

Lucas Paradizo Roma

**Desenvolvimento e aplicação de software na  
caracterização química das ceras cuticulares: Estudo de  
espécies brasileiras de Polypodiopsida**



**Development and application of a software for the  
chemical characterization of cuticular waxes: Study of  
Brazilian species of Polypodiopsida**

São Paulo

2023

Lucas Paradizo Roma

**Desenvolvimento e aplicação de software na caracterização química das ceras cuticulares: Estudo de espécies brasileiras de Polypodiopsida**

**Development and application of a software for the chemical characterization of cuticular waxes: Study of Brazilian species of Polypodiopsida**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Déborah Yara Alves Cursino dos Santos.

**Versão Corrigida da Tese**

São Paulo

2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

Paradizo Roma, Lucas

Desenvolvimento e aplicação de software na caracterização química das ceras cuticulares: Estudo de espécies brasileiras de Polypodiopsida / Paradizo Roma Lucas; orientadora Yara Alves Cursino dos Santos Déborah -- São Paulo, 2023.

142 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Botânica).

1. Cutícula vegetal. 2. Lipídios. 3. Lycopodiopsida. 4. Polypodiales. 5. Samambaias.

Comissão Julgadora:

---


Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Déborah Y. A. C. dos Santos

Orientadora

**Versão Corrigida da Tese**

*Dedico este trabalho aos meus tios Frederico Teixeira de Simas, Regina Célia de Simas, Alexandre Megiorin Roma e Angela Weiss Roma por serem as pessoas mais importantes na minha vida escolar e acadêmica até os dias de hoje. Que este passo da minha vida reflita todo cuidado e apoio que eles me deram em minha jornada até aqui.*

*“O trabalho te dá um propósito e um significado, e a vida é vazia sem isso.”*  
– Stephen Hawking

## AGRADECIMENTOS

À professora Déborah que foi minha orientadora e mentora ao longo de quase 8 anos. Uma pessoa que sempre admirei pelo seu modo de orientar e conduzir pesquisas dentro da universidade. Muito obrigado por todos os ensinamentos, dicas e oportunidades ao longo desse tempo. Obrigado por não ter desistido de mim mesmo nos momentos mais difíceis. Sou muito grato!

Ao professor Jefferson Prado e a Dr<sup>a</sup> Regina Hirai que foram muito importantes para o desenvolvimento do meu trabalho. Obrigado pelas preocupações, dicas, ensinamentos e pelos bons momentos que tivemos durante minhas visitas no IPA e nas coletas das samambaias.

Aos professores do Laboratório de Fitoquímica Marcelo J. Pena Ferreira, Claudia Maria Furlan, Maria Luiza Salatino e Antônio Salatino pelos bons momentos, ensinamentos e por nunca terem me negado nenhum tipo de ajuda e auxílio.

À professora Gladys F. A. Melo de Pinna por abrir as portas do Laboratório de Anatomia para mim e por toda ajuda para o desenvolvimento do meu projeto.

Aos Drs Marcelo F. Devecchi e Rafael S. Cruz pelas conversas e pela ajuda na coleta de algumas espécies para o desenvolvimento do meu trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa do Estado de São Paulo por financiaram meu projeto de pesquisa. Principalmente a CNPq pela concessão de minha bolsa de doutorado (processo 140085/2019-0).

À Agência USP de Inovação (AUSPIN) pelo auxílio no processo de registro do software WaxAlly (BR512022002375-0) no Instituto Nacional de propriedade Industrial (INPI).

Ao Programa de Apoio à Permanência e Formação Estudantil (PAPFE) pelo auxílio financeiro.

À Mourisa por anos de muito apoio tanto para o desenvolvimento da minha pesquisa quanto emocional, me consolando, motivando e me tirando muitos e muitos sorrisos.

À Aline e ao Leandro, que apesar de pouco contato que tivemos ao longo do doutorado, sempre me ajudaram quando precisei.

Aos amigos e amigas que tive o prazer de conhecer através da USP e àqueles que já estão ao meu lado de longa data, que foram essenciais para minha vida ao longo de toda minha pós-graduação. Não tenho palavras que sejam dignas do tamanho do agradecimento que tenho a vocês. Vocês foram o pilar ao longo do desenvolvimento do meu trabalho, com vocês aprendi muito de ciência e sobre a vida. Sou muito grato por tudo, pelo bom e pelo ruim, pelas tristezas e pelas alegrias. Vocês foram essenciais para minha vida ao longo de toda minha pós-graduação.

À Graça e ao Manoel pelos momentos muito divertidos que passamos, pelo acolhimento carinhoso que vocês me deram e pelos muitos ensinamentos sobre a vida que carrego comigo até hoje.

À toda minha família pelo apoio, carinho e suporte! Em especial a minha vó Vera que sempre me olhou como um filho assim como eu a olho como uma mãe e a minha tia Ana Cláudia por ter me acolhido em um momento tão sombrio da minha vida. Eu amo todos vocês e sou muito grato.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL.....	3
Caracterização geral das traqueófitas.....	3
Samambaias e cavalinhas (Polypodiopsida).....	5
Caracterização química geral de Polypodiopsida.....	11
Principais aspectos da cutícula vegetal.....	13
Biossíntese resumida dos principais componentes da cutícula.....	20
Análise das ceras cuticulares e suas adversidades.....	25
Composição química das ceras cuticulares em Polypodiopsida.....	26
OBJETIVOS.....	28
Objetivo geral.....	28
Objetivos específicos.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 1.....	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUCTION.....	41
FRAMEWORK.....	43
SOFTWARE WORKFLOW.....	48
CALCULATOR AND PREDICTION ALGORITHMS.....	49
FINAL CONSIDERATIONS.....	51
REFERENCES.....	52
CAPÍTULO 2.....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
INTRODUCTION.....	58
MATERIAL AND METHODS.....	61
Plant material.....	61
Epicuticular and intracuticular wax extraction and quantification.....	62
Chromatographic analyses and compounds identification.....	62
Scanning electron microscopy.....	63
Statistical analyses and graph construction.....	63
RESULTS.....	63
Wax content.....	63
Chemical composition of the waxes.....	64
Wax Morphology.....	66
DISCUSSION.....	73
Wax content and chemical composition.....	73
Wax morphology.....	76
REFERENCES.....	77
SUPPLEMENTARY TABLES.....	83
CAPÍTULO 3.....	85



RESUMO.....	86
ABSTRACT.....	87
INTRODUÇÃO.....	88
MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
Material vegetal.....	93
Extração e quantificação das ceras cuticulares.....	95
Análises cromatográficas e identificação das substâncias.....	95
Análises estatísticas e construção dos gráficos.....	96
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
Análise de teor.....	96
Composição química das ceras por CG-EM.....	100
Análise dos agrupamentos.....	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	137
REFERÊNCIAS.....	139
RESUMO GERAL.....	141
THESIS ABSTRACT.....	142

## INTRODUÇÃO GERAL

### RESUMO

As samambaias e cavalinhas, também conhecidas como polipodiófitas (Polypodiopsida), pertencem ao segundo grupo mais diverso de plantas vasculares, com cerca de 10.500 espécies. A dispersão por esporos é marcante nesse grupo e, diferente das espermatófitas, apresentam folhas (também denominadas de frondes) tanto com função vegetativa, realizando fotossíntese, quanto função reprodutiva abrigando os esporângios. As frondes que abrigam os esporângios (frondes férteis) são destinadas a essa função desde o início de seu desenvolvimento e podem ser semelhantes ou diferentes morfológicamente das frondes estéreis. Tais características presentes nas polipodiófitas despertaram grande interesse na caracterização química da cutícula vegetal nesse grupo. A cutícula vegetal pode ser definida como uma estrutura hidrofóbica, translúcida e flexível que recobre todos os órgãos aéreos que não apresentam desenvolvimento secundário das embriófitas. Sua fração solúvel, denominada de ceras cuticulares, desempenha papel fundamental na sobrevivência das plantas, restringindo a perda de água via transpiração não-estomática. O principal desafio do estudo das ceras reside no processo de identificação dos espectros de massas obtidos por CG-EM, que podem ser erroneamente identificados por bibliotecas digitais comerciais ou demandar muito tempo para identificação manual a partir do padrão de fragmentação de cada uma das possíveis classes de compostos de cera. Apesar da importância das polipodiófitas e das ceras cuticulares para a ecologia, apenas uma minúscula parcela de suas espécies foi estudada quanto a composição química das ceras cuticulares. Desse modo, o principal objetivo desse trabalho foi desenvolver um software capaz de auxiliar na identificação de homólogos das principais classes de compostos de cera e aplicá-lo na análise das ceras cuticulares de representantes nativos dos principais grupos de Polypodiopsida, visando contribuir para o entendimento das ceras cuticulares nesse grupo de plantas tão diverso e importante.

**Palavras chave:** Cutícula vegetal, Lipídios, Lycopodiopsida, Polypodiales, Samambaias.

## **ABSTRACT**

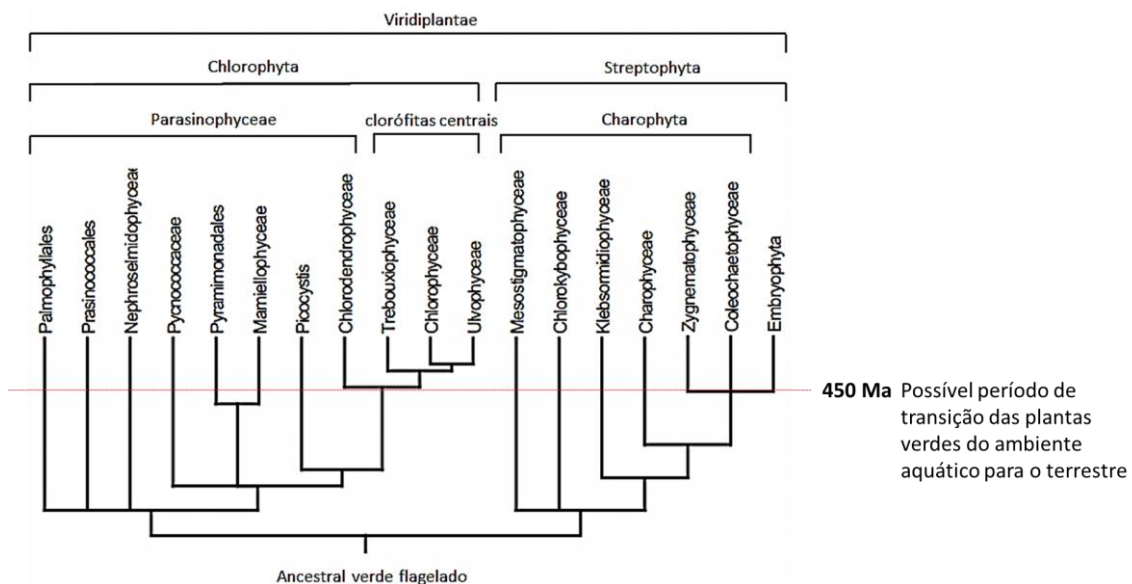
Ferns and horsetails, also known as Polypodiophyta or Polypodiopsida, belong to the second most diverse group of vascular plants, with about 10,500 species. The spore dispersion is a remarkable characteristic in this group and contrary of the Spermatophyta, they have leaves (also called fronds) with both a vegetative function, carrying out photosynthesis, and a reproductive function, sheltering the sporangia. The fronds carrying the sporangia (fertile fronds) are destined for this function from the beginning of their development and may be morphologically similar or different from the sterile fronds. Such characteristics of Polypodiopsida arouse great interest in the chemical characterization of the cuticle in this group. The cuticle of plants can be defined as a hydrophobic, translucent and flexible structure that covers all the aerial organs of embryophytes without secondary development. The soluble fraction of the cuticle, called cuticular waxes, plays an important role in plant survival, restricting water loss via non-stomatal transpiration. The main challenge to study waxes lies in the process of identifying the mass spectra obtained by GC-MS, which can be misidentified by commercial digital libraries or require a lot of time for manual identification based on the fragmentation pattern of each of the possible classes of waxes compounds. Despite the importance of Polypodiopsida and cuticular waxes for ecology, just a few species have been studied regarding the chemical composition of cuticular waxes. Therefore, the main goal of the present work is developing a new software to assisting in the identification of homologues from the main classes of waxes compounds and applying it in the analysis of cuticular waxes from Brazilian native species of the main groups of Polypodiopsida, aiming to contribute to the knowledge of the cuticular waxes in a very diverse and important group of plants.

**Key-words:** Ferns, Lipids, Lycopodiopsida, Plant cuticle, Polypodiales.

## CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

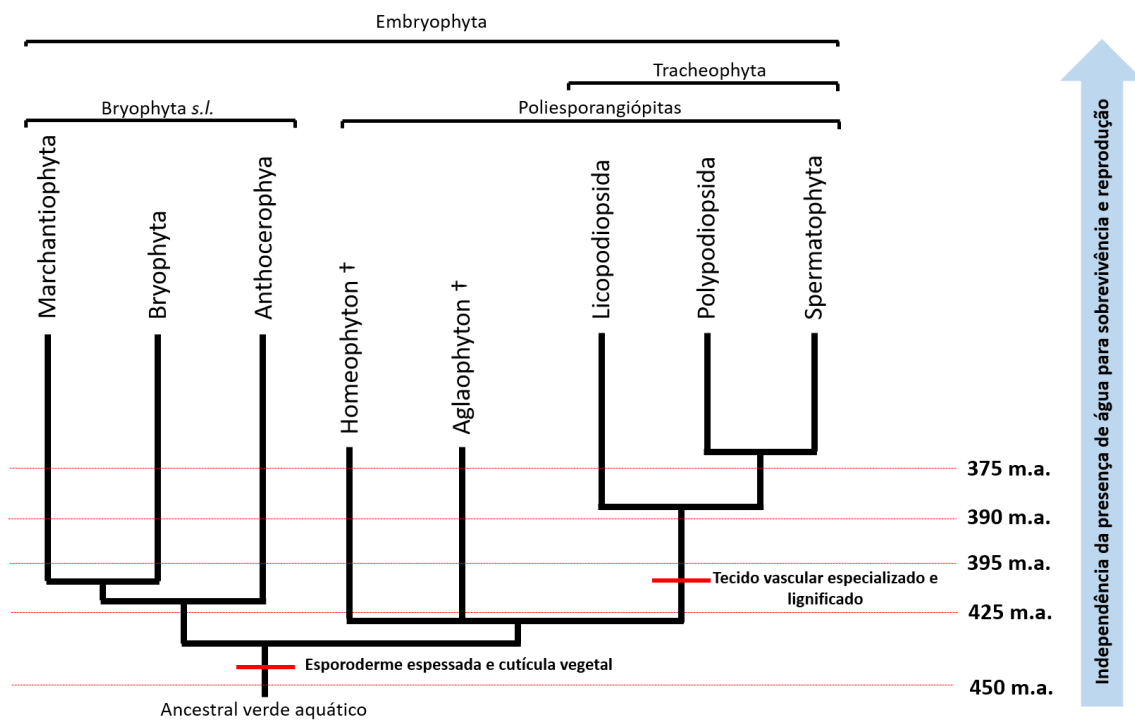
### Caracterização geral das traqueófitas

As primeiras linhagens de plantas a colonizar o ambiente terrestre datam de aproximadamente 450 milhões de anos atrás, entre o início do período Siluriano (~443-419 Ma) e fim do Ordoviciano (~486-443 Ma; Figura 1; Yeats & Rose, 2013; Goldman et al., 2020; Melchin et al., 2020). Populações ancestrais de algas carófitas que apresentavam os esporos revestidos por esporopolenina e que habitavam regiões de margens marinhas ou dulcícolas sujeitas a períodos de estiagem, provavelmente originaram as primeiras linhagens de plantas que passaram a ocupar o ambiente terrestre (Weng & Chapple, 2010; Leliaert et al., 2012). Este novo ambiente, rico em gases como oxigênio e dióxido de carbono e com maior disponibilidade luminosa era bastante vantajoso em relação ao ambiente aquático. Entretanto, o maior risco de dessecação, relativa escassez de água, ausência de estruturas de sustentação e extremos de temperatura, por exemplo, foram grandes barreiras que essas primeiras populações encontraram (Doyle, 2013; Yeats & Rose, 2013).



**Figura 1.** Filogenia das principais linhagens de plantas verdes (Viridiplantae) com a indicação da possível época de transição entre as linhagens aquáticas para as terrestres (adaptado de Leliaert, 2012).

Acredita-se que há cerca de 420 milhões de anos, início do período Devoniano (~419-361 Ma; Becker et al., 2020), surgiram as primeiras linhagens de plantas vasculares terrestres, denominadas de poliesporangiófitas (Figura 2). As principais características morfológicas encontradas nessas plantas são, entre outras, a presença de tecidos vasculares (xilema e floema), parede celular secundária lignificada e esporófitos ramificados, independentes, de vida-longa, com a presença de múltiplos esporângios. Esse grande grupo de plantas é formado por representantes ancestrais, os quais atualmente apenas são conhecidos indivíduos fósseis (por exemplo, *Aglaophyton* (Rinófitas)) e pelo filo Tracheophyta. A principal diferença encontrada entre as poliesporangiófitas ancestrais e as traqueófitas é a presença nessas últimas, de traqueídes especializados, com as paredes celulares fortemente lignificadas (Edwards, 1986; Judd et al., 2008; Simpson, 2010; Weng & Chapple, 2010).



**Figura 2.** Filogenia das principais linhagens de plantas terrestres (Embryophyta) marcada com importantes características que permitiram que cada vez mais as plantas se estabelecessem no ambiente terrestre (adaptado de Schneider et al., 2002; Judd et al., 2008; Doyle, 2013; PPG I, 2016; Cole et al., 2019a e b).

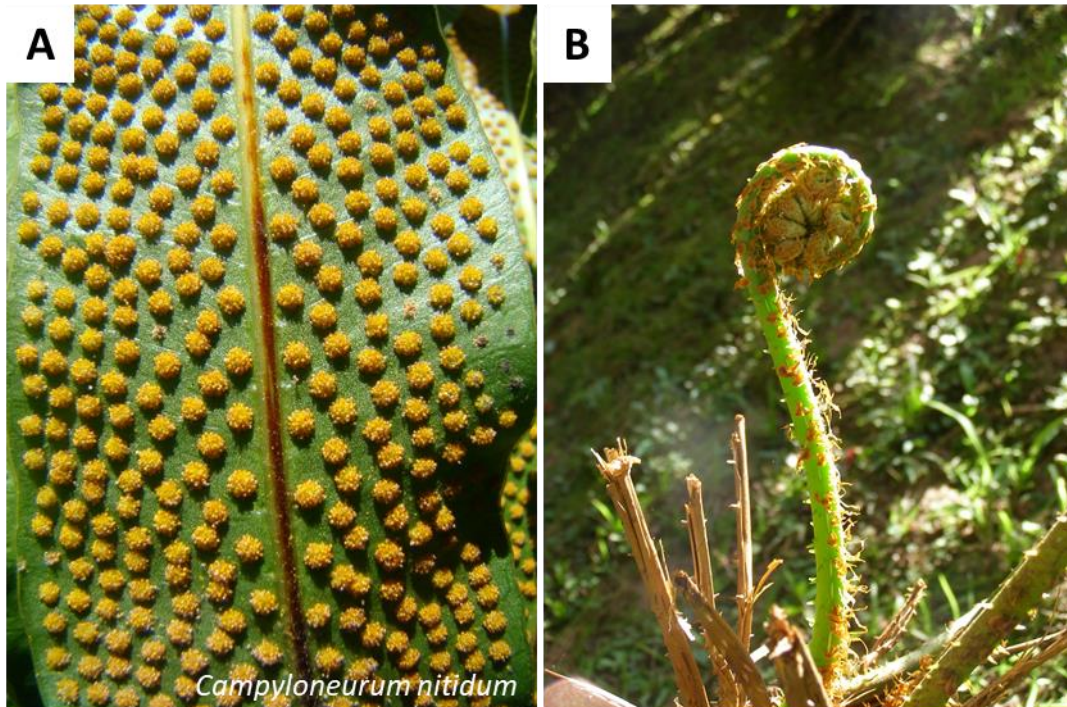
As traqueófitas são formadas por dois grupos de plantas vasculares. A classe das licófitas (Lycopodiopsida), que é caracterizada pela presença de esporângios reniformes,

de posição lateral e deiscência transversal. Além disso, caracterizam-se pela presença de microfilos (folhas pequenas de nervura única). Esse clado de plantas era especialmente diversificado durante o Carbonífero, entretanto atualmente existem apenas cerca de 1.200 espécies, que compreendem menos de 1% das plantas vasculares atuais (Smith et al., 2006; Judd et al., 2008; Schuettpelz & Pryer, 2008). O outro grupo que define as traqueófitas pertence a divisão das eufilófitas (Euphyllophyta). As eufilófitas são caracterizadas por apresentar diferenciação entre o eixo principal dos ramos laterais e presença de megafilos (folhas maiores e mais complexas; Judd et al., 2008). Essa divisão é formada por dois cladogramas principais, as espermatófitas (Spermatophyta) e as polipodiófitas (Polypodiopsida). As espermatófitas compreendem todas as plantas com sementes, como as gimnospermas e angiospermas, totalizando cerca de 260 mil espécies. Já a classe Polypodiopsida compreende um grupo monofilético de plantas vasculares sem sementes com cerca de 10.500 espécies, representando cerca de 5% das espécies de plantas vasculares, o segundo maior grupo de plantas vasculares (Schneider et al., 2004; PPG I, 2016). A classe Polypodiopsida, é comumente conhecida como samambaias, mas também engloba um pequeno grupo de plantas conhecidas como cavalinhas (Equisetales). As samambaias e cavalinhas junto às licófitas formam um grupo parafilético, no passado denominado de Pteridophyta (um termo em desuso), que apresentam em comum, além da presença de vasos condutores, a dispersão por esporos (Smith et al., 2006; Smith et al., 2008; Schuettpelz & Pryer, 2008).

### **Samambaias e cavalinhas (Polypodiopsida)**

As polipodiófitas são caracterizadas e distinguidas das demais linhagens vegetais principalmente por: (I) apresentar esporófito de vida livre como fase dominante (se distinguindo das briófitas *senso lato* que apresentam os gametófitos como fase dominante); (II) ausência de sementes e realização da dispersão através de esporos (se diferenciando das espermatófitas que apresentam sementes); (III) presença de megafilos (se diferenciando das licófitas que apresentam microfilos); (IV) salvo exceções (por exemplo Equisetales), apresentam soros (estrutura que abriga os esporângios) na superfície abaxial das frondes (termo comum usado para se referir as folhas das

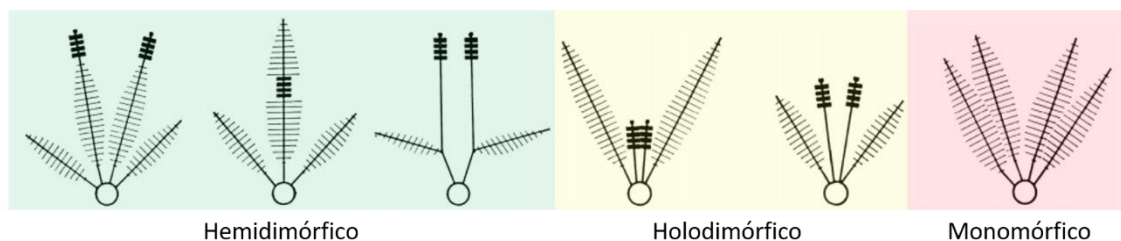
samambaias) e frondes jovens enroladas denominadas de báculos (Figura 3; Moran, 2019).



**Figura 3.** Características das frondes de Polypodiopsida. **A:** Conjunto de soros na superfície abaxial de uma fronde de *Campyloneurum nitidum* (Kaulf.) C.Presl (Regina Hirai); **B:** Fronde jovem em forma de báculo (Déborah Y. A. C. dos Santos).

Outra característica distinta e importante para o ciclo de vida de Polypodiopsida, é que nesse grupo diferente do que é visto para por exemplo, nas espermatófitas, é que suas frondes apresentam tanto função vegetativa (tal como a realização de fotossíntese) como também função reprodutiva. A presença de soros em determinadas frondes tem origem genética e desde seu desenvolvimento inicial essas frondes já são destinadas a serem férteis (com presença de soros) ou estéreis (sem presença de soros; Lee et al., 2018). Morfologicamente as frondes férteis podem apresentar diferentes especializações anatômicas dependendo da espécie (Figura 4). As frondes férteis podem ser dimórficas com padrão hemidimórfico, que é caracterizado pela modificação parcial da fronde na região que abriga os soros ou com padrão holodimórfico, que se caracteriza pela alteração total da fronde fértil; ou elas podem ser monomórficas, em que não há diferenciação entre as frondes estéreis das férteis a não ser pela presença de soros nas frondes férteis (Moran, 2019). A proporção entre frondes férteis e estéreis pode diferir

entre as diferentes espécies, assim como o tempo de vida de cada uma delas, sendo que algumas folhas dimórficas, após a liberação dos esporos, entram em senescência, uma vez que sua função primordial é abrigar os soros (Lee et al., 2008 e 2018).

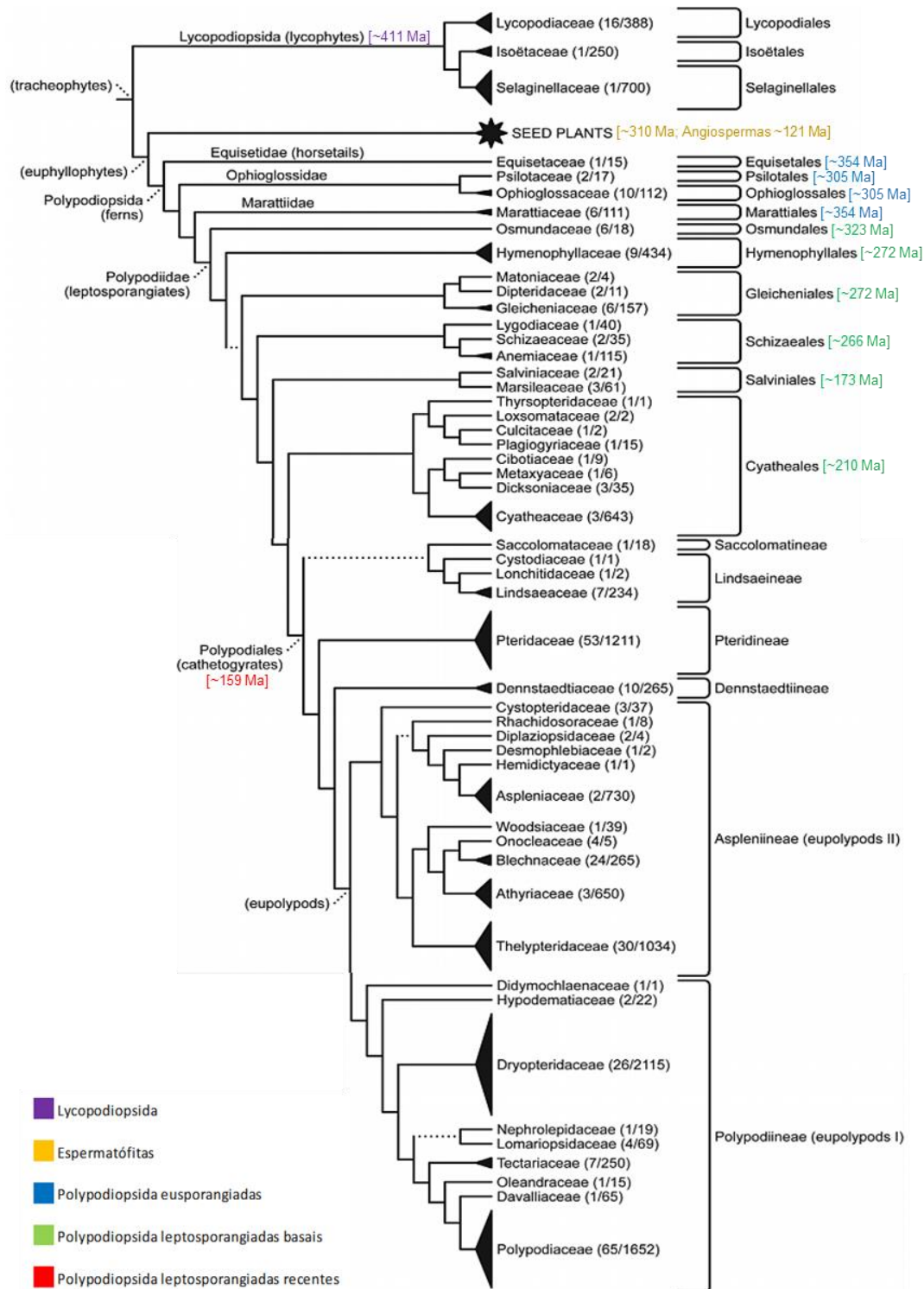


**Figura 4.** Representação do dimorfismo sexual foliar presente em frondes de samambaias (adaptado de Moran, 2019).

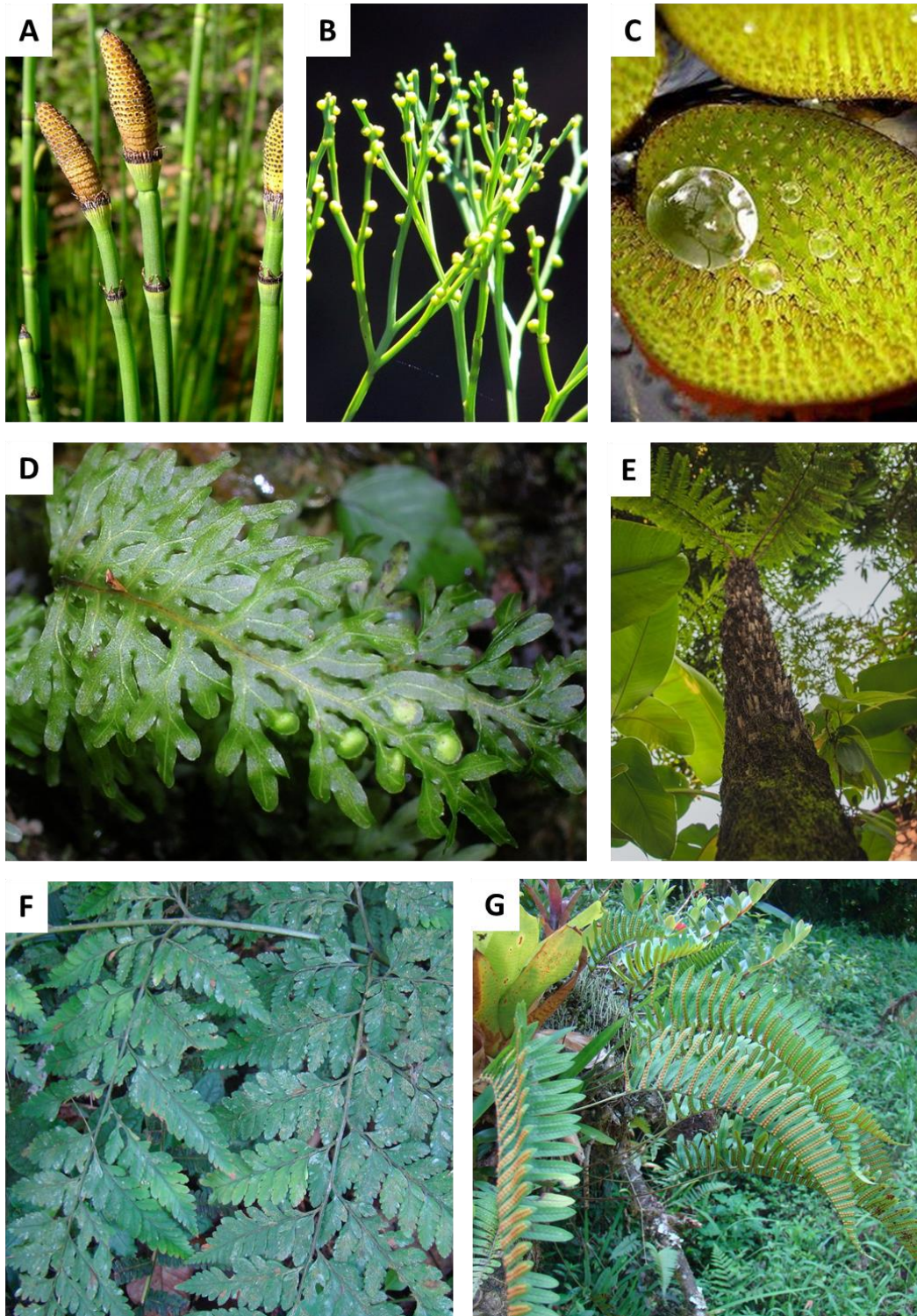
As polipodiófitas são divididas em 11 ordens, 48 famílias, 319 gêneros e 10578 espécies (Figura 5; PPG I, 2016). Algumas das ordens de Polypodiopsida são bastante distintas morfológicamente, por exemplo, Equisetales (cavalinhas) que apresentam um estróbilo apical, com caule articulado (nós e entrenós) e frondes reduzidas em forma de coroa ao redor do caule (figura 6A). Psilotales, ordem também conhecida por *whisky-ferns*, apresenta plantas bastante delicadas, de frondes reduzidas e escamiformes, presentes em solos rochosos ou epifíticas (figura 6B). Hymenophyllales que apresenta espécies com frondes bastante finas, podendo chegar a espessura de apenas uma camada de células, com cutícula delgada, ausência de estômatos e hábito epifítico (Figura 6D; Moran, 2019). Salviniiales, que são conhecidas como as samambaias aquáticas (figura 6C), com muitas espécies que apresentam tricomas diferenciados em forma de “guarda-chuva” que, junto aos cristaloides de ceras epicuticulares, criam uma superfície super-hidrofóbica, formando entre a superfície da folha com a água, um bolsão de ar (Koch & Barthlott, 2009; Barthlott et al., 2010).

Além disso, há também a ordem das samambaias arbóreas (Cyatheaales), com espécies muito altas e distintas das demais samambaias (figura 6E). Uma importante espécie desta ordem, bastante conhecida, é *Dicksonia sellowiana*, conhecida como xaxim (Moran, 2019). Já as Polypodiales representam um grupo de samambaias extremamente diverso e, sozinho, compreende de 80% das espécies de Polypodiopsida (Figura 6F e G; PPG I, 2016).



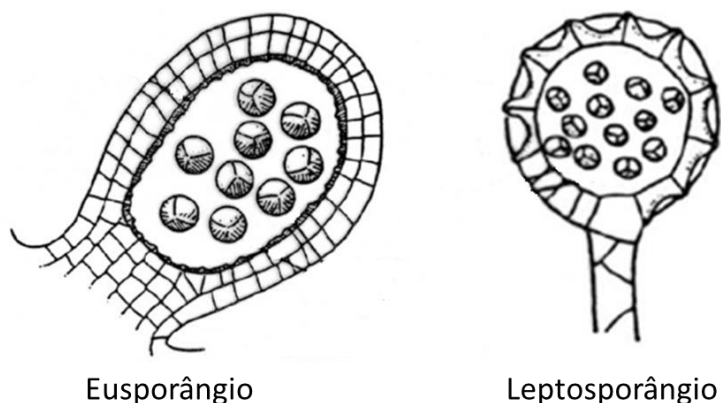


**Figura 5.** Filogenia resumida das traqueófitas atuais, com destaque para as ordens de licófitas (Lycopodiopsida) e samambaias (Polypodiopsida). Nós pontilhados indicam áreas de incertezas filogenéticas. Entre parênteses encontra-se o número de gêneros/número de espécies (adaptado de PPG I, 2016). A data aproximada da origem dos principais grupos encontra-se em colchetes e é baseada tanto nos registros fósseis como nas linhagens atuais (Pryer et al., 2004; Schneider et al., 2004; Matsunaga & Tomescu, 2016).



**Figura 6.** Diversidade morfológica de Polypodiopsida representada através da imagem das seguintes espécies: **A:** *Equisetum hyemale* Mart. (fonte: Floresfrescasonline); **B:** *Psilotum nudum* (L.) P.Beauv. (fonte: plantstomata.wordpress); **C:** *Salvinia auriculata* Aubl. (fonte: aquariumbg); **D:** *Hymenophyllum caudiculatum* Mart. (fonte: catalogoplantas.udec); **E:** *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (fonte: Google imagens); **F:** *Lastreopsis amplissima* (C. Presl) Tindale (fonte: Regina Hirai); **G:** *Serpocaulon catharinae* (Langsd. & Fisch.) A.R. Sm. (fonte: Regina Hirai).

As Polypodiopsida atuais encontram-se bem estabelecidas filogeneticamente, com exceção de alguns clados, por exemplo, Saccolomatineae e Lindsaeineae (Figura 5, linhas pontilhadas). Elas podem ser subdivididas em 2 grupos de acordo com a estrutura de seus esporângios, um formado por ordens eusporangiadas e outro por ordens leptosporangiadas. Os eusporângios são encontrados nas ordens de polipodiófitas mais basais (Equisetales, Ophioglossales, Psilotales e Marattiales) além de também estarem presentes em musgos, hepáticas, antóceros, licófitas e plantas com sementes. Este tipo de esporângios (também conhecidos como esporângios verdadeiros) são caracterizados por apresentar um maior número de células em sua parede quando maduros e tem origem a partir de um conjunto de células (Figura 7). Já os leptosporângios são encontrados nas demais ordens de Polypodiopsida (Osmundales, Hymenophyllales, Gleicheniales, Schizaeales, Salviniales, Cyatheaes e Polypodiales; Figura 5). Os leptosporângios (ou esporângios delgados) se originam a partir de uma única célula e apresentam uma parede quando maduros muito delgada, com praticamente uma camada de células (figura 7). Os eusporângios são maiores e por consequência produzem mais esporos, já os leptosporângios produzem menos esporos, porém compensam a menor produtividade de esporos com uma maior quantidade de esporângios (Moran, 2019).



**Figura 7.** Representação dos esporângios presentes em polipodiófitas (adaptado de Moran, 2019).

A linhagem das polipodiófitas pode ser dividida de acordo com o tipo de esporângio e com o período de sua origem (Figura 5). De acordo com registros fósseis e dados das linhagens atuais, as eusporangiadas têm em sua maioria origem bastante

antiga entre as Polypodiopsida, com ~354 Ma nas Equisetales, ~305 Ma nas Psilotales, ~305 Ma nas Marattinoides e ~354 Ma nas Ophioglossoides. Já as linhagens de leptosporangiadas tiveram origens em períodos distintos, com uma parte originando-se mais ancestralmente como Osmundales (~323 Ma), Hymenophyllales (~272 Ma), Gleichenioides (~272 Ma), Schizaeoides (~266 Ma), Salviniiales (~173 Ma) e Cyathales (~210 Ma) enquanto outra parte tem origem mais recente como *Polypods* (~159 Ma). Vale ressaltar que o clado que comporta o maior número de espécies de Polypodiopsida, *Eupolypods* (~119 Ma), com 67% da diversidade de polipodiófitas, tem origem provável muito próximo as angiospermas (~121 Ma) e ambas passaram por períodos de diversificação muito próximos (Pryer et al., 2004; Schneider et al., 2004). A diversificação tardia desse grupo pode ter ocorrido devido a mudanças nos fatores abióticos, tal como mudanças climáticas e o declínio da concentração de CO<sub>2</sub> ou mesmo devido as alterações florísticas provocadas pelas angiospermas ocorridas nesse período (Schneider et al., 2004).

No Brasil há registros de espécies de praticamente todas as famílias de polipodiófitas, com exceção de Cibotiaceae, Loxomataceae, Thyrsopteridaceae, Matoniaceae e Dipteridaceae (Flora do Brasil 2020, 2018). As samambaias, assim como as licófitas, possuem grande importância para a flora brasileira ocorrendo em ambientes aquáticos e terrestres, principalmente nas regiões de Mata Atlântica e serranas, mas também podem estar presentes em matas de galeria e nas faixas tropicais e subtropicais do Cerrado, bem como na Amazônia (Prado, 1998; Prado et al., 2015). Além disso, algumas poucas espécies também podem ser encontradas no Pantanal, Caatinga e Pampas (Prado et al., 2015).

### **Caracterização química geral de Polypodiopsida**

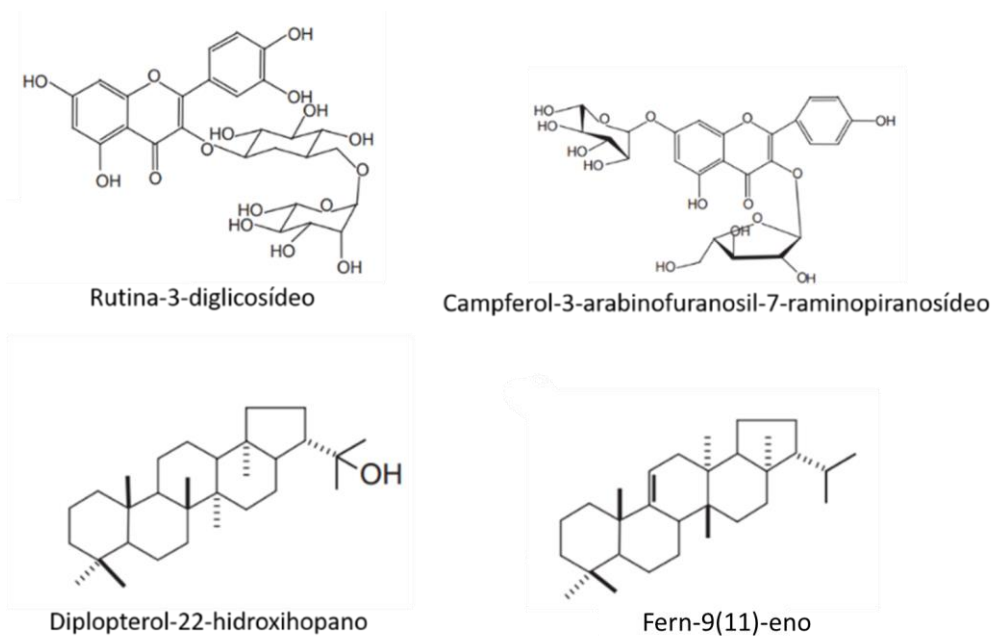
As polipodiófitas são bastante diversas quanto à composição química de seus metabólitos secundários, especialmente se tratando de fenólicos e terpenoides (Ho et al., 2011; Vetter, 2018). Entretanto, essa linhagem de plantas, com poucas exceções, é bastante pobre na síntese de alcaloides (Vetter, 2018; Moran, 2019). Além disso, as

polipodiófitas são caracterizadas pela presença de diferentes oligo e polissacarídeos (Vetter, 2018).

Dentre os fenólicos de polipodiófitas, os flavonoides se destacam, principalmente os glicosídeos derivados de apigenina, luteolina, naringenina e campferol (figura 8; Ho et al., 2011; Vetter, 2018). Quanto aos terpenoides, os mais diversos são os triterpenos, com destaque aos farnanos e seus derivados (figura 8). Esta classe de triterpenos é praticamente exclusiva das polipodiófitas, mas também já foi isolada de algumas espécies de líquens (Ho et al., 2011; Vetter, 2018).

A maior importância de bioatividade atribuída à diversas espécies de polipodiófitas é sua ação antioxidante, principalmente devido aos glicosídeos e aos oligo e polissacarídeos. Além disso, determinados sesquiterpenos e sesquiterpenos glicosilados (ptaquilosídeos) são bastante tóxicos quando ingeridos, principalmente por rebanhos. Em humanos, estas substâncias tóxicas podem estar relacionadas a alguns efeitos carcinogênicos. Elas também apresentam alguns esteroides com forte ação bioinseticida. Por fim, seus compostos também apresentam potencial atividade contra várias doenças, por exemplo, câncer, malária, gastrointestinais, neurológicas e ginecológicas (Ho et al., 2011; Vetter, 2018; Sridhar, 2022).

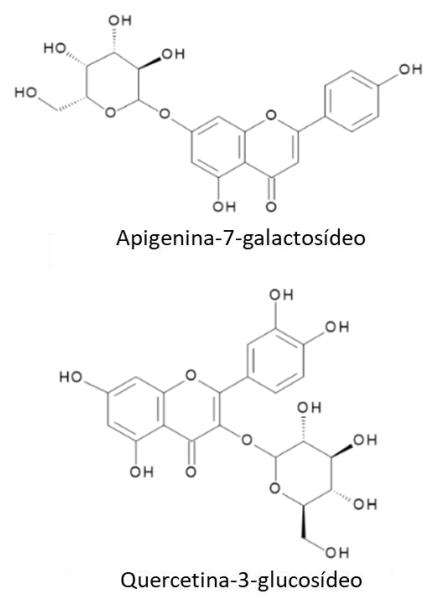
Ademais, foram encontrados alguns trabalhos intitulados como estudo de cera em samambaias, porém eles são realizados em uma pseudo cera, denominada de cera farinhosa. A chamada cera farinhosa é produto da exudação de agliconas de flavonoides, glicosídeos e terpenoides a partir de tricomas glandulares na superfície abaxial das frondes presentes em diferentes gêneros de Pteridaceae (figura 9). Essa secreção apresenta aspecto farináceo e pode possuir coloração branca ou amarela. Apesar de seu nome, esta não é uma cera verdadeira em termos químicos e ontogênicos, não apresentando a mesma origem que as ceras cuticulares (Wollenweber et al., 1987; Salatino & Prado, 1998; Wollenweber & Schneider, 2000; Lange, 2015).



**Figura 8.** Exemplos de compostos das principais classes de metabólitos secundários isolados de Polypodiopsida (adaptado de Ho et al., 2011; Vetter, 2018).



*Notholaena ochracea* (Hook.) Yatsk. & Arbeláez



**Figura 9.** Aspecto e alguns constituintes das ceras farinhasas em Pteridaceae (Google imagens; adaptado de Salatino & Prado, 1998).

### Principais aspectos da cutícula vegetal

Ao longo do processo evolutivo das embriófitas, diversas características surgiram e mantiveram-se permitindo cada vez mais que novos nichos fossem explorados e

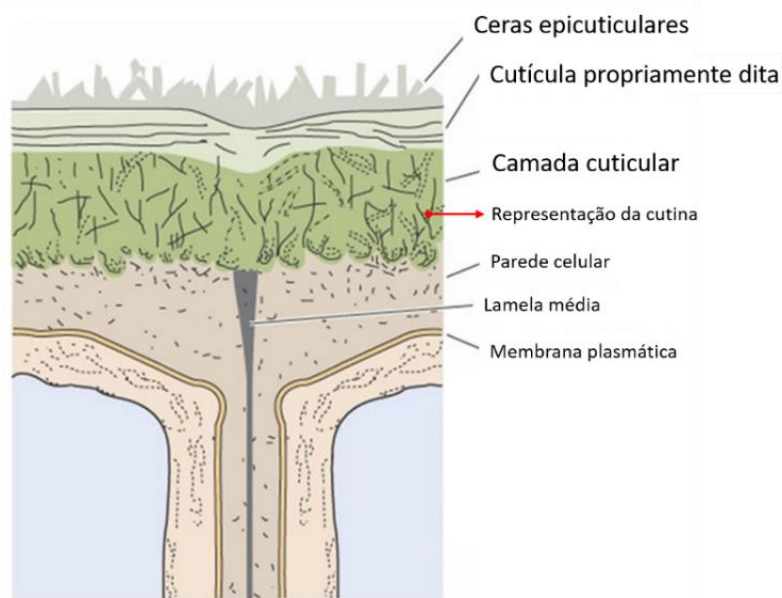
ocupados por esses indivíduos, superando as adversidades encontradas no ambiente terrestre (Weng & Chapple, 2010; Doyle, 2013; Yeats & Rose, 2013). Uma importante novidade evolutiva que surgiu e permitiu que estas primeiras plantas adquirissem maior independência da água e que foi necessária para o sucesso adaptativo no ambiente terrestre foi a cutícula vegetal (Bernard & Joubès, 2013).

A principal função atribuída à cutícula é restringir a perda de água por transpiração não estomática (cuticular). Além disso, a cutícula desempenha outros importantes papéis como: evitar a formação de filmes de água na superfície dos tecidos, dificultando a formação de colônias de microrganismos e acúmulo de partículas sobre a epiderme, atenuar a incidência de radiações excessivas, tais como a ultravioleta, nas células da epiderme e mediar interações de outros organismos, por exemplo insetos, com a planta (Riederer, 2006; Tafolla-Arellano et al., 2013).

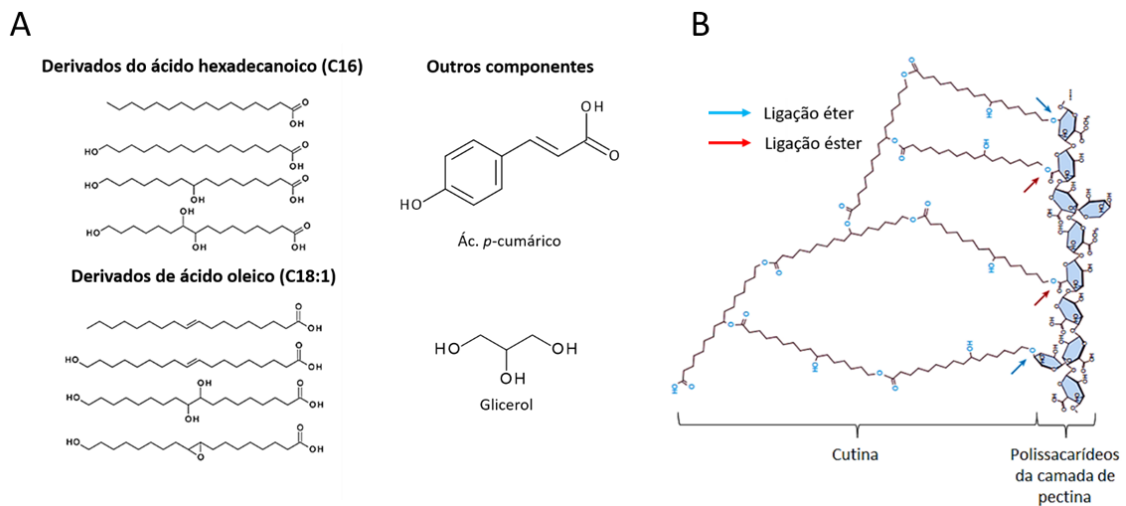
A cutícula é uma estrutura estratificada transluzente encontrada acima da epiderme de todos os órgãos aéreos vegetais que não apresentam desenvolvimento secundário, como as folhas, caules, flores e frutos (Jeffree, 2006). Ela é constituída principalmente por uma matriz de poliéster denominada de cutina e por uma variedade de substâncias lipossolúveis denominadas de ceras cuticulares (Kunst & Samuels, 2003; Jeffree, 2006). Histoquimicamente a cutícula se divide em três camadas (Figura 10): a primeira, mais interna à célula, é denominada de camada cuticular, composta por cera e cutina associadas a elementos da parede celular, como polissacarídeos; a camada intermediária chama-se cutícula propriamente dita e é composta por cutina permeada por ceras; a camada mais externa a célula é denominada de ceras epicuticulares, sendo composta apenas por ceras que podem apresentar diferentes morfologias e ornamentações (Juniper & Jeffree, 1983; Koch & Barthlott, 2009). As ceras encontradas nas camadas cuticular e cutícula propriamente dita são denominadas de ceras intracuticulares em contraste as ceras epicuticulares (Holloway & Jeffree, 2017).

O polímero da cutina é um poliéster formado principalmente por diferentes monômeros hidróxi e epóxi-hidroxilados derivados dos ácidos graxos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1 *cis*-9). Estes monômeros encontram-se esterificados entre si e também

com outras substâncias como o glicerol, ácido *p*-cumárico, álcoois primários, ácidos graxos e ácidos dicarboxílicos (Figura 11A; Beisson et al., 2012). A cutina da camada cuticular (mais interna) encontra-se fixada a parede celular através de ligações do tipo éster ou também do tipo éter aos polissacarídeos da parede celular (Figura 11B; Fich et al., 2016).



**Figura 10.** Representação didática dos diferentes estratos cuticulares (Taiz & Zeiger, 2009).



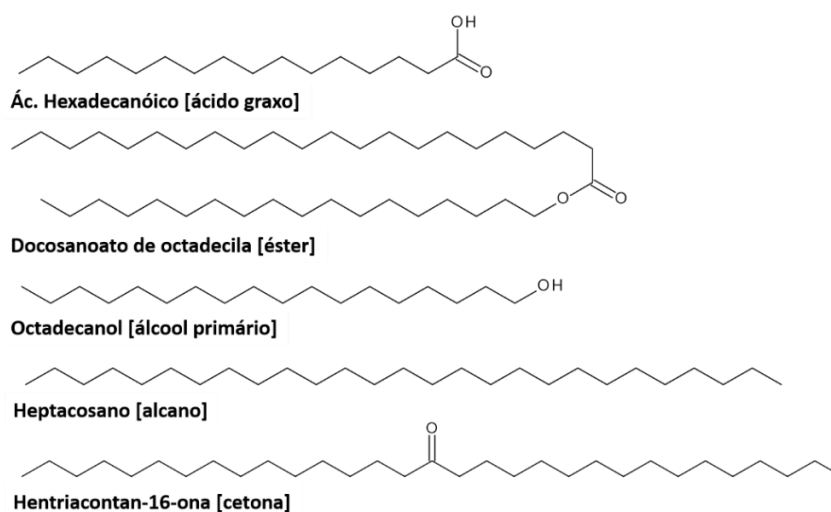
**Figura 11.** Principais monômeros que formam o polímero da cutina (A) e a representação hipotética de sua estrutura (Fich et al., 2016).

A principal função do polímero de cutina é criar uma espécie de fundação resistente e elástica que mantém a estrutura cuticular íntegra e resistente conferindo



não apenas resistência mecânica, mas também impedindo a má formação de determinados tecidos durante o desenvolvimento da planta (Domínguez et al., 2015). Ademais, a cutina pode atuar formando uma barreira química via a liberação de elicitores gerados pela degradação de sua estrutura através de sua digestão por enzimas liberadas por alguns fitopatógenos (Fich et al., 2016).

O termo cera refere-se a diferentes classes de substâncias lipofílicas de cadeia longa que podem ser subdivididas em dois grupos, substâncias de cadeia acíclica e cíclica. As substâncias de cadeia acíclica são geralmente os compostos majoritários das ceras e são formados por diferentes classes originadas através de precursores da via de síntese do acetato-malonato, como os ácidos graxos, alcanos, cetonas, álcoois primários e secundários, aldeídos e ésteres (Figura 12). Além disso, outras substâncias acíclicas podem estar presentes nas ceras, como alcenos, diálcoois e diácidos (Post-Beittenmiller, 1996; Griffiths et al., 2000; Kunst & Samuels, 2003 e 2009).



**Figura 12.** Exemplos de substâncias acíclicas das ceras de algumas classes majoritárias (adaptado de Kunst & Samuels, 2009).

Dentre as substâncias cíclicas das ceras, os terpenos são os mais comuns, por exemplo os triterpenos e esteroides (Figura 13A). Já outras classes, como por exemplo flavonoides e tocoferóis são mais raros e geralmente pouco abundantes nas ceras (Figura 13B). As substâncias cíclicas possuem origem biossintética através de diferentes vias do metabolismo especial das plantas (Post-Beittenmiller, 1996; Griffiths et al., 2000; Kunst & Samuels, 2003 e 2009).

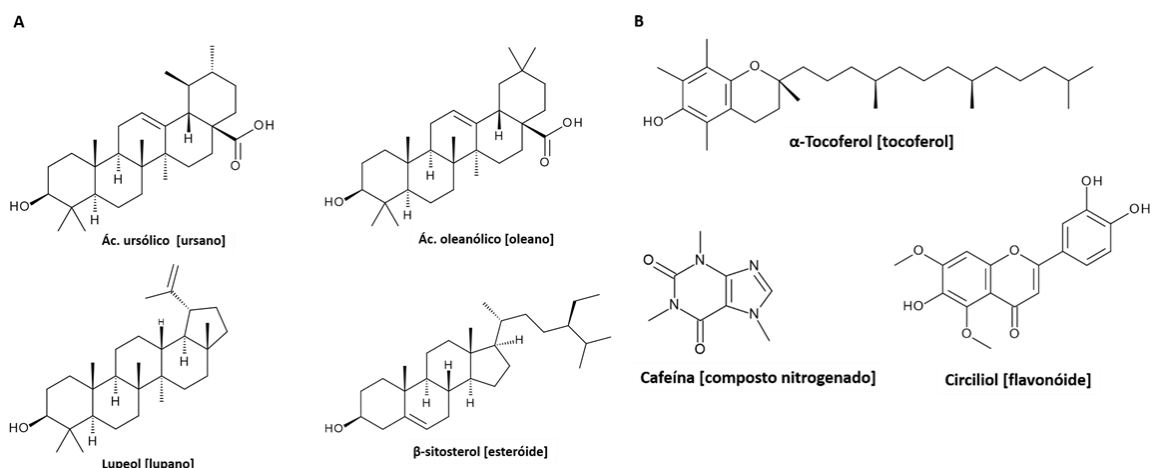
**Tabela 1.** Principais homólogos de ceras encontrados nas plantas (modificado de Barthlott et al., 2017).

<b>Compostos acíclicos</b>	
	<b>Tamanho da cadeia</b>
Alcanos	Ímpares C19-C37
Álcoois primários	Pares C12-C36
Ésteres	Pares C30-C60
Ácidos graxos livres	Pares C12-C36
Aldeídos	Pares C14-C34
Cetonas	Ímpares C25-C33
Álcoois secundários	Ímpares C21-C33
<b>Compostos cíclicos</b>	
Triterpenos	-
Fenólicos	-

Apesar de ser relatado na literatura que as ceras de modo geral apresentam composição química qualitativamente muito semelhante nas plantas, quantitativamente elas podem ser bastante variáveis entre as diferentes espécies, entre populações de uma mesma espécie provenientes de localidades distintas ou mesmo entre diferentes órgãos de um mesmo indivíduo (Buschhaus et al., 2007; Buschhaus & Jetter, 2011; Holloway & Jeffree, 2017). Além disso, foi visto que as ceras de plântulas de indivíduos férteis e não-férteis de algumas espécies de *Equisetum* apresentaram variação qualitativa e quantitativa de sua composição química (Brune & Haas, 2011). Tais variações podem ocorrer por fatores intrínsecos como a constituição genética ou por fatores extrínsecos como características ambientais tal como quantidade de incidência luminosa, taxa pluviométrica e umidade (Baker et al., 1975; Post-Beittenmiller, 1996; Bourdenx et al., 2011; Bernard & Joubès, 2013).

O principal papel das ceras para a cutícula é atuar como uma barreira dificultando a passagem de água por esta camada, uma vez que praticamente todos seus componentes são de natureza bastante hidrofóbica (Kerstiens, 1996; Yeats & Rose, 2013). Porém sua eficiência como barreira contra perda de água pode não ocorrer exclusivamente devido sua quantidade na superfície do tecido (Riederer & Schreiber, 2001). Foi verificado que determinadas classes de compostos são muito mais eficientes que outros nesta tarefa, sendo os alcanos os mais eficientes (Oliveira et al., 2003). Uma possível explicação para este fato reside na capacidade físico-química de determinados

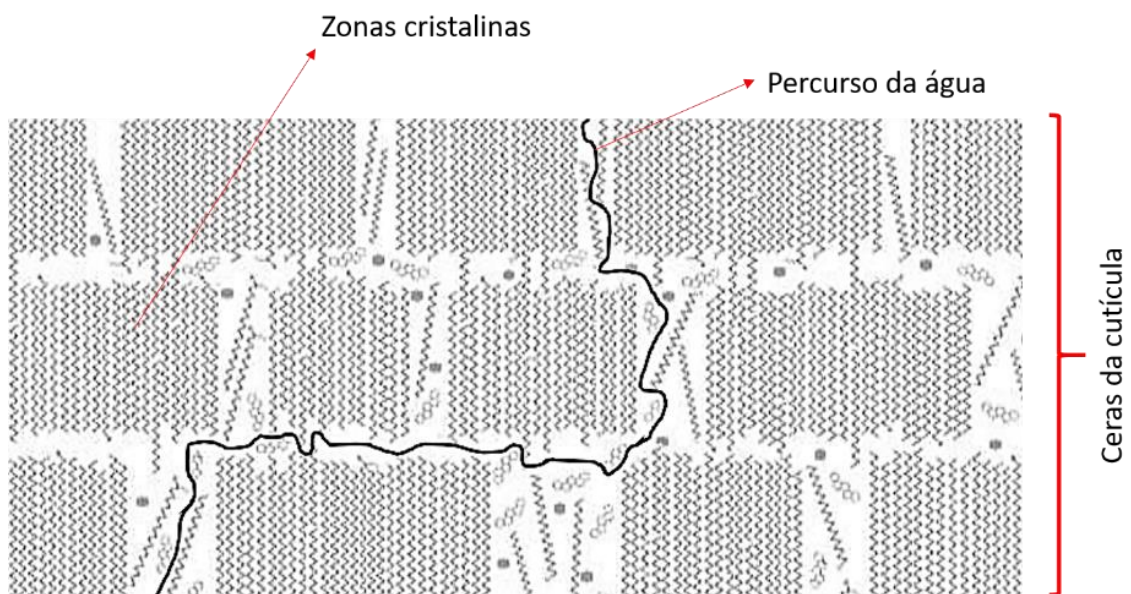
compostos serem capazes de aproximarem mais ou menos suas cadeias carbônicas uns com os outros dentro da cutícula, criando um emaranhado tridimensional (zonas cristalinas) que atuam barrando fisicamente a passagem das moléculas de água. Isso faz com que as moléculas de água necessitem realizar um longo caminho por entre a cutícula para conseguir atravessá-la (Figura 14; Kerstiens, 1996; Kerstiens, 2006; Barthlott et al., 2017).



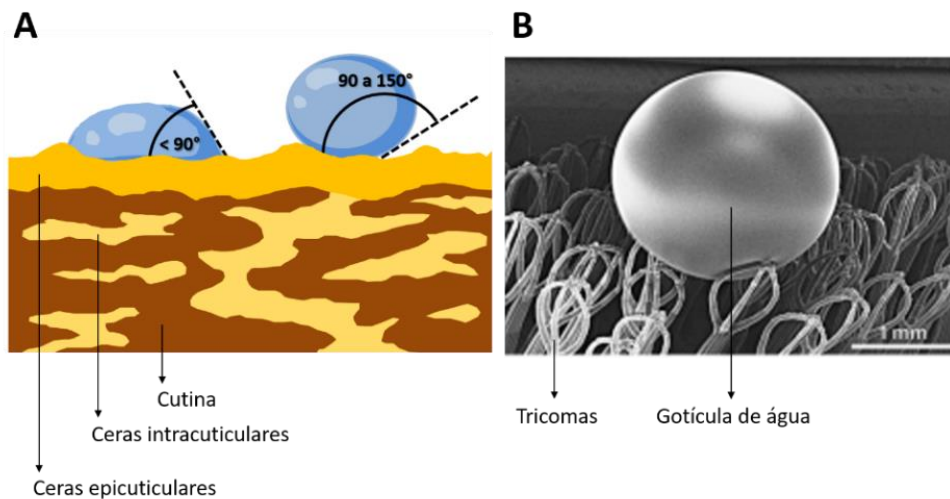
**Figura 13.** Diversidade de substâncias cíclicas das ceras. **A:** Principais tipos de terpenóides encontrados nas ceras (Jeffree, 2006). **B:** Exemplos de substâncias cíclicas de cadeias não terpênicas (Athayde et al., 2000; Alcerito et al., 2002; Jeffree, 2006).

As ceras também são as principais responsáveis pelos efeitos de interação da cutícula com o meio biótico, por exemplo nas interações planta-inseto para a escolha de oviposição ou deterrência durante a alimentação (Jeffree, 2006; Yeats & Rose, 2013). Elas apresentam um papel importante como elicitores para o disparo de uma resposta de defesa pela planta contra a infecção de bactérias e fungos (Walley et al., 2013). Ademais, elas também são muito importantes por dificultar a aderência de água na superfície da cutícula, reduzindo o acúmulo de poeira, esporos e microrganismos sobre o tecido. Tal efeito de limpeza é denominado de Efeito Lótus e ocorre quando a interação das gotículas de água com as ceras epicuticulares fazem com que forme um ângulo de 90° ou mais com a superfície do tecido (figura 15A; Koch & Barthlott, 2009). Em casos específicos como visto em algumas espécies de salvinias, o ângulo formado entre as gotículas de água com a superfície do tecido é bastante obtuso (maior que 150°) e sua superfície é conhecida como super-hidrofóbica. Neste caso, o efeito não ocorre

exclusivamente devido a presença de cristaloides de ceras epicuticulares, mas também à presença de tricomas especiais em forma de “guarda-chuva” que evitam com que a gotícula de água permaneça aderida a superfície do tecido (figura 15B; Koch & Barthlott, 2009; Barthlott et al., 2010). Este efeito de super-hidrofobicidade presente em diferentes espécies de salvinias (*Salvania cucullata*, *S. oblongifolia*, *S. mínima*, *S. biloba* e *S. molesta*) despertou muito a atenção dos pesquisadores, que buscam através de bioengenharia e biomimetismo recriar superfícies semelhantes para serem aplicadas desde a indústria de roupas a de tinturas (Koch & Barthlott, 2009).



**Figura 14.** Representação das ceras na cutícula formando as zonas cristalinas (com moléculas de alcanos) e o percurso necessário para as moléculas de água a atravessarem (adaptado de Huang, 2018).



**Figura 15.** Efeito Lótus. **A:** Interação físico-química das gotículas de água com as ceras epicuticulares (adaptado de Koch & Barthlott, 2009). **B:** Superfície super-hidrofóbica dos tricomas de *Salvinia molesta* (adaptado de Barthlott et al., 2010).

### **Biossíntese resumida dos principais componentes da cutícula**

Didaticamente o metabolismo vegetal é dividido em primário (Figura 16 [letras e quadros cinzas]) e secundário (Figura 16 [letras e quadros coloridos]). O metabolismo primário do carbono é responsável pela síntese de substâncias onipresentes nas plantas, como carboidratos, lipídios, proteínas e nucleotídeos e tem início a partir da fotossíntese (Figura 16 [letras verdes]). Já o chamado metabolismo secundário ou especial das plantas consiste basicamente em quatro principais vias que são derivadas do metabolismo primário, sendo elas a via do metileritritol fosfato (MEP), via do mevalonato, via do acetato-malonato e via do chiquimato. Em sua maioria as vias do metabolismo secundário são responsáveis pela síntese de substâncias relacionadas à defesa vegetal (Figura 16 [letra azul-claro]) e de modo geral, estas substâncias podem variar entre as plantas, com espécies que expressam mais ou menos determinadas vias (Heartmann, 2007; Taiz & Zeiger, 2009).

A biossíntese dos monômeros graxos da cutina e das substâncias alifáticas de cadeia longa acíclicas das ceras iniciam-se a partir do acetil ligado a coenzima A (ou acetil-CoA), um subproduto da glicólise. No plastídio de diferentes células, uma molécula de acetil-CoA é transformada em malonil-CoA e em seguida tem a coenzima A transferida para uma proteína carregadora do grupo acilo, formando o malonil-ACP.

Uma molécula de malonil-ACP (3 carbonos) reage com uma de acetil-CoA (2 carbonos), resultando em uma nova molécula e na perda de um dióxido de carbono. Esta molécula passará por uma redução seguida de uma desidratação e uma nova redução, mediadas pelo complexo enzimático *Fatty acid synthase II* (FAS II), e formará um cetoacil-ACP (4 carbonos), apresentando dois carbonos a mais que a molécula inicial de acetil-CoA. O cetoacil-ACP formado passará novamente pelo ciclo de reações do complexo enzimático FAS II (adição de malonil-ACP – redução – desidratação - redução) e mais dois carbonos serão adicionados. Este ciclo se repete até a formação de acils-graxos de até 16 a 18 carbonos (Figura 16 [vermelho]). Estes acils-graxos formados podem ser liberados na forma de ácidos graxos e poderão formar parte das ceras cuticulares, ou podem ser transportados para o retículo endoplasmático de células epiteliais (Shepherd & Wynne Griffiths, 2006; Haslam & Kunst, 2013; Ohlrogge et al., 2015).

No retículo endoplasmático das células epiteliais, responsáveis pela formação dos componentes da cutícula, estes acils-graxos podem seguir por dois caminhos distintos. Eles podem passar por diversas reações de hidroxilação e/ou epoxidação originando os monômeros graxos da cutina (Figura 16 [laranja]; Beisson et al., 2012). Ou estes acils-graxos poderão ser alongados de 2 em 2 carbonos novamente, por um complexo enzimático semelhante ao FAS II, denominado de *Fatty acid elongase* (FAE), formando os acils-graxos longos com 20 a 36 carbonos (Shepherd & Wynne Griffiths, 2006; Haslam & Kunst, 2013; Ohlrogge et al., 2015).

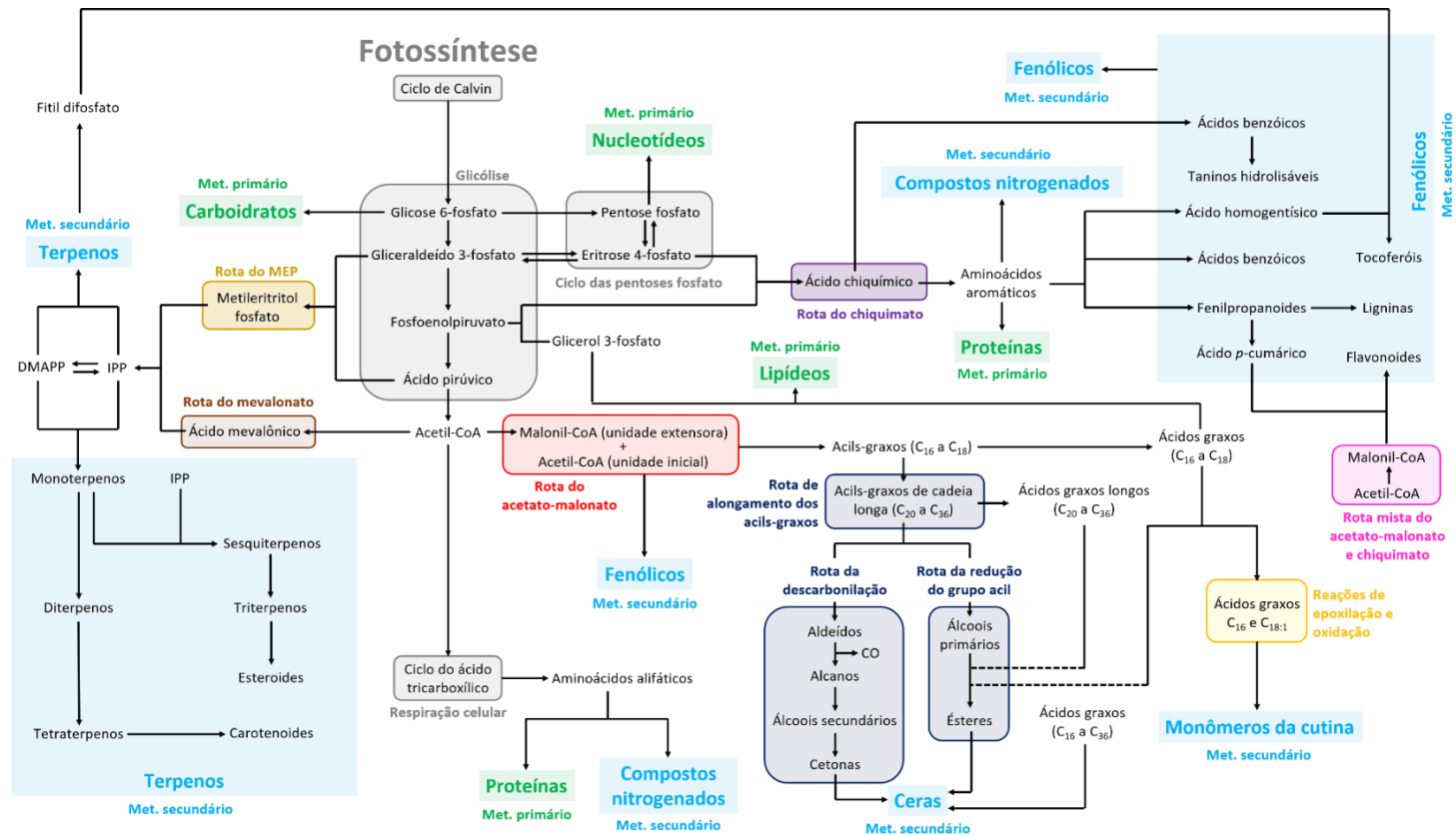
Os acils-graxos de cadeia longa podem ser liberados na forma de ácidos graxos livres de cadeia longa, que podem ser transportados para a cutícula e formar parte das ceras. Ou eles podem seguir pela Rota da redução do grupo acil ou Rota da descarbonilação formando as principais classes de compostos graxos alifáticos acíclicos das ceras (Figura 16 [rotas em azul-escuro]). Na Rota da redução do grupo acil são formados os álcoois primários e estes podem ser esterificados com ácidos graxos ou ácidos graxos de cadeia longa para a formação dos ésteres. Na Rota da descarbonilação são formados inicialmente os aldeídos e estes perdem um monóxido de carbono originando os alcanos, com um carbono a menos que o aldeído precursor. Vale ressaltar que as substâncias anteriores a formação dos alcanos apresentam cadeias carbônicas

que em geral são pares (devido ao processo biossintético da via do acetato-malonato e do alongamento dos acils-graxos) e a partir deles são originadas substâncias com cadeias carbônicas em geral ímpares. Os alcanos são hidroxilados formando os álcoois secundários e estes são reduzidos formando as cetonas (Kunst & Samuels, 2003 e 2009; Ohlrogge et al., 2015).

Os triterpenos e esteroides são formados a partir de unidades pentacarbonadas básicas denominadas de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), que podem ser sintetizados por duas possíveis vias de síntese, a Rota do mevalonato (citosólica) ou a Rota do Metileritritol fosfato (MEP; plastídica). A Rota do mevalonato (Figura 16 [marrom escuro]) tem como precursor três moléculas de acetil-CoA que são unidas e formam como substância intermediária uma molécula de ácido mevalônico. O ácido mevalônico em seguida sofre uma série de reações até formar moléculas IPP, que podem ser isomerizadas em DMAPP (Heldt & Heldt, 1997; Taiz & Zeiger, 2009; Dewick, 2009).

Já a Rota do MEP (Figura 16 [marrom claro]) tem como precursores o gliceraldeído 3-fosfato e o fosfoenolpiruvato, ambos subprodutos da via da glicólise, que são condensados e formam como produto intermediário o metileritritol fosfato (MEP). O MEP é convertido em IPP e este em DMAPP (Dewick, 2009).

A partir das unidades de IPP e DMAPP são formadas as cadeias terpênicas através da condensação cabeça-cauda para formação de cadeias maiores. A união de um IPP com um DMAPP forma uma molécula de geranyl difosfato (GPP), precursora dos monoterpenos (10 carbonos). Um GPP pode ser condensado a uma unidade de IPP para formar uma molécula de farnesil difosfato (FPP), que possui 15 carbonos e é precursor da maioria dos sesquiterpenos. Duas moléculas de FPP podem ser condensadas formando uma de squaleno, molécula precursora dos diferentes triterpenos (Dewick, 2009). Os esteroides são formados a partir dos triterpenos tetracíclicos lanosterol e cicloartenol. Os triterpenos e os esteroides apresentam estruturas muito semelhantes entre si, entretanto os esteroides não possuem três metilas em seu esqueleto básico (Dewick, 2009).



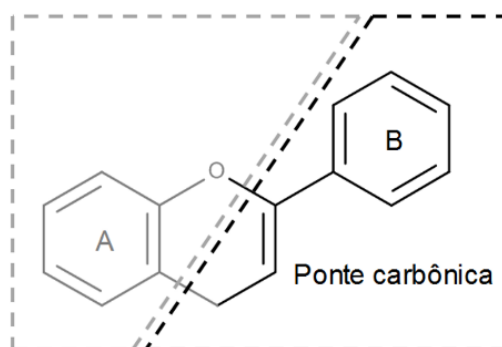
**Figura 16.** Principais rotas biossintéticas resumidas do metabolismo primário e secundário de plantas (adaptado de DellaPenna & Pogson, 2006; Dewick, 2009; Kunst & Samuels, 2009; Beisson et al., 2012; Haslam & Kunst, 2013; Kutchan et al., 2015; Moreira, 2015; Ohlrogge et al., 2015). As vias do metabolismo primário encontram-se destacadas em letras e quadros cinzas e os metabólitos primários destacados em verde. As vias do metabolismo secundário (ou especial) estão destacadas em letras e quadros coloridos (com exceção de verde e cinza) e os metabólitos secundários encontram-se destacados em azul-claro. **Met.:** metabólitos. **MEP:** Metileritritol fosfato. **C<sub>18:1</sub>:** Ácido octadecan-(Z)9-óico (ácido oleico). **Tracejado:** indica que ocorra uma ou outra reação de esterificação.



A formação do ácido *p*-cumárico, uma das principais substâncias cíclicas presente no polímero da cutina e também como componente das ceras de determinadas espécies ocorre através da Rota do chiquimato (Figura 16 [roxo]). Esta via de síntese se inicia a partir do fosfoenolpiruvato (subproduto da glicólise) e da eritrose 4-fosfato (subproduto da via das pentoses fosfato). Estas duas moléculas são unidas e formam como molécula intermediária da via o ácido chiquímico. O ácido chiquímico é transformado em ácido prefênico e este é o precursor da L-fenilalanina e L-tirosina, dois aminoácidos aromáticos precursores de diversas substâncias fenólicas, dentre elas o ácido *p*-cumárico (Fich et al., 2016; Dewick, 2009).

A síntese de flavonoides e tocoferóis não é exclusiva de uma única via de síntese, ela ocorre parte por produtos da Rota do chiquimato e parte pela Rota do acetato-malonato no caso dos flavonoides e parte pela Rota do MEP e Rota do mevalonato no caso dos tocoferóis (Dewick, 2009).

No caso dos flavonoides, o ácido *p*-cumárico (Rota do chiquimato) é transformado em *p*-cumaroil-CoA e este é usado como unidade inicial no lugar de acetil-CoA pela Rota do acetato-malonato (Figura 16 [violeta]). O *p*-cumaroil-CoA é então estendido por 3 unidades de malonil-CoA e transformado inicialmente em chalconas, que são a base para síntese dos diferentes flavonoides. A porção de origem da via do chiquimato forma o anel B e a ponte carbônica da molécula básica dos flavonoides, enquanto que a porção do acetato-malonato forma o anel A (Figura 17; Dewick, 2009).



**Figura 17.** Esqueleto básico de flavonoides (adaptado de Kutchan et al., 2015).

Já os tocoferóis têm como precursor da via do chiquimato uma molécula de ácido 4-hidroxfarnesil-piruvico, que é sintetizado a partir do ácido prefênico. O ácido 4-hidroxfarnesil-piruvico é transformado em ácido homogentísico. Ao ácido 4-hidroxfarnesil-piruvico é condensado uma molécula de fitil difosfato, originada de um geranylgeranyl difosfato (GGPP; formada pela união de duas moléculas de GPP sintetizadas nas rotas de biossíntese de terpenos), dando origem a uma molécula de 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol (MPBQL). O MPBQL é o precursor dos diferentes tocoferóis (DellaPenna & Pogson, 2006; Dewick, 2009).

### **Análise das ceras cuticulares e suas adversidades**

As ceras, bem como outros lipídios, são comumente analisadas através de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) principalmente através de impacto eletrônico a 70 eV (Cardona et al., 2023; Zhao et al., 2023). A espectrometria de massas foi muito importante para o aumento no conhecimento sobre lipídios (Subramaniam, 2011) e um dos desafios limitantes para o estudo dos lipídios por CG-EM é a interpretação e identificação dos espectros de massas gerados.

Dentre as formas utilizadas para identificar os espectros de massas de ceras, a análise através de bibliotecas digitais, como por exemplo a NIST, é bastante aplicada. As bibliotecas digitais são ferramentas muito poderosas para a identificação de produtos naturais via CG-EM, porém para determinadas substâncias, como os homólogos acíclicos presentes nas ceras, ela pode não ser uma ferramenta muito eficiente. Isso se deve a semelhança que muitos dos espectros de massas desses lipídios apresentam entre si ao longo de uma série homóloga, associado ao fato de que para algumas classes, os fragmentos diagnósticos para determinação do homólogo possuem abundância relativa muito baixa em relação ao restante dos fragmentos, que são iguais entre todos os homólogos, levando a identificações errôneas pela biblioteca digital.

Uma nova ferramenta que pudesse ser utilizada para identificar os espectros de massas de ceras junto aos métodos tradicionais, que fosse barata e que contornasse as adversidades encontradas pelas bibliotecas digitais seria interessante para futuras pesquisas com as ceras cuticulares.

## Composição química das ceras cuticulares em Polypodiopsida

Foi realizado um levantamento a partir do banco de dados Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>) utilizando-se a combinação do termo *wax* associado aos termos *fern*, *Cyatheales*, *Equisetales*, *Gleicheniales*, *Hymenophyllales*, *Marratiales*, *Ophioglossales*, *Osmundales*, *Polypodiales*, *Psilotales*, *Salvinales*, *Schizaeales* e *Pteridophyta*.

Ao todo foram encontrados 16 trabalhos que estudaram quimicamente as ceras em polipodiófitas, seja analisando todos seus componentes ou apenas uma de suas frações. Das 11 ordens descritas de polipodiófitas atuais, foram encontrados estudos em pouquíssimas espécies de oito destas ordens, sendo elas **Cyatheales** (Bottari et al., 1972; Franich et al., 1985; Tanaka et al., 1992; Bush & McInerney, 2013), **Equisetales** (Brune & Haas, 2011; Yang et al., 2011), **Ophioglossales** (Bottari et al., 1972), **Osmundales** (Jetter & Riederer, 1999; Jetter & Riederer, 2000; Bush & McInerney, 2013), **Polypodiales** (Bottari et al., 1972; Siems et al., 1996; Bush & McInerney, 2013; Manubolu et al., 2013; Guo et al., 2018; Cerón-Carpio et al., 2019), **Salvinales** (Bottari et al., 1972; Barthlott et al., 1994; Cerman et al., 2009; Barthlott et al., 2010; Tricinci et al., 2015), **Schizaeales** (Bottari et al., 1972) e **Marattiales** (Cerón-Carpio et al., 2019).

De acordo com o levantamento realizado, a classe dos ácidos graxos está muito presente nas ceras das polipodiófitas, principalmente em Equisetales (Brune & Haas, 2011) e em espécies tropicais mexicanas de Polypodiales, com teores que chegam a 95,2% das ceras totais em *Lomariopsis recurvata* Fée (Cerón-Carpio et al., 2019), com homólogos variando de 9 carbonos (ácido nonanoico) até 32 carbonos (ácido dotriacontanoico). Os ésteres foram encontrados muito abundantes nas ceras de espécies de Polypodiales temperadas, chegando a 87,6% em *Cryptogramma crispera* (L.) R.Br. ex Hook. (Guo et al., 2018). Em *Cyathea dealbata* (G.Forst.) Sw., espécie endêmica da Nova Zelândia, diversos homólogos de ésteres, principalmente com 46, 48 e 50 carbonos (Franich et al., 1985). A classe das cetonas foi encontrada em abundâncias maiores que 27,0% nas ceras de *Osmunda regalis* L. (Osmundales; Jetter & Riederer, 2000) e em *Gymnocarpium dryopteris* (L.) Newman (Polypodiales; Guo et al., 2018), com

homólogos variando de 18 a 33 carbonos. Já os alcanos, aldeídos e álcoois primários foram encontrados em maior abundância em Equisetales (Brune & Haas, 2011). Nas ceras foliares de espécies tropicais mexicanas foram identificados três compostos fenólicos, caracterizados por apresentar esqueletos curtos com no máximo 9 carbonos (como o ácido cinâmico), ocorrendo em porcentagens relativas menores que 5,0%, com exceção de *Danaea nodosa* (L.) Sm. (Marattiales) que apresentou 23,5% de fenólicos em sua cera (Cerón-Carpio et al., 2019). Em *Lophosoria quadripinnata* (J.F.Gmel.) C.Ch. foram identificados diferentes triterpenos pertencentes a classe dos hopanos (Tanaka et al., 1992), que apresentam um esqueleto pentacíclico saturado e de modo geral são raros nas plantas, sendo mais comuns em microrganismos (Elvert et al., 2001). Além disso, nas ceras foliares de *O. regalis* foram identificados homólogos pertencentes a classes bastante distintas das demais polipodiófitas, como dicetonas, ceto-aldeídos, ceto-álcoois e ceto-ésteres (Jetter & Riederer, 1999 e 2000). Outras classes com menor relevância também foram identificadas nas ceras das polipodiófitas como álcoois secundários, esteroides, dióis, tocoferol e sesquiterpenos (Siems et al., 1996; Jetter & Riederer, 1999 e 2000; Manubolu et al., 2013).

Essas classes encontradas nas ceras das samambaias e cavalinhas são muito semelhantes qualitativamente em relação ao descrito na literatura para linhagens de angiospermas (Post-Beittenmiller, 1996; Barthlott et al., 2017). Além disso, muitas destas classes também já foram descritas para as briófitas *sensu lato* (Haas, 1982; Xu et al., 2009; Busta et al., 2016a e b). Tais dados apontam que as polipodiófitas apresentam o maquinário biossintético das vias de redução do grupo acil e descarbonilação, já bem descritas nas angiospermas (Kunst & Samuels, 2003 e 2009).

Um aspecto bastante interessante observado a partir desse levantamento, é que Polypodiales, que contém 8714 espécies teve praticamente a mesma quantidade de estudos que Salviniiales, que contém apenas 82 espécies (PPG I, 2016). A princípio esses números não condizem com a diversidade relacionada a cada grupo, porém como descrito nos tópicos anteriores, há um grande interesse na superfície das folhas de várias espécies de salvinias devido suas características super-hidrofóbicas e sua aplicação em biomateriais e bioengenharia.

Em vista das adversidades encontradas na análise das ceras, da lacuna de estudos sobre esses compostos em um grupo tão importante evolutivamente e de grande diversidade no Brasil, essa pesquisa foi planejada. Seu maior foco é contribuir para o avanço da análise e conhecimento sobre a química e evolução das ceras cuticulares a partir da compreensão dessas substâncias no grupo das polipodiófitas, que é pouco estudado e apresenta grande diversidade no Brasil.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Desenvolver um software que auxilie na análise química das ceras cuticulares através de espectrometria de massas acoplada a cromatografia a gás a partir de representantes nativos dos principais grupos de Polypodiopsida, além de verificar semelhanças e/ou diferenças em relação ao descrito para outras espécies neste grupo, visando contribuir para o entendimento da importância evolutiva desta estrutura presente nas plantas há milhões de anos.

### **Objetivos específicos**

1. Desenvolver um software para auxiliar no estudo e análises das ceras através da espectrometria de massas acoplada a cromatografia a gás.
2. Analisar a composição química e quantificar as ceras epi e intracuticulares provenientes de frondes férteis e estéreis em um representante de samambaia.
3. Analisar a composição química e quantificar as ceras cuticulares de diferentes espécies das diferentes ordens de polipodiófitas.
4. Contribuir para o entendimento da importância evolutiva das ceras cuticulares nas plantas a partir da análise de diferentes espécies de polipodiófitas.

## REFERÊNCIAS

- Alcerito, T., Barbo, F. E., Negri, G., Santos, D. Y., Meda, C. I., Young, M. C. M., ... & Blatt, C. T. (2002). Foliar epicuticular wax of *Arabidopsis thaliana*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(7), 677-683.
- Athayde, M. L., Coelho, G. C., & Schenkel, E. P. (2000). Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry*, 55(7), 853-857.
- Baker, E. A., Procopiou, J., & Hunt, G. M. (1975). The cuticles of *Citrus* species. Composition of leaf and fruit waxes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(8), 1093-1101.
- Barthlott, W. (1994). Epicuticular wax ultrastructure and systematics. In: H. D. Behnke & T. Mabry (Eds.), *Caryophyllales: Evolution and systematics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Barthlott, W., Mail, M., Bhushan, B., & Koch, K. (2017). Plant surfaces: structures and functions for biomimetic innovations. *Nano-Micro Letters*, 9, 1-40.
- Barthlott, W., Schimmel, T., Wiersch, S., Koch, K., Brede, M., Barczewski, M., ... & Bohn, H. F. (2010). The *Salvinia* paradox: superhydrophobic surfaces with hydrophilic pins for air retention under water. *Advanced Materials*, 22(21), 2325-2328.
- Bernard, A., & Joubès, J. (2013). *Arabidopsis* cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 110-129.
- Becker, R. T., Marshall, J. E. A., Da Silva, A. C., Agterberg, F. P., Gradstein, F. M., & Ogg, J. G. (2020). The Devonian Period. In: *Geologic time scale 2020*. Elsevier.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., & Pollard, M. (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 329-337.
- Bottari, F., Marsili, A., Morelli, I., & Pacchiani, M. (1972). Aliphatic and triterpenoid hydrocarbons from ferns. *Phytochemistry*, 11(8), 2519-2523.
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., ... & Joubès, J. (2011). Overexpression of *Arabidopsis* ECERIFERUM1 promotes wax very-long-

chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant physiology*, 156(1), 29-45.

Brune, T., & Haas, K. (2011). Equisetum species show uniform epicuticular wax structures but diverse composition patterns. *AoB Plants*, 2011, plr009.

Buschhaus, C., Herz, H., & Jetter, R. (2007). Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Annals of Botany*, 100(7), 1557-1564.

Buschhaus, C., & Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces?. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 841-853.

Bush, R. T., & McInerney, F. A. (2013). Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 117, 161-179.

Busta, L., Budke, J. M., & Jetter, R. (2016). Identification of  $\beta$ -hydroxy fatty acid esters and primary, secondary-alkanediol esters in cuticular waxes of the moss *Funaria hygrometrica*. *Phytochemistry*, 121, 38-49.

Busta, L., Budke, J. M., & Jetter, R. (2016). The moss *Funaria hygrometrica* has cuticular wax similar to vascular plants, with distinct composition on leafy gametophyte, calyptra and sporophyte capsule surfaces. *Annals of Botany*, 118(3), 511-522.

Cardona, J. B., Grover, S., Busta, L., Sattler, S. E., & Louis, J. (2023). Sorghum cuticular waxes influence host plant selection by aphids. *Planta*, 257(1), 22.

Cerman, Z., Striffler, B. F., & Barthlott, W. (2009). Dry in the water: the superhydrophobic water fern *Salvinia*—a model for biomimetic surfaces. *Functional Surfaces in Biology: Little Structures with Big Effects*, 1, 97-111.

Cerón-Carpio, A. B., Pérez-García, B., Villanueva, J. L. M., Kiel-Martínez, A. L., Espinosa-Matias, S., Guerrero-Analco, J. A., & Mehlreter, K. (2019). Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*, 85, 13-20.

- Cole, T. C., Hilger, H. H., & Goffinet, B. (2019a). Bryophyte phylogeny poster (BPP). PeerJ Preprints.
- Cole, T. C., Bachelier, J. B., & Hilger, H. H. (2019b). Tracheophyte Phylogeny Poster (TPP). PeerJ Preprints.
- DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 711-738.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic Approach (Third)*. John Wiley & Sons Ltd.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J. A., & Heredia, A. (2015). Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends in plant science*, *20*(9), 551-558.
- Doyle, J. A. (2013). Phylogenetic analyses and morphological innovations in land plants. In: B. A. Ambrose & M. Purugganan (Eds.), *Annual plant reviews, volume 45: The evolution of plant form*. Blackwell Publishing Ltd.
- Edwards, D. S. (1986). *Aglaophyton major*, a non-vascular land-plant from the Devonian Rhynie Chert. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *93*(2), 173-204.
- Elvert, M., Whiticar, M. J., & Suess, E. (2001). Diploptene in varved sediments of Saanich Inlet: Indicator of increasing bacterial activity under anaerobic conditions during the Holocene. *Marine Geology*, *174*(1-4), 371-383.
- Fich, E. A., Segerson, N. A., & Rose, J. K. (2016). The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual Review of Plant Biology*, *67*, 207-233.
- Flora do Brasil 2020 em construção. In: Samambaias e Licófitas. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB128483>>. Acessado em: 24 Ago. 2018.
- Franich, R. A., Goodin, S. J., & Hansen, E. (1985). Wax esters of the New Zealand silver fern, *Cyathea dealbata*. *Phytochemistry*, *24*(5), 1093-1095.
- Goldman, D., Sadler, P. M., Leslie, S. A., Melchin, M. J., Agterberg, F. P., & Gradstein, F. M. (2020). The Ordovician Period. In: *Geologic time scale 2020*. Elsevier.



- Griffiths, D. W., Robertson, G. W., Shepherd, T., Birch, A. N. E., Gordon, S. C., & Woodford, J. A. T. (2000). A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. *Phytochemistry*, 55(2), 111–116.
- Guo, Y., Li, J. J., Busta, L., & Jetter, R. (2018). Coverage and composition of cuticular waxes on the fronds of the temperate ferns *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crispa*, *Polypodium glycyrrhiza*, *Polystichum munitum* and *Gymnocarpium dryopteris*. *Annals of Botany*, 122(4), 555-568.
- Haas, K. (1982). Surface wax of *Andraea* and *Pogonatum* species. *Phytochemistry*, 21(3), 657-659.
- Haslam, T. M., & Kunst, L. (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant science*, 210, 93-107.
- Heartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22), 2831-2846.
- Heldt, H. W., & Heldt, F. (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 522p.
- Ho, R., Teai, T., Bianchini, J. P., Lafont, R., & Raharivelomanana, P. (2010). Ferns: From traditional uses to pharmaceutical development, chemical identification of active principles. In: *Working with ferns: issues and applications*. Springer New York.
- Holloway, P. J. & Jeffree, C. E. (2017). Epicuticular waxes. In: B. Thomas, D. J. Murphy & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of applied plant sciences, second edition, vol. 2*. Academic Press.
- Huang, H. (2018). *Comparative investigation of the chemical composition and the water permeability of fruit and leaf cuticles* (Tese de Doutorado, Universidade de Würzburg).
- Jeffree, C. E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. In: M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Annual Plant Reviews, volume 23: Biology of the plant cuticle*. Blackwell publishing Ltd.

- Jetter, R., & Riederer, M. (2000). Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 399-412.
- Jetter, R., & Riederer, M. (1999). Long-chain alkanediols, ketoaldehydes, ketoalcohols and ketoalkyl esters in the cuticular waxes of *Osmunda regalis* fronds. *Phytochemistry*, 52(5), 907-915.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (2008). *Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético (Terceira)*. ARTMED Editora AS.
- Juniper B. E. & Jeffree, C. E. (1983). *Plant surfaces*. Butler & Tanner Ltd.
- Kerstiens, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany*, 47(12), 1813-1832.
- Kerstiens, G. (2006). Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 2493-2499.
- Koch, K., & Barthlott, W. (2009). Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1893), 1487-1509.
- Kunst, L., & Samuels, A. L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, 42(1), 51-80.
- Kunst, L., & Samuels, L. (2009). Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 721-727.
- Kutchan, T. M., Gershenzon, J., Moller, B. L. M., & Gang, D. R. (2015). Natural products. In: B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants*. John Wiley & Sons Ltd.
- Lange, B. M. (2015). The evolution of plant secretory structures and emergence of terpenoid chemical diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 139-159.
- Lee, P. H., Huang, Y. M., & Chiou, W. L. (2018). Fern phenology. In: *Current advances in fern research*. Springer Cham.

- Lee, P. H., Lin, T. T., & Chiou, W. L. (2008). Phenology of 16 species of ferns in a subtropical forest of northeastern Taiwan. *Journal of Plant Research*, *122*, 61-67.
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *31*(1), 1-46.
- Manubolu, M., Goodla, L., Chandar, B. G. N., Ravilla, S., & Obulum, V. R. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of wax from *Actiniopteris radiata* (Sw.) Link. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *16*(3), 387-392.
- Matsunaga, K. K., & Tomescu, A. M. (2016). Root evolution at the base of the lycophyte clade: insights from an Early Devonian lycophyte. *Annals of Botany*, *117*(4), 585-598.
- Melchin, M. J., Sadler, P. M., & Cramer, B. D. (2020). The Silurian period. In: *Geologic time scale 2020*. Elsevier.
- Moran, R. C. (2019). *American Genera of Ferns and Lycophytes: A Guide for Students*. New York Botanical Garden.
- Moreira, F. A. (2015). *Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre Tapirira guianensis Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por Phoradendron crassifolium (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Ohlrogge, J., Browse, J., Jaworski, J., & Somerville, C. (2015). Lipids. In: B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants*. John Wiley & Sons Ltd.
- Oliveira, A. F., Meirelles, S. T., & Salatino, A. (2003). Epicuticular waxes from Caatinga and Cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *75*, 431-439.
- Post-Beittenmiller, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *47*(1), 405-430.

- PPG I. (2016). Vários organizadores. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(6), 563-603.
- Prado, J. (1998). Pteridófitas do estado de São Paulo. In: C. E. M. Bicudo & G. J. Shepherd (Eds.), *Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 2: fungos macroscópicos e plantas*. FAPESP.
- Prado, J., Sylvestre, L. D. S., Labiak, P. H., Windisch, P. G., Salino, A., Barros, I. C., ... & Matos, F. B. (2015). Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. *Rodriguésia*, 66, 1073-1083.
- Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Wolf, P. G., Schneider, H., Smith, A. R., & Cranfill, R. (2004). Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany*, 91(10), 1582-1598.
- Riederer, M. (2006). Introduction: biology of the plant cuticle. In: M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Annual plant reviews, volume 23: Biology of the plant cuticle*. Blackwell publishing Ltd.
- Riederer, M., & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of experimental botany*, 52(363), 2023-2032.
- Salatino, M. L. F., & Prado, J. (1998). Flavonoid glycosides of Pteridaceae from Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26(7), 761-769.
- Schneider, H., Pryer, K. M., Cranfill, R., Smith, A. R., & Wolf, P. G. (2002). Evolution of vascular plant body plans: a phylogenetic perspective. *Developmental Genetics and Plant Evolution*, 330-364.
- Schneider, H., Schuettpelz, E., Pryer, K. M., Cranfill, R., Magallón, S., & Lupia, R. (2004). Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature*, 428(6982), 553-557.
- Schuettpelz, E. & Pryer K. M. (2008). Fern phylogeny. In: T. A. Ranker & C. H. Haufler (Eds.), *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press.
- Shepherd, T., & Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3), 469-499.

- Siems, K., Weigt, F., & Wollenweber, E. (1996). Drimanes from the epicuticular wax of the fern *Nephrolepis biserrata*. *Phytochemistry*, 41(4), 1119-1121.
- Simpson, M. G. (2010). *Plant Systematics (Second)*. Academic press.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz E., Korall, P., Schneider H. & Wolf, P. G. (2008). Fern classification. In: T. A. Ranker & C. H. Haufler (Eds.), *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*, 55(3), 705-731.
- Sridhar, K. R. (2023). On the Bioactive Potential of Ferns: An Overview. *Bioactive Compounds in Bryophytes and Pteridophytes*, 1-29.
- Subramaniam, S., Fahy, E., Gupta, S., Sud, M., Byrnes, R. W., Cotter, D., ... & Maurya, M. R. (2011). Bioinformatics and systems biology of the lipidome. *Chemical Reviews*, 111(10), 6452-6490.
- Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L., & Báez-Sañudo, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 3-12.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: *Fisiologia vegetal (Quarta)*. ARTMED Editora AS.
- Tanaka, N., Wada, H., Dietz, V., & Wollenweber, E. (1992). Leaf surface terpenoids of the tree fern *Lophosoria quadripinnata*. *Phytochemistry*, 31(1), 347-349.
- Tricinci, O., Terencio, T., Mazzolai, B., Pugno, N. M., Greco, F., & Mattoli, V. (2015). 3D micropatterned surface inspired by *Salvinia molesta* via direct laser lithography. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(46), 25560-25567.
- Vetter, J. (2018). Secondary metabolites of ferns. In: *Current advances in fern research*. Springer Cham.
- Walley, J. W., Kliebenstein, D. J., Bostock, R. M., & Dehesh, K. (2013). Fatty acids and early detection of pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 520-526.

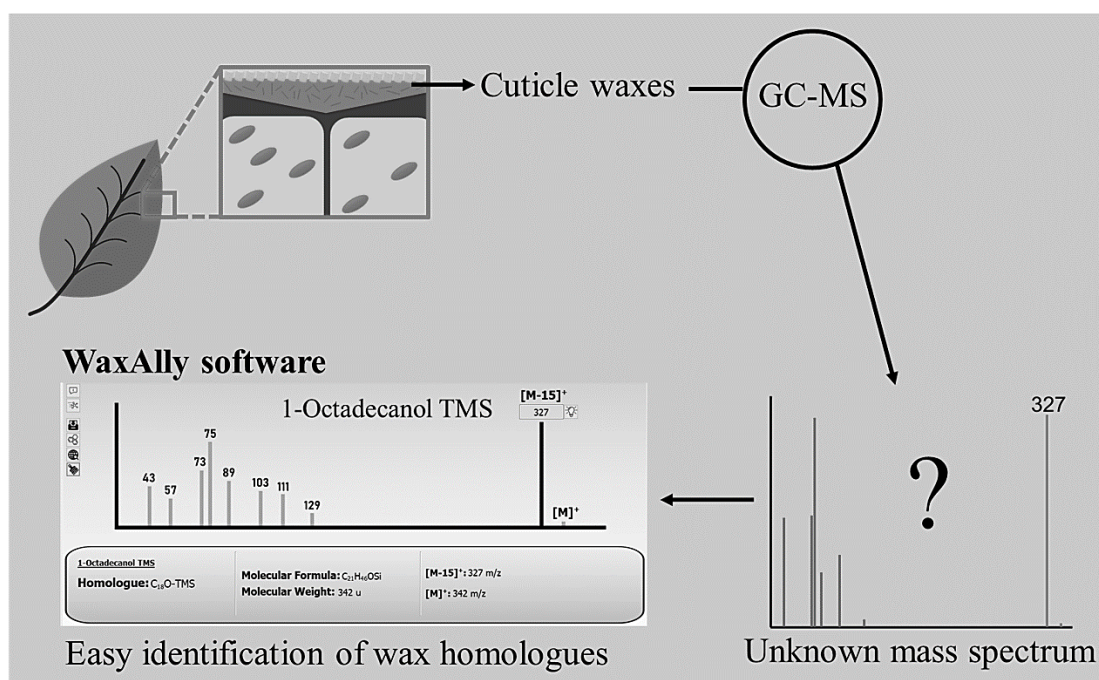
- Weng, J. K., & Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187(2), 273-285.
- Wollenweber, E., Scheele, C., & Tryon, A. F. (1987). Flavonoids and spores of *Platyzoma microphyllum*, an endemic fern of Australia. *American Fern Journal*, 77(1), 28-32.
- Wollenweber, E., & Schneider, H. (2000). Lipophilic exudates of Pteridaceae – Chemistry and chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(8), 751-777.
- Xu, S. J., Jiang, P. A., Wang, Z. W., & Wang, Y. (2009). Crystal structures and chemical composition of leaf surface wax depositions on the desert moss *Syntrichia caninervis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(6), 723-730.
- Yang, H., Liu, W., Leng, Q., Hren, M. T., & Pagani, M. (2011). Variation in n-alkane  $\delta D$  values from terrestrial plants at high latitude: Implications for paleoclimate reconstruction. *Organic Geochemistry*, 42(3), 283-288.
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*, 163(1), 5-20.
- Zhao, Z., Zhao, J., Peng, C., Duan, X., Deng, M., & Wen, J. (2023). Comparative analysis of petal epidermal wax composition and loss-water resistance in five cut lily cultivars (*Lilium* spp). *Scientia Horticulturae*, 311, 111805.

# CAPÍTULO 1

## WaxAly: New software to identify acyclic lipids from gas chromatography coupled to mass spectrometry

Capítulo formatado para submissão no periódico *Química Nova* (IF = 0,961).

Este capítulo não teve participação de colaboradores.



## RESUMO

A cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) tem sido amplamente utilizada e, juntamente com outras metodologias, como a derivatização, é uma ferramenta poderosa para analisar compostos e metabólitos, incluindo os componentes das ceras cuticulares. Os desafios envolvidos na identificação e interpretação dos espectros de massas obtidos por CG-EM desses lipídios limitam o estudo desses compostos. Assim, como uma nova alternativa complementar aos métodos tradicionais de identificação de lipídios alifáticos acíclicos baseados em espectros de massa, foi criado o novo software WaxAlly construído envolto de algoritmos simples. O software permite o reconhecimento rápido de oito classes de lipídios alifáticos acíclicos, incluindo alcanos, alcenos, aldeídos, cetonas, ésteres e derivados TMS de ácidos graxos livres, álcoois primários e secundários e seus homólogos com cadeias de carbono variando entre 10 e 100 carbonos. Além disso, o software WaxAlly fornece uma seção de organização de dados, comparação na Internet com os bancos de dados da NIST e do PubChem e informações acadêmicas sobre a fragmentação dos lipídios acíclicos. Além do software ter se mostrado uma técnica complementar muito útil na identificação de homólogos de lipídios de cera vegetal, novos padrões de fragmentação de classes de lipídios podem ser adicionados no futuro para aprimorar o programa.

**Palavras-chave:** Bibliotecas digitais de padrões, ceras cuticulares, compostos derivatizados, ésteres, ácidos graxos, espectrometria de massa.



## ABSTRACT

Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) has been widely used and along with other methodologies, such as derivatization, is a powerful tool to analyze compounds and metabolites, including cuticular wax components. The challenges involved in identifying and interpreting the GC-MS mass spectra of these lipids limit the study of these compounds. Thus, as a new complementary alternative to the traditional methods of identifying aliphatic acyclic lipids based on mass spectra, the new software WaxAlly was created grounded on simple algorithms. The software enables rapidly recognition of eight aliphatic acyclic lipid classes, including, alkanes, alkenes, aldehydes, ketones, esters, and TMS derivatives of free fatty acids, primary and secondary alcohols, and its homologues with carbon chains varying between 10 and 100 carbons. In addition, WaxAlly software provides a data organization section, internet comparison to NIST and PubChem databases, and academic information about mass fragmentation of the acyclic lipids. Besides the software has proved to be very useful complementary technique in identifying plant wax lipid homologues, new fragmentation pattern of lipid classes can be added in the future to improve the program.

**Keywords:** Cuticular waxes, derivatized compounds, digital libraries of standards, esters, fatty acids, mass spectrometry.

## INTRODUCTION

Lipids are organic compounds characterized by their hydrophobic nature, often soluble in non-polar organic solvents. Examples of lipids are fatty acids, steroids, and waxes. These compounds are important in maintaining life being, for example, elementary constituents of lipoprotein membranes,<sup>1</sup> source of energy,<sup>2</sup> chemical signalers via peroxidation<sup>3</sup> and a crucial part of hydrophobic coatings of plant surfaces.<sup>4</sup> Moreover, knowledge of lipids extends to archeology<sup>5</sup> and health.<sup>6</sup>

The coating lipids covering the plant surfaces are known as cuticular waxes and stand out primarily for their importance as a barrier that limits water loss in aerial tissues with no secondary thickening, such as flowers, leaves, stems and fruits.<sup>7</sup> Waxes exhibit a wide diversity of lipid classes, mostly alkanes, primary and secondary alcohols, aldehydes, ketones and, esters, predominantly acyclic and aliphatic, often unbranched and long-chained, usually with sizes of 16 to 36 carbons, reaching up to 60 carbons in esters, presented in homologous series.<sup>8</sup>

Waxes, as well as other lipids, are traditionally analyzed through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).<sup>9,10</sup> The electron impact ionization (EII) technique at 70 eV is the most used technique alongside GC-MS, thereby enabling the separation of complex mixtures associated with a powerful technique to identify compounds.<sup>11</sup> The effectiveness of MS improves when combined with other methodologies, such as derivatization, allowing the change of the analyte properties increasing molecular thermal and catalytic stability in addition to reducing its volatilization point.<sup>12</sup>

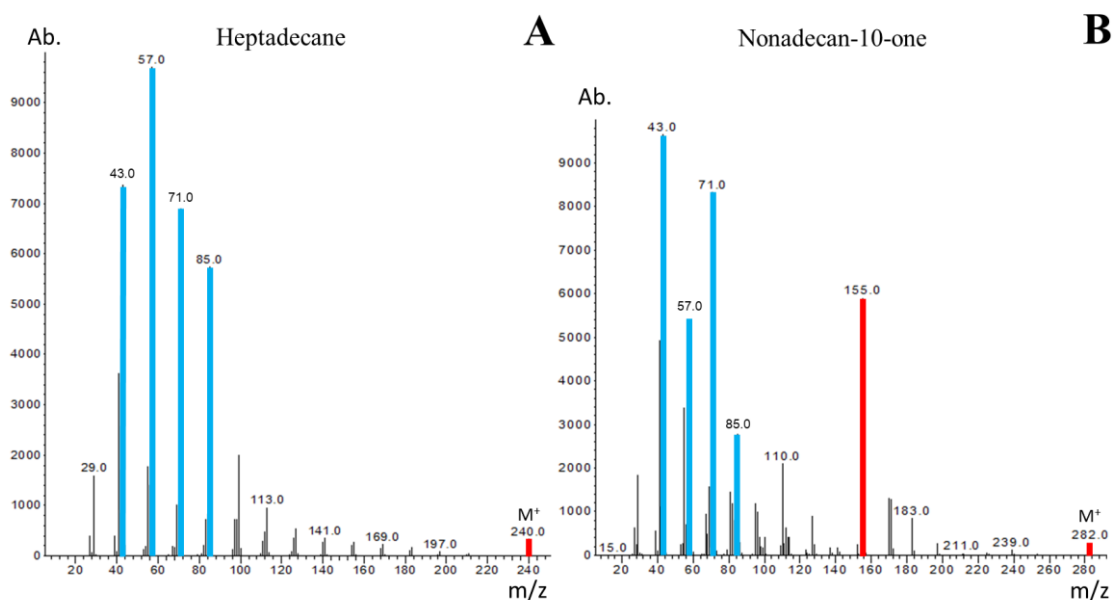
Although mass spectrometry (MS) was one of the main drivers of increased lipid knowledge,<sup>13</sup> interpreting the mass spectra and identifying the compound is a big challenge hindering lipid study. Among the best-known ways to identify surface lipids using GC-MS are (I) the comparison of the mass spectra and retention times obtained with those of the standards injected in the same methodology, (II) the application of the theoretical knowledge of fragmentation patterns specific to each lipid class, and (III) the use of virtual libraries (i.e. NIST). Even though identification by comparing with standards is quite robust, a broad diversity of standards is required, which might prove

challenging to attain and quite expansive. Interpreting fragmentation patterns using theoretical knowledge enables the suggestion of different compounds, but requires skill on mass spectrometry, which may be time consuming for inexperienced researchers or studies with large number of samples. Virtual libraries, on the other hand, can quickly and reliably identify many compounds based on spectra, primarily at the class level. However, for compounds whose diagnostic fragments are not significant or multiple and constant for the class, homologue identification may be compromised, furthermore the trimethylsilyl derivatives database are quite limited. Therefore, to increase the efficacy of lipid sample identification using mass spectra, these strategies should be combined.

Considering saturated acyclic lipids, characteristic of waxes, two sets of MS fragments are essential for their identification. One set is responsible for the recognition of the lipid class (alkanes, ketones and others), while the other set is needed for the homologue identification. The fragments related to organic function (diagnostic class ions or fragments – DCF) are repetitive and identical for most the homologous series, thus enabling the recognition of the class of the compound. By the other hand, fragments related to the original molecule mass (for instance molecular ion ( $M^+$ ) and  $[M-15]^+$ ), which depends on the number of total carbons in the molecule, enable the homologue identification (diagnostic homologue ions or fragments – DHF).<sup>14</sup>

Although commercial digital libraries are accurate and extensively used in identifying plant compounds, for these acyclic lipids they can lead to incorrect identifications as false positives.<sup>15</sup> The identification process of these kind of compounds faces two problems. The first one is observed when the DCF are much more abundant than the DHF (Figure 1A), as observed for alkanes, alkenes and aldehydes. For these compounds, during the automatic search using commercial digital libraries the DHF are underestimate, leading to the correct identification of the class but not the correct homologue. The second problem occurs with compounds that contain two or more DHF for the correct homologue identification sometimes with short  $M^+$  or  $[M-15]^+$  ions (i.e. ketones, esters and secondary alcohols) (Figure 1B). The multiple potential combinations between the DHF and lower abundances of  $M^+$  or  $[M-15]^+$  hinder the digital identification, leading to incorrect identification.

In this context, the software WaxAlly (registered at Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) with process number BR512022002375-0; The first software registered by AUSPIN from IB-USP) was created to complement traditional methods for identifying common acyclic lipids found in cuticular waxes using mass spectrum data. Thus, the program can help identify acyclic homologues of alkanes, alkenes, aldehydes, ketones, esters and TMS-derivatized free fatty acids, primary and secondary alcohols, with chains varying between 10 and 100 carbons based on algorithms with mass spectra DHF values obtained via GC-MS. The main goal of the software is to help new and experienced users to identify a broad range of acyclic aliphatic lipids using mass spectra data.



**Figure 1.** Examples of different types of mass spectra found in aliphatic acyclic lipids of waxes. The mass spectra of heptadecane (alkane) (A) and nonadecan-10-one (ketone) (B) exhibit less abundant or multiple DHF (diagnostic homologue ions or fragments) of the homologue (red bars) when compared to the DCF (diagnostic class ions or fragments) (blue bars).

## FRAMEWORK

The software was written with the IDE QtCreator v.7.0.0 in C++ language, designed for use in Windows, and is composed of four main windows: (i) Home - which contains some basic information and main tutorials, (ii) Calculator – where DHF values can be added to a typical class spectrum allowing the homologues identification, (iii)

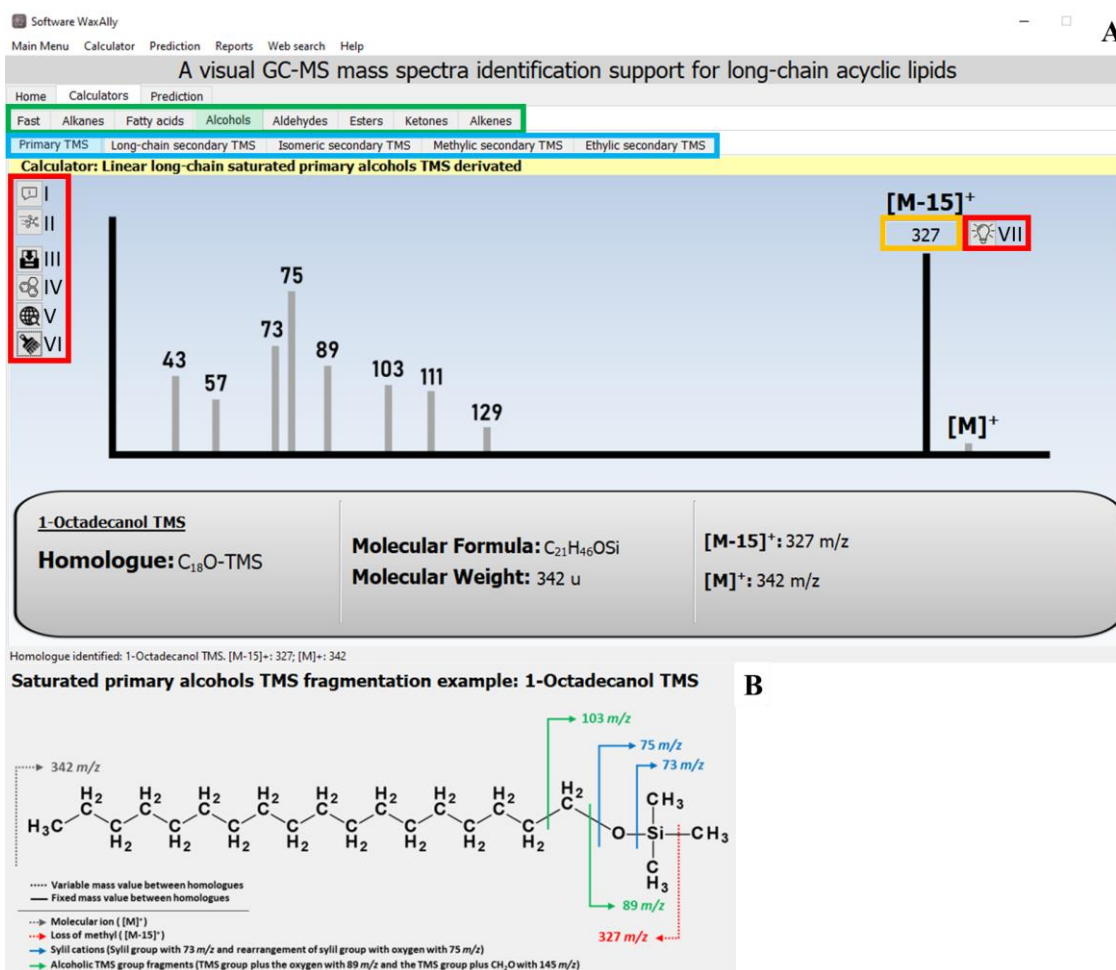
Prediction – the DHF of hypothetical homologues will be available after entering the carbon number of the chain length, and (iv) Report – where all the identifications can be organized in a text file. The software interface was constructed to be simple and accessible for new and experienced users of MS data for wax lipids identification.

The Home window displays the main information of the program, and basic tutorials with step-by-step instructions about the software operation, the appropriated way to insert data, and how to use the software tools.

In the Calculator window, users can access each tab of lipid classes, visually compare the mass spectrum of their sample with that of the program and then identify which class the mass spectrum of the sample corresponds to. Next, based on the user data, DHF mass values can be inserted into the corresponding boxes. If the values are correct, the software will provide important information, such as the name, molecular mass, molecular formula and the mass of some important DHF. Currently, this window is divided into seven main compound class tabs including one called Fast. Each of the main tabs may contain sub-tabs. For example, the alcohol class tab (Alcohols) is subdivided into derivatized primary alcohols (Primary TMS), derivatized secondary alcohols (long-chain secondary TMS), derivatized isomeric secondary alcohols (isomeric secondary TMS) and secondary alcohols with derivatized methyl and ethyl ends (methylic secondary TMS and ethylic secondary TMS respectively; Figure 2). Each class tab or sub-tab contain a scheme of a mass spectrum corresponding to that class, with grey bars corresponding to the main DCF that characterize the mass spectrum of the selected class and black bars, with empty boxes on top, corresponding to the DHF needed to identify the homologue. These empty boxes should be filled in with proper mass values obtained during the sample mass spectra analysis. In the left side and above the mass spectra scheme, there are seven auxiliary buttons to assist the user with complementary information for the correct identification of the analyzed mass spectrum (Table 1).








The Report window, which was designed to save the identified compound class and name, is structured into three sections (Figure 3). The first section (Report Assistant) (Figure 3, green area) allows the construction of a basic report including identified

compounds, chemical class, and sample name. The second section, called Report Text, consists of a text editing area where the previous report can be saved or loaded as a text document (.txt; Figure 3, blue area). The last section, the Internet Search window, the user can carry out an online search using compound names or molecular formula using two databases, NIST Webbook (<https://webbook.nist.gov/>) and PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; Figure 3, yellow area).



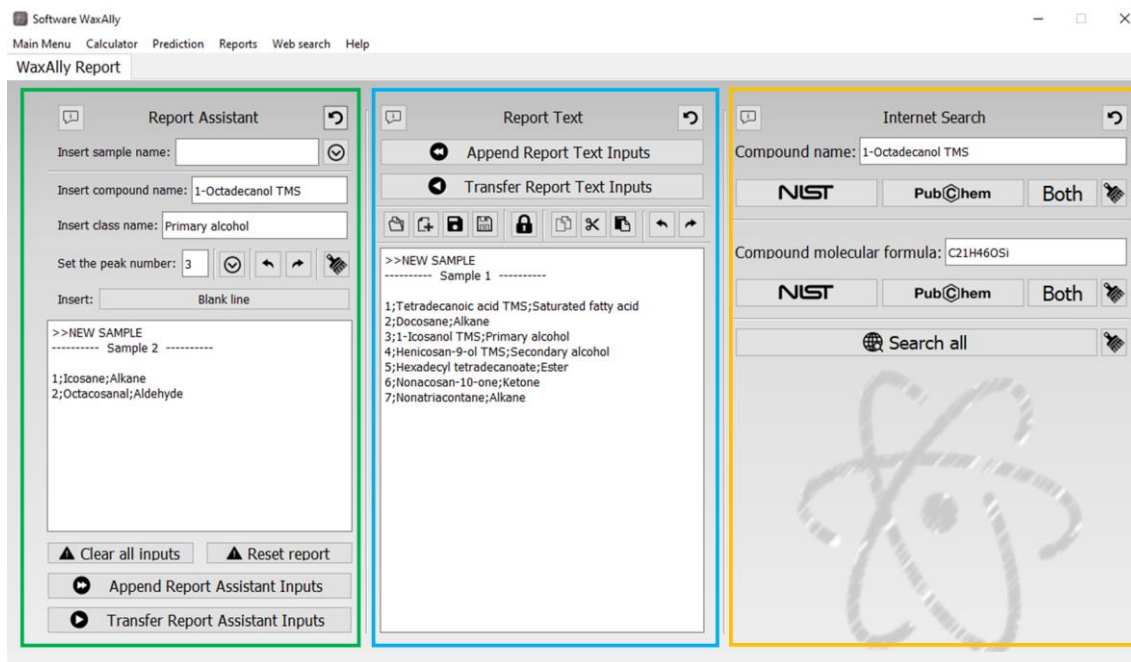
**Figure 2.** Calculator window exemplified by the Alcohols tab with Primary alcohols TMS sub-tab selected to illustrate the identification (A) and the fragmentation pattern of the selected compound class (B) using as example the homologue 1-octadecanol TMS derivative. In (A) the Class tabs and Fast tab are highlighted in green and the specific sub-tabs of each class in blue. In orange is the box to fill in the designated DHF mass value, in this case, the value of  $m/z = 327$ , and in red the auxiliary buttons, described in the Table 1.

**Table 1.** Auxiliary buttons of Calculator function. Position numbers correspond to figure 3A.

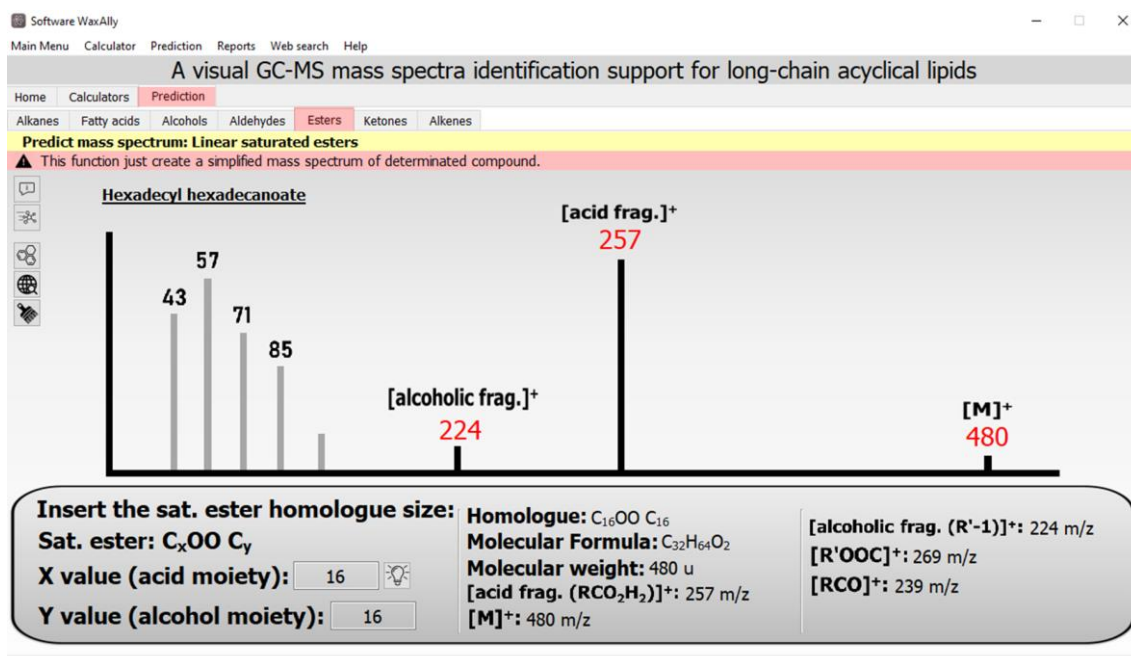
Icon	Position	Name	Function
	I	How to use	Basic information about the fragmentation of the selected class and some tips on how the selected calculator works
	II	Fragmentation example	An example of the fragmentation pattern of the selected calculator
	III	Open WaxAlly Report	Open the Report Assitant window
	IV	Molecule structure	A representation of the identified molecule
	VI	Web search	Open Internet Search window
	VI	Clear	Clear identification results
	VII	DHF tips	Show some tips to fill in the DHF inputs

DHF: Diagnostic homolog ions or fragments.

The design of the Prediction window (Figure 4) resembles that of its Calculator counterpart and presents nearly all the elements and tools of the latter. This window enables the user, after selecting a class, enter the carbon number of the DHF in order to obtain information about the homologue including the mass of important fragments and the molecular formula.



**Figure 3.** Report window. Outlined in green is the region of the window where recently identified compounds can be added to the current report. In blue is the region where the text can be edited and the reports saved or loaded in .txt. In orange is the region where searches can be conducted on the NIST and PubChem sites using both the compound name and the molecular formula.








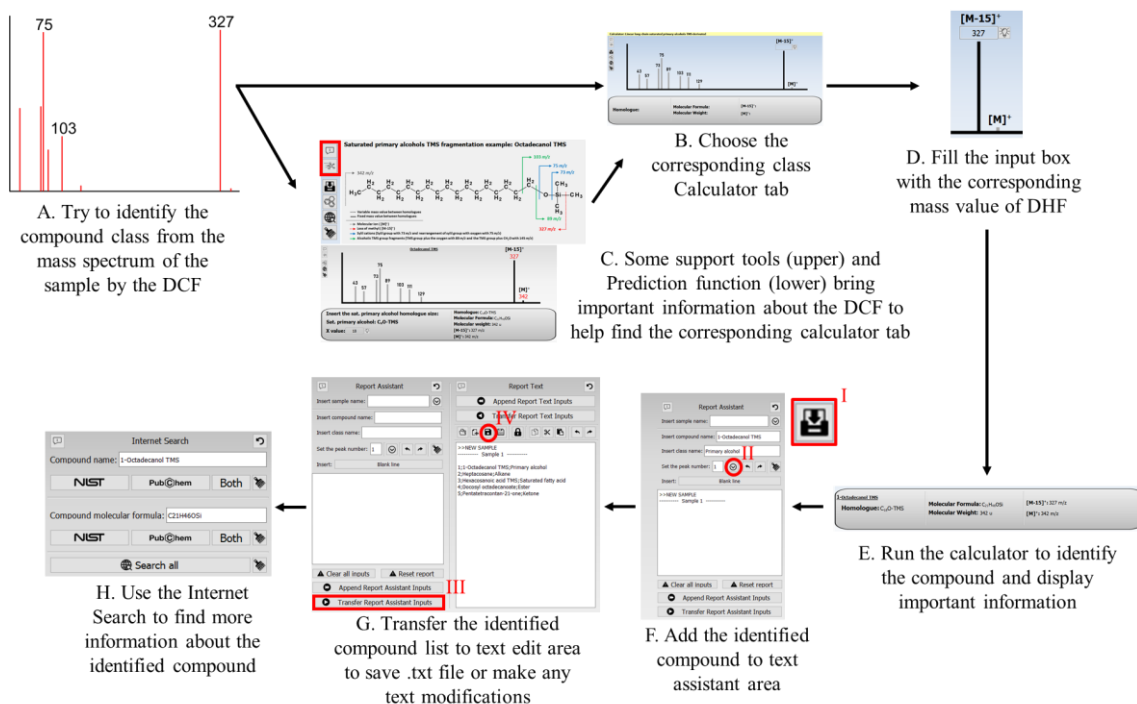
**Figure 4.** Prediction window exemplifying the prediction mass spectra of an ester. In this example, the mass spectrum of hexadecyl hexadecanoate, an ester containing 16 carbons in its acid and alcohol parts. Information of diagnostic ions mass, as well as molecular formula and molecular weight of the compound is shown.



## SOFTWARE WORKFLOW

The software offers to the users several information to help with the correct identification of an acyclic lipid through mass spectrum. To start a simple analysis, the user can follow these basic steps:

- (1) Choose a mass spectrum from a homologue to identify (Figure 5A);
- (2) If the user has already identified the class by the DCFs, choose the correspondent Calculator tab (Figure 5B). If has not, the user can explore some support tools available on each Calculator tab (,  and ; Table 1) to help recognizing the lipid class based on DCF and then choose the correct tab (Figure 5C);
- (3) Fill the input boxes above the DHF with the corresponding mass value obtained from the sample (Figure 5D) and run the calculator. With a correct DHF value, the software will identify the homologue and important information will be displayed below the mass spectrum (Figure 5E).
- (4) After the homologue identification, start creating a basic report by clicking on  (Open WaxAlly Report tab; Figure 5F).
- (5) At the Report Assistant section of the Report window (Figure 5F), press  to add the identified compound to the text area.
- (6) The user can proceed steps 1 – 5 for all desired homologues;
- (7) After the identification of all sample compounds, the results can be transferred to the Report Text section by pressing “Transfer Report Assistant Inputs” and saved it in a .txt file (Figure 5G). More information about the identified compounds can be accessed on the NIST and PubChem websites, quickly accessed through the Internet Search section of Report window (Figure 5H).



**Figure 5.** Diagram of a suggested workflow to carry out the identification and organization of acyclic lipids using WaxAll software. The red letters and squares of (C) indicate the buttons to open the auxiliary windows of each calculator; in (F) the buttons to open the Report Window (I) and save the compound identification temporarily in the Report Assistant section (II); and in (G) the button to transfer the temporarily identifications of Report Assistant section to the Report Text section (III) and the button to save the report to a .txt file (IV).

## CALCULATOR AND PREDICTION ALGORITHMS

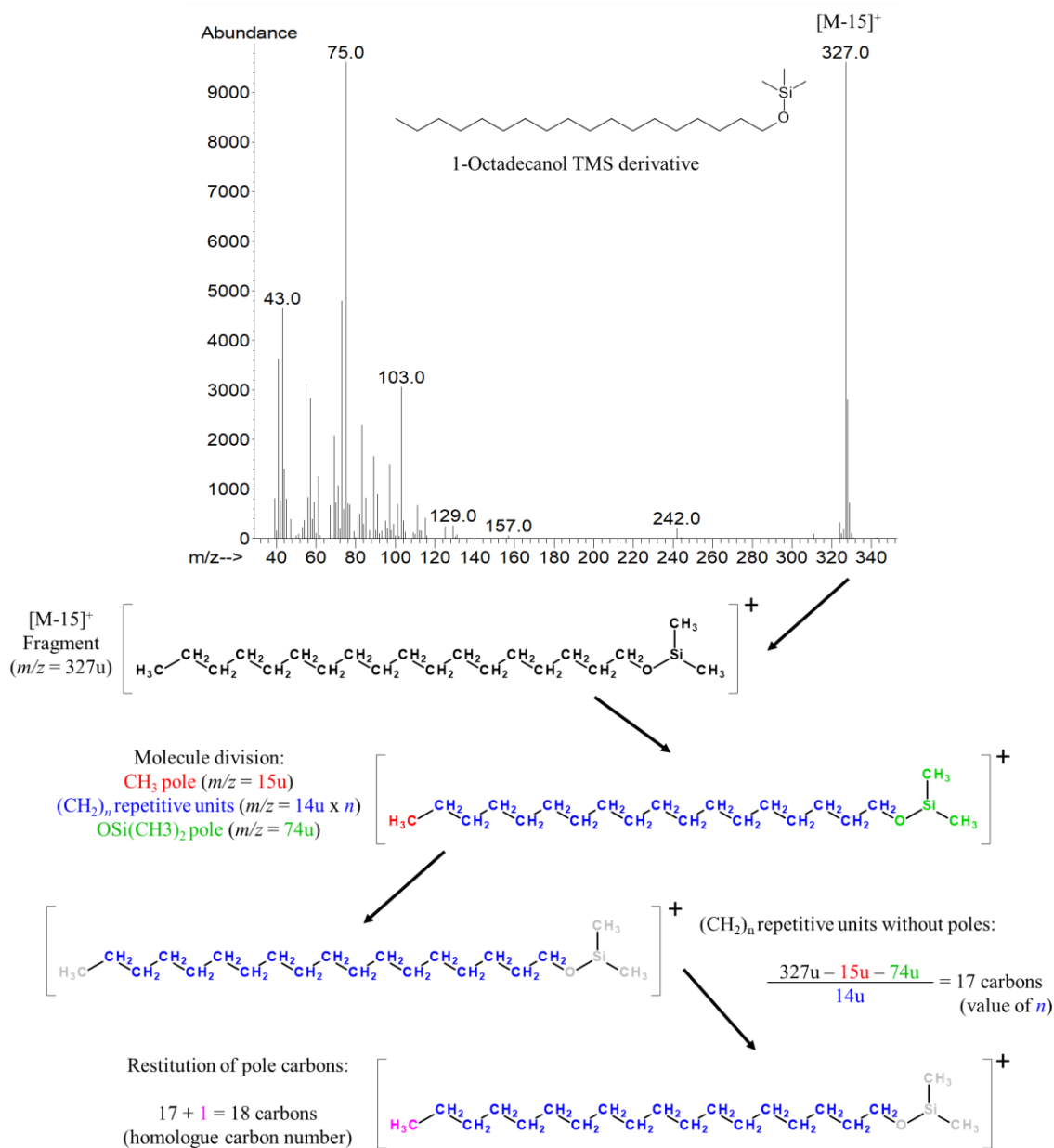
Identifying each homologue consists of transforming DHF into mathematical equations, which are based on isolating their CH<sub>2</sub> units removing the mass values that do not repeat along the chain of each fragment (for example the CH<sub>3</sub> units of the molecular poles or carbons linked to organic functions). Thus, the mass corresponding to this set of CH<sub>2</sub> units is calculated, the number of carbon atoms in the fragment is discovered and, consequently, the corresponding homologue is identified.

A simple example is the calculation used to identify primary alcohols derivatized with BSTFA (Figure 6). The main DCFs of this class are  $m/z = 73, 75, 89, 103, 111,$  and  $129$ , which appear in mass spectra of all homologues of saturated primary alcohols TMS derivatives. For this class, the main DHF corresponds to [M-15]<sup>+</sup>, which is abundant and easily distinct.<sup>16</sup> This fragment is composed by a CH<sub>3</sub> terminal with a mass of 15u, CH<sub>2</sub>

units with a mass of 14u which repeat  $n$  times, and an end  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$  with total mass of 74u, corresponding to the organic function with the silyl derivative group less one methyl. After the addition of the DHF mass value, the software calculates the number of  $\text{CH}_2$  repetitive units of the molecule subtracting the mass of the two poles ( $\text{CH}_3 = 15\text{u}$  and  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2 = 74\text{u}$ ) from the  $[\text{M}-15]^+$  and divides the remaining mass by 14, which corresponds to the  $\text{CH}_2$  repetitive units of the molecule. To achieve the total carbon number of the corresponding primary alcohol, the next step is to add the carbon from the  $\text{CH}_3$  pole that was subtracted before. In other words, one carbon should be added to the number of  $\text{CH}_2$  repetitive units. Considering the 1-octadecanol TMS, the DHF is  $[\text{M}-15]^+ = 327$ . Subtracting the mass values corresponding to the two poles, leaves 238, which corresponds to 17  $\text{CH}_2$  units. Adding the pole carbon, the primary alcohol chain contains 18 carbons corresponding to 1-octadecanol TMS.

The algorithms created for all classes of acyclic lipids were constructed based on two premises: (i) establish an interval of mass values that the user can type into the DHF boxes, controlling the maximum and minimum size of each homologue to guarantee a reliable result; (ii) guarantee that the mass value of the total  $\text{CH}_2$  repetitive units is multiple of 14, allowing a trustable chain length. It is important to note that the identifications produced by the program should, whenever possible, have a second confirmation by obtaining the compound mass spectrum of an article or site, as well as compare retention time with the internal standards.

The algorithms for the Prediction function are diametrically opposite to those used for the calculators, where the number of carbons that determine chain size is used to generate all the mass values of the DHF.



**Figure 6.** Flowchart of each calculation steps involved in Calculator function exemplified by 1-octadecanol TMS. The Prediction function work by reversing these algorithms to construct the fragments.

## FINAL CONSIDERATIONS

The software we created proved to be very useful in identifying the components of plant cuticular waxes, whose classes characteristically exhibit compounds that follow a homologous series, and other types of samples rich in unbranched acyclic long-chain lipids, primarily due to the mathematical way in which they are identified. Additionally,

the didactic nature of the software in the mass spectrometry of different lipid classes make it a promising tool for new or experienced researchers, but whose basic formation does not include mass spectrometry. In the future, due to the mathematical premise of how the software was constructed, several new calculators (identification and prediction) can be added as needed, given that any class of compounds with a fragmentation pattern in MS can be reduced and transformed into a mathematical algorithm enabling them to be added to the software.

The acquisition of the software can be made through direct contact with the authors ([waxallysoftware@gmail.com](mailto:waxallysoftware@gmail.com)) or with Agência USP de Inovação (AUSPIN – [transtec@usp.br](mailto:transtec@usp.br)), which holds the software registration rights.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – process number: 140085/2019-0 and 311543/2021-9) for the scientific research grants. Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for funding this study (funding code 001). Agência USP de Inovação (AUSPIN) for assisting in the registration process of the software (BR512022002375-0).

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

LPR and DYACS designed the study, and wrote the article. LR built the software.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there is no conflict of interest.

## **REFERENCES**

1. Levental, I.; Lyman, E.; *Nat Rev Mol Cell Biol* **2022**, *24*, 107.

[<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00524-4>]

2. Asadollahi, E.; Trevisiol, A.; Saab, A. S.; Looser, Z. J.; Dibaj, P.; Kusch, K.; ...Nave, K. A.; *bioRxiv* **2022**, *02*. [<https://doi.org/10.1101/2022.02.24.481621>]

3. Liu, J.; Kang, R.; Tang, D; *FEBS J* **2022**, *289*, 7038.

[<https://doi.org/10.1111/febs.16059>]

4. García-Coronado, H.; Tafolla-Arellano, J. C.; Hernández-Oñate, M. Á.; Burgara-Estrella, A. J.; Robles-Parra, J. M.; Tiznado-Hernández, M. E.; *Plants* **2022**, *11*, 1133.

[<https://doi.org/10.3390/plants11091133>]

5. García-Granero, J. J.; Suryanarayan, A.; Cubas, M.; Craig, O. E.; Cárdenas, M.; Ajithprasad, P.; Madella, M.; *Front Ecol Evol* **2022**, *10*, 209.

[<https://doi.org/10.3389/fevo.2022.840199>]

6. Parthasarathy, S.; Soundararajan, P.; Krishnan, N.; Karuppiah, K. M.; Devadasan, V.; Prabhu, D.; ...Raman, P.; *Biomass Convers Biorefin* **2022**, *1*.

[<https://doi.org/10.1007/s13399-022-03572-0>]

7. Müller, C.; Riederer, M.; *J Chem Ecol* **2005**, *31*, 2621.

[<https://doi.org/10.1007/s10886-005-7617-7>]

8. Bernard, A.; Joubès, J.; *Prog Lipid Res* **2013**, *52*, 110.

[<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.002>]

9. Cardona, J. B.; Grover, S.; Busta, L.; Sattler, S. E.; Louis, J.; *Planta* **2023**, *257*, 22.

[<https://doi.org/10.1007/s00425-022-04046-3>]

10. Zhao, Z.; Zhao, J.; Peng, C.; Duan, X.; Deng, M.; Wen, J. *Sci Hort* **2023**, *311*, 111805.

[<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111805>]

11. Grayson, M. A.; In *The encyclopedia of mass spectrometry Volume 9: Historical Perspectives, Part A: The Development of Mass Spectrometry*; Gross M. L.; Caprioli, R. M., eds; Elsevier: Amsterdam, **2016**, chapter 4.

[<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-043848-1.00020-1>]

12. Halket, J. M.; Zaikin, V. G. *Eur J Mass Spectrom* **2003**, *9*, 1.

[<https://doi.org/10.1255/ejms.619>]

13. Subramaniam, S.; Fahy, E.; Gupta, S.; Sud, M.; Byrnes, R. W.; Cotter, D.; ... Maurya, M. R.; *Chemical reviews* **2011**, *111*, 6452. [<https://doi.org/10.1021/cr200295k>]

14. Silverstein, M. R.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; *Spectrometric identification of organic compounds, 7 th ed.*, John Willey and Son: New Jersey, **2005**.

15. Stein, S; *Anal Chem* **2012**, *84*, 17. [<https://doi.org/10.1021/ac301205z>]

16. Taghizadeh, T.; In *Produtos naturais no controle de insetos*, EdUFSCar: São Carlos, **2001**.

## CAPÍTULO 2

### **Stratified analysis of cuticular waxes on fertile and sterile fronds of *Gleichenella pectinata* (Gleicheniaceae)**

Capítulo aceito para publicação no periódico *Brazilian Journal of Botany* (IF = 1,600).

Este capítulo teve como colaboradores:

Regina Yoshie Hirai<sup>1</sup>

Jefferson Prado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), Av. Miguel Estéfano 3687, São Paulo, SP 04301-012, Brazil.





## RESUMO

*Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching é uma espécie de samambaia com frondes monomórficas (ou seja, as frondes estéreis e férteis são morfologicamente semelhantes) e amplamente distribuída na América do Sul. No presente estudo, a composição química das ceras das frondes férteis e estéreis foi analisada e as ceras epi e intracuticulares foram extraídas separadamente. O teor de cera intracuticular total ( $55,85 \pm 10,55 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) foi significativamente maior do que o teor epicuticular total ( $44,36 \pm 6,29 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) das frondes. No entanto, o teor de cera total não diferiu entre frondes estéreis ( $92,54 \pm 7,44 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) e férteis ( $107,90 \pm 17,26 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Foi identificado um total de 32 compostos pertencentes a sete classes diferentes: alcanos ( $\text{C}_{25}\text{-C}_{27}$ ), ésteres ( $\text{C}_{34}$ ), aldeídos ( $\text{C}_{26}\text{-C}_{32}$ ), cetonas ( $\text{C}_{27}\text{-C}_{31}$ ), ácidos graxos livres ( $\text{C}_{14}\text{-C}_{28}$ ) e álcoois primários ( $\text{C}_{18}\text{-C}_{35}$ ) e secundários ( $\text{C}_{33}\text{-C}_{35}$ ). As classes mais abundantes nas ceras foram cetonas, aldeídos, ácidos graxos e álcoois primários, sendo a nonacosan-10-ona, octacosanal e ácido octacosanóico os compostos mais relevantes. Embora não tenham sido observadas diferenças qualitativas, as ceras epicuticulares e intracuticulares acumularam quantitativamente mais cetonas ( $46,73 \pm 16,17\%$ ) e aldeídos ( $27,83 \pm 6,11\%$ ), respectivamente. O acúmulo desses compostos nas ceras epicuticulares pode estar relacionado à formação de cristaloides cerosos específicos. Em geral, no que diz respeito à fertilidade das frondes, não houve diferença no teor ou na composição da cera. Comparadas a outras linhagens de samambaias, as ceras encontradas para *G. pectinata* mostraram-se muito semelhantes às ceras de *Osmunda regalis* L., outra espécie leptosporangiada basal. Muitas diferenças foram encontradas comparando as ceras de frondes de *G. pectinata* com samambaias eusporangiadas e leptosporangiadas recentes.

**Palavras-chave:** Cera abaxial, cera adaxial, cutícula, cera intracuticular, Gleicheniales, Polypodiopsida, quimiotaxonomia.

## ABSTRACT

*Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching is a fern species with monomorphic fronds (i.e., the sterile and fertile fronds are similar morphologically) and is widely distributed in South America. In the present study, the chemical composition of waxes on fertile and sterile fronds was analyzed and the epi and intracuticular wax portions were extracted separately. The total intracuticular wax content ( $55.85 \pm 10.55 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) was significantly higher than the total epicuticular content ( $44.36 \pm 6.29 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) of fronds. However, total wax content did not differ between sterile ( $92.54 \pm 7.44 \mu\text{g.cm}^{-2}$ ) and fertile ( $107.90 \pm 17.26 \mu\text{g.cm}^{-2}$ ) fronds. A total of 32 compounds belonging to seven different classes were identified: alkanes (C<sub>25</sub>-C<sub>27</sub>), esters (C<sub>34</sub>), aldehydes (C<sub>26</sub>-C<sub>32</sub>), ketones (C<sub>27</sub>-C<sub>31</sub>), free fatty acids (C<sub>14</sub>-C<sub>28</sub>), and primary (C<sub>18</sub>-C<sub>35</sub>) and secondary alcohols (C<sub>33</sub>-C<sub>35</sub>). The most abundant classes in the waxes were ketones, aldehydes, fatty acids, and primary alcohols, with nonacosan-10-one, octacosanal, and octacosanoic acid as the most prominent compounds. While no qualitative differences were observed, epicuticular and intracuticular waxes quantitatively accumulated more ketones ( $46.73 \pm 16.17\%$ ) and aldehydes ( $27.83 \pm 6.11\%$ ), respectively. The accumulation of these compounds in epicuticular waxes may be related to the formation of specific waxy crystalloids. In general, with regard to frond fertility, there was no difference in wax content or composition. Compared to other ferns lineages, the waxes found for *G. pectinata* showed very similarities with waxes from *Osmunda regalis* L., another basal leptosporangiate species. A great number of differences were found comparing the *G. pectinata* frond waxes with eusporangiate and recent leptosporangiate ferns.

**Keywords:** Abaxial wax, adaxial wax, cuticle, intracuticular wax, Gleicheniales, Polypodiopsida, chemotaxonomy.

## INTRODUCTION

Gleicheniaceae (Gleicheniales) is a relatively diverse ancestral monophyletic family of basal leptosporangiate ferns (Subclass Polypodiidae, majority of ferns; PPG I 2016) – Gleichenioid ferns: age estimate is ~272 Mya (Pryer et al. 2004), consisting of six genera and 157 species with a predominantly tropical distribution (PPG I 2016; Moran 2019). They are mostly terrestrial or epiphytic plants, with rigid monomorphic fronds and exindusiate rounded sori on the abaxial surface that contain nongreen spores. *Gleichenella* is an interesting genus within the family and it consists of a single species, *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching. This species is widely recognized for its unevenly branched opposite pinnae, lack of secondary branches (Lima and Salino 2018), and often with their segments abaxially glaucous (Mickel and Smith 2004). It can be found from Mexico to Bolivia and Brazil. In Brazil, it is present in several different states, including those in the Southeast, such as São Paulo, occurring in various plant domains and at low to median elevations (100 to 1800 m). Populations of *G. pectinata* are typically found in areas with little shade, such as those containing anthropogenic vegetation, roadsides, or forest edges (Lima and Salino 2018; do Monte et al. 2021).

In *G. pectinata*, as with other ferns, fronds that contain reproductive structures are referred to as fertile, and those that do not, as sterile (Lee et al. 2018). As such, unlike spermatophyte species, fern fronds are responsible for both vegetative and reproductive functions, which may lead to physiological changes between fertile and sterile fronds (Bauer et al. 1991; Chiou et al. 2005). Despite similar photosynthetic rates, Watkins et al. (2016) detected different negative water pressures between the sterile and fertile fronds of monomorphic ferns.

Leaf water loss or retention occurs due to the mutual action of the stomata and plant cuticle. In this process, the cuticle forms a permanent translucent hydrophobic barrier on the epidermis of tissues with no secondary growth to prevent water loss via non-stomatal transpiration, especially when the stomata are closed (Riederer and Muller 2008). The cuticle is also involved in other important functions, such as self-cleaning the leaf surface and protecting against plant pathogens and herbivores (Tafolla-Arellano et al. 2013).

The cuticle consists primarily of a polyester matrix known as cutin and a variety of liposoluble compounds denominated cuticular waxes (Kunst and Samuels 2003; Jeffree 2006), which can be acyclic, such as alcohols, alkanes, fatty acids, and esters (Kunst and Samuels 2009) or cyclic, in the form of terpenoids (Oliveira and Salatino 2000; Palacios et al. 2015) and phenolic compounds (Alcerito et al. 2002; Cerón-Carpio et al. 2019).

Structurally, the cuticle is divided into three layers: the first and innermost is the cuticular layer, which is composed of wax and cutin associated with cell wall components such as polysaccharides; the intermediate layer or cuticle proper, consisting of a cutin network permeated by wax; and the outermost layer is composed only by waxes named epicuticular waxes. Waxes in the cuticular layer and cuticle proper are known as intracuticular waxes in opposite to epicuticular waxes (Bernard and Joubès 2013; Holloway and Jeffree 2017). Whether quantitatively (Haas and Rentschler 1984; van Maarseveen and Jetter 2009) or qualitatively (Buschhaus et al. 2007; Buschhaus and Jetter 2011), intra and epicuticular waxes may have different compositions, which may reflect the distinct ecological functions of each of these layers in the species.

Distinct morphologies and ornamentation are described for epicuticular waxes, like film-type, rodlets or plates (Juniper and Jeffree 1983; Koch and Barthlott 2009). Some specific types have been associated with specific wax components. The predominance of ketone, mainly hentriacontane-16-one, is responsible for the formation of rod-like crystalloids in *Liriodendron tulipifera* L. (Gülz et al. 1992). The accumulation of the primary alcohol hexacosan-1-ol (C<sub>26</sub>) is associated with platelet morphology, whereas the accumulation of *n*-nonacosanol (C<sub>29</sub>), a secondary alcohol, is specifically related to the morphology of tubules (Ensikat et al. 2006).

According to Guo et al. (2018), despite their considerable species diversity and global dispersion, the cuticular waxes of ferns have received little attention. Several species in the order Polypodiales (mostly recent leptosporangiate; ~210 Mya; Pryer et al. 2004), which contains the largest number of species among the fern orders (26 families, 8,714 species; PPG I 2016; Moran 2019), have been investigated for their cuticular waxes, including those from temperate zones, such as *Gymnocarpium*

*dryopteris* (L.) Newman (Cystopteridaceae), *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Dennstaedtiaceae), *Cryptogramma crispera* (L.) R.Br. ex Hook. (Pteridaceae), and *Polypodium glycyrrhiza* D.C.Eaton (Polypodiaceae), with contents ranging from 3.9  $\mu\text{g cm}^{-2}$  in the last to 16.9  $\mu\text{g cm}^{-2}$  in the first and alkyl esters as the main compounds, followed by smaller amounts of ketones, primary alcohols, and alkanes (Guo et al. 2018). On the other hand, tropical species such as *Bolbitis portoricensis* (Spreng.) Hennisman (Dryopteridaceae), *Diplazium drepanolobium* A.R.Sm. (Athyraceae), *Goniopteris rhachiflexuosa* (Riba) Salino & T.E.Almeida (Thelypteridaceae), and *Lomariopsis recurvata* Fée (Lomariopsidaceae) contain large amounts of free fatty acids, with total wax contents between  $349 \pm 61 \mu\text{g cm}^{-2}$  in *B. portoricensis* and  $740 \pm 322 \mu\text{g cm}^{-2}$  in *L. recurvata* (Cerón-Carpio et al. 2019). Additionally, high proportions of wax compounds from other classes were found in species from different lineages of Polypodiopsida. In some *Equisetum* species (Equisetales, eusporangiate; ~354 Mya; Pryer et al. 2004) such as *Equisetum hyemale* L., the waxes contained large quantities of alkanes, aldehydes, and free fatty acids (Brune and Haas 2011). The foliar waxes of *Danaea nodosa* (L.) Sm. (Marattiales, eusporangiate; ~354 Mya; Pryer et al. 2004) contained more than 20% phenolic compounds (Cerón-Carpio et al. 2019), whereas a variety of unusual compounds were reported in *Osmunda regalis* L. (Osmundales, basal leptosporangiate; ~323 Mya; Pryer et al. 2004), including diols, diketones, and ketol, among others (Jetter and Riederer 2000).

Although little explored, the stratified characterization of intra and epicuticular foliar waxes and the separate composition of fertile and sterile fronds have already been described. Brune and Haas (2011) studied *Equisetum* species and found quantitative differences in the chemical composition of waxes in fertile and sterile sprouts, with 61.25%, 76.09% and, 20.66% higher total wax content in fertile *Equisetum arvense* L., *E. telmateia* Ehrh., and *E. sylvaticum* L. shoots, respectively, than in sterile ones (Brune and Haas 2011).

Most of the studies with fern cuticular waxes were made majority with recent leptosporangiate lineages, for instance, species of Polypodiales. As such, the present study aimed to present the composition of the foliar cuticular waxes of an early

leptosporangiate fern, *G. pectinata*, characterizing the different wax layers of fertile and sterile fronds. The main goal is to better understand the waxes of ferns (Polypodiopsida) and, consequently, contribute to the evolutionary knowledge of the cuticle in the group.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material**

The study was carried out using adult fronds of *Gleichenella pectinata*, characterized by its 1 or 2-pseudo dichotomously furcate fronds, erect, coriaceous laminae, light brown petioles, pinnae adaxially glabrous and abaxially with hairs, often with a glaucous aspect, and sori occupying median position, with 5 to 14 sporangia (Mickel and Smith 2004; Prado 2004). The specimens were deposited in the SP Herbarium, of the Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), voucher *L.P. Roma et al. 2* (LPR2). Three fertile and three sterile healthy and fully expanded fronds were collected in April of 2019 from six plants (one frond per plant) in the municipality of Salesópolis (São Paulo state, Brazil), in an Atlantic Forest preserved area with vegetation typically of high elevations (Boracéia Biological Station, approximately -23.6367 S, -45.9457 W), specifically on the edge of a lightly shaded ravine with sparse bushes, in Brazil's tropical zone closely of temperate zone. According to the closest weather station from the study site (Bertioga A765) and the INMET data repository, for the period between April 2018 to April 2019 the annual temperature and precipitation were  $23.03 \pm 2.67$  °C and  $232.83 \pm 159.25$  mm, respectively. All specimens were collected in similar conditions not so far from each other, in the same microenvironmental conditions, along the roadside.

The plant material was washed, dried, and pressed in an oven at 40 °C for one week. Then both pinnae surfaces were gently cleaned with a soft brush and the remaining sori were carefully removed with a small spatula from the fertile fronds to not damage the cuticular structure.

### **Epicuticular and intracuticular wax extraction and quantification**

The process of mechanical extraction of the epicuticular waxes as well as the solvent extraction of the intracuticular waxes were performed as described by Riedel et al. (2003). Epicuticular waxes were mechanically removed from the adaxial and abaxial surfaces of the fronds using gum arabic as an adhesive. To that end, commercial powdered gum arabic was previously washed in soxhlet with chloroform for 3 hours. Next, a solution was prepared using 9 g of washed gum arabic diluted in 10 mL of water. The solution was then spread onto the abaxial and adaxial surfaces of each frond and allowed to dry at room temperature. The film of gum containing the epicuticular waxes was then peeled off the frond, transferred to a separatory funnel, and partitioned with water and chloroform. The nonpolar partition phase with the wax was removed. Following the removal of the epicuticular wax layer, the intracuticular waxes were extracted via three successive 30-second immersions in chloroform. After extraction, the waxes were concentrated in a rotary evaporator and placed in a desiccator until constant weight.

The fronds used in extraction were scanned and their areas were measured using ImageJ software v. 1.49. The wax load from the epicuticular waxes was then divided for the total area while the intracuticular waxes were divided for the twice area, considering both frond surfaces. Epicuticular wax contents of the abaxial and adaxial surfaces and total intracuticular wax contents were expressed in  $\mu\text{g cm}^{-2}$ .

### **Chromatographic analyses and compounds identification**

Aliquots of 1 mg of waxes were derivatized with 50:50  $\mu\text{L}$  of BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) and pyridine for 1 hour at 70 °C (modified from Jetter et al. 2000). Next, the samples were injected into a GC-MS instrument (HP 5890 Series II/ HP 5989B, Agilent), equipped with an HP5-MS capillary column (Agilent, 30 m x 250  $\mu\text{m}$  i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$ ). The injection volume was 1  $\mu\text{L}$ , with helium as carrier gas at a flow rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . The temperature of the injector was adjusted to 300 °C and that of the column was programmed to start at 100 °C, maintaining this temperature for 5 minutes, with heating at 5 °C  $\text{min}^{-1}$  until 320 °C, maintained for 8 min, totaling a 57-minute run. The source and quadrupole temperatures were 280 °C and 180 °C,

respectively. Electron ionization energy was 70 eV, operating in full scan mode from  $m/z = 50$  to 800 at 2.66 scan  $s^{-1}$  (Santos et al. 2020).

Wax components were identified by comparing retention times with authentic standards, by analyzing and comparing the mass spectra against those in the literature and NIST digital library (v2.0, 2008; similarity index of 90% or higher), and via *WaxAlly* software v.1.0.2 (registered under BR512022002375-0), developed by the authors.

### **Scanning electron microscopy**

Fronds were previously lyophilized for 3 days and 1 mm<sup>2</sup> fragments were removed between the midrib and lateral veins of the center of the blade (Matos et al. 2022). The fragments were fixed onto aluminum stubs with double-sided tape, gold coated using a Balzers SCD 050 sputter coater (Barthlott and Neinhuis 1997), and analyzed at 5 to 10kV on a Sigma VP scanning electron microscope (Zeiss, Germany) at the USP Biosciences Institute. The morphology of the epicuticular waxes was classified based on a comparison with data available in the literature (Barthlott et al. 1998).

### **Statistical analyses and graph construction**

Tests of normality, homoscedasticity, and significance of differences were performed using R software (4.0.3). The compared data were analyzed for normality and homoscedasticity using the Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. The significance of differences between pairs of tested data was assessed by the Student's t-test (for data with Gaussian and homoscedastic distribution), Welch's t-test (Gaussian and heteroscedastic distribution) and the Wilcoxon test (nonparametric data). Principal component analysis (PCA) was performed with Fitopac software v. 2.1.2.85 (Shepherd 2010), and graphs were constructed in Prism software v.6.01 (Graphpad, Inc.).

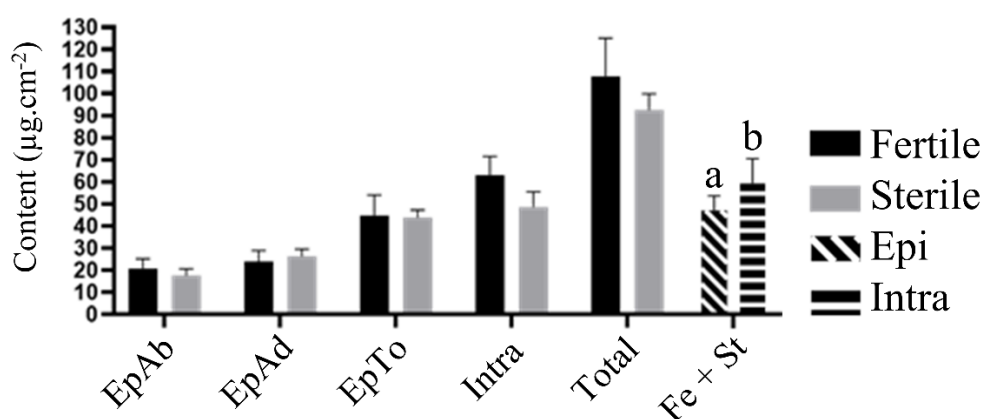
## **RESULTS**

### **Wax content**

The total foliar wax content (epicuticular abaxial and adaxial + intracuticular) for *Gleichenella pectinata* was  $107.90 \pm 17.26 \mu\text{g cm}^{-2}$  in fertile fronds and  $92.54 \pm 7.44 \mu\text{g}$



cm<sup>-2</sup> in their sterile counterparts, with no significant difference (Fig. 1, Table 1S). The average overall wax content of *G. pectinata* fronds was 100.22 ± 14.66 µg cm<sup>-2</sup>. As observed for total wax content, the abaxial, adaxial and total epicuticular wax contents did not differ significantly between fertile and sterile *G. pectinata* fronds (Fig. 1). Disregarding the reproductive condition, total intracuticular wax content (55.85 ± 10.55 µg cm<sup>-2</sup>) was significantly higher than total epicuticular content (44.36 ± 6.29 µg cm<sup>-2</sup>; *p* > 0.05; Fig. 1, Table 1S) in the fronds of *G. pectinata*.



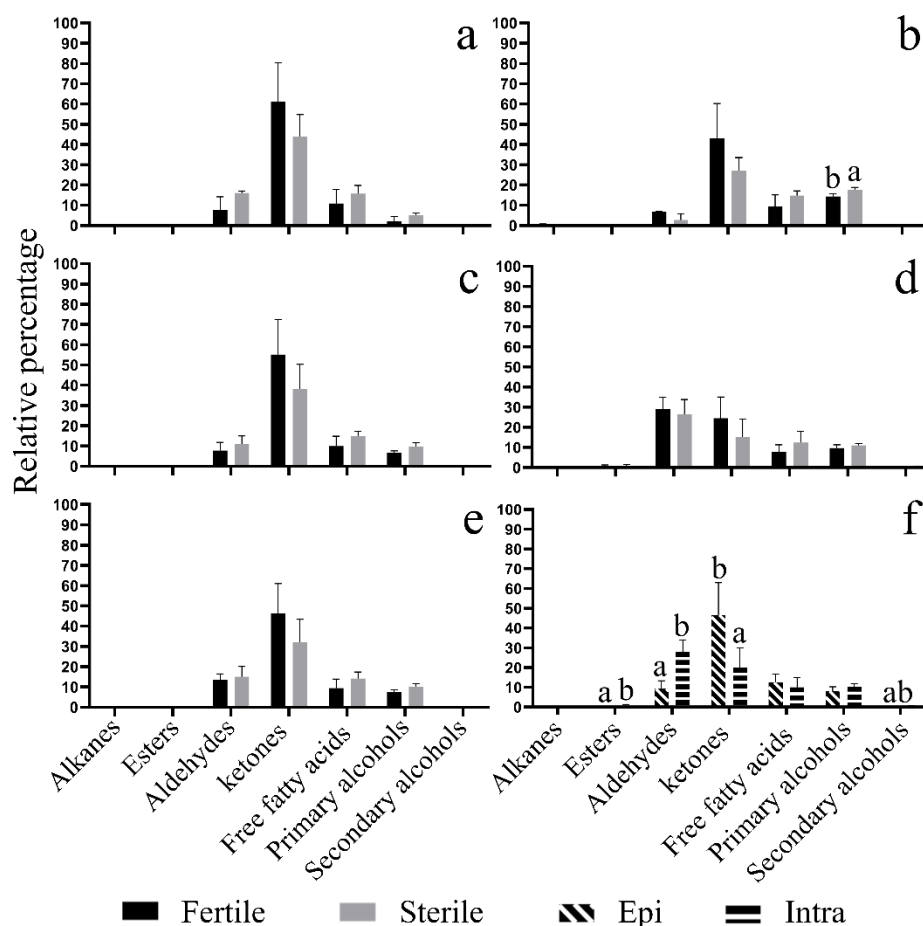
**Fig. 1.** Wax content (µg cm<sup>-2</sup>) of *Gleichenella pectinata* fronds in relation to the epicuticular abaxial (EpAb), and adaxial (EpAd) surfaces, epicuticular total (EpTo), intracuticular (Intra), total waxes of fertile and sterile fronds (Total), and epicuticular and intracuticular waxes of fertile + sterile fronds (Fe + St). Different letters indicate statistically significant differences between a pair of columns (letters were only shown in pairs of columns with significant differences).

### Chemical composition of the waxes

A total of 32 compounds were identified in *Gleichenella pectinata* waxes, belonging to seven different classes, as alkanes (C<sub>25</sub>-C<sub>27</sub>), esters (C<sub>34</sub>), aldehydes (C<sub>26</sub>-C<sub>32</sub>), ketones (C<sub>27</sub>-C<sub>31</sub>), free fatty acids (C<sub>14</sub>-C<sub>28</sub>), and primary (C<sub>18</sub>-C<sub>35</sub>) and secondary alcohols (C<sub>33</sub>-C<sub>35</sub>) (Table 1 and 2). Among the compounds detected in *G. pectinata* waxes, ketones, aldehydes, fatty acids, and primary alcohols were the most abundant classes (Fig. 2).

Only a few compounds among the 32 identified stood out in terms of their content in the waxes analyzed. The main compounds detected were nonacosan-10-one, octacosanal, and octacosanoic acid (Table 1 and 2). The variation in nonacosan-10-one and octacosanal content between the different waxes in *G. pectinata* was similar to that

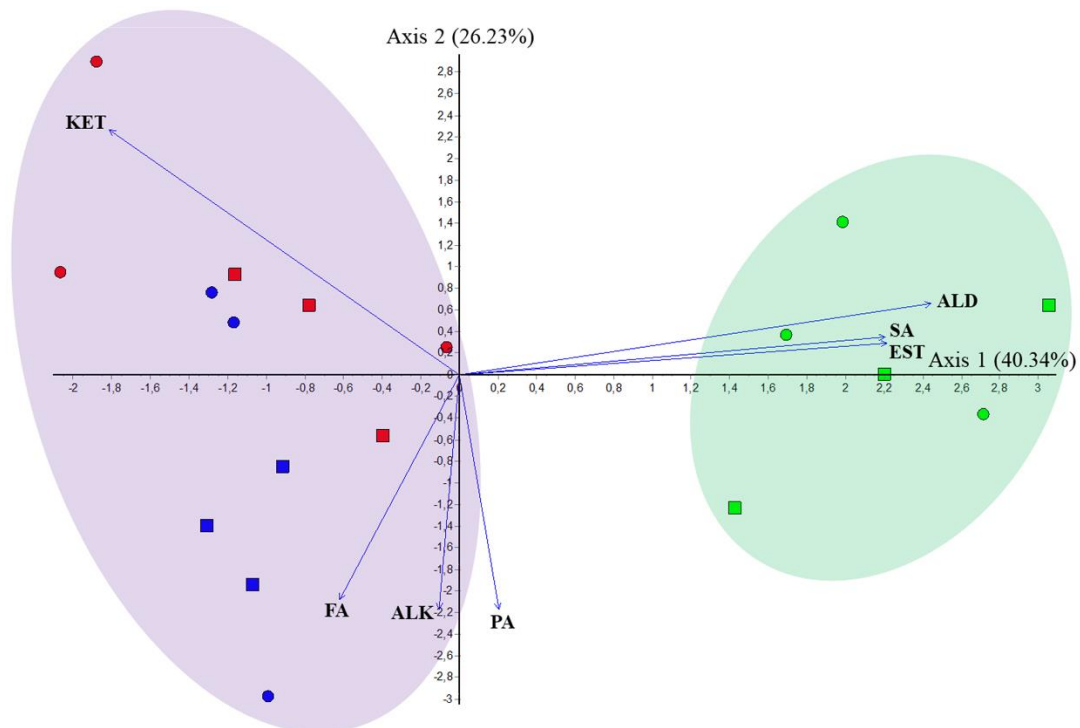
of their respective classes of ketones and aldehydes (Table 2 and 2S), while octacosanoic acid was more abundant in the epicuticular wax of sterile fronds.



**Fig. 2.** The relative abundance (%) of cuticular waxes compounds from fronds of *Gleichenella pectinata* in  $\text{CHCl}_3$  extracts of epicuticular abaxial (a), and adaxial (b) surfaces, epicuticular total (c), intracuticular (d), total waxes of fertile and sterile fronds (e), and epicuticular and intracuticular waxes of fertile + sterile fronds (f). Different letters indicate statistically significant differences between a pair of columns (letters were only shown in pairs of columns with significant differences).

The greatest differences in the wax chemical composition of *G. pectinata* were observed between epicuticular and intracuticular waxes. Epicuticular waxes contain a larger amount of ketones, while aldehydes, esters, and secondary alcohols are more abundant in intracuticular waxes ( $p < 0.05$ ; Fig. 2f and Table 1S). Principal component analysis (PCA; Fig. 3) using the relative percentage of the wax classes shows the distinction between intra and epicuticular waxes regardless of the surface or fertile or

sterile status of the fronds. The first principal component (PC1) is positively influenced by aldehydes, esters, and secondary alcohols and explains 40.34% of the total variance, while the second principal component (PC2) is positively influenced by ketones and negatively by fatty acids, alkanes, and primary alcohols, with high explained variance (26.23%).



**Fig. 3.** Principal component analysis (PCA) based on the relative percentage of classes of compounds present in epicuticular waxes on the abaxial (red) and adaxial surfaces (blue) and in the intracuticular waxes (green) of fertile (circles) and sterile fronds (squares) of *Gleichenella pectinata*. Ket: ketones; FA: fatty acids; ALK: alkanes; PA: primary alcohols; ALD: aldehydes; SA: secondary alcohols; EST: esters.

### Wax Morphology

As shown in the SEM images of the adaxial surface of individual fertile and sterile fronds of *Gleichenella pectinata* (Fig. 4A and D), epicuticular wax exhibits an amorphous film-like morphology with crystalloids resembling sparsely distributed granules. The crystalloid morphology on the abaxial surface (Fig. 4B, C, and E) is quite distinct, with the presence of rod-like structures.

**Table 1.** The relative percentage of homologs identified in the cuticular waxes of fertile and sterile fronds of *Gleichenella pectinata*.

Class (number of homologs) Compound (carbon number)	Epi abaxial	Epi adaxial	Epi total	Intracuticular	Total
<b>Fertile fronds</b>					
<b>Alkanes (2)</b>					
Pentacosane (C25)	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.29	0.05 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.06
Heptacosane (C27)	0.09 ± 0.15	0.12 ± 0.21	0.10 ± 0.17	0.10 ± 0.17	0.10 ± 0.17
<b>Esters (1)</b>					
Hexacosyl octadecanoate (C34)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.91 ± 0.37	0.24 ± 0.05
<b>Aldehydes (4)</b>					
Hexacosanal (C26)	2.54 ± 0.93	1.92 ± 0.25	2.34 ± 0.66	5.64 ± 0.22	3.30 ± 0.26
Octacosanal (C28)*	5.05 ± 5.25a	4.81 ± 0.24a	5.24 ± 3.27a	16.65 ± 2.03a	8.61 ± 1.75a
Triacontanal (C30)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.99 ± 5.66	1.34 ± 1.18
Dotriacontanal (C32)	0.19 ± 0.32	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.22	0.89 ± 0.25	0.34 ± 0.18
<b>Ketones (3)</b>					
Heptacosan-10-one (C27)	2.93 ± 2.68	2.85 ± 2.47	2.87 ± 2.55	0.53 ± 0.47	2.11 ± 1.83
Nonacosan-10-one (C29)*	57.80 ± 17.43a	38.09 ± 15.37a	51.21 ± 15.30a	23.87 ± 10.13a	43.56 ± 13.21a
Hentriacontan-12-one (C31)	0.53 ± 0.18	2.14 ± 0.70	1.08 ± 0.24	0.15 ± 0.13	0.81 ± 0.17
<b>Free fatty acids (8)</b>					
Tetradecanoic acid (C14)	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.20	0.03 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.04
Pentadecanoic acid (C15)	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.13	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03
Hexadecanoic acid (C16)	2.24 ± 1.12	3.30 ± 2.35	2.51 ± 1.25	1.98 ± 1.27	2.33 ± 1.23
Octadecanoic acid (C18)	1.56 ± 0.86	2.65 ± 2.24	1.87 ± 1.18	1.98 ± 1.35	1.87 ± 1.18
Icosanoic acid (C20)	0.23 ± 0.21	0.43 ± 0.30	0.29 ± 0.21	0.34 ± 0.07	0.31 ± 0.17
Tetracosanoic acid (C24)	0.30 ± 0.27	0.22 ± 0.37	0.26 ± 0.29	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.22
Hexacosanoic acid (C26)	2.52 ± 4.36	0.00 ± 0.00	1.39 ± 2.41	0.00 ± 0.00	0.88 ± 1.51
Octacosanoic acid (C28)*	4.05 ± 2.20a	2.49 ± 0.27a	3.53 ± 1.63a	3.04 ± 5.26a	3.72 ± 2.05a
<b>Primary alcohols (12)</b>					
Octadecanol (C18)	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.10	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02
Icosanol (C20)	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.16	0.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03
Tetracosanol (C24)	0.90 ± 0.90	2.61 ± 0.70	1.54 ± 0.40	2.01 ± 0.65	1.71 ± 0.36
Pentacosanol (C25)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.08	0.02 ± 0.03
Hexacosanol (C26)	0.58 ± 0.61	3.21 ± 0.62	1.53 ± 0.19	2.52 ± 0.27	1.82 ± 0.24

<b>Class (number of homologs)</b>	<b>Epi abaxial</b>	<b>Epi adaxial</b>	<b>Epi total</b>	<b>Intracuticular</b>	<b>Total</b>
Compound (carbon number)					
Heptacosanol (C27)	0.09 ± 0.15	0.06 ± 0.10	0.08 ± 0.13	0.15 ± 0.13	0.11 ± 0.11
Octacosanol (C28)	0.12 ± 0.20	2.43 ± 0.36	0.94 ± 0.13	2.08 ± 1.02	1.22 ± 0.27
Triacontanol (C30)	0.09 ± 0.15	1.50 ± 0.49	0.57 ± 0.18	1.43 ± 1.07	0.77 ± 0.34
Hentriacontanol (C31)	0.25 ± 0.22	1.45 ± 1.25	0.72 ± 0.40	0.43 ± 0.37	0.64 ± 0.34
Dotriacontanol (C32)	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.27	0.05 ± 0.08	0.16 ± 0.27	0.07 ± 0.11
Tritriacontanol (C33)	0.09 ± 0.16	2.70 ± 0.14	1.02 ± 0.09	0.64 ± 0.12	0.90 ± 0.03
Pentatriacontanol (C35)	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.20	0.03 ± 0.06	0.19 ± 0.19	0.08 ± 0.08
<b>Secondary alcohols (2)</b>					
Tritriacontan-14-ol (C33)	0.07 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.08	0.23 ± 0.20	0.11 ± 0.01
Pentatriacontan-16-ol (C35)	0.08 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.09	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.06
	<b>Sterile fronds</b>				
<b>Alkanes (2)</b>					
Pentacosane (C25)	0.06 ± 0.09	0.06 ± 0.09	0.06 ± 0.09	0.03 ± 0.05	0.05 ± 0.08
Heptacosane (C27)	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.05	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02
<b>Esters (1)</b>					
Hexacosyl octadecanoate (C34)	0.15 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.09	0.75 ± 0.69	0.24 ± 0.11
<b>Aldehydes (4)</b>					
Hexacosanal (C26)	3.85 ± 0.42	1.12 ± 0.06	2.79 ± 0.61	4.70 ± 0.53	3.29 ± 0.62
Octacosanal (C28)*	11.71 ± 0.73a	1.58 ± 2.73a	7.78 ± 3.36a	16.83 ± 0.47a	10.10 ± 2.75a
Triacontanal (C30)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.68 ± 6.38	1.05 ± 1.81
Dotriacontanal (C32)	0.46 ± 0.14	0.07 ± 0.12	0.29 ± 0.13	1.28 ± 0.21	0.55 ± 0.15
<b>Ketones (3)</b>					
Heptacosan-10-one (C27)	1.31 ± 0.66	1.85 ± 0.49	1.51 ± 0.50	0.20 ± 0.22	1.17 ± 0.44
Nonacosan-10-one (C29)*	42.70 ± 10.11a	23.51 ± 6.4a	35.86 ± 12.31a	15.11 ± 8.52a	30.42 ± 11.25a
Hentriacontan-12-one (C31)	0.00 ± 0.00	1.65 ± 0.32	0.66 ± 0.53	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.40
<b>Free fatty acids (8)</b>					
Tetradecanoic acid (C14)	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.16	0.10 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.01
Pentadecanoic acid (C15)	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.01
Hexadecanoic acid (C16)	2.94 ± 0.60	4.11 ± 0.71	3.19 ± 0.29	2.02 ± 0.66	2.90 ± 0.12
Octadecanoic acid (C18)	2.68 ± 0.63	2.57 ± 0.42	2.49 ± 0.27	1.96 ± 0.90	2.37 ± 0.03
Icosanoic acid (C20)	0.40 ± 0.16	0.41 ± 0.17	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.08	0.37 ± 0.02
Tetracosanoic acid (C24)	0.56 ± 0.09	0.27 ± 0.06	0.45 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.41 ± 0.01

<b>Class (number of homologs)</b>	<b>Epi abaxial</b>	<b>Epi adaxial</b>	<b>Epi total</b>	<b>Intracuticular</b>	<b>Total</b>
Compound (carbon number)					
Hexacosanoic acid (C26)	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.88	1.49 ± 1.59	0.00 ± 0.00	1.12 ± 1.19
Octacosanoic acid (C28)*	9.13 ± 2.71a	3.54 ± 0.57b	6.73 ± 0.40b	7.76 ± 6.75a	6.90 ± 1.94a
<b>Primary alcohols (12)</b>					
Octadecanol (C18)	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.11	0.06 ± 0.10	0.07 ± 0.06	0.06 ± 0.06
Icosanol (C20)	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.09	0.05 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04
Tetracosanol (C24)	2.61 ± 0.33	1.92 ± 1.71	2.42 ± 0.65	1.58 ± 0.59	2.19 ± 0.44
Pentacosanol (C25)	0.06 ± 0.10	0.10 ± 0.08	0.07 ± 0.08	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.06
Hexacosanol (C26)	1.93 ± 0.28	3.66 ± 0.68	2.52 ± 0.17	2.42 ± 0.39	2.49 ± 0.12
Heptacosanol (C27)	0.14 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.08	0.15 ± 0.03	0.10 ± 0.05
Octacosanol (C28)	0.37 ± 0.06	2.05 ± 1.95	1.06 ± 0.67	2.56 ± 0.67	1.45 ± 0.54
Triaccontanol (C30)	0.00 ± 0.00	2.93 ± 0.66	1.00 ± 0.37	2.17 ± 1.01	1.31 ± 0.49
Hentriacontanol (C31)	0.12 ± 0.20	2.80 ± 0.32	1.11 ± 0.43	0.67 ± 0.13	1.00 ± 0.29
Dotriacontanol (C32)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.24 ± 0.41	0.06 ± 0.10
Tritriacontanol (C33)	0.00 ± 0.00	3.71 ± 0.89	1.25 ± 0.39	0.80 ± 0.06	1.14 ± 0.28
Pentatriacontanol (C35)	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.18	0.07 ± 0.11	0.25 ± 0.04	0.12 ± 0.09
<b>Secondary alcohols (2)</b>					
Tritriacontan-14-ol (C33)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.03	0.08 ± 0.01
Pentatriacontan-16-ol (C35)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.09	0.07 ± 0.02

\*Only major compounds were submitted to pairwise comparison between fertile and sterile fronds; for example, the Fertile Epi abaxial and Sterile Epi abaxial columns. Different letters between the correspondent values from fertile and sterile fronds indicate statistically significant differences (mean ± standard deviation).

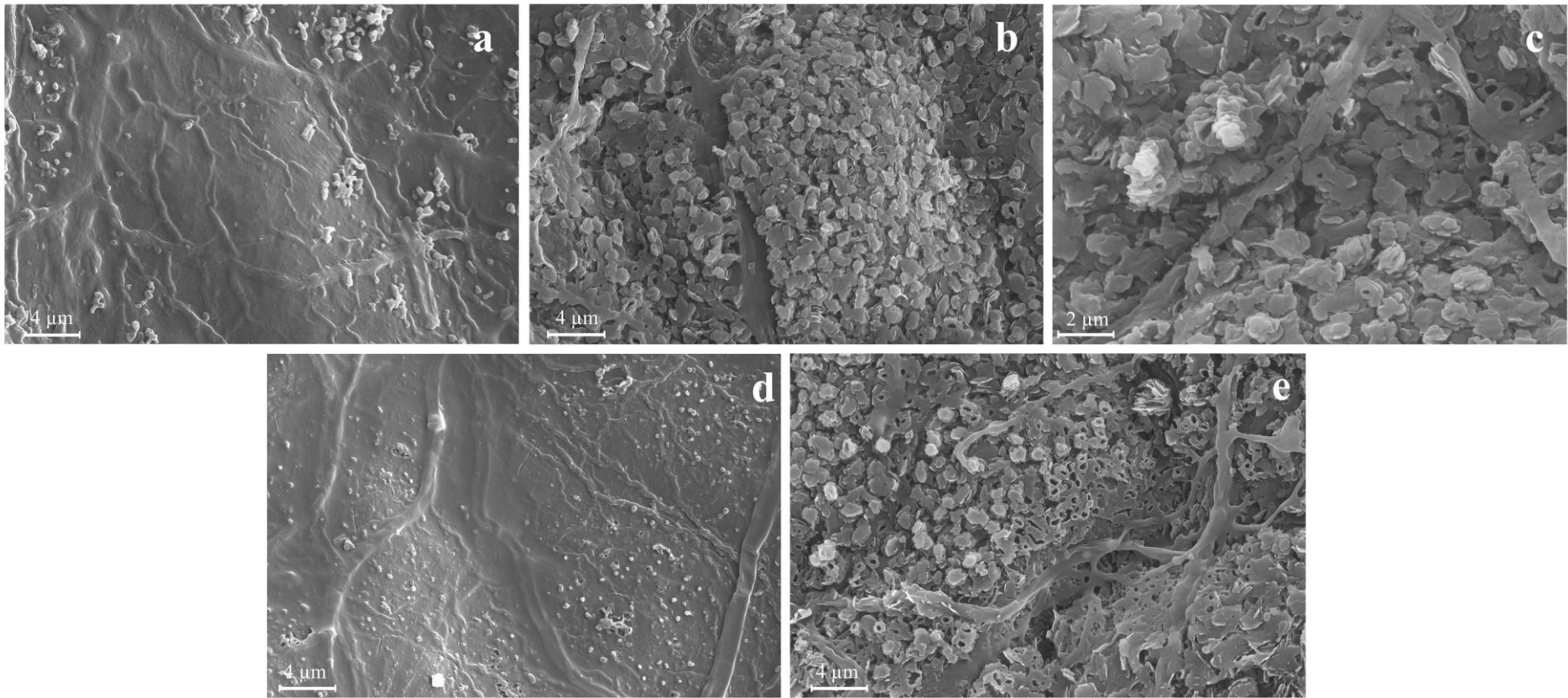
**Table 2.** The relative percentage of homologs identified in the epicuticular (adaxial + abaxial) and intracuticular waxes of fertile + sterile fronds of *Gleichenella pectinata*.

<b>Class (number of homologs)</b> Compound (carbon number)	<b>Epicuticular</b> <b>(abaxial + adaxial)</b>	<b>Intracuticular</b>
<b>Alkanes (2)</b>		
Pentacosane (C25)	0.05 ± 0.08	0.02 ± 0.03
Heptacosane (C27)	0.06 ± 0.11	0.05 ± 0.12
<b>Esters (1)</b>		
Hexacosyl octadecanoate (C34)	0.03 ± 0.06	0.83 ± 0.51
<b>Aldehydes (4)</b>		
Hexacosanal (C26)	2.57 ± 0.62	5.17 ± 0.63
Octacosanal (C28)*	6.51 ± 3.28a	16.7 ± 1.32b
Triacosanal (C30)	0.00 ± 0.00	4.84 ± 5.54
Dotriacosanal (C32)	0.21 ± 0.18	1.08 ± 0.29
<b>Ketones (3)</b>		
Heptacosan-10-one (C27)	2.19 ± 1.80	0.37 ± 0.37
Nonacosan-10-one (C29)*	43.53 ± 15.00b	19.5 ± 9.65a
Hentriacosan-12-one (C31)	0.87 ± 0.43	0.07 ± 0.11
<b>Free fatty acids (8)</b>		
Tetradecanoic acid (C14)	0.07 ± 0.05	0.00 ± 0.00
Pentadecanoic acid (C15)	0.05 ± 0.03	0.00 ± 0.00
Hexadecanoic acid (C16)	2.85 ± 0.89	2.00 ± 0.90
Octadecanoic acid (C18)	2.18 ± 0.84	1.97 ± 1.02
Icosanoic acid (C20)	0.32 ± 0.14	0.37 ± 0.07
Tetracosanoic acid (C24)	0.35 ± 0.21	0.28 ± 0.01
Hexacosanoic acid (C26)	1.44 ± 1.83	0.00 ± 0.00
Octacosanoic acid (C28)*	5.12 ± 2.05a	5.40 ± 5.99a
<b>Primary alcohols (12)</b>		
Octadecanol (C18)	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05
Icosanol (C20)	0.04 ± 0.05	0.00 ± 0.00
Tetracosanol (C24)	1.98 ± 0.68	1.79 ± 0.60
Pentacosanol (C25)	0.04 ± 0.06	0.08 ± 0.06

<b>Class (number of homologs)</b>	<b>Epicuticular (abaxial + adaxial)</b>	<b>Intracuticular</b>
Compound (carbon number)		
Hexacosanol (C26)	2.02 ± 0.56	2.47 ± 0.31
Heptacosanol (C27)	0.08 ± 0.10	0.15 ± 0.08
Octacosanol (C28)	0.10 ± 0.41	2.32 ± 0.81
Triacontanol (C30)	0.80 ± 0.35	1.80 ± 1.01
Hentriacontanol (C31)	0.91 ± 0.43	0.55 ± 0.28
Dotriacontanol (C32)	0.03 ± 0.05	0.20 ± 0.31
Tritriacontanol (C33)	1.13 ± 0.28	0.71 ± 0.12
Pentatriacontanol (C35)	0.05 ± 0.08	0.22 ± 0.13
<b>Secondary alcohols (2)</b>		
Tritriacontan-14-ol (C33)	0.02 ± 0.06	0.27 ± 0.13
Pentatriacontan-16-ol (C35)	0.02 ± 0.06	0.24 ± 0.08

\*Only major compounds were submitted to pairwise comparison between Epicuticular and Intracuticular waxes. Different letters between each column pair indicate statistically significant differences (mean ± standard deviation).





**Fig. 4.** Electron micrographs (18,000x magnification) of the adaxial surface of fertile (a) and sterile fronds (d) and the abaxial surface of fertile (b) and sterile fronds (e) of *Gleichenella pectinata*. Electron micrograph (37,000x magnification) of the abaxial surface of fertile fronds (c). These images demonstrate the film-like (a and d) and crystalloid morphology (b, c, and e) of *G. pectinata* epicuticular waxes.

## DISCUSSION

### Wax content and chemical composition

The average overall wax content of *Gleichenella pectinata* fronds was greater than that recorded in fern species from temperate zones (Guo et al. 2018), but much lower when compared to that of some Mexican tropical species grown under heavy rainfall (Cerón-Carpio et al. 2019). Although *G. pectinata* and the Mexican species of ferns grown in a Tropical zone, the Mexican species according to the authors have a thicker cuticular waxes layer to protect them against nutrient leaching under the heavy rainfall of the collect site in Mexico (Cerón-Carpio et al. 2019). On the other hand, experimentally, high temperatures and solar radiation levels can stimulate greater wax production (Shepherd and Griffiths 2006). Given that *G. pectinata* was collected in a transition zone between tropical and temperate climates, the wax content found was higher than that of temperate fern species and lower than the levels of tropical species grown under heavy rainfall. Despite the wax content of *G. pectinata* have an expected range for the climate in which it was collected in comparison to the other fern species, future studies with more species are necessary to better understand the influence of abiotic factors on wax content in this lineage of plants.

Despite the abaxial, adaxial and total epicuticular wax contents between fertile and sterile fronds of *G. pectinata* did not differ, for *Equisetum* species, the presence of structures linked to spore production influenced the wax classes contents in *E. telmateia* and *E. arvense*. Although in *E. sylvaticum* the differences in wax classes content between fertile and sterile branches were minimal probably due to the morphological similarity between the fertile and sterile sprouts before the release of the spores by the fertile sprouts (Brune and Haas 2011). The same could be explained for *G. pectinata* with their monomorphic leaves, morphologically the fertile and sterile fronds are similar after the release of the spores by the fertile fronds, so the wax production could not be affected in relation to a fertile or sterile state (Moran 2019).

Although cuticular wax composition has been shown as more important than wax content in the effectiveness of the barrier against water loss in flowering plants (Riederer and Schreiber 2001; Oliveira et al. 2003; Grünhofer et al. 2022), the greater

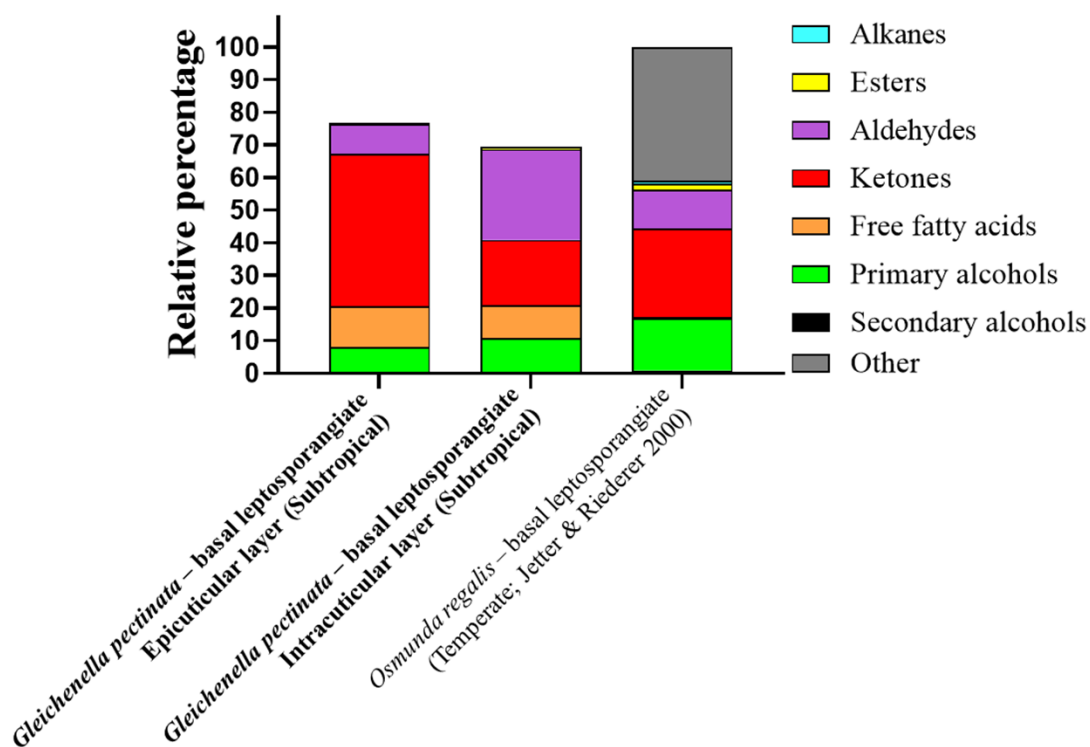
accumulation of intracuticular wax of *G. pectinata* may provide better water loss protection in this fern, once intracuticular waxes have been particularly described as an important water barrier in the cuticle for some species (Zeisler and Schreiber 2016; Zeisler-Diehl et al. 2018). However, further research is needed to elucidate this point.

As observed for wax content, there was little variation in class composition between fertile and sterile fronds and between abaxial and adaxial epicuticular wax layers in general (Fig. 2). To the best of our knowledge, there are no data on a detailed analysis of cuticular wax composition in ferns. However, considerable quantitative and qualitative similarity has been reported between the abaxial and adaxial surfaces of *Secale cereale* L. leaves (Poales; Ji and Jetter 2008).

Wax compounds from alkanes, esters, aldehydes, ketones, alcohols, and free fatty acids have been already described for other species in Polypodiopsida. The relative abundances of ketones, aldehydes, and primary alcohols, the main classes of compounds found in *G. pectinata* wax, were very similar to other basal leptosporangiate species, *Osmunda regalis* (Osmundales), except for the high content of free fatty acids in *G. pectinata* and some unusual compounds found in *O. regalis* (Fig. 5; Jetter and Riederer 2000). However, the chemical profile of waxes of *G. pectinata* was very different in relation to the others described for eusporangiate and recent leptosporangiate species (Brune and Haas 2011; Guo et al. 2018; Cerón-Carpio et al. 2019), mainly by the low contents of ketones in these groups. The abaxial surface of *G. pectinata* fronds is characterized as glaucous and its cuticle waxes accumulated great amounts of ketones (Table 1), a class of wax compounds related to the glaucous appearance in leaves of *Thellungiella halophila* (C.A.Meyer) O.E.Schultz (Teusink et al. 2002) and in wheat (*Triticum* L.) in the form of diketones (Zhang et al. 2015; Su et al. 2020).

The greatest differences in the wax chemical composition of *G. pectinata* were the large amounts of ketones in epicuticular wax whereas the aldehydes were more abundant in intracuticular waxes. There is no data in the literature for other fern species, but differences in foliar intra and epicuticular wax composition have been reported in angiosperms such as blackberry (*Rubus fruticosus* L.; Haas and Rentschler 1984), *Rosa*

*canina* L. (Buschhaus et al. 2007), and *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (van Maarseveen and Jetter 2009). The large proportion of aldehydes in intracuticular waxes, a class previously described as an efficient barrier against water loss in *Citrus* (Zou et al. 2022), may reinforce the importance of this wax layer in water loss resistance in *G. pectinata*.



**Fig. 5.** Mean relative abundance (%) of compound classes from epicuticular and intracuticular waxes of the fronds of *Gleichenella pectinata* in relation to *Osmunda regalis*, another basal leptosporangiate fern. Other compounds (the gray bar) refer to a mixture of different homologs of diketones, ketols, alkanediols, keto-alcohols, keto-aldehydes, and keto-alkylesters.

The nonacosan-10-one, octacosanal, and octacosanoic acid, the main homologues found in *G. pectinata* wax, are common compounds found in homologous series of plant waxes of different plant lineages (Barthlott et al. 2017). Nonacosan-10-one, octacosanal and octacosanoic acid are also important compounds identified in the frond wax of *O. regalis* (Jetter and Riederer 2000). Octacosanal was also the major aldehyde in *E. sylvaticum* waxes, while octacosanoic acid was also the main fatty acid described for different *Equisetum* species (Brune and Haas 2011), as well as for *Polypodium glycyrrhiza* and *Polystichum munitum* (Kaulf.) C.Presl (Guo et al. 2018).

Nonacosan-10-one has been reported in the wax of *Gymnocarpium dryopteris* fronds, but in low quantities when compared to other isomers (Guo et al. 2018).

### **Wax morphology**

The rod-like epicuticular crystalloids found in the abaxial leaf surface have been associated with rich ketone waxes, as described in *Liriodendron tulipifera* (Gülz et al. 1992). Waxes on the abaxial surface of *Gleichenella pectinata* are rich in ketones, with fertile and sterile fronds containing  $61.25 \pm 19.08$  and  $44.01 \pm 10.77\%$  respectively, reinforcing that ketone accumulation in waxes is linked to the formation of rod-like crystalloids (Barthlott et al. 1998; Barthlott et al. 2017). The *G. pectinata* pinnae are characterized to have a glabrous adaxial surface and a glaucous abaxial surface (Mickel and Smith 2004; Prado 2004) but no differences were found in wax contents of both surfaces (Fig. 1). According to Laskoś et al. (2021) different wax crystals morphology may result in a glabrous (e.g., platelet-like crystalloids) or glaucous appearance (e.g., tubule-like crystalloids), therefore the glabrous surface found for *G. pectinata* pinnae could be related to the wax crystalloids found in the abaxial surface. The glaucousness found in abaxial surface of pinnae may be also related to water loss reduction as well as described for wheat (Zhang et al. 2015).

This study provides new data on the chemical composition of waxes in a fern species hitherto not studied. Our data indicate that the reproductive characteristic of *G. pectinata* fronds does not seem to influence waxes. The chemical composition of intra and epicuticular waxes differ primarily in the balance between aldehydes and ketones. The high abundance of a ketone homologue on the abaxial surface of the fronds, may be related to the formation of waxy crystalloids. The high aldehyde content in intracuticular waxes may be linked to prevention of water loss through the cuticle. Chemical similarities observed between *G. pectinata* and *Osmunda regalis*, two basal leptosporangiate lineages, distinguish these species from eusporangiate and recent leptosporangiate ferns. However, further research is needed with other species in order to better understand the lack of variation between fertile and sterile fronds and the role of intra and epicuticular waxes in ferns.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – process number: 140085/2019-0) for the doctoral research grant awarded, Mourisa Ferreira and Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna for their assistance throughout the study, and SEM operator Irwandro Pires.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

LPR and DYACS designed the study and wrote the original draft of the article, RH and JP played a crucial role in collecting and identifying the botanic material. All the authors prepared and reviewed the article.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Alcerito T, Barbo FE, Negri G, Santos DYAC, Meda CI, Young MCM, Chávez D, Blatt, CT (2002) Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochem Syst Ecol* 30:677–683
- Barthlott W, Mail M, Bhushan B, Koch K (2017) Plant surfaces: structures and functions for biomimetic innovations. *Nano-micro Lett* 9:1–40
- Barthlott W, Neinhuis C (1997) Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202:1–8
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot J Linn Soc* 126:237–260

- Bauer H, Gallmetzer C, Sato T (1991) Phenology and photosynthetic activity in sterile and fertile sporophytes of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. *Oecologia* 86:159–162
- Bernard A, Joubès J (2013) *Arabidopsis* cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. *Prog Lip Res*, 52:110–129
- Brune T, Haas K (2011) *Equisetum* species show uniform epicuticular wax structures but diverse composition patterns. *AoB Plants* 2011:plr009. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr009>
- Buschhaus C, Herz H, Jetter R (2007) Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Ann Bot* 100:1557–1564
- Buschhaus C, Jetter R (2011) Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? *J Exp Bot* 62:841–853
- Cerón-Carpio AB, Pérez-García B, Villanueva JLM, Kiel-Martínez AL, Espinosa-Matias S, Guerrero-Analco JA, Mehltreter K (2019) Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico. *Biochem Syst Ecol* 85:13–20
- Chiou W-L, Martin CE, Lin T-C, Hsu C-C, Lin S-H, Lin K-C (2005) Ecophysiological differences between sterile and fertile fronds of the subtropical epiphytic fern *Pyrrosia lingua* (Polypodiaceae) in Taiwan. *Am Fern J* 95:131–140
- do Monte VHA, França IB, da Gama SVG, Chirol ADA (2021) Distribuição geográfica de *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching (Gleicheniaceae) na porção meridional da trilha Abraão-Dois Rios, Ilha Grande, Angra dos Reis–RJ: Causas, impactos e funções ecológicas. *Humboldt-Revista de Geografia Física e Meio Ambiente* 1:e60218
- Ensikat HJ, Boese B, Mader W, Barthlott W, Koch K (2006) Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies. *Chem Phys Lipids* 144:45–59

- Grünhofer P, Herzig L, Sent S, Zeisler-Diehl VV, Schreiber L (2022) Increased cuticular wax deposition does not change residual foliar transpiration. *Plant Cell Environ* 45:1157–1171
- Guo Y, Li JJ, Busta L, Jetter R (2018) Coverage and composition of cuticular waxes on the fronds of the temperate ferns *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crispera*, *Polypodium glycyrrhiza*, *Polystichum munitum* and *Gymnocarpium dryopteris*. *Ann Bot* 122:555–568
- Gülz PG, Müller E, Schmitz K, Marner FJ, Güth S (1992) Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*. *Z Naturf C* 47:516–526
- Haas K, Rentschler I (1984) Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in blackberry leaves: ultrastructural and chemical evidence. *Plant Sci Lett* 36:143–147
- Holloway PJ, Jeffree CE (2017) Epicuticular Waxes. In: Thomas B, Murray BG, Murphy DJ (eds) *Encyclopedia of applied plant sciences*, vol 2. Academic Press, Oxford, pp 374–386. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00075-7>
- Jeffree CE (2006) The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C (eds) *Annual plant reviews*, vol 23: *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 11–110. <https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch2>
- Jetter R, Riederer M (2000) Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *J Chem Ecol* 26:399–412
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell Environ* 23:619–628
- Ji X, Jetter R (2008) Very long chain alkylresorcinols accumulate in the intracuticular wax of rye (*Secale cereale* L.) leaves near the tissue surface. *Phytochemistry* 69:1197–1207



- Juniper BE, Jeffree CE (1983) Plant surfaces. Butler & Tanner Ltd, London.  
<https://doi.org/10.2307/2806628>
- Koch K, Barthlott W (2009) Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philos Trans Royal Soc A Math Phys Eng Sci* 367:1487–1509
- Kunst L, Samuels AL (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res* 42:51–80
- Kunst L, Samuels L (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr Opin Plant Biol* 12:721–727
- Laskoś K, Czyczyło-Mysza IM, Dziurka M, Noga A, Goralska M, Bartyzel J, Myskow B (2021) Correlation between leaf epicuticular wax composition and structure, physio-biochemical traits and drought resistance in glaucous and non-glaucous near-isogenic lines of rye. *Plant J* 108:93–119
- Lee P-H, Huang Y-M, Chiou W-L (2018) Fern phenology. In: Fernández H (ed.) *Current Advances in Fern Research*, Springer, Oviedo-Spain, pp 381–399.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_18)
- Lima LV, Salino A (2018) The fern family Gleicheniaceae (Polypodiopsida) in Brazil. *Phytotaxa* 358:199–234
- Matos TM, Cruz R, Peralta DF, Melo-de-Pinna GFDA, Santos DYACD (2022) Cuticle structure and chemical composition of waxes in *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk (Notothyladaceae, Anthocerotophyta). *Front Plant Sci* 13:785812
- Moran RC (2019) American genera of ferns and lycophytes – a guide for students. *Version 2.1*
- Mickel JT, Smith AR (2004) The pteridophytes of Mexico. *Mem New York Bot Gard* 88:1-1054
- Oliveira AF, Meirelles ST, Salatino A (2003) Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *An Acad Bras Cienc* 75:431–439

- Oliveira AF, Salatino A (2000) Major constituents of the foliar epicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. *Z Naturf C* 55:688–692
- Palacios CEJ, Negri G, Salatino A (2015) Esters and other constituents of the foliar cuticular wax of a soybean variety. *Biochem Syst Ecol* 63:198–200
- PPG I (2016) A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *J Syst Evol* 54:563–603
- Prado J (2004) Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Pteridophyta*: 8. Gleicheniaceae. *Hoehnea* 31:791–800
- Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR, Cranfill R (2004) Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *Am J Bot* 91:1582–1598
- Riedel M, Eichner A, Jetter R (2003) Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* 218:87–97
- Riederer M, Müller C (eds) (2008) *Biology of the Plant Cuticle*. *Annu Plant Rev*, vol 23. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 10.1002/9780470988718
- Riederer M, Schreiber L (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* 52:2023–2032
- Santos DY, Ferreira MJ, Matos TM, Sala-Carvalho WR, Anselmo-Moreira F, Roma LP, Carvalho JCS, Peña-Hidalgo M, French K, Waterman MJ, Robinson AS, Furlan CM (2021) UV-B and drought stress influenced growth and cellular compounds of two cultivars of *phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). *Photochem Photobiol* 97:166–179
- Shepherd GJ (2010) *Fitopac 2.1: Tutorial básico*. Unicamp, Campinas-SP
- Shepherd T, Griffiths DW (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171:469–499
- Su R, Chen L, Wang Z, Hu Y (2020) Differential response of cuticular wax and photosynthetic capacity by glaucous and non-glaucous wheat cultivars under mild and severe droughts. *Plant Physiol Biochem* 147:303–312

- Tafolla-Arellano JC, González-León A, Tiznado-Hernández ME, Zacarías García L, Báez-Sañudo R (2013) Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev Fitotec Mex* 36:3–12
- Teusink RS, Rahman M, Bressan RA, Jenks MA (2002) Cuticular waxes on *Arabidopsis thaliana* close relatives *Thellungiella halophila* and *Thellungiella parvula*. *Int J Plant Sci* 163:309–315
- van Maarseveen C, Jetter R (2009) Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. *Phytochemistry* 70:899–906
- Watkins Jr JE, Churchill AC, Holbrook NM (2016) A site for sori: ecophysiology of fertile–sterile leaf dimorphy in ferns. *Am J Bot* 103:845–855
- Zeisler V, Schreiber L (2016) Epicuticular wax on cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves does not constitute the cuticular transpiration barrier. *Planta* 243:65–81
- Zeisler-Diehl V, Müller Y, Schreiber L (2018) Epicuticular wax on leaf cuticles does not establish the transpiration barrier, which is essentially formed by intracuticular wax. *J Plant Physiol* 227:66–74
- Zhang Z, Wei W, Zhu H, Challa GS, Bi C, Trick HN, Li W (2015) W3 is a new wax locus that is essential for biosynthesis of  $\beta$ -diketone, development of glaucousness, and reduction of cuticle permeability in common wheat. *PLoS One* 10:e0140524
- Zou Y, Wan H, Yang H, Xu R, Xiang Y, Cheng Y (2022) C24 and C26 aldehydes are potential natural additives of coating for citrus water retention. *Food Chem* 397:133742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133742>

**SUPPLEMENTARY TABLES**

**Table 1S.** *p*-Values of the comparisons of compound classes identified in cuticular waxes of fertile and sterile fronds of *Gleichenella pectinata* from figures 1 and 2.

Groups	Wax content ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )			Wax classes relative percentage																				
				Alkanes			Esters			Aldehydes			Ketones			Free fatty acids			Primary alcohols			Secondary alcohols		
	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C
Fertile abaxial	0.51			0.00			*			0.70			0.96			0.62			0.69			0.00		
Sterile abaxial	0.26	0.69	0.36	0.00	0.77	1.00	*	0.37	0.51	0.78	0.21	0.09	0.99	0.49	0.24	0.30	0.58	0.35	0.22	0.36	0.10	*	0.37	0.51
Fertile adaxial	0.26			0.00			*	*	*	0.82			0.20			0.03			0.05			*		*
Sterile adaxial	0.13	0.75	0.55	0.00	0.54	1.00	*			0.01	0.42	0.10	0.14	0.52	0.21	0.47	0.62	0.40	0.60	0.88	0.04	*	*	*
Fertile epicuticular	0.38			0.00			*			0.61			0.67			0.29			0.27			0.00		
Sterile epicuticular	0.38	0.45	0.89	0.00	0.68	1.00	*	0.37	0.51	0.80	1.00	0.40	0.60	0.70	0.23	0.89	0.58	0.19	0.26	0.65	0.07	*	0.37	0.51
Fertile intracuticular	0.65			0.00			0.43			0.53			0.63			0.96			0.79			0.43		
Sterile intracuticular	0.81	0.82	0.08	0.00	0.55	1.00	0.75	0.50	0.74	0.11	0.90	0.65	0.92	0.84	0.31	0.49	0.70	0.28	0.29	0.54	0.29	0.01	0.62	0.30
Fertile total	0.84			0.00			0.05			0.17			0.96			0.12			0.18			0.42		
Sterile total	0.08	0.38	0.23	0.00	0.65	1.00	0.90	0.48	1.00	0.73	0.54	0.70	0.75	0.74	0.25	0.80	0.84	0.21	0.30	0.74	0.09	0.58	0.61	0.32
Epicuticular total	0.78			0.01			0.00			0.62			0.99			0.26			0.75			0.00		
Intracuticular total	0.96	0.48	0.05	0.00	0.64	0.94	0.52	0.00	0.02	0.33	0.40	0.00	0.95	0.31	0.01	0.82	0.44	0.40	0.96	0.45	0.06	0.24	0.29	0.01

N: Normality (Shapiro-Wilk); H: Homoscedasticity (Levene); C: Comparison (t-Student, Welch t-Student or Wilcoxo Rank-Sum). \* Test not performed because there is a group with only zeros. Values 0.01 are values equal to or lesser than 0.01.

**Table 2S.** *p*-Values of the comparisons of main homologs in cuticular waxes of fronds of *Gleichenella pectinata* from tables 1 and 2.

Main compounds	Octacosanal			Nonacosan-10-one			Octacosanoic acid		
	N	H	C	N	H	C	N	H	C
Fertile abaxial	0.87			0.80			0.94		
Sterile abaxial	0.24	0.17	0.10	0.97	0.53	0.26	0.02	0.95	0.07
Fertile adaxial	0.88			0.19			0.39		
Sterile adaxial	0.00	0.42	0.18	0.12	0.55	0.20	0.41	0.53	0.05
Fertile epicuticular	0.73			0.87			0.83		
Sterile epicuticular	0.70	0.98	0.40	0.53	0.77	0.25	0.47	0.23	0.03
Fertile intracuticular	0.00			0.61			0.00		
Sterile intracuticular	0.50	0.51	0.89	0.91	0.86	0.32	0.19	0.83	0.35
Fertile total	0.47			0.89			0.62		
Sterile total	0.76	0.60	0.47	0.69	0.83	0.26	0.45	0.93	0.12
Epicuticular total	0.65			1.00			0.38		
Intracuticular total	0.13	0.01	0.00	0.94	0.41	0.01	0.03	0.00	0.92

N: Normality (Shapiro-Wilk); H: Homoscedasticity (Levene); C: Comparison (t-Student, Welch t-Student or Wilcoxo Rank-Sum). Values 0.01 are values equal to or lesser than 0.01.

## CAPÍTULO 3

### **Composição química das ceras cuticulares de frondes de diferentes espécies de Polypodiopsida do Brasil e sua implicação quimiotaxonômica**

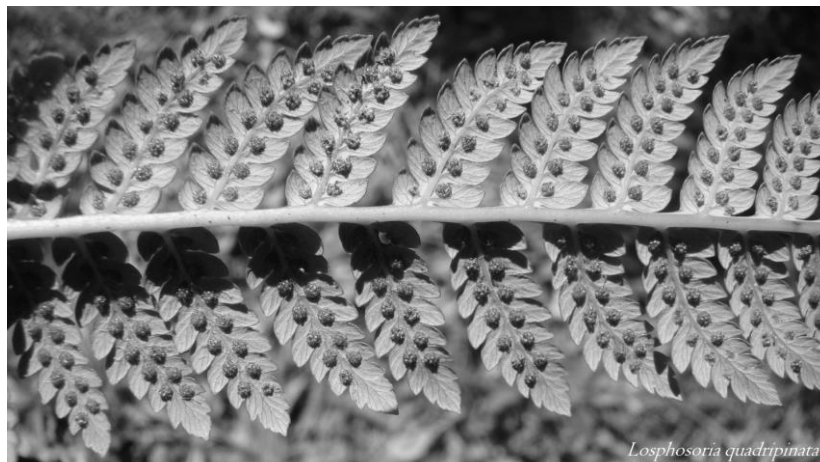
Este capítulo será formatado para ser publicado em um dos periódicos a seguir: *Annals of Botany* (IF = 5,350), *Biochemical Systematics and Ecology* (IF = 1,460), *Brazilian journal of Botany* (IF = 1,320) ou *American Fern Journal* (IF = 0,850).

Este capítulo teve como colaboradores:

Regina Yoshie Hirai<sup>1</sup>

Jefferson Prado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), Av. Miguel Estéfano 3687, São Paulo, SP 04301-012, Brazil.



## RESUMO

Até o momento o estudo das ceras cuticulares da linhagem das samambaias recebeu pouca atenção em relação a outros grupos de plantas. As samambaias representam a segunda maior linhagem de plantas vasculares e suas ceras têm apresentado uma diversidade química muito grande. Sendo assim, esse estudo investigou a composição química das ceras foliares de 21 espécies de samambaias de praticamente todas as ordens de Polypodiopsida e também 2 espécies de licófitas tropicais nativas do Brasil. O teor de cera variou de  $3,76 \pm 0,57 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Selaginella muscosa* a  $58,63 \pm 2,91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Lophosoria quadripinnata*, sendo que as espécies de leptosporangiadas basais apresentaram os maiores teores com uma média de  $31,06 \pm 20,51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Ao todo foram identificados 94 compostos pertencendo a 13 classes diferentes mostrando que maquinário de síntese presente e já amplamente descrito para angiospermas também se encontra presente nas polipodiófitas. De modo geral as classes mais abundantes encontradas na grande maioria das espécies foram os ácidos graxos livres chegando a uma proporção de 74% nas ceras de *Ophioglossum reticulatum* e as cetonas chegando a cerca de 50% em *Gleichenella pectinata*. Quimiotaxonomicamente as ceras das samambaias parecem não ser plásticas quanto ao tipo de esporângios e data de origem dos grupos, nem quanto ao hábito de vida. No entanto, espécies de Osmundaceae apresentam substâncias bastante particulares entre as Polypodiopsida, tal como compostos da classe dos cetóis (por exemplo 16-hidroxinonacosan-10-ona), sendo possíveis marcadores quimiotaxonomicos desse grupo. Este estudo contribui com a adição de grande quantidade de dados sobre este grupo de plantas ainda pouco estudado quanto a química das ceras cuticulares.

**Palavras-chave:** Cutícula, Lycopodiopsida, samambaias, plantas sem sementes.

## ABSTRACT

Cuticular wax analysis from fern lineages have received little attention compared to other plant groups. Ferns represent the second largest lineage of vascular plants and their waxes have shown a very large chemical diversity. Therefore, this study investigated the chemical composition of the frond waxes of 21 tropical species from almost all orders of Polypodiopsida and two species of tropical lycophytes native from Brazil. In general, the wax content ranged from  $3.76 \pm 0.57 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in *Selaginella muscosa* to  $58.63 \pm 2.91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in *Lophosoria quadripinnata*. Basal leptosporangiate species presented the highest contents of cuticular waxes with an average of  $31,06 \pm 20,51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . A total of 94 compounds belonging to 13 different classes, commonly found in angiosperms were identified, suggesting a conservative biosynthesis routes among vascular plants. In general, the most abundant classes found in the majority of species were free fatty acids, reaching a proportion of 74% in waxes of *Ophioglossum reticulatum*, and ketones, reaching about 50% in *Gleichenella pectinata*. No correlation was observed between wax composition and type of sporangia, origin periods or life habits for the studied plants. However, the detection of diols in *Psilotum* and ketols in *Osmunda* deserves more attention to confirm the chemotaxonomical potencial of these compounds for Psilotaceae and Osmundaceae, respectively. In conclusion, this study contributes with the addition of a large amount of data on fern wax chemical profile which is still little studied.

**Keywords:** Cuticle, Lycopodiopsida, ferns, seedless plants.



## INTRODUÇÃO

A epiderme de todos os tecidos aéreos das plantas expostas ao ambiente e que não tem desenvolvimento secundário é coberta por uma estrutura resistente e maleável de caráter hidrofóbico denominada de cutícula vegetal (Domínguez et al., 2011; Yeats & Rose, 2013). A cutícula é composta por uma matriz polimérica de cutina e cutano (Pollard et al., 2008) permeada e sobreposta por uma grande diversidade de compostos de caráter apolar lipofílicos denominada de ceras cuticulares. Os compostos de cera podem ser acíclicos como alcanos, ésteres, ácidos graxos livres, aldeídos, cetonas e álcoois primários e secundários com cadeias carbônicas que variam comumente de 20 a 60 carbonos e por diferentes compostos cíclicos como triterpenos, esteroides e também determinados derivados fenilpropânicos e flavonoides (Müller & Riederer, 2005). A mistura das classes químicas das ceras e o teor de cera podem variar entre as diferentes espécies por questões intrínsecas, mas também podem ser um reflexo dos estresses e condições do ambiente que a planta está inserida, dentre eles a temperatura e umidade (Shepherd & Griffiths, 2006; Jetter et al., 2006; Guo et al., 2017; Lewandowska et al., 2020). Entretanto, apesar destas variações, qualitativamente as ceras cuticulares como um todo demonstram ser bastante semelhantes entre si para a maioria das espécies que tiveram sua composição descrita, com classes químicas em sua maioria bastante estabelecidas (Buschhaus et al., 2007; Buschhaus & Jetter, 2011; Holloway & Jeffrey, 2017).

A principal função atribuída às ceras cuticulares é restringir a perda de água por transpiração não estomática (cuticular), principalmente quando os estômatos se encontram fechados (Grünhofer et al., 2022). Entretanto, ela desempenha outros importantes papéis como: evitar a formação de filmes de água na superfície dos tecidos, dificultando a formação de colônias de microrganismos e acúmulo de partículas; atenuar a incidência de radiações excessivas, tais como a ultravioleta, além de mediar interações de outros organismos com a planta, por exemplo, com os insetos (Riederer, 2006; Báez-Sañudo et al., 2013).

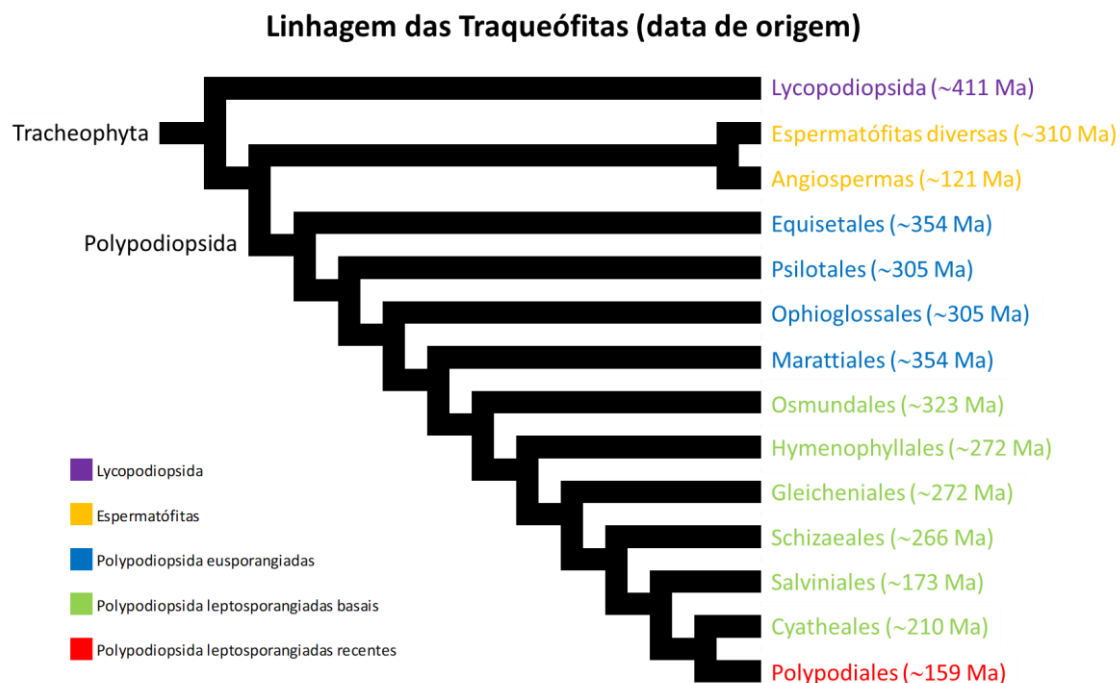
O conhecimento sobre as vias de biossíntese das ceras e componentes da cutícula, o transporte dos componentes de cera do meio intracelular para o extracelular,

a regulação genética, as funções da cutícula, a morfologia das ceras epicuticulares e a composição química dos compostos das ceras e monômeros da cutina (Gérard et al., 1992; Osman et al., 1995; Post-Beittenmiller, 1996; Bonaventure et al., 2004; Shepherd & Griffiths, 2006; Panikashvile et al., 2007; Pollard et al., 2008; Samuels et al., 2008; Kunst & Haslam, 2013; Yeats & Rose, 2013; Guo et al., 2018) são bem conhecidos, principalmente em espécies de angiospermas como *Arabidopsis ssp* ou espécies de valor econômico. Entretanto, para as outras linhagens vegetais, por exemplo linhagens de plantas mais basais como as briófitas e as polipodiófitas (Guo et al., 2018; Cerón-Carpio et al., 2019) esse conhecimento é bem pouco explorado.

As polipodiófitas (Polypodiopsida) compreendem uma linhagem monofilética com cerca de 10.500 espécies de plantas vasculares sem sementes, representando cerca de 5% das espécies de plantas vasculares, correspondendo à segunda maior linhagem desse grupo (PPG I, 2016). O clado Polypodiopsida é chamado informalmente de samambaias, mas engloba também um pequeno grupo de plantas conhecidas como cavalinhas (*Equisetum* L.; Smith et al., 2006; PPG I, 2016).

A linhagem das polipodiófitas pode ser dividida principalmente de acordo com o tipo de esporângio e com o período de sua origem (Figura 1). Considerando a origem das linhagens a partir dos registros fósseis e também das linhagens atuais, o grupo das eusporangiadas, como Equisetales (*Horsetails*; ~354 Ma), Psilotales (*Whisk ferns*; ~305 Ma), Marattioides (~354 Ma) e Ophioglossoides (~305 Ma) apresentam origem mais basal dentro da filogenia, datando da era Paleozoica entre os períodos Devoniano e Carbonífero (~350 Ma). Já as linhagens de leptosporangiadas tiveram origens em períodos distintos, com uma parte originando-se mais ancestralmente (grupo das leptosporangiadas basais) como Osmundales (~323 Ma), Hymenophyllales (*Filmy ferns*; ~272 Ma), Gleichenioides (~272 Ma), Schizaeoides (~266 Ma), Cyatheaes (*Tree ferns*; ~210 Ma) e Salviniaceae (*Water ferns*; ~173 Ma), também na era Paleozoica no período Carbonífero (~320 Ma), enquanto outra parte tem origem mais recente (grupo das leptosporangiadas recentes), como as famílias de Polipodiales *polypods* (~159 Ma) tal como Pteridaceae e Dennstaedtiaceae, com origem na era Mesozoica no período Jurássico (~160 Ma) e das Polipodiales *eupolypods* (~119 Ma) como Blechnaceae,

Dryopteridaceae e Polypodiaceae, que originaram-se próximo às angiospermas (~121 Ma) e partilharam do mesmo período de diversificação, que ocorreu na era Mesozoica durante o período Cretáceo (~100 Ma; Pryer et al., 2004; Schneider et al., 2004).



**Figura 1.** Representação da filogenia de Polypodiopsida e outras linhagens de traqueófitas com indicação de época aproximada de origem do grupo (modificado de Pryer et al., 2004; Schneider et al., 2004; Matsunaga & Tomescu, 2016).

No Brasil há registros de espécies de praticamente todas as famílias de polipodiófitas, com exceção de Cibotiaceae, Loxomataceae, Thyrsopteridaceae, Matoniaceae e Dipteridaceae (Flora do Brasil 2020, 2023). As polipodiófitas, assim como as licófitas, possuem grande importância para a flora brasileira ocorrendo em ambientes aquáticos e terrestres, principalmente nas regiões de Mata Atlântica e serranas, mas também podem estar presentes em matas de galeria e nas faixas tropicais e subtropicais do Cerrado, bem como na Amazônia (Prado, 1998; Prado et al., 2015). Além disso, algumas poucas espécies também podem ser encontradas no Pantanal, Caatinga e Pampas (Prado et al., 2015).

Ao todo foram encontrados 17 trabalhos que estudaram quimicamente as ceras de 54 espécies de polipodiófitas e 2 de licófitas, seja analisando todos seus componentes ou apenas uma de suas frações (Tabela 1S). Das 11 ordens descritas de polipodiófitas atuais, foram encontrados estudos de poucas espécies pertencendo a apenas oito

destas ordens, sendo elas: **Equisetales** (Brune & Haas, 2011; Yang et al., 2011), **Ophioglossales** (Bottari et al., 1972), **Marattiales** (Cerón-Carpio et al., 2019), **Osmundales** (Jetter & Riederer, 1999 e 2000; Bush & McInerney, 2013), **Schizaeales** (Bottari et al., 1972), **Salviniales** (Bottari et al., 1972; Barthlott et al., 1994; Cerman et al., 2009; Barthlott et al., 2010; Tricinci et al., 2015), **Cyatheaales** (Bottari et al., 1972; Franich et al., 1985; Tanaka et al., 1992; Bush & McInerney, 2013), **Polypodiales** (Bottari et al., 1972; Siems et al., 1996; Bush & McInerney, 2013; Manubolu et al., 2013; Guo et al., 2018; Cerón-Carpio et al., 2019). Já nas licófitas, apenas uma espécie de Selaginellales e uma de Lycopodiales foram estudadas quanto as ceras cuticulares (Kong et al., 2020).

De acordo com os dados levantados, de modo geral para a maioria das espécies de polipodiófitas e licófitas, foram encontradas nas ceras compostos pertencentes às classes dos triterpenos, esteroides, ésteres, alcanos, ácidos graxos, aldeídos, cetonas, álcoois primários e secundários, ressaltando que as principais vias de biossíntese encontradas para as espermatófitas e para as espécies não vasculares também estão presentes para as polipodiófitas (Guo et al., 2018). Essas classes encontradas nas ceras de samambaias são muito semelhantes qualitativamente com o descrito na literatura para as ceras de grande parte das angiospermas. Além disso, muitas destas classes também já foram descritas em linhagens mais basais de diferentes espécies de briófitas *sensu lato* (Haas, 1982; Xu et al., 2009; Busta et al., 2016a e b; Matos et al., 2021 e 2022). Entretanto, nas ceras foliares de algumas espécies de polipodiófitas foram encontradas algumas classes de compostos bastante peculiares que não são tão comuns, como por exemplo, em *Osmunda regalis* L. (Osmundales) foram encontrados homólogos pertencentes a classe dos dióis, cetóis,  $\beta$ -dicetonas e ceto-aldeídos (Jetter & Riederer, 1999; Jetter & Riederer, 2000). E em espécies de samambaias tropicais mexicanas foi descrita a presença de alguns fenólicos como ácido cinâmico e ácido 4-metil-benzoico (Cerón-Carpio et al., 2019).

Ademais, foram encontrados trabalhos intitulados como estudo de cera em samambaias, porém eles são realizados em uma pseudo cera, denominada de cera farinosa. A chamada cera farinosa é produto da exudação de agliconas de flavonoides

e de terpenoides a partir de tricomas glandulares na superfície abaxial das folhas presentes em diferentes gêneros de Pteridaceae. Essa secreção apresenta aspecto farináceo e pode possuir coloração branca ou amarela. Apesar de seu nome, está não é uma cera verdadeira em termos bioquímicos, pois não apresenta a mesma origem que as ceras cuticulares (Wollenweber et al., 1987; Wollenweber & Schneider, 2000; Lange, 2015).

A conquista do ambiente terrestre pelas plantas foi um grande evento evolutivo que ocorreu a cerca de 450 milhões de anos (Yeats & Rose, 2013). Esse fenômeno foi possível graças ao surgimento de estruturas e revestimentos que permitiram que as primeiras linhagens de plantas terrestres adquirissem certa independência da água (Yeats & Rose, 2013; Reanult et al., 2017). Dados apontam que o surgimento da cutícula deve ter ocorrido quase que concomitantemente com o início da conquista do ambiente terrestre pelas plantas e, devido a sua importância, essa estrutura foi mantida desde os grupos mais simples até os mais complexos, ocorrendo, pelo que se sabe, em todas as embriófitas (Judd et al., 2008; Budke et al., 2012; Busta et al., 2016a; Guo et al., 2018). Apesar de já existir um grande conhecimento sobre diversos aspectos da cutícula este conhecimento é restrito nas linhagens vegetais. Os estudos realizados com a composição química das ceras nos grupos mais ancestrais, por exemplo, em briófitas (Haas, 1982; Xu et al., 2009; Busta et al., 2016a e b) e samambaias (Brune & Haas, 2011; Guo et al., 2018; Cerón-Carpio et al., 2019), apontam que a composição geral, em termos de classes de substâncias, nesses grupos é muito semelhante com as angiospermas apesar da diferença de complexidade encontrada entre eles. Porém, a cutícula dessas linhagens menos complexas ainda é muito pouco estudada para que afirmações contundentes sejam feitas.

Neste contexto, acreditamos que este estudo pode contribuir para o avanço do conhecimento sobre a química e o papel evolutivo das ceras cuticulares de modo geral, principalmente em grupos pouco estudados de embriófitas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

O estudo foi realizado com um total de 23 espécies, destas 21 pertencem a 10 das 11 ordens de Polypodiopsida, não sendo amostrada apenas a ordem Marattiales, e duas ao grupo externo das Lycopodiopsidas (Tabela 1). Frondes e caules verdes saudáveis, completamente expandidos e sem avarias foram coletados de diferentes indivíduos ou pools de indivíduos para formar as amostras de cada espécie.

Esses indivíduos foram coletados na zona tropical brasileira, principalmente no município de Salesópolis (São Paulo, Brasil), dentro de uma reserva de Mata Atlântica denominada de Estação Biológica de Boraceia (aproximadamente em -23.6367, -45.9457) em abril e novembro de 2019. As espécies *Equisetum hyemale* L., *Ophioglossum reticulatum* L., *Salvinia auriculata* Aubl. e *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) de la Sota foram coletadas de amostras presentes no fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) (aproximadamente em -23.5661, -46.7305) em junho de 2021. A espécie *Psilotum nudum* (L.) P.Beauv. foi coletada no campus da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (Santa Catarina, Brasil) (aproximadamente em -27.5634, -48.5150) em julho de 2019. Os materiais testemunhos foram depositados no herbário SP do Instituto de Pesquisas ambientais (IPA; São Paulo, Brasil) e no Herbário FLOR (Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil).

Após a coleta, o material vegetal foi limpo e seco em estufa a 40°C por uma semana. Os soros das folhas férteis foram removidos cuidadosamente para não fissurar as folhas.

**Tabela 1.** Nome, classificação, sub-divisão e voucher das espécies coletadas para este estudo.

Nome	Ordem	Família	Sub-divisão*	Voucher	Quantidade
<i>Selaginella muscosa</i> Spring	Selaginellales	Selaginellaceae	Externo	LPR11	4 pools**
<i>Palhinhaea cernua</i> (L.) Franco & Vasc.	Lycopodiales	Lycopodiaceae		LPR16	3 pools
<i>Equisetum hyemale</i> L.	Equisetales	Equisetaceae	Eusporangiada	LPR24	3 pools
<i>Psilotum nudum</i> (L.) P.Beauv.	Psilotales	Psilotaceae		CRUZ31	5 pools
<i>Ophioglossum reticulatum</i> L.	Ophioglossales	Ophioglossaceae		LPR26	1 pool
<i>Osmunda spectabilis</i> Willd.	Osmundales	Osmundaceae	Leptosporangiada basal	LPR1,9,12	4 indivíduos
<i>Hymenophyllum caudiculatum</i> Mart.	Hymenophyllales	Hymenophyllaceae		LPR8,13	3 pools
<i>Gleichenella pectinata</i> (Willd.) Ching	Gleicheniales	Gleicheniaceae		LPR2	4 indivíduos
<i>Anemia villosa</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	Schizeales	Anemiaceae		LPR14	2 pools
<i>Salvinia auriculata</i> Jean Baptiste Christian Fusée-Aublet	Salviniales	Salviniaceae		LPR25	3 pools
<i>Cyathea atrovirens</i> (Langsd. & Fisch.) Domin	Cyatheales	Cyatheaceae		LPR3	4 indivíduos
<i>Lophosoria quadripinata</i> (J.F. Gmel.) C. Chr.				LPR15	4 indivíduos
<i>Tryonia myriophylla</i> (Sw.) Schuettp. et al.	Polypodiales	Pteridaceae	Leptosporangiada recente	LPR17	3 pools
<i>Hypolepis stolonifera</i> Fée		Dennstaedtiaceae		LPR10	4 indivíduos
<i>Pteridium esculentum</i> (G. Forst.) Cockayne				LPR20	4 indivíduos
<i>Parablechnum cordatum</i> (Desv.) Gasper & Salino		Blechnaceae		LPR19	4 indivíduos
<i>Neoblechnum brasiliense</i> (Desv.) Gasper & V.A.O. Dittrich				LPR5	4 indivíduos
<i>Elaphoglossum lingua</i> (C. Presl) Brack.		Dryopteridaceae		LPR21	1 pool
<i>Lastreopsis amplissima</i> (C. Presl) Tindale				LPR4	4 indivíduos
<i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forst.) Ching				LPR6	4 indivíduos
<i>Microgramma squamulosa</i> (Kaulf.) de la Sota		Polypodiaceae		LPR27	3 pools
<i>Campyloneurum nitidum</i> (Kaulf.) C. Presl				LPR18	3 pools
<i>Serpocaulon catharinae</i> (Langsd. & Fisch.) A.R. Sm.				LPR22	1 pool

\*Sub-divisão baseada no tipo de esporângio e data de surgimento do grupo.

\*\*O termo *pool* foi utilizado para indicar que a amostra é formada por uma grande quantidade de frondes provenientes de diferentes indivíduos de uma população.

### **Extração e quantificação das ceras cuticulares**

As ceras cuticulares foram extraídas a partir das frondes para a grande maioria dos indivíduos deste estudo, com exceção das espécies *Selaginella muscosa* Spring, *Palhinhaea cernua* (L.) Vasc. & Franco, *Equisetum hyemale* L. e *Psilotum nudum* (L.) P.Beauv. cuja a extração ocorreu a partir de ramos verdes (caules + folhas), uma vez que suas folhas são extremamente diminutas. A extração foi realizada através de três imersões sucessivas em diclorometano por 50 segundos cada (Riedel et al., 2003). Após as extrações, as ceras foram concentradas em rotaevaporador e mantidas em dessecador até atingirem massa constante.

As folhas extraídas foram escaneadas e suas áreas foram medidas através do software ImageJ 1.49v. Os teores das cuticulares foram obtidos pela razão entre a quantidade de cera pela área.

### **Análises cromatográficas e identificação das substâncias**

A análise das ceras foi realizada através de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para isso, alíquotas de 1 mg de ceras foram derivatizadas com 50:50 µL de BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) e piridina por 1 hora a 70 °C (modificado de Jetter et al., 2000). Em seguida, as amostras foram injetadas em CG-EM (conjunto HP 5890 ser. II/ HP 5989B, Agilent), equipado com uma coluna capilar HP5-MS (Agilent, 30 m x 250 µm d.i. x 0.25 µm). O volume de injeção foi de 1 µL com hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi ajustada para 300 °C e a temperatura da coluna foi programada para iniciar a 100 °C mantida por 5 minutos, aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup> até a temperatura final de 320 °C, que foi mantida por 8 min, totalizando 57 minutos de corrida. As temperaturas da fonte e do quadrupolo foram de 280 °C e 180 °C, respectivamente. A energia para o impacto eletrônico foi de 70 eV, funcionando no modo de aquisição *full-scan* para fragmentos de  $m/z = 50$  a 800 com 2.66 scan.s<sup>-1</sup> (Santos et al., 2021).

Os componentes das ceras foram identificados através da comparação dos tempos de retenção com padrões autênticos, por meio da análise e comparação dos



espectros de massas com a literatura e a biblioteca digital NIST (v2.0, 2008) e através do auxílio do software *WaxAlly* v.1.0.3 (registro BR512022002375-0).

### **Análises estatísticas e construção dos gráficos**

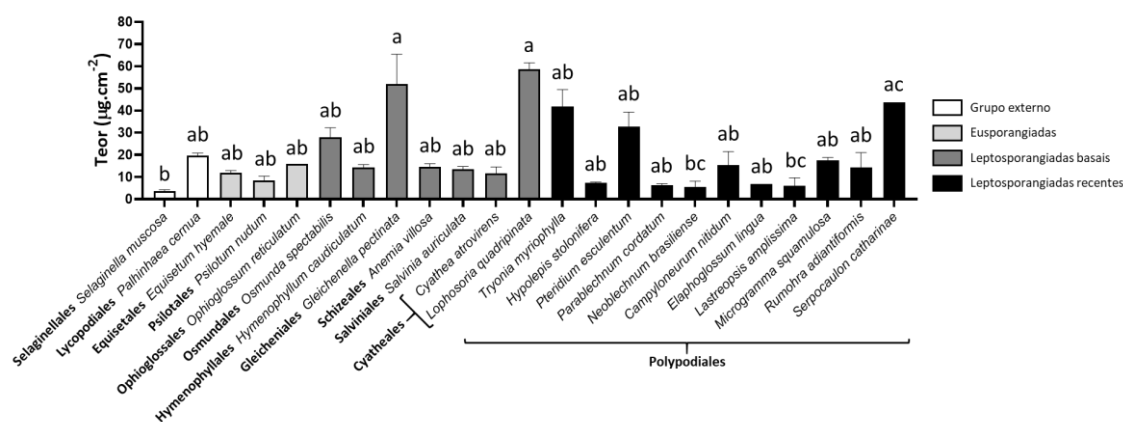
Os testes de normalidade, homocedasticidade e significância das diferenças foram realizados usando o software R (4.0.3). Os dados comparados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. A significância das diferenças entre os pares independentes de dados testados foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis. Para o teste de Shapiro-Wilk e Kruskal-Wallis foram considerados os valores de  $p$  ajustados pelo teste de Holm. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada através do software FITOPAC v. 2.1.2.85 com os dados de média das classes químicas das ceras foliares identificadas. Os gráficos foram feitos com o software Prism v.6.01 (*Graphpad, Inc.*).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

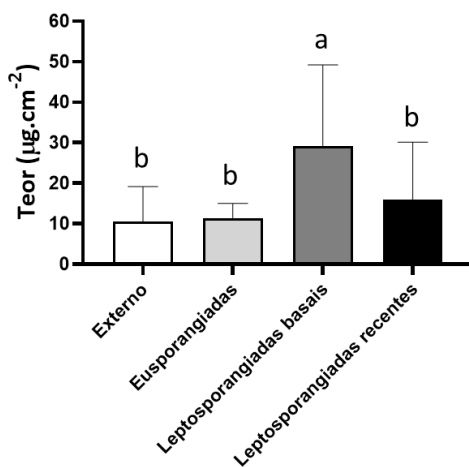
### **Análise de teor**

A partir das extrações de diclorometano das frondes e caules verdes das espécies de Polypodiopsida foram obtidos teores de cera que variaram de  $5,62 \pm 2,58 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Neoblechnum brasiliense* (Desv.) Gasper & V.A.O.Dittrich a  $58,63 \pm 2,91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Lophosoria quadripinnata* (J.F.Gmel.) C.Chr. (Figura 2; Tabelas 2S a 5S). No entanto, o menor valor de cera obtido foi para *Selaginella muscosa* (Lycopodiopsida), com  $3,76 \pm 0,57 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , a única espécie que apresentou diferença significativa quanto ao teor de cera ( $p < 0,05$ ; Tabelas 6S e 7S) entre as espécies analisadas, com teores menores que *Lophosoria quadripinnata*, *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching ( $51,96 \pm 13,46 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e *Serpocaulon catharinae* (Langsd. & Fisch.) A.R.Sm ( $43,71 \pm 0,00 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Entretanto, para muitas espécies deste estudo o valor médio de cera foi de cerca de  $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Comparando o teor de cera das espécies agrupadas quanto ao tipo de esporângios, apenas as leptosporangiadas basais apresentaram teores médios significativamente ( $p$

< 0,05; Tabelas 8S e 9S) maiores ( $31,06 \pm 20,51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) em relação ao grupo externo, eusporangiadas e leptosporangiadas recentes (Figura 3; Tabela 10S).



**Figura 2.** Teor de cera cuticular foliar das espécies de Polypodiopsida e Lycopodiopsida analisadas neste estudo. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Teor de cera cuticular foliar das espécies em relação ao tipo de esporângio, idade de surgimento e grupo externo (Lycopodiopsida). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os valores de teor de cera descrito para as espécies deste trabalho se encontram em concordância para o que há descrito para outras espécies de Polypodiopsida na literatura (Tabela 2), que apresentaram teores que variaram de  $3,10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Equisetum arvense* L. (Brune & Haas, 2011) a  $740,00 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Lomariopsis recurvata* Fée (Cerón-Carpio et al., 2019). O mesmo também é válido para as espécies de Lycopodiopsida, cujos teores de cera descritos na literatura variam de  $4,37 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$

em *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank & Mart. (Lycopodiales) a  $4,68 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em *Selaginella moellendorffii* Hieron. (Selaginellales; Kong et al., 2020). O teor de cera nas diferentes linhagens de plantas como as Polypodiopsida, Lycopodiopsida, angiospermas (eudicotiledôneas e monocotiledôneas) e gimnospermas parece variar entre pouco menos de  $10,00 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  podendo chegar em algumas espécies a teores de mais de  $700,00 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Wen et al., 2006; Brune & Haas, 2011; Maiti et al., 2016; Guo et al., 2018; Cerón-Carpio et al., 2019; Li et al., 2019; Favaro et al., 2020; Kong et al., 2020). A exceção parece ocorrer apenas nas linhagens mais basais de embriófitas (briófitas, antóceros e hepáticas), cujos teores raramente ultrapassam mais de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Busta et al., 2016b; Matos et al., 2021 e 2022).

As ceras cuticulares desde seu surgimento junto a cutícula a cerca de 450 milhões de anos atrás, têm uma forte relação com o controle hídrico e de vapores nas embriófitas, sendo essencial para sua sobrevivência em um ambiente desprovido de água perpétua ao seu redor, como ocorria com suas ancestrais aquáticas (Yeats & Rose, 2013). Sendo assim, espécies com maiores teores de cera podem levar a falsa conclusão de possuir uma cutícula mais resistente a perda de água. Entretanto um estudo recente de Grünhofer e colaboradores (2022) demonstrou que o teor de cera pode não levar efetivamente a uma maior proteção contra dessecação, uma vez que foi demonstrado que diferentes classes que compõe as ceras são mais ou menos eficientes em reter água (Oliveira et al., 2003). Além disso, em representantes tropicais mexicanas, algumas espécies alcançaram teores extremamente altos de cera, como *Lomariopsis recurvata* ( $740,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; Tabela 2) e encontram-se em um ambiente caracterizado por altos teores de chuva e suas ceras mais espessas seriam uma adaptação contra a lixiviação de nutrientes das folhas nessas espécies (Cerón-Carpio et al., 2019). Mais estudos em relação ao teor de cera em espécies de Polypodiopsida são necessários para entender o modo com que as pressões abióticas atuam sobre os teores de ceras nesse grupo.

**Tabela 2.** Teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e porcentagem relativa (%) das frondes de diferentes espécies de Polypodiopsida descritas na literatura.

Espécies	Clima	Ordem	Grupo	CT	ALK	EST	AG	ALD	AP	AS	DL	CET	COL	STD	TRI	FEN	OU*
<i>Equisetum arvense</i> L. (plântula inteira) <sup>a</sup>	TE	Equisetales	EUS	3,1	3,4	13,0	45,7	17,2	23,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Equisetum hyemale</i> L. (plântula inteira) <sup>a</sup>	TE	Equisetales	EUS	24,6	43,0	0,9	20,1	29,1	7,5	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh. (plântula inteira) <sup>a</sup>	TE	Equisetales	EUS	4,6	0,7	50,8	20,9	8,8	19,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Danaea nodosa</i> (L.) Sm. <sup>b</sup>	TR	Marattiales	EUS	72,0	11,2	0,2	66,8	0,4	0,7	—	—	—	—	—	—	23,5	—
<i>Osmunda regalis</i> L.** <sup>c</sup>	TE	Osmundales	LPBA	22,5	0,9	1,8	0,5	12,3	16,0	0,9	10,	27,7	10,0	0,9	—	—	27,7
<i>Actiniopteris radiata</i> (J. Koenig ex Sw.) Link <sup>d</sup>	TR	Polypodiales	LPRC	—	16,0	—	26,0	—	19,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bolbitis portoricensis</i> (Spreng.) Hennipman <sup>b</sup>	TR	Polypodiales	LPRC	349,0	9,9	3,5	93,7	0,3	0,4	—	—	—	—	—	—	4,5	—
<i>Lomariopsis recurvata</i> Fée <sup>b</sup>	TR	Polypodiales	LPRC	740,0	11,4	1,2	95,2	—	0,1	—	—	—	—	—	—	0,7	—
<i>Goniopteris rhachiflexuosa</i> (Riba) Salino & T.E.Almeida <sup>b</sup>	TR	Polypodiales	LPRC	21,0	6,3	1,4	92,3	1,0	0,4	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Gymnocarpium dryopteris</i> (L.) Newman <sup>e</sup>	TE	Polypodiales	LPRC	17,2	1,0	60,0	—	1,0	2,0	5,0	—	31,0	—	—	—	—	—
<i>Cryptogramma crispa</i> (L.) R.Br. ex Hook. <sup>e</sup>	TE	Polypodiales	LPRC	6,9	7,8	87,6	—	—	1,1	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Polypodium glycyrrhiza</i> D.C.Eaton <sup>e</sup>	TE	Polypodiales	LPRC	3,9	12,7	61,3	0,9	>0,1	1,6	—	—	—	—	—	1,8	—	—

**CT:** Teor; **ALK:** Alcanos; **EST:** Ésteres; **AG:** Ácidos graxos livres; **ALD:** Aldeídos; **AP:** Álcoois primários; **AS:** Álcoois secundários; **DL:** Diois; **CET:** Cetonas; **COL:** Cetóis; **TCL:** Tocoferóis; **STD:** Esteroides; **TRI:** Triterpenos; **FEN:** Fenólicos; **OU:** Outros.

**TE:** Coletado em clima temperado; **TR:** Coletado em clima tropical.

**EUS:** Eusporangiadas; **LPBA:** Leptosporangiadas basais; **LPRC:** Leptosporangiadas recentes;

<sup>a</sup>Brune & Haas, 2021; <sup>b</sup>Cerón-Carpio et al., 2019; <sup>c</sup>Jetter & Riederer, 2000; <sup>d</sup>Manubolo et al., 2013; <sup>e</sup>Guo et al., 2018.

\*Soma da porcentagem relativa das seguintes classes: Dicetonas, ceto-aldeídos, ceto-álcoois e ceto-ésteres.

\*\*Valores de porcentagem relativa adaptados a partir dos valores de massa em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

“—“: Classe não identificada.

“—”“: Valor indisponível.

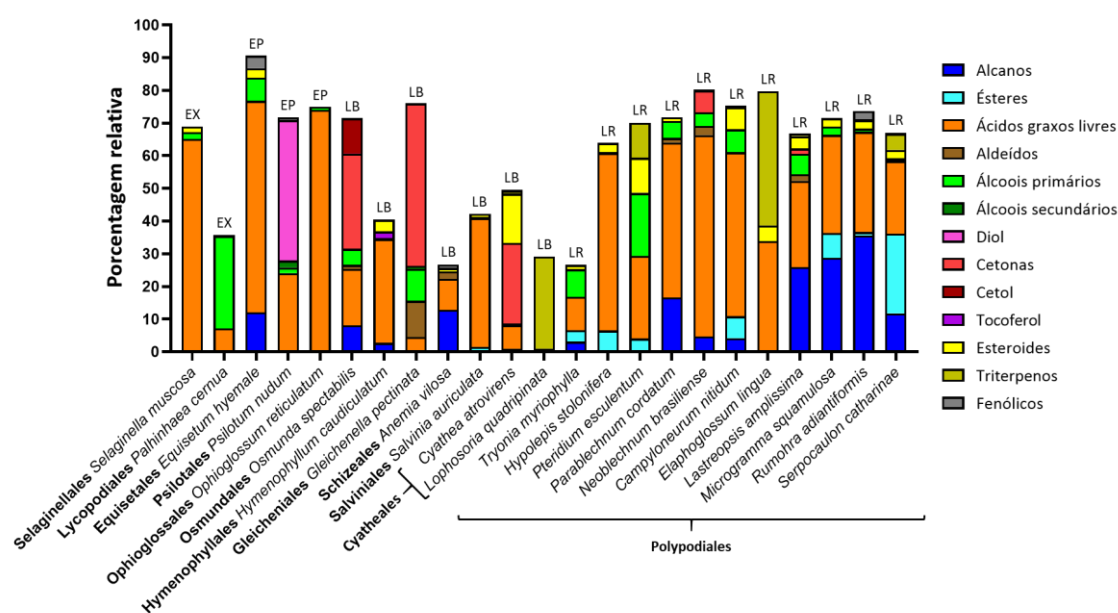
## Composição química das ceras por CG-EM

As ceras cuticulares das frondes das espécies estudadas apresentaram grande diversidade de compostos pertencendo a 13 classes diferentes (Figura 4). As classes mais abundantes encontradas nas espécies estudadas foram os ácidos graxos livres presentes em grandes quantidades em muitas das espécies inclusive no grupo externo (de  $7,03 \pm 4,51\%$  em *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc. a  $64,95 \pm 4,36\%$  em *Selaginella muscosa* Spring), eusporangiadas (de  $23,68 \pm 7,53\%$  em *Psilotum nudum* (L.) P.Beauv. a  $74,03 \pm 0,00\%$  em *Ophioglossum reticulatum* L.) e leptosporangiadas recentes (de  $10,15 \pm 1,62\%$  em *Tryonia myriophylla* (Sw.) Schuettp. et al. a  $61,57 \pm 9,27\%$  em *Neoblechnum brasiliense* (Desv.) Gasper & V.A.O. Dittrich) e as cetonas, muito abundantes em espécies de leptosporangiadas basais (ausente em *Hymenophyllum caudiculatum* Mart. e *Anemia villosa* Humb. & Bonpl. ex Willd., porém chegando a  $49,82 \pm 14,06\%$  em *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching). As outras classes foram encontradas em menores quantidades entre as espécies estudadas ou presentes em apenas alguns indivíduos mesmo que de maneira abundante. Os alcanos foram abundantes principalmente nas espécies de Polypodiales (leptosporangiadas recentes), como em *Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching, chegando a  $35,59 \pm 9,93\%$ , os ésteres apareceram em poucas espécies e encontraram-se abundantes em *Serpocaulon catharinae* (Langsd. & Fisch.) A.R. Sm. com  $24,38 \pm 0,00\%$ . Os aldeídos de modo geral também foram pouco abundantes entre as espécies, porém em *G. pectinata* eles chegaram a  $11,13 \pm 4,23\%$ . Os álcoois primários apareceram em espécies dos diferentes grupos estudados, porém em abundâncias relativas baixas na grande maioria das polipodiófitas, com exceção de *Pteridium esculentum* que apresentou uma média de  $19,17 \pm 9,25\%$ , sendo que o maior teor dessa classe foi verificado para *P. cernua* (Lycopodiopsida) com  $28,25 \pm 17,51\%$  formando a maior porção da mistura de suas ceras. Os álcoois secundários, tocoferóis e fenólicos apareceram em poucas das espécies estudadas e não ultrapassaram 4% da composição total das ceras. Os esteroides apareceram em diferentes espécies, porém em baixas quantidades, com exceção da *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin com  $15,11 \pm 2,15\%$  das ceras totais. Já os triterpenos apareceram em poucas espécies, mas foram muito abundantes nas ceras de *Elaphoglossum lingua* (C. Presl) Brack. com  $41,09 \pm 0,00\%$  e nas ceras de *Lophosoria quadripinata* (J.F. Gmel.) C. Chr.,  $28,23 \pm 2,57\%$ , sendo

a principal classe identificada. Por fim, diol e cetol foram classes identificadas exclusivamente em *P. nudum* ( $42,89 \pm 4,89\%$ ) e *Osmunda spectabilis* Willd. ( $10,76 \pm 1,71\%$ ) respectivamente.

Assim como ressaltado por Guo e colaboradores (2018) e pelos resultados obtidos por este estudo, é possível observar em Polypodiopsida há a presença de todo o maquinário das vias de alongamento e diferenciação de acils graxos em diferentes classes de compostos de ceras, como álcoois, ésteres, cetonas e alcanos, assim como é visto para diferentes espécies de angiospermas (Baker et al., 1975; Guelz et al., 1987; Guo et al., 2017). Tais classes de compostos também se encontram presentes nas linhagens das briófitas *sensu lato* (Busta et al., 2016b; Matos et al., 2021 e 2022) e gimnospermas (Gülz et al., 1992; Wen et al., 2006). Sendo assim é possível observar que as ceras cuticulares nos mais diversos grupos e linhagens vegetais são muito semelhantes quanto as classes químicas que podem estar presentes em sua mistura, entretanto podem variar bastante quanto a quantidade e distribuição dessas classes (Cerón-Carpio et al., 2019).

Uma comparação das ceras cuticulares foliares de grande número de espécies de Polypodiopsida deste estudo com as 8 espécies tropicais mexicanas (Cerón-Carpio et al., 2019) é possível observar que ambas apresentam a predominância de ácidos graxos nas ceras. Os ácidos graxos, principalmente os ácidos hexadecanoico e octadecanoico junto aos seus homólogos insaturados estão associados ao aumento de resistência contra a infecção de bactérias e fungos em algumas espécies de plantas, atuando como sinalizadores para o disparo de uma resposta de defesa vegetal (Lim et al., 2017). No ambiente tropical, em que o clima quente e úmido favorece a proliferação de bactérias e fungos (García-Guzmán & Heil, 2014), a presença dessa classe em grandes proporções nas ceras pode atuar protegendo as folhas contra a infecção destes microorganismos. Já em relação as espécies de Polypodiopsida temperadas, as ceras foliares apresentaram composições químicas muito diferentes, uma vez que a presença de ésteres nas ceras das espécies temperadas foi muito proeminente (Guo et al., 2017) e nas espécies tropicais a presença de ésteres é bastante reduzida.



**Figura 4.** Porcentagem relativa das classes de compostos identificadas nas ceras cuticulares foliares de diferentes espécies de Polypodiopsida e Lycopodiopsida (grupo externo). EX: grupo externo; EP: Eusporangiadas; LB: Leptosporangiadas basais; LR: Leptosporangiadas recentes.

Ao todo foram identificados 94 compostos diferentes nas ceras cuticulares foliares das polipodiófitas e licófitas analisadas. A classe mais diversa encontrada foi a dos ácidos graxos livres com 18 substâncias diferentes contendo homólogos saturados (16) e insaturados (4), variando de 12 a 32 carbonos, presentes com bastante diversidade em praticamente todas as espécies estudadas (Tabelas 3 a 6).

Os principais homólogos para a grande maioria das espécies foram os ácidos hexadecanoico (C16) e octadecanoico (C18), também descritos como extremamente abundantes nas ceras das polipodiófitas tropicais mexicanas (Cerón-Carpio et al., 2019). Em espécies de *Equisetum* (Brune & Hass, 2011), polipodiófitas temperadas (Guo et al., 2018) e *Osmunda regalis* (Jetter & Riederer, 2000) a porcentagem de ácidos graxos é reduzida, sendo mais abundantes os homólogos de cadeia maiores, como os homólogos com 26 (ácido hexacosanoico), 28 (ácido octacosanoico) e 30 (ácido triacontanoico) carbonos. Apesar de apresentarem grandes quantidades dos homólogos C16 e C18, as espécies eusporangiadas desse estudo foram as únicas que também apresentaram maiores quantidades dos homólogos C26 ( $17,72 \pm 0,00\%$  em *Osmunda spectabilis*), C28 ( $9,37 \pm 3,87\%$  em *Psilotum nudum*) e C30 ( $7,50 \pm 1,60\%$  em *Equisetum hyemale*; Tabela 3). Ácidos graxos livres insaturados nas ceras de polipodiófitas foram previamente

descritos para algumas espécies tropicais mexicanas na forma de 9-hexadecenoico (ácido palmitoleico) e 9-octadecenoico (ácido oleico; Cerón-Carpio et al., 2019). Neste estudo, foram detectados os ácidos oleico e linoleico em algumas espécies, principalmente naquelas leptosporangiadas (Tabelas 4 a 6).

Os alcanos foram a segunda classe mais diversa de compostos, com um total de 14 homólogos variando de 23 a 36 carbonos (Tabelas 3 a 6). Os principais homólogos encontrados foram os homólogos ímpares com 29 (nonacosano), 31 (hentriacontano) e 33 carbonos (tritriacontano). As espécies leptosporangiadas recentes, além de serem as espécies com as maiores quantidades dessa classe, também foram as espécies com a maior diversidade de homólogos (Tabelas 5 e 6). Entretanto mesmo dentro desse grupo, em algumas espécies os alcanos não foram identificados, por exemplo em *Salvinia auriculata*, *Pteridium esculentum* (G. Forst.) Cockayne e *Elaphoglossum lingua*. A presença mais abundante de homólogos ímpares de alcanos nas ceras é o mais esperado independente da linhagem vegetal, uma vez que em seu processo de biossíntese há a perda de monóxido de carbono da molécula precursora que possui mais comumente número par de carbonos (Kunst & Samuels, 2009). Essa distribuição de alcanos foi semelhante também para várias outras espécies de polipodiófitas descritas na literatura (Jetter & Riederer, 2000; Brune & Hass, 2011; Guo et al., 2018; Cerón-Carpio et al., 2019). As licófitas apresentaram apenas o homólogo nonacosano em baixíssimas quantidades.



**Tabela 3.** Porcentagem relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos compostos identificados no extrato de diclorometano nas ceras cuticulares foliares das espécies de Lycopodiopsida (grupo externo) e Polypodiopsida eusporangiadas estudadas.

Compostos	Lycopodiopsida			Polypodiopsida	
	<i>Selaginella muscosa</i> (Selaginellales)	<i>Palhinhaea cernua</i> (Lycopodiales)	<i>Equisetum hyemale</i> (Equisetales)	<i>Psilotum nudum</i> (Psilotales)	<i>Ophioglossum reticulatum</i> (Ophioglossales)
<b>Alcanos</b>					
Pentacosano (C25)	—	—	0,09 $\pm$ 0,13	—	—
Heptacosano (C27)	—	—	1,78 $\pm$ 0,33	0,41 $\pm$ 0,26	—
Nonacosano (C29)	0,18 $\pm$ 0,21	0,12 $\pm$ 0,09	9,95 $\pm$ 2,14	—	—
Hentriacontano (C31)	—	—	0,29 $\pm$ 0,20	—	—
<b>Ácidos graxos livres</b>					
Ácido dodecanoico (C12)	0,41 $\pm$ 0,16	—	1,98 $\pm$ 0,32	0,11 $\pm$ 0,14	—
Ácido tetradecanoico (C14)	0,86 $\pm$ 0,13	0,22 $\pm$ 0,16	0,65 $\pm$ 0,46	0,05 $\pm$ 0,10	—
Ácido pentadecanoico (C15)	0,43 $\pm$ 0,10	—	0,13 $\pm$ 0,18	—	—
Ácido hexadecanoico (C16)	16,5 $\pm$ 2,92	1,10 $\pm$ 0,65	20,55 $\pm$ 0,99	5,86 $\pm$ 2,33	14,14 $\pm$ 0,00
Ácido heptadecanoico (C17)	0,39 $\pm$ 0,11	—	—	—	—
Ácido octadecanoico (C18)	26,5 $\pm$ 4,92	0,63 $\pm$ 0,49	23,86 $\pm$ 4,61	6,18 $\pm$ 4,62	15,69 $\pm$ 0,00
Ácido icosanoico (C20)	0,34 $\pm$ 0,08	—	0,21 $\pm$ 0,15	—	0,88 $\pm$ 0,00
Ácido docosanoico (C22)	0,79 $\pm$ 0,40	—	0,40 $\pm$ 0,28	0,18 $\pm$ 0,15	7,44 $\pm$ 0,00
Ácido tetracosanoico (C24)	3,54 $\pm$ 2,02	0,51 $\pm$ 0,27	1,70 $\pm$ 0,16	0,25 $\pm$ 0,14	6,6 $\pm$ 0,00
Ácido pentacosanoico (C25)	0,63 $\pm$ 0,26	—	—	—	—
Ácido hexacosanoico (C26)	6,06 $\pm$ 2,36	1,43 $\pm$ 0,78	2,39 $\pm$ 0,37	1,00 $\pm$ 0,58	17,72 $\pm$ 0,00
Ácido heptacosanoico (C27)	1,21 $\pm$ 0,60	—	—	0,29 $\pm$ 0,37	1,06 $\pm$ 0,00
Ácido octacosanoico (C28)	4,78 $\pm$ 1,88	1,40 $\pm$ 1,00	4,97 $\pm$ 0,95	9,37 $\pm$ 3,87	7,51 $\pm$ 0,00
Ácido nonacosanoico (C29)	0,26 $\pm$ 0,29	—	—	—	—
Ácido triacontanoico (C30)	1,77 $\pm$ 0,04	1,75 $\pm$ 1,36	7,50 $\pm$ 1,60	0,39 $\pm$ 0,24	—
Ácido dotriacontanoico (C32)	0,35 $\pm$ 0,21	—	0,33 $\pm$ 0,24	—	—
Ácido oleico (C18:1)	0,10 $\pm$ 0,17	—	—	—	—
Ácido linoleico (C18:2)	—	—	—	—	2,98 $\pm$ 0,00
<b>Álcoois primários</b>					
Icosan-1-ol (C20)	0,31 $\pm$ 0,07	0,05 $\pm$ 0,04	—	0,53 $\pm$ 0,30	—
Docosan-1-ol (C22)	—	—	—	0,43 $\pm$ 0,43	—
Tetracosan-1-ol (C24)	0,13 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,69	0,08 $\pm$ 0,11	—	—
Pentacosan-1-ol (C25)	—	0,05 $\pm$ 0,08	—	—	—
Hexacosan-1-ol (C26)	0,28 $\pm$ 0,10	8,77 $\pm$ 5,75	0,84 $\pm$ 0,26	0,09 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,00

Compostos	Lycopodiopsida			Polypodiopsida	
	<i>Selaginella muscosa</i> (Selaginellales)	<i>Palhinhaea cernua</i> (Lycopodiales)	<i>Equisetum hyemale</i> (Equisetales)	<i>Psilotum nudum</i> (Psilotales)	<i>Ophioglossum reticulatum</i> (Ophioglossales)
Heptacosan-1-ol (C27)	—	0,31 ± 0,23	—	—	—
Octacosan-1-ol (C28)	0,40 ± 0,25	9,90 ± 6,17	2,26 ± 0,75	0,59 ± 0,17	—
Nonacosan-1-ol (C29)	—	1,33 ± 1,10	—	—	—
Triacontan-1-ol (C30)	0,70 ± 0,44	6,81 ± 3,80	3,70 ± 1,06	0,04 ± 0,09	—
Hentriacontan-1-ol (C31)	0,11 ± 0,12	—	—	—	—
Dotriacontan-1-ol (C32)	0,11 ± 0,19	0,28 ± 0,20	0,15 ± 0,21	—	—
<b>Álcoois secundários</b>					
Heptacosan-6-ol (C27)	—	—	—	0,52 ± 0,10	—
Nonacosan-6-ol (C29)	—	—	—	1,62 ± 0,48	—
<b>Diol</b>					
Tricosan-6,7-diol (C23)	—	—	—	42,89 ± 4,89	—
<b>Esteroides</b>					
Campesterol (C28)	0,23 ± 0,14	—	0,60 ± 0,48	—	—
Campestanol (C28)	—	—	—	—	—
Stigmasterol (C29)	0,18 ± 0,18	0,04 ± 0,06	—	—	—
<i>beta</i> -Sitosterol (C29)	—	—	1,93 ± 0,28	—	—
Sitostenona (C29)	1,24 ± 0,18	—	0,46 ± 0,32	0,06 ± 0,11	—
<b>Fenólicos</b>					
Ácido <i>p</i> -cumárico (C9)	—	0,13 ± 0,09	—	0,84 ± 0,46	—
Ácido hidroxicinâmico (C9)	—	—	—	—	—
Ácido ferúlico (C10)	—	0,21 ± 0,15	2,97 ± 1,20	—	—
Ácido isoferúlico (C10)	—	—	0,83 ± 0,36	—	—

“—”: Homólogo não identificado.

**Tabela 4.** Porcentagem relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos compostos identificados no extrato de diclorometano nas ceras cuticulares foliares das espécies de Polypodiopsida leptosporangiadas basais estudadas.

Compostos	<i>Osmunda spectabilis</i> (Osmundales)	<i>Hymenophyllum caudiculatum</i> (Hymenophyllales)	<i>Gleichenella pectinata</i> (Gleicheniales)	<i>Anemia villosa</i> (Schizeales)	<i>Salvinia auriculata</i> (Salviniales)	<i>Cyathea atrovirens</i> (Cyatheaales)	<i>Lophosoria quadripinata</i> (Cyatheaales)
<b>Alcanos</b>							
Tricosano (C23)	—	—	—	—	—	0,16 $\pm$ 0,05	—
Tetracosano (C24)	1,84 $\pm$ 3,19	—	—	—	—	0,19 $\pm$ 0,06	—
Pentacosano (C25)	1,46 $\pm$ 2,54	—	0,07 $\pm$ 0,10	—	—	0,22 $\pm$ 0,06	—
Hexacosano (C26)	1,60 $\pm$ 2,76	—	—	—	—	0,18 $\pm$ 0,05	—
Heptacosano (C27)	—	0,23 $\pm$ 0,22	0,05 $\pm$ 0,11	—	—	0,11 $\pm$ 0,06	—
Octacosano (C28)	0,82 $\pm$ 1,42	—	—	—	—	0,02 $\pm$ 0,04	—
Nonacosano (C29)	0,14 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,13	0,12 $\pm$ 0,18	0,89 $\pm$ 0,11	—	0,05 $\pm$ 0,06	—
Triacotano (C30)	0,67 $\pm$ 1,16	—	—	—	—	—	—
Hentriacotano (C31)	—	1,21 $\pm$ 0,67	0,03 $\pm$ 0,07	11,5 $\pm$ 0,30	—	—	—
Dotriacotano (C32)	0,64 $\pm$ 1,12	—	—	—	—	—	—
Tritriacotano (C33)	—	0,72 $\pm$ 0,41	—	0,45 $\pm$ 0,01	—	—	—
Hexatriacotano (C36)	0,90 $\pm$ 1,57	—	—	—	—	—	—
<b>Ésteres</b>							
Hexadecanoato de tetracosila (C40)	—	—	—	—	—	0,02 $\pm$ 0,04	—
Icosanoato de tetracosila (C44)	—	—	—	—	0,97 $\pm$ 0,93	—	—
Hexadecanoato de triacotila (C46)	—	—	—	—	0,58 $\pm$ 0,57	—	—
<b>Ácidos graxos livres</b>							
Ácido dodecanoico (C12)	—	—	—	0,07 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,09	—	—
Ácido tetradecanoico (C14)	—	0,10 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,34	—	0,63 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,07	—
Ácido pentadecanoico (C15)	—	—	—	—	0,34 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,04	—
Ácido hexadecanoico (C16)	2,91 $\pm$ 1,06	5,78 $\pm$ 2,62	2,15 $\pm$ 0,73	1,83 $\pm$ 0,54	17,77 $\pm$ 1,47	2,82 $\pm$ 0,63	0,39 $\pm$ 0,07
Ácido heptadecanoico (C17)	—	—	—	—	0,21 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,03	—
Ácido octadecanoico (C18)	1,83 $\pm$ 0,71	7,47 $\pm$ 4,48	0,86 $\pm$ 1,01	1,56 $\pm$ 0,71	17,1 $\pm$ 3,61	1,91 $\pm$ 0,56	0,23 $\pm$ 0,05
Ácido icosanoico (C20)	—	7,11 $\pm$ 9,58	0,63 $\pm$ 0,34	—	0,28 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,11	—
Ácido docosanoico (C22)	—	0,33 $\pm$ 0,02	—	—	0,30 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,02	—
Ácido tetracosanoico (C24)	—	0,39 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,02	—
Ácido pentacosanoico (C25)	—	—	—	—	0,13 $\pm$ 0,09	—	—
Ácido hexacosanoico (C26)	—	0,22 $\pm$ 0,09	—	0,29 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,13	1,08 $\pm$ 0,55	—
Ácido heptacosanoico (C27)	—	—	—	—	0,03 $\pm$ 0,05	—	—

<b>Compostos</b>	<b><i>Osmunda spectabilis</i> (Osmundales)</b>	<b><i>Hymenophyllum caudiculatum</i> (Hymenophyllales)</b>	<b><i>Gleichenella pectinata</i> (Gleicheniales)</b>	<b><i>Anemia villosa</i> (Schizeales)</b>	<b><i>Salvinia auriculata</i> (Salviniales)</b>	<b><i>Cyathea atrovirens</i> (Cyatheaales)</b>	<b><i>Lophosoria quadripinata</i> (Cyatheaales)</b>
Ácido octacosanoico (C28)	0,87 ± 0,50	—	—	0,44 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,08 ± 0,16	—
Ácido nonacosanoico (C29)	—	—	—	0,07 ± 0,07	—	—	—
Ácido triacontanoico (C30)	6,68 ± 3,14	—	—	0,92 ± 0,02	—	—	—
Ácido dotriacontanoico (C32)	0,18 ± 0,31	—	—	1,55 ± 0,09	—	—	—
Ácido oleico (C18:1)	2,92 ± 1,69	5,99 ± 2,80	—	1,87 ± 0,47	0,04 ± 0,06	—	—
Ácido linoleico (C18:2)	1,86 ± 1,11	4,33 ± 1,08	—	0,65 ± 0,28	—	—	—
<b>Aldeídos</b>							
Heptadecanal (C17)	—	—	1,41 ± 0,44	—	—	—	—
Hexacosanal (C26)	0,32 ± 0,19	—	2,2 ± 0,74	—	—	—	—
Octacosanal (C28)	0,92 ± 0,48	—	5,34 ± 2,07	—	—	—	—
Triacontanal (C30)	—	—	2,06 ± 1,18	0,76 ± 0,26	—	—	—
Dotriacontanal (C32)	—	—	0,13 ± 0,19	1,56 ± 0,34	—	—	—
<b>Álcoois primários</b>							
Icosan-1-ol (C20)	—	—	—	—	0,03 ± 0,04	—	—
Tetracosan-1-ol (C24)	1,15 ± 0,32	—	2,21 ± 0,13	—	—	—	—
Pentacosan-1-ol (C25)	—	—	0,03 ± 0,08	—	—	—	—
Hexacosan-1-ol (C26)	2,20 ± 0,49	—	2,87 ± 0,22	—	—	0,36 ± 0,47	—
Heptacosan-1-ol (C27)	—	—	0,04 ± 0,09	—	—	—	—
Octacosan-1-ol (C28)	0,76 ± 0,24	—	2,08 ± 0,49	—	—	0,15 ± 0,14	—
Triacontan-1-ol (C30)	0,85 ± 0,26	—	1,14 ± 0,45	—	—	—	—
Hentriacontan-1-ol (C31)	—	—	1,26 ± 0,09	—	—	—	—
Dotriacontan-1-ol (C32)	—	0,12 ± 0,17	0,10 ± 0,14	—	—	0,06 ± 0,12	—
Tetratriacontan-1-ol (C34)	—	0,20 ± 0,17	—	—	—	—	—
<b>Álcoois secundários</b>							
Trtriacontan-14-ol (C33)	—	—	0,86 ± 0,22	—	—	0,01 ± 0,03	—
<b>Cetonas</b>							
Heptacosan-10-ona (C27)	—	—	1,80 ± 0,75	—	—	—	—
Nonacosan-10-ona (C29)	27,09 ± 1,82	—	47,5 ± 13,47	—	0,18 ± 0,06	0,1 ± 0,12	0,29 ± 0,41
Hentriacontan-12-ona (C31)	0,53 ± 0,06	—	0,52 ± 0,17	—	0,10 ± 0,08	—	—
Trtriacontan-12-ona (C33)	1,08 ± 0,28	—	—	—	—	—	—
Trtriacontan-14-ona (C33)	—	—	—	—	—	8,95 ± 2,34	—
Pentatriacontan-14-ona (C35)	0,37 ± 0,12	—	—	—	—	10,16 ± 1,7	—
Heptatriacontan-16-ona (C37)	—	—	—	—	—	5,39 ± 0,93	—
<b>Cetol</b>							

Compostos	<i>Osmunda spectabilis</i> (Osmundales)	<i>Hymenophyllum caudiculatum</i> (Hymenophyllales)	<i>Gleichenella pectinata</i> (Gleicheniales)	<i>Anemia villosa</i> (Schizeales)	<i>Salvinia auriculata</i> (Salviniales)	<i>Cyathea atrovirens</i> (Cyatheaales)	<i>Lophosoria quadripinata</i> (Cyatheaales)
16-Hidroxinonacosan-10-ona (C29)	10,76 ± 1,71	—	—	—	—	—	—
<b>Tocoferol</b>							
<i>alpha</i> -Tocoferol (C29)	—	2,07 ± 0,19	—	—	—	—	—
<b>Esteroides</b>							
Campesterol (C28)	—	—	—	—	0,08 ± 0,12	0,03 ± 0,06	—
Campestanol (C28)	—	—	—	—	—	2,46 ± 1,28	—
Stigmastanol (C29)	—	1,37 ± 0,21	—	—	0,13 ± 0,18	12,06 ± 1,69	0,05 ± 0,08
<i>beta</i> -Sitosterol (C29)	0,12 ± 0,21	2,11 ± 0,24	—	0,81 ± 0,18	0,58 ± 0,36	0,56 ± 0,96	—
Sitostenona (C29)	0,04 ± 0,08	—	—	0,17 ± 0,08	0,14 ± 0,02	—	—
<b>Triterpenos</b>							
Diplopteno (C30)	—	0,25 ± 0,10	—	—	—	0,88 ± 0,80	28,23 ± 2,57
<b>Fenólicos</b>							
Ácido <i>p</i> -cumárico (C9)	—	—	—	—	—	0,31 ± 0,10	—
Curcumeno (C15)	—	—	—	1,12 ± 0,03	—	—	—

“—”: Homólogo não identificado.

**Tabela 5.** Porcentagem relativa (média ± desvio padrão) dos compostos identificados no extrato de diclorometano nas ceras cuticulares foliares das espécies de Polypodiopsida leptosporangiadas recentes (Polypodiales) (parte 1) estudadas.

Compostos	<i>Tryonia myriophylla</i>	<i>Hypolepis stolonifera</i>	<i>Pteridium esculentum</i>	<i>Parablechnum cordatum</i>	<i>Neoblechnum brasiliense</i>	<i>Campyloneurum nitidum</i>
<b>Alcanos</b>						
Tricosano (C23)	—	—	—	—	0,15 ± 0,16	—
Tetracosano (C24)	—	—	—	—	0,36 ± 0,28	—
Pentacosano (C25)	—	—	—	—	0,86 ± 0,51	—
Hexacosano (C26)	—	—	—	—	0,97 ± 0,59	—
Heptacosano (C27)	0,53 ± 0,02	—	—	—	1,08 ± 0,55	—
Octacosano (C28)	—	—	—	—	0,29 ± 0,23	—
Nonacosano (C29)	0,97 ± 0,07	—	—	6,77 ± 4,63	0,97 ± 0,43	0,65 ± 0,54
Triacotano (C30)	—	—	—	0,95 ± 0,83	—	0,05 ± 0,07
Hentriacotano (C31)	1,44 ± 0,08	—	—	8,64 ± 5,19	—	2,00 ± 2,23

<b>Compostos</b>	<i>Tryonia myriophylla</i>	<i>Hypolepis stolonifera</i>	<i>Pteridium esculentum</i>	<i>Parablechnum cordatum</i>	<i>Neoblechnum brasiliense</i>	<i>Campyloneurum nitidum</i>
Dotriacontano (C32)	—	—	—	0,11 ± 0,15	—	0,18 ± 0,26
Tritriacontano (C33)	0,17 ± 0,04	—	—	0,18 ± 0,26	—	1,30 ± 1,47
<b>Ésteres</b>						
Icosanoato de docosila (C42)	—	1,68 ± 1,68	—	—	—	—
Octadecanoato de tetracosila (C42)	—	—	4,07 ± 3,02	—	—	—
Hexadecanoato de hexacosila (C42)	2,43 ± 3,43	—	—	—	—	2,63 ± 2,15
Docosanoato de docosila (C44)	—	4,78 ± 0,50	—	—	—	—
Octadecanoato de hexacosila (C44)	—	—	—	—	—	0,22 ± 0,31
Hexadecanoato de octacosila (C44)	1,10 ± 1,55	—	—	—	—	3,82 ± 5,40
<b>Ácidos graxos livres</b>						
Ácido dodecanoico (C12)	—	0,94 ± 0,29	—	1,24 ± 0,17	—	0,93 ± 0,58
Ácido tetradecanoico (C14)	—	0,51 ± 0,01	0,28 ± 0,21	0,28 ± 0,22	0,51 ± 0,18	0,76 ± 0,16
Ácido pentadecanoico (C15)	—	0,08 ± 0,08	0,04 ± 0,06	—	0,36 ± 0,29	0,12 ± 0,03
Ácido hexadecanoico (C16)	2,14 ± 0,11	20,65 ± 0,50	9,37 ± 3,77	12,4 ± 1,74	23,36 ± 4,44	15,05 ± 1,74
Ácido heptadecanoico (C17)	—	0,07 ± 0,07	—	—	0,32 ± 0,24	0,20 ± 0,05
Ácido octadecanoico (C18)	1,17 ± 0,40	27,72 ± 0,21	3,78 ± 1,58	17,68 ± 2,7	33,30 ± 14,05	14,40 ± 3,96
Ácido icosanoico (C20)	0,16 ± 0,01	0,65 ± 0,14	0,25 ± 0,25	0,18 ± 0,13	1,06 ± 0,28	0,24 ± 0,05
Ácido docosanoico (C22)	0,68 ± 0,48	0,73 ± 0,12	0,59 ± 0,39	0,09 ± 0,13	0,54 ± 0,31	0,17 ± 0,03
Ácido tetracosanoico (C24)	1,46 ± 0,18	1,58 ± 0,21	7,19 ± 2,39	2,06 ± 0,26	0,70 ± 0,44	0,71 ± 0,09
Ácido pentacosanoico (C25)	0,09 ± 0,06	—	—	—	—	—
Ácido hexacosanoico (C26)	1,16 ± 0,84	0,72 ± 0,00	1,85 ± 1,20	1,47 ± 0,12	0,08 ± 0,19	0,57 ± 0,26
Ácido heptacosanoico (C27)	0,09 ± 0,07	—	—	—	—	—
Ácido octacosanoico (C28)	2,20 ± 0,33	0,31 ± 0,01	0,23 ± 0,32	0,87 ± 0,07	1,18 ± 1,69	0,29 ± 0,23
Ácido triacontanoico (C30)	0,55 ± 0,09	—	0,22 ± 0,32	4,69 ± 1,33	—	2,46 ± 1,23
Ácido dotriacontanoico (C32)	0,25 ± 0,02	—	—	3,05 ± 1,00	—	0,80 ± 0,72
Ácido oleico (C18:1)	0,21 ± 0,02	0,48 ± 0,16	0,94 ± 1,26	2,37 ± 1,11	0,16 ± 0,19	9,65 ± 2,78
Ácido linoleico (C18:2)	—	—	0,56 ± 0,79	0,98 ± 0,78	—	3,83 ± 0,48
<b>Aldeídos</b>						
Octacosanal (C28)	—	—	—	—	1,67 ± 1,18	—
Triacontanal (C30)	—	—	—	—	1,11 ± 2,01	—
Dotriacontanal (C32)	—	—	—	1,37 ± 1,02	—	—
<b>Álcoois primários</b>						
Icosan-1-ol (C20)	—	—	—	—	—	0,21 ± 0,14
Docosan-1-ol (C22)	—	—	—	—	—	0,14 ± 0,20
Tetracosan-1-ol (C24)	0,60 ± 0,08	0,07 ± 0,07	2,38 ± 0,78	0,07 ± 0,09	—	0,08 ± 0,11
Pentacosan-1-ol (C25)	1,15 ± 0,21	—	—	—	—	—
Hexacosan-1-ol (C26)	1,18 ± 0,31	0,08 ± 0,08	9,22 ± 4,45	0,16 ± 0,11	0,25 ± 0,29	0,95 ± 0,21

<b>Compostos</b>	<i>Tryonia myriophylla</i>	<i>Hypolepis stolonifera</i>	<i>Pteridium esculentum</i>	<i>Parablechnum cordatum</i>	<i>Neoblechnum brasiliense</i>	<i>Campyloneurum nitidum</i>
Heptacosan-1-ol (C27)	2,39 ± 0,14	—	—	—	0,29 ± 0,23	0,38 ± 0,06
Octacosan-1-ol (C28)	2,39 ± 0,45	—	5,89 ± 2,97	0,30 ± 0,21	2,03 ± 1,59	2,41 ± 0,58
Nonacosan-1-ol (C29)	—	—	—	—	—	2,02 ± 2,11
Triacontan-1-ol (C30)	0,58 ± 0,09	—	—	1,66 ± 0,42	1,18 ± 0,79	0,71 ± 1,00
Hentriacontan-1-ol (C31)	—	—	—	—	0,27 ± 0,31	—
Dotriacontan-1-ol (C32)	0,18 ± 0,13	—	1,68 ± 1,28	1,97 ± 0,92	0,18 ± 0,28	—
Tritriacontan-1-ol (C33)	—	—	—	—	0,04 ± 0,08	—
Tetratriacontan-1-ol (C34)	—	—	—	1,07 ± 0,84	0,02 ± 0,06	0,10 ± 0,14
<b>Cetonas</b>						
Nonacosan-8-ona (C29)	—	—	—	—	3,03 ± 2,40	—
Hentriacontan-16-ona (C31)	—	—	—	—	0,87 ± 0,81	—
Tritriacontan-16-ona (C33)	—	—	—	—	2,19 ± 1,72	—
Pentatriacontan-18-ona (C35)	—	—	—	—	0,54 ± 0,68	—
<b>Tocoferol</b>						
<i>alpha</i> -Tocoferol (C29)	—	—	0,09 ± 0,12	—	—	—
<b>Esteroides</b>						
Campesterol (C28)	—	—	0,24 ± 0,21	—	—	0,61 ± 0,22
Stigmasterol (C29)	—	—	0,22 ± 0,31	—	—	0,24 ± 0,18
Stigmastanol (C29)	—	—	—	—	0,04 ± 0,09	—
<i>beta</i> -Sitosterol (C29)	0,61 ± 0,18	—	6,25 ± 5,46	—	—	5,65 ± 0,88
Sitostenona (C29)	0,74 ± 0,12	2,79 ± 0,63	4,00 ± 1,42	1,15 ± 0,68	0,33 ± 0,73	0,25 ± 0,36
<b>Triterpenos</b>						
Diplopteno (C30)	—	—	—	—	—	0,44 ± 0,32
Cicloartanona (C30)	—	—	10,65 ± 4,47	—	—	—

“—”: Homólogo não identificado.

**Tabela 6.** Porcentagem relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos compostos identificados no extrato de diclorometano nas ceras cuticulares foliares das espécies de Polypodiopsida leptosporangiadas recentes (Polypodiales) (parte 2) estudadas.

Compostos	<i>Elaphoglossum lingua</i>	<i>Lastreopsis amplissima</i>	<i>Microgramma squamulosa</i>	<i>Rumohra adiantiformis</i>	<i>Serpocaulon catharinae</i>
<b>Alcanos</b>					
Tricosano (C23)	—	0,23 $\pm$ 0,31	—	—	—
Tetracosano (C24)	—	0,59 $\pm$ 0,24	—	—	—
Pentacosano (C25)	—	0,60 $\pm$ 0,27	—	0,09 $\pm$ 0,18	—
Hexacosano (C26)	—	0,61 $\pm$ 0,29	—	0,09 $\pm$ 0,18	—
Heptacosano (C27)	—	0,55 $\pm$ 0,25	0,76 $\pm$ 0,14	0,41 $\pm$ 0,48	—
Octacosano (C28)	—	0,15 $\pm$ 0,33	0,71 $\pm$ 0,19	0,11 $\pm$ 0,22	—
Nonacosano (C29)	—	0,39 $\pm$ 0,47	25,72 $\pm$ 4,81	1,47 $\pm$ 0,95	—
Triacotano (C30)	—	0,13 $\pm$ 0,30	0,35 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,20	11,77 $\pm$ 0,00
Hentriacotano (C31)	—	0,93 $\pm$ 0,21	1,18 $\pm$ 0,15	23,74 $\pm$ 7,83	—
Dotriacotano (C32)	—	0,95 $\pm$ 0,22	—	0,53 $\pm$ 0,37	—
Tritriacotano (C33)	—	18,73 $\pm$ 5,22	—	9,01 $\pm$ 2,51	—
Tetratriacotano (C34)	—	1,16 $\pm$ 0,21	—	—	—
Pentatriacotano (C35)	—	0,90 $\pm$ 0,24	—	—	—
<b>Ésteres</b>					
Hexadecanoato de tetracosila (C40)	—	—	0,89 $\pm$ 0,67	—	0,56 $\pm$ 0,00
Icosanoato de docosila (C42)	—	—	—	—	1,63 $\pm$ 0,00
Octadecanoato de tetracosila (C42)	—	—	—	0,07 $\pm$ 0,13	9,47 $\pm$ 0,00
Icosanoato de tricosila (C43)	—	—	1,42 $\pm$ 1,00	—	—
Icosanoato de tetracosila (C44)	—	—	2,40 $\pm$ 3,40	0,2 $\pm$ 0,41	12,72 $\pm$ 0,00
Octadecanoato de hexacosila (C44)	—	—	2,35 $\pm$ 1,66	—	—
hexadecanoato de octacosila (C44)	—	—	—	0,73 $\pm$ 0,96	—
Hexadecanoato de triacotila (C46)	—	—	0,57 $\pm$ 0,42	—	—
<b>Ácidos graxos livres</b>					
Ácido dodecanoico (C12)	0,34 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,10	0,2 $\pm$ 0,18	0,29 $\pm$ 0,00
Ácido tetradecanoico (C14)	0,63 $\pm$ 0,00	2,20 $\pm$ 0,98	0,36 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,24	0,19 $\pm$ 0,00
Ácido pentadecanoico (C15)	0,54 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,15	0,18 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,12	—
Ácido hexadecanoico (C16)	—	11,35 $\pm$ 5,04	11,59 $\pm$ 1,38	11,16 $\pm$ 5,38	9,53 $\pm$ 0,00
Ácido heptadecanoico (C17)	12,15 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,23	—	—	—
Ácido octadecanoico (C18)	10,69 $\pm$ 0,00	5,22 $\pm$ 1,87	8,21 $\pm$ 1,83	15,65 $\pm$ 8,29	8,72 $\pm$ 0,00
Ácido icosanoico (C20)	—	1,79 $\pm$ 0,35	1,05 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,00
Ácido docosanoico (C22)	—	0,70 $\pm$ 0,31	0,82 $\pm$ 0,02	—	0,58 $\pm$ 0,00



<b>Compostos</b>	<b><i>Elaphoglossum lingua</i></b>	<b><i>Lastreopsis amplissima</i></b>	<b><i>Microgramma squamulosa</i></b>	<b><i>Rumohra adiantiformis</i></b>	<b><i>Serpocaulon catharinae</i></b>
Ácido tetracosanoico (C24)	1,49 ± 0,00	0,46 ± 0,19	2,74 ± 0,31	0,9 ± 0,14	2,01 ± 0,00
Ácido hexacosanoico (C26)	1,08 ± 0,00	1,71 ± 0,26	0,48 ± 0,04	0,68 ± 0,21	0,38 ± 0,00
Ácido heptacosanoico (C27)	—	—	—	0,06 ± 0,12	—
Ácido octacosanoico (C28)	0,40 ± 0,00	0,07 ± 0,16	0,26 ± 0,02	0,86 ± 0,29	—
Ácido nonacosanoico (C29)	—	—	0,26 ± 0,19	—	—
Ácido triacontanoico (C30)	—	—	2,82 ± 0,23	0,2 ± 0,2	—
Ácido dotriacontanoico (C32)	—	—	0,24 ± 0,02	0,07 ± 0,14	0,12 ± 0,00
Ácido oleico (C18:1)	3,74 ± 0,00	2,22 ± 1,35	0,48 ± 0,40	0,15 ± 0,29	0,2 ± 0,00
Ácido linoleico (C18:2)	2,77 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,27 ± 0,38	0,06 ± 0,12	—
<b>Aldeídos</b>					
Nonadecanal (C19)	—	0,50 ± 0,96	—	—	—
Hexacosanal (C26)	—	0,59 ± 0,42	—	—	—
Triacontanal (C30)	—	0,11 ± 0,24	—	—	—
Dotriacontanal (C32)	—	0,37 ± 0,83	—	0,10 ± 0,19	—
Tetratriacontanal (C34)	—	0,47 ± 0,44	—	—	—
<b>Álcoois primários</b>					
Docosan-1-ol (C22)	—	0,03 ± 0,06	0,15 ± 0,12	—	—
Tetracosan-1-ol (C24)	—	0,31 ± 0,13	0,66 ± 0,07	—	0,21 ± 0,00
Hexacosan-1-ol (C26)	—	1,79 ± 1,58	0,29 ± 0,03	—	0,15 ± 0,00
Octacosan-1-ol (C28)	—	1,79 ± 1,19	0,42 ± 0,12	0,28 ± 0,17	0,14 ± 0,00
Nonacosan-1-ol (C29)	—	—	—	—	—
Triacontan-1-ol (C30)	—	—	1,02 ± 0,27	0,33 ± 0,17	0,23 ± 0,00
Dotriacontan-1-ol (C32)	—	0,96 ± 0,22	—	0,32 ± 0,21	—
Tritriacontan-1-ol (C33)	—	0,58 ± 0,25	—	—	—
Tetratriacontan-1-ol (C34)	—	0,81 ± 0,57	—	—	—
<b>Cetonas</b>					
Hentriacontan-16-ona (C31)	—	0,25 ± 0,24	—	—	—
Tritriacontan-16-ona (C33)	—	0,85 ± 0,61	—	—	—
Pentatriacontan-18-ona (C35)	—	0,49 ± 0,41	—	—	—
<b>Esteroides</b>					
Cholestanona (C27)	3,60 ± 0,00	—	—	0,18 ± 0,18	—
Campesterol (C28)	—	0,17 ± 0,10	—	—	—
Campestanol (C28)	—	0,19 ± 0,15	0,27 ± 0,03	—	—
Stigmastanol (C29)	—	0,06 ± 0,14	1,01 ± 0,11	—	—
<i>beta</i> -Sitosterol (C29)	1,21 ± 0,00	3,31 ± 0,90	1,20 ± 0,24	1,23 ± 1,05	2,59 ± 0,00
Sitostenona (C29)	—	—	—	1,07 ± 0,87	—
<b>Triterpenos</b>					

<b>Compostos</b>	<b><i>Elaphoglossum lingua</i></b>	<b><i>Lastreopsis amplissima</i></b>	<b><i>Microgramma squamulosa</i></b>	<b><i>Rumohra adiantiformis</i></b>	<b><i>Serpocaulon catharinae</i></b>
Diplopteno (C30)	41,09 ± 0,00	0,70 ± 0,73	0,23 ± 0,17	0,40 ± 0,69	5,02 ± 0,00
<b>Fenólicos</b>					
Ácido cinâmico (C9)	—	—	—	0,93 ± 1,27	—
Ácido <i>p</i> -cumárico (C9)	—	0,18 ± 0,11	—	—	0,30 ± 0,00
Ácido hidroxicinâmico (C9)	—	—	—	1,58 ± 2,30	—

“—”: Homólogo não identificado.

Um total de 13 homólogos diferentes de álcoois primários foram encontrados, variando de 20 a 34 carbonos, principalmente homólogos pares, presentes em grande diversidade na maioria das espécies mesmo que em muitos casos em baixas porcentagens relativas. Homólogos com cadeias carbônicas variando amplamente em comprimento também foram encontrados em samambaias temperadas (Guo et al., 2018), diferentes espécies de *Equisetum* (Brune & Haas, 2011) e para *Osmunda regalis* (Jetter & Riederer, 2000), enquanto em samambaias mexicanas os homólogos de álcoois primários apresentaram cadeias carbônicas mais curtas, variando de 10 a 16 carbonos (Cerón-Carpio et al., 2019). Os homólogos mais abundantes de álcoois primários foram o hexacosan-1-ol (C26), octacosan-1-ol (C28) e triacontan-1-ol (C30), chegando a  $8,77 \pm 5,75$ ,  $9,90 \pm 6,17$  e  $6,81 \pm 3,80\%$  respectivamente na licófito *Palhinhaea cernua* (Tabela 3). As espécies de licófitas descritas na literatura *H. selago* e *S. moellendorffii* também apresentaram os álcoois primários bastante abundantes em suas ceras, com uma série homóloga similar, variando do homólogo tetracosan-1-ol (C24) ao dotriacontan-1-ol (C32), sendo que o homólogo triacontan-1-ol na *H. selago* chegou a cerca de 20% da cera total (Kong et al., 2020).

Três homólogos de álcoois secundários foram detectados. Os homólogos heptacosan-6-ol (C27) e nonacosan-6-ol (C29) foram identificados apenas em *Psilotum nudum* (Tabela 3) e o tritriacontan-14-ol (C33) foi identificado apenas em *Gleichenella pectinata* (Tabela 4). Álcoois secundários com cadeias carbônicas de 27 até 35 carbonos já foram descritos em outras espécies de polipodiófitas (Jetter & Riederer, 2000; Guo et al., 2018). Um diálcool secundário-secundário (tricosan-6,7-diol) presente com  $42,89 \pm 4,89\%$  foi encontrado nas ceras de *P. nudum*. Dentre as polipodiófitas que tiveram cera descrita na literatura, apenas *O. regalis* apresentou um homólogo semelhante, o nonacosan-10,16-diol (Jetter & Riederer, 2000).

As cetonas apareceram em grande diversidade de homólogos, com um total de 11, que variaram de 27 a 37 carbonos. Porém, apesar de grande variabilidade de homólogos, apenas um máximo de quatro homólogos por espécie foram identificados (Tabelas 3 a 6). O principal homólogo identificado foi a nonacosan-10-ona (C29), extremamente abundante nas ceras de *Gleichenella pectinata* ( $47,50 \pm 13,47\%$ ) e

*Osmunda spectabilis* ( $27,09 \pm 1,82\%$ ; Tabela 4). A variabilidade de homólogos de cetonas detectada foi muito maior do que a encontrada para as espécies tropicais mexicanas, as quais apresentaram apenas um homólogo com uma cadeia carbônica curta, com apenas 18 carbonos (Cerón-Carpio et al., 2019). Em relação as espécies temperadas, apesar de pouco abundantes, as cetonas apresentaram diversidade de homólogos semelhante as espécies tropicais desse estudo, tanto em relação ao tamanho da cadeia carbônica, quanto em relação a posição da função orgânica (Jetter & Riederer, 2000; Guo et al., 2018). Em *Osmunda spectabilis* (Tabela 4), foi encontrado um homólogo de cetol único dentre as espécies estudadas, a 16-hidroxinonacosan-10-ona (Tabela 4), com uma porcentagem relativa de  $10,76 \pm 1,71\%$ . Jetter e Riederer (2000) descreveram esse mesmo homólogo nas ceras foliares de *Osmunda regalis*. Dessa forma, os cetóis podem ser considerados potenciais marcadores quimiotaxonômicos das ceras de Osmundaceae, dentro das polipodiófitas, uma vez que, até o momento, esta classe foi apenas identificada em espécies dessa família.

Os ésteres e aldeídos apresentaram 10 e 7 homólogos distintos respectivamente, sendo o primeiro variando de 40 a 46 carbonos e o segundo de 17 a 34 carbonos, entretanto para a grande maioria das espécies eles estão presentes em baixíssimas quantidades (Tabelas 3 a 6). Duas espécies foram exceção, *Gleichenella pectinata* que apresentou maiores quantidades de aldeídos, com  $11,13 \pm 4,23\%$ , composto principalmente dos homólogos pares hexacosanal (C26), octacosanal (C28) e triacontanal (C30) e *Serpocaulon catharinae* que apresentou  $24,38 \pm 0,00\%$  de ésteres, principalmente o octadecanoato de tetracosila (C42) e o icosanoato de tetracosila (C44). Os aldeídos C26, C28 e C30 também foram abundantes nas ceras foliares de *Osmunda regalis* (Jetter & Riederer, 2000), uma espécie leptosporangiada basal assim como *G. pectinata*. Já os ésteres foram extremamente abundantes em diferentes espécies de polipodiófitas temperadas, com cadeias diversas variando de 36 até 54 carbonos (Guo et al., 2018).

Por fim, foram identificados 16 compostos cíclicos (esteroides, triterpenos, fenólicos e tocoferol), que foram encontrados de modo geral com pouca porcentagem relativa na mistura das ceras cuticulares das espécies estudadas. Dentre os compostos

cíclicos identificados, os principais foram os esteroides estigmastanol (C29), *beta*-sitosterol (C29), sitostenona (C29) e o triterpeno hopano diplopteno (C30) (Tabelas 3 a 6). A alta proporção de compostos cíclicos presentes nas ceras cuticulares geralmente está associada a funções não relacionadas a retenção de água, tal como proteção contra herbivoria como o caso dos triterpenos (Oliveira et al., 2003) e proteção contra o excesso de radiação ultravioleta como visto para os fenólicos (González Moreno et al., 2022). As espécies com as maiores quantidades de compostos cíclicos foram *Elaphoglossum lingua* (Dryopteridaceae) e *Lophosoria quadripinata* (Cyatheaceae), ambas com altas concentrações do triterpeno diplopteno, com  $41,09 \pm 0,00\%$  e  $28,23 \pm 2,57\%$  respectivamente (Tabelas 4 e 6). Ambas as famílias apresentam espécies caracterizadas por apresentar folhas nutritivas e quantidade variável de tricomas, apresentando como forma de defesa compostos bioativos (Farias et al., 2020). A alta quantidade do triterpeno diplopteno pode estar associada a proteção de suas folhas nutritivas contra herbívoros. O diplopteno não é um triterpeno comumente identificado como parte das ceras vegetais, sendo mais comum presente em microorganismos e no solo (Elvert et al., 2001). Entretanto esse triterpeno já foi isolado em extratos foliares de *Dryopteris crassirhizoma* Nakai (Dryopteridaceae – Polypodiales; Ageta et al., 1963). A presença de tocoferol e fenólicos como parte das ceras não é comum, porém a identificação destas substâncias como parte das ceras de polipodiófitas já foi realizada em *Actiniopteris radiata* (Sw.) Link e em diferentes espécies tropicais mexicanas (Manubolu et al., 2013; Cerón-Carpio et al., 2019).

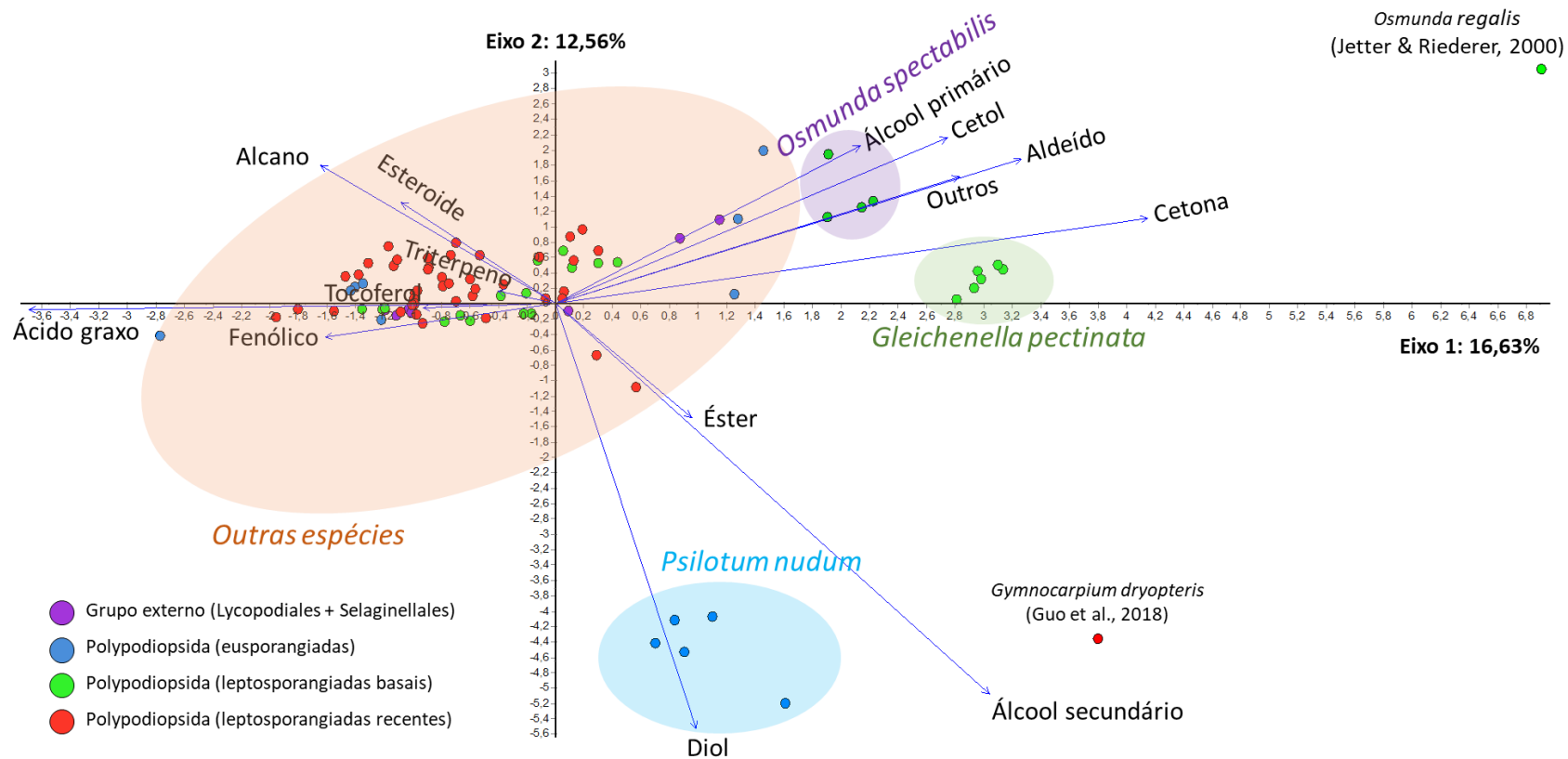
### **Análise dos agrupamentos**

Através da Análise de Componentes Principais (PCA) realizada a partir da porcentagem relativa das classes encontradas nas ceras dos indivíduos desse estudo e também pela porcentagem relativa das ceras das espécies presentes na Tabela 2, é possível verificar a formação de quatro grupos distintos (Figura 5), com uma explicação de 16,63% para o eixo 1 e 12,56% para o eixo 2. Três desses grupos são formados por todos os indivíduos de uma única espécie cada, sendo um deles formado pela *Gleichenella pectinata*, outro pelo *Psilotum nudum* e por fim outro pela *Osmunda spectabilis*. Já o último grupo é formado pelo aglomerado do restante das espécies de

Polipodiopsida e também pelas espécies do grupo externo. A formação dos grupos com apenas uma espécie cada ocorreu principalmente pela presença exclusiva ou de grandes quantidades de compostos específicos. O grupo formado pela *G. pectinata* é fortemente influenciado por grandes quantidades de cetonas (principalmente pelo homólogo nonacosan-10-ona) e também pela maior presença relativa de aldeídos em suas ceras, enquanto o grupo formado pela *P. nudum* apresenta maiores quantidades relativas de álcoois secundários e a presença exclusiva do diálcool tricosan-6,7-diol. Já o grupo formado pela *O. spectabilis* foi influenciado por grandes quantidades de cetonas (principalmente pelo homólogo nonacosan-10-ona), quantidades relativamente altas de álcoois primários e pela presença exclusiva do cetol 16-hidroxinonacosan-10-ona. O grande grupo formado pelo restante dos indivíduos pertencentes ao restante das espécies teve influência fortemente associada a maiores quantidades de ácidos graxos livres e de alcanos.

A presença exclusiva de tricosan-6,7-diol nas ceras de *P. nudum* e de 16-hidroxinonacosan-10-ona nas ceras de *O. spectabilis* mostram-se interessantes como possíveis marcadores quimiotaxonômicos de suas famílias, uma vez que se sobressaíram dentro das diferentes espécies de Polypodiopsida e Lycopodiopsida estudadas e também pelas já descritas na literatura. Um estudo futuro com a análise das ceras foliares de outras espécies de Psilotaceae e Osmundaceae será interessante para testar o potencial quimiotaxonômico dessas substâncias encontradas nas ceras dessas duas famílias.

As espécies *Gymnocarpium dryopteris* (Guo et al., 2018) e *Osmunda regalis* (Jetter & Riederer, 2000) ficaram isoladas dos grupos formados pelo PCA devido às suas constituições distintas de suas ceras. A cera de *G. dryopteris* apresenta grandes teores de éster (~60%) e também de cetonas (~31%) enquanto em *O. regalis* há a presença de grande quantidade de homólogos de dicetonas, ceto-aldeídos, ceto-álcoois e ceto-ésteres (~27,70%), fazendo com que essas espécies apresentem composições de ceras com proporções únicas dentre as Polipodiopsida estudadas se destoando dos grupos formados.



**Figura 5.** Análise de componentes principais (PCA) realizada através dos valores de porcentagem relativa de cada classe encontrada para as diferentes espécies analisadas nesse estudo e pelas espécies apresentadas na Tabela 2. O vetor “Outros” é formado pela soma das porcentagens relativas das classes da dicetonas, ceto-aldeídos, ceto-álcoois e ceto-ésteres.

Pouca relação foi verificada quanto à composição química entre as espécies de polipodiófitas quanto a divisão em relação ao tipo de esporângios, época de surgimento do grupo e hábito (aquático, arbóreo, arbustivo e epifítico). As características mais marcantes encontradas foi a presença de cetonas em grandes quantidades associada a baixas porcentagens relativas de ácidos graxos nas espécies de leptosporangiadas basais em relação aos outros grupos considerando as licopodiófitas. Além disso, ressalta-se a importância de estudar mais a fundo a influência do ambiente sobre as ceras de polipodiófitas e licopodiófitas em trabalhos futuros, usando de base mesmas espécies coletadas em diferentes regiões.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo da continuidade a trabalhos recentemente publicados adicionando muitos dados inéditos sobre as ceras foliares de espécies de polipodiófitas e também duas espécies de licopodiófitas, grupos reconhecidamente pouco explorados quanto as ceras cuticulares. A partir dos dados obtidos, fica evidente que o maquinário biossintético presente e já amplamente descrito para angiospermas está presente nas polipodiófitas, uma vez que diversas classes e homólogos de compostos de cera foram identificados nos grupos estudados. Baseado nas espécies utilizadas nesse estudo, nenhuma relação clara foi identificada nas ceras quanto a proximidade filogenética das espécies, tipo de esporângio, data de surgimento ou hábito. A presença em grandes quantidades de cetonas junto a baixas porcentagens relativas de ácidos graxos nas espécies de leptosporangiadas basais em relação aos outros grupos incluindo as licopodiófitas foi a característica que mais distinguiu as espécies estudadas. Ademais, a presença de diol nas ceras de *Psilotum* e cetois nas ceras de *Osmunda* mostra-se promissora como possíveis marcadores quimiotaxonômicos de Psilotaceae e Osmundaceae, respectivamente. Estudos futuros com a mesma espécie de Polypodiopsida coletada em mais de um ambiente pode confirmar a real importância do clima sobre as ceras cuticulares nesse grupo, além disso, o estudo de mais espécies de mesma família ou mesma ordem podem ajudar a estabelecer novos marcadores quimiotaxonômicos dentro das polipodiófitas.



## RECONHECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo de número: 140085/2019-0) pela concessão da bolsa de pesquisa científica de doutorado. A Estação Biológica de Boraceia (EEB) pela liberação das coletas de material vegetal. Também gostariam de agradecer aos doutores Rafael da Silva Cruz e Marcelo Fernando Devecchi pela coleta de alguns espécimes e auxílio no Herbário SPF da Universidade de São Paulo.

## REFERÊNCIAS

- Ageta, H., Iwata, K., & Yonezawa, K. (1963). Fern constituents: fernene and diploptene, triterpenoid hydrocarbons isolated from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 11(3), 408-409.
- Báez-Sañudo, R., Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., & García, L. Z. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en Plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 3–12.
- Baker, E. A., Procopiou, J., & Hunt, G. M. (1975). The cuticles of *Citrus* species. Composition of leaf and fruit waxes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(8), 1093-1101.
- Barthlott, W., Schimmel, T., Wiersch, S., Koch, K., Brede, M., Barczewski, M., ... & Bohn, H. F. (2010). The *Salvinia* paradox: superhydrophobic surfaces with hydrophilic pins for air retention under water. *Advanced Materials*, 22(21), 2325-2328.
- Barthlott, W., Rieder, K., & Wolter, M. (1994). Mimicry and ultrastructural analogy between the semi-aquatic grasshopper *Paulinia acuminata* (Orthoptera: Pauliniidae) and its foodplant, the water-fern *Salvinia auriculata* (Filicatae: Salviniaceae). *Amazoniana*, 13(1-2), 47-58.
- Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., & Pollard, M. (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis* epidermis:

occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1, 18-dioate as the major component. *The Plant Journal*, 40(6), 920-930.

Brune, T., & Haas, K. (2011). *Equisetum* species show uniform epicuticular wax structures but diverse composition patterns. *AoB Plants*, 2011.

Bottari, F., Marsili, A., Morelli, I., & Pacchiani, M. (1972). Aliphatic and triterpenoid hydrocarbons from ferns. *Phytochemistry*, 11(8), 2519-2523.

Budke, J. M., Goffinet, B., & Jones, C. S. (2012). The cuticle on the gametophyte calyptra matures before the sporophyte cuticle in the moss *Funaria hygrometrica* (Funariaceae). *American Journal of Botany*, 99(1), 14-22.

Bush, R. T., & McInerney, F. A. (2013). Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 117, 161-179.

Buschhaus, C., & Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces?. *Journal of experimental botany*, 62(3), 841-853.

Buschhaus, C., Herz, H., & Jetter, R. (2007). Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Annals of botany*, 100(7), 1557-1564.

Busta, L., Budke, J. M., & Jetter, R. (2016a). Identification of  $\beta$ -hydroxy fatty acid esters and primary, secondary-alkanediol esters in cuticular waxes of the moss *Funaria hygrometrica*. *Phytochemistry*, 121, 38-49.

Busta, L., Budke, J. M., & Jetter, R. (2016b). The moss *Funaria hygrometrica* has cuticular wax similar to vascular plants, with distinct composition on leafy gametophyte, calyptra and sporophyte capsule surfaces. *Annals of botany*, 118(3), 511-522.

Cerman, Z., Striffler, B. F., & Barthlott, W. (2009). Dry in the water: the superhydrophobic water fern *Salvinia* – a model for biomimetic surfaces. In: S. N. Gorb (ed.), *Functional surfaces in biology*, Springer, 97-111.

- Cerón-Carpio, A. B., Pérez-García, B., Villanueva, J. L. M., Kiel-Martínez, A. L., Espinosa-Matias, S., Guerrero-Analco, J. A., & Mehlreter, K. (2019). Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*, *85*, 13-20.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J. A., & Heredia, A. (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New phytologist*, *189*(4), 938-949.
- Elvert, M. A. R. C. U. S., Whitticar, M. J., & Suess, E. (2001). Diploptene in varved sediments of Saanich Inlet: indicator of increasing bacterial activity under anaerobic conditions during the Holocene. *Marine Geology*, *174*(1-4), 371-383.
- Farias, R. D. P., da Costa, L. E. N., de Oliveira, A. F. M., Barros, I. C. L., & Mehlreter, K. (2020). Leaf defense syndromes in tropical ferns. *Plant Ecology*, *221*(10), 853-865.
- Favaro, M. A., Molina, M. C., Roeschlin, R. A., Gadea, J., Gariglio, N., & Marano, M. R. (2020). Different responses in mandarin cultivars uncover a role of cuticular waxes in the resistance to *Citrus* canker. *Phytopathology*, *110*(11), 1791-1801.
- Flora do Brasil 2020. In: Samambaias e Licófitas. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB128483>>. Acesso em: 24 Ago. 2018.
- Franich, R. A., Goodin, S. J., & Hansen, E. (1985). Wax esters of the New Zealand silver fern, *Cyathea dealbata*. *Phytochemistry*, *24*(5), 1093-1095.
- García-Guzmán, G., & Heil, M. (2014). Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist*, *201*(4), 1106-1120.
- Gérard, H. C., Osman, S. F., Fett, W. F., & Moreau, R. A. (1992). Separation, identification and quantification of monomers from cutin polymers by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *Phytochemical Analysis*, *3*(3), 139-144.
- González Moreno, A., de Cózar, A., Prieto, P., Domínguez, E., & Heredia, A. (2022). Radiationless mechanism of UV deactivation by cuticle phenolics in plants. *Nature Communications*, *13*(1), 1786.

- Grünhofer, P., Herzig, L., Sent, S., Zeisler-Diehl, V. V., & Schreiber, L. (2022). Increased cuticular wax deposition does not change residual foliar transpiration. *Plant, Cell & Environment*, 45(4), 1157-1171.
- Guelz, P. G., Scora, R. W., Mueller, E., & Marner, F. J. (1987). Epicuticular leaf waxes of *Citrus halimii* Stone. *Journal of agricultural and food chemistry*, 35(5), 716-720.
- Gülz, P. G., Müller, E., Schmitz, K., Marner, F. J., & Güth, S. (1992). Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47(7-8), 516-526.
- Guo, Y., Busta, L., & Jetter, R. (2017). Cuticular wax coverage and composition differ among organs of *Taraxacum officinale*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 372-379.
- Guo, Y., Li, J. J., Busta, L., & Jetter, R. (2018). Coverage and composition of cuticular waxes on the fronds of the temperate ferns *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crispa*, *Polypodium glycyrrhiza*, *Polystichum munitum* and *Gymnocarpium dryopteris*. *Annals of botany*, 122(4), 555-568.
- Haas, K. (1982). Surface wax of *Andreaea* and *Pogonatum* species. *Phytochemistry*, 21(3), 657-659.
- Holloway, P. J. & Jeffree, C. E. (2017). Epicuticular waxes. In: B. Thomas, D. J. Murphy & B. G. Murray (eds.). *Encyclopedia of applied plant sciences, second edition, vol. 2*. Academic Press, 1190-1204.
- Jetter, R., Kunst, L., & Samuels, A. L. (2006). Composition of plant cuticular waxes. *Annual plant reviews volume 23: Biology of the plant cuticle*, 145-181.
- Jetter, R., & Riederer, M. (2000). Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *Journal of chemical ecology*, 26(2), 399-412.
- Jetter, R., & Riederer, M. (1999). Long-chain alkanediols, ketoaldehydes, ketoalcohols and ketoalkyl esters in the cuticular waxes of *Osmunda regalis* fronds. *Phytochemistry*, 52(5), 907-915.

- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (2008). *Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético* (Terceira). ARTMED Editora SA, 632p.
- Kong, L., Liu, Y., Zhi, P., Wang, X., Xu, B., Gong, Z., & Chang, C. (2020). Origins and evolution of cuticle biosynthetic machinery in land plants. *Plant Physiology*, *184*(4), 1998-2010.
- Kunst, L. & Haslam T. M. (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Science*, *210*, 93-107.
- Kunst, L., & Samuels, L. (2009). Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current opinion in plant biology*, *12*(6), 721-727.
- Lange, B. M. (2015). The evolution of plant secretory structures and emergence of terpenoid chemical diversity. *Annual review of plant biology*, *66*, 139-159.
- Lewandowska, M., Keyl, A., & Feussner, I. (2020). Wax biosynthesis in response to danger: its regulation upon abiotic and biotic stress. *New Phytologist*, *227*(3), 698-713.
- Li, L., Du, Y., He, C., Dietrich, C. R., Li, J., Ma, X., ... & Zheng, J. (2019). Maize glossy6 is involved in cuticular wax deposition and drought tolerance. *Journal of experimental botany*, *70*(12), 3089-3099.
- Lim, G. H., Singhal, R., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2017). Fatty acid–and lipid-mediated signaling in plant defense. *Annual review of Phytopathology*, *55*, 505-536.
- Maiti, R., Rodriguez Gonzalez, H., Gonzalez, E. A., Kumari, A., & Sarkar, N. C. (2016). Variability in epicuticular wax in 35 woody plants in Linares, Northeast Mexico. *Journal of forest research*, *5*(1).
- Manubolu, M., Goodla, L., Chandar, B. G. N., Ravilla, S., & Obulum, V. R. (2013). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Wax from *Actinopterys radiata* (Sw.) Link. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *16*(3), 387-392.

- Matos, T. M., Cruz, R., Peralta, D. F., & dos Santos, D. Y. A. C. (2022). Cuticle structure and chemical composition of waxes in *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk (Notothyladaceae, Anthocerotophyta). *Frontiers in plant science*, *13*, 785812-785812.
- Matos, T. M., Peralta, D. F., Roma, L. P., & Santos, D. Y. A. C. D. (2021). The morphology and chemical composition of cuticular waxes in some Brazilian liverworts and mosses. *Journal of Bryology*, *43*(2), 129-137.
- Matsunaga, K. K., & Tomescu, A. M. (2016). Root evolution at the base of the lycophyte clade: insights from an Early Devonian lycophyte. *Annals of botany*, *117*(4), 585-598.
- Müller, C., & Riederer, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of chemical ecology*, *31*, 2621-2651.
- Oliveira, A. F., Meirelles, S. T., & Salatino, A. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *75*, 431-439.
- Osman, S. F., Gerard, H. C., Fett, W. F., Moreau, R. A., & Dudley, R. L. (1995). Method for the production and characterization of tomato cutin oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(8), 2134-2137.
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R. B., Höfer, R., ... & Aharoni, A. (2007). The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant physiology*, *145*(4), 1345-1360.
- Prado, J. (1998). Pteridófitas do estado de São Paulo. In: C. E. M. Bicudo & G. J. Shepherd (Eds.), *Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 2: fungos macroscópicos e plantas*, 47-61.
- Prado, J., Sylvestre, L. D. S., Labiak, P. H., Windisch, P. G., Salino, A., Barros, I. C., ... & Pereira, A. F. D. N. (2015). Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. *Rodriguésia*, *66*(4), 1073-1083.

- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in plant science*, 13(5), 236-246.
- Post-Beittenmiller, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Plant Biology*, 47(1), 405–430.
- Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Wolf, P. G., Schneider, H., Smith, A. R., & Cranfill, R. (2004). Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American journal of Botany*, 91(10), 1582-1598.
- PPG I. (2016). A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of systematics and evolution*, 54(6), 563-603.
- Renault, H., Alber, A., Horst, N. A., Lopes, A. B., Fich, E. A., Kriegshauser, L., ... & Pineau, E. (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature communications*, 8, 14713.
- Riedel, M., Eichner, A., & Jetter, R. (2003). Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta*, 218, 87-97.
- Riederer, M. (2006). Introduction: biology of the plant cuticle. In: M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Annual plant reviews, volume 23: Biology of the plant cuticle*. Blackwell publishing Ltd, 1-8.
- Samuels, L., Kunst, L., & Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 683-707.
- Santos, D. Y., Ferreira, M. J., Matos, T. M., Sala-Carvalho, W. R., Anselmo-Moreira, F., Roma, L. P., ... & Furlan, C. M. (2021). UV-B and drought stress influenced growth and cellular compounds of two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). *Photochemistry and Photobiology*, 97(1), 166-179.
- Schneider, H., Schuettpelz, E., Pryer, K. M., Cranfill, R., Magallón, S., & Lupia, R. (2004). Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature*, 428(6982), 553-557.

- Shepherd, T., & Griffiths, W. D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3), 469-499.
- Siems, K., Weigt, F., & Wollenweber, E. (1996). Drimanes from the epicuticular wax of the fern *Nephrolepis biserrata*. *Phytochemistry*, 41(4), 1119-1121.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*, 55(3), 705-731.
- Tanaka, N., Wada, H., Dietz, V., & Wollenweber, E. (1992). Leaf surface terpenoids of the tree fern *Lophosoria quadripinnata*. *Phytochemistry*, 31(1), 347-349.
- Tricinci, O., Terencio, T., Mazzolai, B., Pugno, N. M., Greco, F., & Mattoli, V. (2015). 3D micropatterned surface inspired by *Salvinia molesta* via direct laser lithography. *ACS applied materials & interfaces*, 7(46), 25560-25567.
- Wen, M., Buschhaus, C., & Jetter, R. (2006). Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. *Phytochemistry*, 67(16), 1808-1817.
- Wollenweber, E., & Schneider, H. (2000). Lipophilic exudates of Pteridaceae—chemistry and chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(8), 751-777.
- Wollenweber, E., Scheele, C., & Tryon, A. F. (1987). Flavonoids and spores of *Platyzoma microphyllum*, an endemic fern of Australia. *American fern journal*, 77(1), 28-32.
- Xu, S. J., Jiang, P. A., Wang, Z. W., & Wang, Y. (2009). Crystal structures and chemical composition of leaf surface wax depositions on the desert moss *Syntrichia caninervis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(6), 723-730.
- Yang, H., Liu, W., Leng, Q., Hren, M. T., & Pagani, M. (2011). Variation in n-alkane  $\delta D$  values from terrestrial plants at high latitude: implications for paleoclimate reconstruction. *Organic Geochemistry*, 42(3), 283-288.
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant physiology*, 163(1), 5-20.



## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 1S.** Levantamento das espécies de polipodiófitas e licófitas analisadas quanto as ceras cuticulares incluindo as deste estudo. Para o levantamento foi usado o nome das ordens e famílias associada aos termos *wax* (cera) e *cuticle* (cutícula).

Ordem*	Família**	Espécie	Principal fração estudada	Ref.
Selaginellales (1/1)	Selaginellaceae (2/700)	<i>Selaginella muscosa</i> Spring	Total	1
		<i>S. moellendorffii</i> Hieron.	Total	2
Lycopodiales (1/1)	Lycopodiaceae (2/338)	<i>Palhinhaea cernua</i> (L.) Franco & Vasc.	Total	1
		<i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh. ex Schrank & Mart.	Total	2
Equisetales (1/1)	Equisetaceae (8/15)	<i>Equisetum hyemale</i> L.	Total	1 e 3
		<i>E. pratense</i> Ehrh.	Alcanos	4
		<i>E. arvense</i> L.	Total	3
		<i>E. telmateia</i> Ehrh.	Total	3
		<i>E. sylvaticum</i> L.	Total	3
		<i>E. scirpoides</i> Michx.	Total	3
		<i>E. variegatum</i> Schleich. ex Weber & Mohr	Total	3
		<i>E. fluviatile</i> L.	Total	3
Psilotales (1/1)	Psilotaceae (1/17)	<i>Psilotum nudum</i> (L.) P.Beauv.	Total	1
Ophioglossales (1/1)	Ophioglossaceae (2/112)	<i>Ophioglossum reticulatum</i> L.	Total	1
		<i>O. costatum</i> R.Br.	Alcanos e triterpenos	5
Marattiales (1/1)	Marattiaceae (1/111)	<i>Danaea nodosa</i> (L.) Sm.	Total	6
Osmundales (1/1)	Osmundaceae (2/18)	<i>Osmunda spectabilis</i> Willd.	Total	1
		<i>O. regalis</i> L.	Alcanos e Total	7,8 e 9
Hymenophyllales (1/1)	Hymenophyllaceae (1/434)	<i>Hymenophyllum caudiculatum</i> Mart.	Total	1
Gleicheniales (1/3)	Gleicheniaceae (1/157)	<i>Gleichenella pectinata</i> (Willd.) Ching	Total	1
Schizeales (2/3)	Anemiaceae (1/115)	<i>Anemia villosa</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	Total	1
	Schizaeaceae (1/35)	<i>Lygodium smithianum</i> Presl ex Kuhn	Alcanos e triterpenos	5
Salviniales (2/2)	Salviniaceae (7/21)	<i>Salvinia auriculata</i> Jean Baptiste Christian Fusée-Aublet	Total e morfologia	1 e 10
		<i>S. cucullata</i> Roxb	Morfologia	11
		<i>S. oblongifolia</i> Martius	Morfologia	11
		<i>S. minima</i> Baker	Morfologia	11
		<i>S. biloba</i> Raddi	Morfologia	11

Ordem*	Família**	Espécie	Principal fração estudada	Ref.
		<i>S. molesta</i> D.S. Mitch	Morfologia	11, 12 e 13
		<i>Azolla africana</i> Desv.	Alcanos e triterpenos	5
	Marsileaceae (3/61)	<i>Marsilea diffusa</i> Lepr. ex A. Br.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>M. polycarpa</i> Hook. et Grev.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>M. quadrifolia</i> L.	Alcanos e triterpenos	5
Cyatheales (1/8)	Cyatheaceae (5/643)	<i>Cyathea atrovirens</i> (Langsd. & Fisch.) Domin	Total	1
		<i>C. manniana</i> Hook.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>C. cooperi</i> (Hook. Ex F. Muell) Domin.	Alcanos	7
		<i>C. dealbata</i> (G.Forst.) Sw.	Ésteres	14
		<i>Lophosoria quadripinata</i> (J.F. Gmel.) C. Chr.	Total e terpenoides	1 e 15
Polypodiales (12/26)	Dennstaedtiaceae (3/265)	<i>Hypolepis stolonifera</i> Fée	Total	1
		<i>Pteridium esculentum</i> (G. Forst.) Cockayne	Total	1
		<i>P. aquilinum</i> (L.) Kuhn	Total	17
	Pteridaceae (4/1211)	<i>Tryonia myriophylla</i> (Sw.) Schuettp. et al.	Total	1
		<i>Adiantum vogelii</i> Mett. ex Keys.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Actiniopteris radiata</i> (Sw.) Link	Total	16
		<i>Cryptogramma crispera</i> (L.) R.Br. ex Hook.	Total	17
	Cystopteridaceae (1/37)	<i>Gymnocarpium dryopteris</i> (L.) Newman	Total	17
	Aspleniaceae (4/730)	<i>Asplenium adiantum-nigrum</i> L.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>A. africanum</i> Desv.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>A. trichomanes</i> L.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Phyllitis scolopendrium</i> (L.) Newman	Alcanos e triterpenos	5
	Blechnaceae (3/265)	<i>Parablechnum cordatum</i> (Desv.) Gasper & Salino	Total	1
		<i>Neoblechnum brasiliense</i> (Desv.) Gasper & V.A.O. Dittrich	Total	1
		<i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth	Alcanos e triterpenos	5
	Athyriaceae (1/650)	<i>Diplazium drepanolobium</i> A.R.Sm.	Total	6
	Thelypteridaceae (1/1034)	<i>Goniopteris rhachiflexuosa</i> (Riba) Salino & T.E.Almeida	Total	6
	Dryopteridaceae (9/2115)	<i>Elaphoglossum lingua</i> (C. Presl) Brack.	Total	1
		<i>Lastreopsis amplissima</i> (C. Presl) Tindale	Total	1
		<i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forst.) Ching	Total	1
		<i>Ctenitis protensa</i> (Afz. ex Swartz) Ching	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Bolbitis portoricensis</i> (Spreng.) Hennipman	Total	6

Ordem*	Família**	Espécie	Principal fração estudada	Ref.
		<i>Mickelia bernoullii</i> (Kuhn ex Christ) R.C.Moran, Labiak & Sundue	Total	6
		<i>M. pergamentacea</i> (Maxon) R.C.Moran, Labiak & Sundue	Total	6
		<i>Polystichum munitum</i> (Kaulf.) C.Presl	Total	17
	Lomariopsidaceae (2/69)	<i>Lomariopsis palustris</i> (Hook.) Mett. ex Kuhn	Alcanos e triterpenos	5
		<i>L. recurvata</i> Fée	Total	6
	Oleandraceae (1/15)	<i>Oleandra distenta</i> Kunze	Alcanos e triterpenos	5
	Davalliaceae (1/65)	<i>Nephrolepis biserrata</i> (Swartz) Schott	Alcanos e terpenoides	5 e 18
	Polypodiaceae (9/1652)	<i>Microgramma squamulosa</i> (Kaulf.) de la Sota	Total	1
		<i>Campyloneurum nitidum</i> (Kaulf.) C. Presl	Total	1
		<i>Serpocaulon catharinae</i> (Langsd. & Fisch.) A.R. Sm.	Total	1
		<i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Platyterium elephantotis</i> Schweinf.	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Phymatodes scolopendria</i> (N. L. Burm.) Ching	Alcanos e triterpenos	5
		<i>Polypodium rhachipterygium</i> Liebm.	Total	6
		<i>P. glycyrrhiza</i> D.C.Eaton	Total	17
		<i>Matteuccia pensylvanica</i> subsp. <i>pensylvanica</i> (L.) Tod.	Alcanos	7

Refs.: <sup>1</sup>Este estudo; <sup>2</sup>Kong et al., 2020; <sup>3</sup>Brune & Haas, 2011; <sup>4</sup>Yang et al., 2011; <sup>5</sup>Bottari et al., 1972; <sup>6</sup>Cerón-Carpio et al., 2019; <sup>7</sup>Bush & McInerney, 2013; <sup>8</sup>Jetter & Riederer, 1999; <sup>9</sup>Jetter & Riederer, 2000; <sup>10</sup>Barthlott et al., 1994; <sup>11</sup>Cerman et al., 2009; <sup>12</sup>Barthlott et al., 2010; <sup>13</sup>Tricinci et al., 2015; <sup>14</sup>Franich et al., 1985; <sup>15</sup>Tanaka et al., 1992; <sup>16</sup>Manubolu et al., 2013; <sup>17</sup>Guo et al., 2018; <sup>18</sup>Siems et al., 1996.

\*Ordem (Número de famílias estudadas / Número total de famílias da ordem).

\*\*Família (Número de espécies estudadas / Número de espécies da família).

**Tabela 2S.** Valores de teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e porcentagem relativa das classes de compostos utilizados para a construção das figuras 2, 4 e 5 das espécies pertencentes ao grupo externo e eusporangiadas.

<b>Espécies</b>	<i>Selaginella muscosa</i>	<i>Palhinhaea cernua</i>	<i>Equisetum hyemale</i>	<i>Psilotum nudum</i>	<i>Ophioglossum reticulatum</i>
<b>Teor (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}</math>)</b>	3,76 ± 0,57	19,7 ± 1,15	11,83 ± 1,11	8,40 ± 2,01	15,95 ± 0,00
<b>Classes (%)</b>					
Alcanos	0,18 ± 0,21	0,12 ± 0,09	12,10 ± 2,21	0,41 ± 0,26	—
Ésteres	—	—	—	—	—
Ácidos graxos	64,95 ± 4,36	7,03 ± 4,51	64,67 ± 4,32	23,68 ± 7,53	74,03 ± 0,00
Aldeídos	—	—	—	—	—
Álcoois Primários	2,04 ± 0,74	28,25 ± 17,51	7,04 ± 1,87	1,68 ± 0,63	0,90 ± 0,00
Álcoois secundários	—	—	—	2,14 ± 0,49	—
Diol	—	—	—	42,89 ± 4,89	—
Cetonas	—	—	—	—	—
Cetol	—	—	—	—	—
Tocoferol	—	—	—	—	—
Esteroides	1,66 ± 0,47	0,04 ± 0,06	2,98 ± 1,07	0,06 ± 0,11	—
Triterpenos	—	—	—	—	—
Fenólicos	—	0,34 ± 0,24	3,79 ± 1,55	0,84 ± 0,46	—

“—“ Classes não identificadas.

**Tabela 3S.** Valores de teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e porcentagem relativa das classes de compostos utilizados para a construção das figuras 2, 4 e 5 das espécies pertencentes ao grupo das leptosporangiadas basais.

<b>Espécies</b>	<i>Osmunda spectabilis</i>	<i>Hymenophyllum caudiculatum</i>	<i>Gleichenella pectinata</i>	<i>Anemia villosa</i>	<i>Salvinia auriculata</i>	<i>Cyathea atrovirens</i>	<i>Lophosoria quadripinata</i>
<b>Teor (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}</math>)</b>	27,91 ± 4,29	14,46 ± 1,16	51,96 ± 13,46	14,67 ± 1,33	13,48 ± 1,29	11,73 ± 2,86	58,63 ± 2,91
<b>Classes (%)</b>							
Alcanos	8,08 ± 13,68	2,70 ± 0,71	0,26 ± 0,44	12,84 ± 0,20	—	—	0,93 ± 0,35
Ésteres	—	—	—	—	—	1,55 ± 1,05	0,02 ± 0,04
Ácidos graxos	17,26 ± 5,10	31,73 ± 2,55	4,22 ± 1,64	9,44 ± 2,11	0,62 ± 0,04	39,40 ± 4,72	7,14 ± 1,62
Aldeídos	1,24 ± 0,68	—	11,13 ± 4,23	2,32 ± 0,60	—	—	—
Álcoois Primários	4,96 ± 1,26	0,31 ± 0,22	9,74 ± 1,34	—	—	0,03 ± 0,04	0,57 ± 0,53
Álcoois secundários	—	—	0,86 ± 0,22	—	—	—	0,01 ± 0,03
Diol	—	—	—	—	—	—	—
Cetonas	29,07 ± 1,98	—	49,82 ± 14,06	—	0,29 ± 0,41	0,28 ± 0,13	24,59 ± 4,71
Cetol	10,76 ± 1,71	—	—	—	—	—	—
Tocoferol	—	2,07 ± 0,19	—	—	—	—	—
Esteroides	0,17 ± 0,29	3,48 ± 0,23	—	0,98 ± 0,10	0,05 ± 0,08	0,93 ± 0,68	15,11 ± 2,15
Triterpenos	—	0,25 ± 0,10	—	—	28,23 ± 2,57	—	0,88 ± 0,80
Fenólicos	—	—	—	1,12 ± 0,03	—	—	0,31 ± 0,10

“—” Classes não identificadas.

**Tabela 4S.** Valores de teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e porcentagem relativa das classes de compostos utilizados para a construção das figuras 2, 4 e 5 das espécies pertencentes ao grupo das leptosporangiadas recentes (parte 1).

<b>Espécies</b>	<i>Tryonia myriophylla</i>	<i>Hypolepis stolonifera</i>	<i>Pteridium esculentum</i>	<i>Parablechnum cordatum</i>	<i>Neoblechnum brasiliense</i>	<i>Campyloneurum nitidum</i>
<b>Teor (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}</math>)</b>	41,88 ± 7,60	7,38 ± 0,39	32,84 ± 6,44	6,31 ± 0,72	5,62 ± 2,58	15,43 ± 6,07
<b>Classes (%)</b>						
Alcanos	3,11 ± 0,05	—	—	16,65 ± 10,99	4,69 ± 2,38	4,19 ± 4,57
Ésteres	3,52 ± 2,98	6,46 ± 2,17	4,07 ± 3,02	—	—	6,67 ± 5,56
Ácidos graxos	10,15 ± 1,62	54,43 ± 0,53	25,31 ± 10,94	47,36 ± 4,47	61,57 ± 9,27	50,19 ± 4,86
Aldeídos	—	—	—	1,37 ± 1,02	2,78 ± 2,51	—
Álcoois Primários	8,47 ± 1,19	0,16 ± 0,16	19,17 ± 9,25	5,23 ± 2,28	4,26 ± 3,34	6,99 ± 3,10
Álcoois secundários	—	—	—	—	—	—
Diol	—	—	—	—	—	—
Cetonas	—	—	—	—	6,63 ± 4,04	—
Cetol	—	—	—	—	—	—
Tocoferol	—	—	0,09 ± 0,12	—	—	—
Esteroides	1,35 ± 0,30	2,79 ± 0,63	10,7 ± 5,48	1,15 ± 0,68	0,36 ± 0,81	6,75 ± 0,91
Triterpenos	—	—	10,65 ± 4,47	—	—	0,44 ± 0,32
Fenólicos	—	—	—	—	—	—

“—“ Classes não identificadas.

**Tabela 5S.** Valores de teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e porcentagem relativa das classes de compostos utilizados para a construção das figuras 2, 4 e 5 das espécies pertencentes ao grupo das leptosporangiadas recentes (parte 2).

<b>Espécies</b>	<i>Elaphoglossum lingua</i>	<i>Lastreopsis amplissima</i>	<i>Microgramma squamulosa</i>	<i>Rumohra adiantiformis</i>	<i>Serpocaulon catharinae</i>
<b>Teor (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}</math>)</b>	6,91 ± 0,00	6,01 ± 3,69	17,51 ± 1,29	14,29 ± 6,77	47,31 ± 0,00
<b>Classes (%)</b>					
Alcanos	—	25,93 ± 5,52	28,71 ± 5,27	35,59 ± 9,93	11,77 ± 0,00
Ésteres	—	—	7,63 ± 2,4	1,00 ± 1,02	24,38 ± 0,00
Ácidos graxos	33,82 ± 0,00	26,33 ± 9,99	30,00 ± 4,12	30,67 ± 13,89	22,28 ± 0,00
Aldeídos	—	2,04 ± 1,92	—	0,10 ± 0,19	—
Álcoois Primários	—	6,27 ± 3,44	2,53 ± 0,45	0,93 ± 0,43	0,73 ± 0,00
Álcoois secundários	—	—	—	—	—
Diol	—	—	—	—	—
Cetonas	—	1,59 ± 1,24	—	—	—
Cetol	—	—	—	—	—
Tocoferol	—	—	—	—	—
Esteroides	4,81 ± 0,00	3,73 ± 1,06	2,49 ± 0,28	2,48 ± 0,65	2,59 ± 0,00
Triterpenos	41,09 ± 0,00	0,70 ± 0,73	0,23 ± 0,17	0,40 ± 0,69	5,02 ± 0,00
Fenólicos	—	0,18 ± 0,11	—	2,51 ± 3,57	0,30 ± 0,00

“—“ Classes não identificadas.

**Tabela 6S.** Valores de  $p$  obtidos através das comparações das ceras cuticulares das espécies apresentadas na figura 2.

Grupos	Teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		
	N*	$p$ H	C*
<i>Selaginella muscosa</i>	1,000		
<i>Palhinhaea cernua</i>	1,000		
<i>Equisetum hyemale</i>	1,000		
<i>Psilotum nudum</i>	1,000		
<i>Ophioglossum reticulatum</i>	1,000		
<i>Osmunda spectabilis</i>	1,000		
<i>Hymenophyllum caudiculatum</i>	1,000		
<i>Gleichenella pectinata</i>	1,000		
<i>Anemia villosa</i>	1,000		
<i>Salvinia auriculata</i>	1,000		
<i>Cyathea atrovirens</i>	1,000		
<i>Lophosoria quadripinata</i>	1,000	0,002	> 0,001
<i>Tryonia myriophylla</i>	1,000		
<i>Hypolepis stolonifera</i>	1,000		
<i>Pteridium esculentum</i>	1,000		
<i>Parablechnum cordatum</i>	1,000		
<i>Neoblechnum brasiliense</i>	1,000		
<i>Campyloneurum nitidum</i>	1,000		
<i>Elaphoglossum lingua</i>	1,000		
<i>Lastreopsis amplissima</i>	0,953		
<i>Microgramma squamulosa</i>	1,000		
<i>Rumohra adiantiformis</i>	1,000		
<i>Serpocaulon catharinae</i>	1,000		

N: Normalidade (Shapiro-Wilk); H: Homocedasticidade (Levene); C: Comparação (Kruskal-Wallis). \*Valores de  $p$  ajustados pelo método de Holm.

**Tabela 7S.** Valores de  $p$  obtidos através do teste de Dunn das ceras cuticulares das espécies apresentadas na figura 2.

Comparação dos grupos por teste de Dunn que obtiveram valores < 0,001		$p^*$
<i>Gleichenella pectinata</i>	x <i>Lastreopsis amplissima</i>	0,001
<i>Lastreopsis amplissima</i>	x <i>Lophosoria quadripinata</i>	0,029
<i>Gleichenella pectinata</i>	x <i>Neoblechnum brasiliense</i>	0,001
<i>Lophosoria quadripinata</i>	x <i>Neoblechnum brasiliense</i>	0,031
<i>Gleichenella pectinata</i>	x <i>Selaginella muscosa</i>	0,001
<i>Lophosoria quadripinata</i>	x <i>Selaginella muscosa</i>	0,015
<i>Serpocaulon catharinae</i>	x <i>Selaginella muscosa</i>	0,048

\*Valores de  $p$  ajustados pelo método de Holm.



**Tabela 8S.** Valores de  $p$  obtidos através das comparações das ceras cuticulares dos grupos apresentados na figura 3.

Grupos	Teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		
	N*	$p$ H	C*
Externo	> 0,001		
Eusporangiadas	0,309	0,035	0,001
Leptosporangiadas basais	0,022		
Leptosporangiadas recentes	0,365		

N: Normalidade (Shapiro-Wilk); H: Homocedasticidade (Levene); C: Comparação (Kruskal-Wallis). \*Valores de  $p$  ajustados pelo método de Holm.

**Tabela 9S.** Valores de  $p$  obtidos através do teste de Dunn das ceras cuticulares dos grupos apresentados na figura 3.

Comparação dos grupos por teste de Dunn			$p^*$
Leptosporangiadas basais	x	Eusporangiadas	0,041
Leptosporangiadas basais	x	Externo	0,023
Eusporangiadas	x	Externo	1,000
Leptosporangiadas basais	x	Leptosporangiadas recentes	0,003
Eusporangiadas	x	Leptosporangiadas recentes	0,863
Externo	x	Leptosporangiadas recentes	1,000

\*Valores de  $p$  ajustados pelo método de Holm.

**Tabela 10S.** Valores de teor e porcentagem relativa das classes de compostos utilizados para a construção da figura 3.

Grupo	Teor ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
Externo	10,60 $\pm$ 8,60
Eusporangiadas	11,40 $\pm$ 3,60
Leptosporangiadas basais	29,10 $\pm$ 20,10
Leptosporangiadas recentes	16,00 $\pm$ 14,10

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cutícula vegetal é extremamente importante para a sobrevivência das plantas no ambiente terrestre desde às primeiras linhagens de embriófitas. As ceras, cuja principal função na cutícula é restringir a perda de água por transpiração não estomática, têm seu estudo limitado pela análise dos espectros de massa obtidos principalmente através de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Apesar das polipodiófitas representarem o segundo grupo mais diverso de plantas vasculares do planeta, pouquíssimas espécies foram estudadas quanto a composição química de suas ceras. Neste cenário, o principal objetivo desse projeto foi desenvolver uma nova ferramenta para auxiliar na identificação dos espectros de massas obtidos por CG-EM de ceras e aplicá-la na análise das ceras foliares de diferentes espécies de polipodiófitas brasileiras.

A ferramenta que desenvolvemos (Software WaxAlly) se mostrou muito útil auxiliando na identificação dos compostos acíclicos não ramificados das ceras cuticulares das espécies estudadas. Com o auxílio desse novo software, foram identificados mais de 70 compostos presentes nas ceras foliares das diferentes espécies de polipodiófitas e licófitas analisadas nesse estudo. A partir da divulgação do capítulo 1 e consequentemente do software, novos pesquisadores poderão usá-lo e com o retorno desses novos usuários será possível aprimorá-lo e adicionar novos conteúdos.

Esse estudo contribuiu para a adição de novos dados da composição química das ceras de 18 espécies de polipodiófitas e 2 de licófitas que ainda não tinham descrição química de suas ceras. Esses dados contribuíram para descrever pelo menos uma espécie de 4 famílias que ainda não tinham nenhuma espécie estudada quanto a composição química das ceras, sendo elas Psilotaceae, Hymenophyllaceae, Gleicheniaceae e Anemiaceae. Após esse estudo, todas as ordens de polipodiófitas possuem pelo menos 1 espécie estudada quanto a composição química das ceras cuticulares. Os dados obtidos são essenciais para ajudar a entender melhor a composição química das ceras de um grupo extremamente diverso e com representantes de origem bastante antiga dentro das embriófitas.

As ceras das polipodiófitas se mostraram incrivelmente diversas, com a presença de compostos de 13 classes diferentes. A presença nas ceras de fenólicos (classe pouco comum nas misturas das ceras de modo geral) e triterpenos hopanos (classe de triterpeno incomum para a grande maioria das plantas, mas já descritas em ceras de samambaias) reforçam como as ceras dessa linhagem de plantas é diversa e interessante. Tal diversidade ajuda a corroborar a hipótese que as principais rotas biossintéticas das ceras, como a via de alongamento (FAE), via da redução do grupo acil e via da descarboxilação, são representativas nas samambaias assim como o descrito para as angiospermas.

A classe mais abundante encontrada nas ceras da maioria das espécies desse estudo, coletadas na zona tropical no Brasil, foram os ácidos graxos. Os ácidos graxos também foram muito abundantes nas espécies de samambaias tropicais mexicanas (Cerón-Carpio et al., 2019). A presença em grande quantidade dessa classe nas espécies de samambaias tropicais pode estar relacionada a proteção contra a infecção de microorganismos, abundantes nas zonas tropicais que são quentes e úmidas, atuando como elicitores para o disparo de uma resposta de defesa vegetal (García-Guzmán & Heil, 2014; Lim et al., 2017). Essa classe de compostos foi pouco expressiva para espécies diferentes coletadas na zona temperada, cujos ésteres foram muito expressivos (Guo et al., 2018).

Vale ressaltar que em alguns grupos específicos, ocorreu a presença exclusiva de determinadas substâncias ou abundância elevada de determinada classe de compostos. Por exemplo, os cetóis foram identificados apenas em Osmundales nesse estudo, especificamente em *Osmunda spectabilis* e foram descritos na literatura apenas em *O. regalis* (Jetter & Riederer, 2000), sugerindo que essas substâncias podem ser possíveis marcadores taxonômicos desse grupo. Já o diálcool secundário-secundário tricosan-6,7-diol foi encontrado nesse estudo apenas em *Psilotum nudum*, entretanto a classe dos dióis foi descrita também para *O. regalis* (Jetter & Riederer, 2000). Para confirmar o potencial quimiotaxonômico que esses compostos têm para seus grupos, há a necessidade da análise de mais espécies dessas famílias.

De modo geral, a composição química das ceras das polipodiófitas estudadas não apresenta correlações com o tipo de esporângios, a época de origem, o hábito de vida ou a fertilidade ou não das frondes. Com os dados desse trabalho, algumas ideias de pesquisa para estudos futuros são: (I) analisar as ceras de novas espécies de todas as ordens de polipodiófitas, para ajudar a entender como as ceras estão distribuídas em seus diferentes grupos; (II) analisar a composição química das ceras de uma mesma espécie coletada em diferentes localidades para ajudar a entender como os fatores abióticos influenciam na composição das ceras cuticulares nas espécies de polipodiófitas; (III) analisar a composição química das ceras de modo estratificado em espécies de polipodiófitas hemidimórficas e holodimórficas, a fim de verificar se o padrão observado em *Gleichenella pectinata* se repete em frondes morfologicamente diferentes dentro de um mesmo indivíduo e quais as implicações disso quanto a fatores vegetativos e reprodutivos no indivíduo; (IV) avaliar o potencial quimiotaxonômico das ceras especificamente em Psilotaceae e Osmundaceae.

## REFERÊNCIAS

- Cerón-Carpio, A. B., Pérez-García, B., Villanueva, J. L. M., Kiel-Martínez, A. L., Espinosa-Matias, S., Guerrero-Analco, J. A., & Mehlreter, K. (2019). Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*, *85*, 13-20.
- García-Guzmán, G., & Heil, M. (2014). Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist*, *201*(4), 1106-1120.
- Guo, Y., Li, J. J., Busta, L., & Jetter, R. (2018). Coverage and composition of cuticular waxes on the fronds of the temperate ferns *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crista*, *Polypodium glycyrrhiza*, *Polystichum munitum* and *Gymnocarpium dryopteris*. *Annals of botany*, *122*(4), 555-568.
- Jetter, R., & Riederer, M. (2000). Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *Journal of chemical ecology*, *26*, 399-412.

Lim, G. H., Singhal, R., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2017). Fatty acid–and lipid-mediated signaling in plant defense. *Annual review of Phytopathology*, 55, 505-536.

## RESUMO GERAL

As polipodiófitas representam a segunda maior linhagem de plantas vasculares. Entretanto pouca atenção foi dada quanto ao estudo da composição química das ceras cuticulares no grupo. A principal função atribuída as ceras é de reduzir a perda de água por transpiração não estomática nos órgãos aéreos que não apresentam desenvolvimento secundário. Dada a importância das ceras cuticulares para as plantas terrestres e a lacuna de conhecimento dessas substâncias nas polipodiófitas, o principal objetivo dessa pesquisa foi desenvolver uma ferramenta que ajude na análise das ceras aplicada para o estudo dessas substâncias a partir de diferentes espécies de polipodiófitas brasileiras. Para isso, as ceras foliares de 21 espécies de praticamente todas as ordens de polipodiófitas foram estudadas. A ferramenta que foi desenvolvida, o software WaxAlly, auxiliou na identificação de mais de 70 compostos alifáticos acíclicos presentes nas ceras das espécies estudadas. De modo geral, as ceras das polipodiófitas estudadas apresentaram grande diversidade de compostos pertencendo a 13 classes diferentes. Pouca relação foi verificada quanto a composição química das ceras em relação à fertilidade das frondes, tipo de esporângio, época de origem e hábito de vida presentes nas polipodiófitas. No entanto, foi verificado o acúmulo de cetonas em espécies de leptosporangiadas basais. A presença exclusiva de dióis e cetóis nas ceras de *Psilotum nudum* e *Osmunda spectabilis* respectivamente, podem ser sugeridos como possíveis marcadores quimiotaxonômicos para suas respectivas famílias. Ademais, nas ceras das frondes de *Gleichenella pectinata*, foi verificado acúmulo de cetonas e aldeídos respectivamente nas ceras epi e intracuticulares, podendo estar relacionado a morfologia semelhante a bastonetes verificada nas ceras epicuticulares dessa espécie. Por fim, nossos dados sugerem que ainda há a necessidade do estudo de mais espécies de todas as ordens de polipodiófitas para melhor compreender as ceras nessa linhagem, além do estudo de diferentes populações de uma mesma espécie coletadas em ambientes distintos, para verificar a influência dos fatores abióticos sobre as ceras nesse grupo.

**Palavras-chave:** Samambaias, lipídios de superfície, ceras cuticulares.

## THESIS ABSTRACT

Polypodiopsida represent the second largest lineage of vascular plants, however this group had received little attention about the chemical composition of the cuticular waxes. Cuticular waxes play an important role reducing the water loss by non-stomatal transpiration in aerial organs without secondary development. Considering the waxes importance for terrestrial plants and the lack of knowledge about these substances in Polypodiopsida, the main goal of this research was to develop a tool that helps in the analysis of waxes applied to the study of these compounds from different species of polypodiopsida from Brazil. For this, the leaf waxes of 21 species belonging to practically all orders of Polypodiopsida were studied. The developed tool, WaxAlly software, helped to identify more than 70 acyclic aliphatic compounds in the waxes of the studied species. In general, the foliar waxes of the analyzed Polypodiopsida showed a great diversity of compounds belonging to 13 different classes. Such diversity reinforces the hypothesis that the main pathways of wax biosynthesis, widely described for angiosperms, were also present in the Polypodiopsida group. Little relation between the chemical composition of the waxes and the fertility of the fronds, type of sporangium, time of origin and life habits were found. However, the accumulation of ketones in basal leptosporangiate species was verified. The exclusive presence of diols and ketols in waxes from *Psilotum nudum* and *Osmunda spectabilis* respectively, may be a possible chemotaxonomic marker for their respective families. Furthermore, in the waxes of the fronds of *Gleichenella pectinata*, an accumulation of ketones and aldehydes was observed in the epicuticular and intracuticular waxes, respectively, which may be related to the rod-like morphology observed in the epicuticular waxes of this species. Finally, our data suggest that there is still a need to study more species of all orders of polypodiopsida to better understand the waxes in this lineage, in addition to studying the same species collected in different environments, to verify the influence of abiotic factors on waxes in this group.

**Keywords:** Ferns, surface lipids, cuticular waxes.