24321
550POS	479.19	19.6341	1.41505	241POS	439.159	15.9042	1.24175

ID _{disc.}	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	M3.VIP	ID _{disc.}	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	M3.VIP
242POS	461.141	15.9109	1.24175	406NEG	203.019	1.50308	1.08227
537POS	407.169	17.269	1.24123	773POS	289.07	11.6573	1.082
186NEG	235.926	0.013063	1.23536	204POS	222.133	0.909738	1.08198
349NEG	134.864	7.264	1.22897	512NEG	611.141	11.9182	1.08161
806POS	445.146	15.9049	1.22879	327NEG	366.994	1.85151	1.07811
525POS	269.969	1.92827	1.22605	723NEG	327.072	5.61672	1.07768
332POS	278.123	1.02118	1.22565	584NEG	434.104	8.22457	1.07665
752POS	148.977	2.17002	1.22304	256NEG	134.864	4.56642	1.07283
302NEG	162.838	1.03823	1.22184	559POS	307.263	14.6539	1.07169
325POS	266.123	0.96055	1.21873	425NEG	531.318	17.3417	1.07169
9NEG	191.055	0.996834	1.21299	621NEG	503.12	10.196	1.0709
353NEG	205.937	36.1466	1.2088	621POS	243.101	18.6108	1.07011
538POS	445.125	17.3109	1.20543	813POS	411.091	15.0308	1.06861
539POS	429.151	17.3058	1.20543	21NEG	353.088	5.9294	1.06798
51NEG	235.926	0.012431	1.2031	843POS	555.089	9.69022	1.0677
776POS	289.07	8.84729	1.20039	842POS	515.118	9.72591	1.06453
370POS	351.214	14.5637	1.19907	339NEG	266.946	1.95053	1.06139
1311POS	115.964	0.001878	1.19901	345NEG	563.141	7.74512	1.05778
633NEG	531.115	7.89774	1.19822	471POS	128.019	0.763274	1.054
825POS	355.102	4.90175	1.19765	600NEG	116.927	0.013503	1.0534
809POS	447.164	17.9714	1.1964	306POS	148.977	2.43365	1.05225
552POS	517.146	19.6322	1.19545	148NEG	433.078	9.39387	1.04704
555POS	501.172	19.6295	1.19545	106NEG	225.113	7.62781	1.04566
66NEG	207.931	0.012469	1.19264	572POS	274.092	1.55296	1.04446
128NEG	694.957	28.6559	1.18778	1804POS	149.953	36.5857	1.04402
43NEG	351.072	5.94186	1.18706	371NEG	283.061	17.6202	1.03393
422POS	269.969	1.98915	1.1862	143NEG	165.039	0.965548	1.03392
574NEG	423.166	12.981	1.18617	419POS	593.186	12.2007	1.03251
175NEG	215.868	0.771967	1.1857	176NEG	637.178	12.1986	1.03251
430POS	406.329	28.5262	1.18533	114NEG	271.061	13.3652	1.02645
47NEG	174.828	36.69	1.1783	147NEG	179.034	6.16285	1.02525
10POS	206.102	1.00995	1.1755	531POS	149.023	0.043687	1.02334
1802POS	104.507	36.5787	1.17453	188NEG	207.931	0.013132	1.01323
157POS	172.977	1.18367	1.17185	334NEG	160.841	1.03565	1.01104
216NEG	207.05	1.03064	1.15204	390POS	176.972	0.044053	1.01002
535POS	559.516	32.4609	1.14776	199NEG	112.984	12.8835	1.00682
449POS	224.128	1.97399	1.1434	315POS	477.115	15.9037	1.00595
453POS	294.154	1.99789	1.12932				
455POS	159.969	2.02718	1.12557				
486NEG	571.289	25.3394	1.1245				
367NEG	132.867	5.15474	1.11035				
506NEG	359.077	5.73557	1.107				
12NEG	193.05	10.155	1.10553				
150NEG	431.192	7.11509	1.09775				
190NEG	309.207	18.9182	1.0919				

Legenda: ID_{disc.}, identificação do discriminante (POS representa que o discriminante foi indicado no modo de ionização positivo e NEG representa que o discriminante foi encontrado no modo de ionização negativo); *m/z*, razão massa/carga; *t_R*, tempo de retenção em minutos; M3.VIP, valor do VIP.

