

1 **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE *WUNDERLICHIA AZULENSIS***
2 **MAGUIRE & G. M. BARROSO (ASTERACEAE): ANATOMIA,**
3 **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA”**

4
5
6
7
8
9
10
11 **FERNANDA GOMES TRINDADE**

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27 **UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF**

28 **CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

29 **Dezembro - 2018**

30

1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE *WUNDERLICHIA AZULENSIS* MAGUIRE
2 & G. M. BARROSO (ASTERACEAE): ANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4
5
6
7
8
9 FERNANDA GOMES TRINDADE

10
11
12
13 Tese de Doutorado apresentada ao Programa
14 de Pós-Graduação em Biociências e
15 Biotecnologia, área de concentração em
16 Biologia Celular, linha de pesquisa
17 Anatomia e Ultraestrutura Vegetal, da
18 Universidade Estadual do Norte Fluminense
19 Darcy Ribeiro, como parte das exigências
20 para obtenção do título de Doutor em
21 Biociências e Biotecnologia.

22
23
24 Aluna: Fernanda Gomes Trindade

25 Orientadora: Dr^a Maura Da Cunha
26
27
28
29

30
31 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

32 CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

33 Dezembro - 2018

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Este trabalho está sendo desenvolvido no setor de Biologia Vegetal do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/CBB da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação da Dra. Maura Da Cunha, com financiamento de apoio a pesquisa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e bolsa Doutorado concedida pela FAPERJ.

1	Sumário	
2	Resumo	4
3	Introdução geral	7
4	Família	8
5	Gênero <i>Wunderlichia</i>	10
6	Afloramentos rochosos	13
7	Morfoanatomia dos órgãos vegetativos da família Asteraceae	14
8	Estruturas secretoras da família	15
9	Metabolitos especiais da família	16
10	Objetivos	19
11	Conclusões	20
12	Referencias bibliográficas	22
13	Capítulo 1 - Morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos	29
14	Sumário	30
15	Introdução	31
16	Objetivo	35
17	Materiais e Métodos	35
18	Resultados	41
19	Discussão	47
20	Conclusão	54
21	Referencias Bibliográficas	55
22	Capítulo 2 – Estudos Químicos	68
23	Sumário	69
24	Introdução	70
25	Objetivo	77
26	Materiais e Métodos	77
27	Resultados	81
28	Manuscript Submit	82
29	Supporting Information	112
30	Referencias Bibliográficas	135

ABSTRACT

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

The “Maciço do Itaoca” is characterized as an inselberg. These rocky outcrops are frequent in the landscape of the southeastern region of Brazil and present very peculiar flora. Among the representative families of the vegetation of this rocky outcrop is the family Asteraceae, in which the species *Wunderlichia azulensis* stands out. The species of this genus are rich glandular trichomes and tectores and present biological activities that give them an importance in the search for bioactive compounds. However, although it is endemic in Brazil, anatomical and chemical studies on the genus *Wunderlichia* are still scarce. Therefore, this work aimed to anatomically characterize the vegetative organs of the species *W. azulensis* occurring in the rocky outcrop "Maciço do Itaoca". From analysis of morpho - morphology and foliar histochemical investigation it was possible to identify several adaptive characteristics of this species to the environment, as well as stem and root adaptations. Among the most significant we can mention the density of trichomes in the leaves, presence of hypodermis, cells with hygroscopic substances in the root cortex. Through phytochemical methods, we isolated and idealized six chemicals of terpene character, as well as promising results regarding the biological activity tests with fractions from the root dichloromethane partition. In addition, the union of the anatomical and chemical investigations are an important data base for the taxonomy, helping the literature establish new limits for the genus within the Asteraceae family. Thus, the comparative study between the phytochemical, morpho-anatomical characters, provided subsidies for a better understanding of the relation of the genera inserted in the Wunderlichieae tribe. In addition, as a result of its current degradation situation, researches of conservationist interests that aim to describe the diversity and wealth of its remnants are of extreme importance to provide data for subsequent activities and conservation policies of the ecosystems present in this biome.

Palavra Chave: *W. azulensis*; Anatomy; Xeric; Sesquiterpenic lactone; Antifungal Activity; Antiparasitic Activity

1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3 *Wunderlichia*, é uma planta endêmica do Brasil, porém pouco conhecida e os
4 trabalhos sobre este taxa referem-se à revisão de Barroso & Maguire (1973). Este gênero
5 apresenta hábito arbustivo, as folhas pubescentes, coriáceas e caducas a corola de
6 *Wunderlichia* é actinomorfa, tubular, a porção apical da antera possui uma projeção,
7 estilete é rugoso e próximo ao ponto de bifurcação do estigma (Feres *et al.*, 2008).
8 Também são encontrados estudos relacionados à sua filogenia e fitogeografia (Jeffrey,
9 1967; Cabrera, 1977; Bremer, 1994; Feres *et al.*, 2008; Hind & Semir 1998; Ortiz *et al.*,
10 2009) no entanto, existem poucos estudos sobre a composição química, estes restritos a
11 apenas duas espécies (Bohlmann *et al.*, 1981, 1984; Nuñez *et al.*, 2003).

12 No Brasil, ocorrem seis espécies de *Wunderlichia*, distribuídas dos estados de
13 Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia (Panero & Funk, 2008). Estas
14 apresentam características adaptativas de ambientes xérico e rupestres e raro também é o
15 estudo da anatomia e ultraestrutura deste gênero. As espécies deste gênero são ricas em
16 tricomas glandulares e tectores e apresentam atividades biológicas conferindo-lhes
17 importância no que se refere à investigação de compostos bioativos (Bohlmann *et al.*,
18 1981, 1984; Nuñez *et al.*, 2003). Dentre estas espécies encontra-se *Wunderlichia*
19 *azulensis* Maguire & G. M. Barroso (Asteraceae) na vegetação do afloramento rochoso
20 do Maciço do Itaoca, localizado no distrito de Ibitioca (Município de Campos dos
21 Goytacazes).

22 Neste sentido, o estudo da espécie *W. azulensis* se justifica pelos os raros estudos
23 do gênero, pelo estudo de estruturas secretoras, como no caso os tricomas glandulares,
24 que tem-se mostrado relevante para o conhecimento de sua anatomia, da natureza química
25 do exsudato e do papel que desempenham no corpo da planta (Lüttge, 1971; Schnepf,
26 1974; Esau, 1976; Cutter, 1978; Fahn, 1979, 1988). Através de análises anatômicas dos
27 órgãos vegetativos e os estudos químicos sobre os metabólitos secundários que revelam
28 importantes informações sobre os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos.
29 Assim como, pelos estudos de atividade biológica que podem identificar novas
30 substâncias e ações destas sobre doenças humanas (Núñez, 2000; Stangarlin *et al.*, 2011).

31 Por tudo apresentado, este trabalho tem como objetivo caracterizar
32 anatomicamente os órgãos vegetativos da espécie *W. azulensis* ocorrente no afloramento
33 rochoso “Maciço do Itaoca”, bem como, analisar aspectos fitoquímicos e atividade
34 biológica dos principais metabólitos encontrados nestes órgãos. Para tanto, a tese foi

1 dividida em dois capítulos, onde o primeiro artigo apresenta os resultados relativos à
2 descrição anatomia dos órgãos vegetativos (raízes, caule, folhas) relacionando tais
3 características com o ambiente em que estão inseridos. Esses dados serão submetidos
4 revista *Journal of Plant Research*, intitulado: “Morphoanatomy analysis of vegetative
5 organs of *Wunderlichia azulensis* Maguire & G. M. Barroso (Asteraceae) on Rock
6 Outcrops”. O segundo capítulo apresenta a composição química do órgão raiz a partir da
7 partição diclorometano, bem como, isolamento e a identificação desses metabólitos
8 especiais. Além da relação química com atividades antiparasitárias, antitumoral e
9 antifúngicas de extratos foliares, caulinares e radiculares da espécie *Wunderlichia*
10 *azulensis*. Parte desses dados foram submetidos para a revista *Journal of Natural Products*,
11 intitulado: The antifungal and antiparasitic activity of the dichloromethane roots from
12 *Wunderlichia azulesis* Maguire & G. M. Barroso (Asteraceae).

13

14 **Família**

15 A família Asteraceae está constituída de ervas perenes, subarbustos e arbustos,
16 mas ocorrem também ervas anuais, lianas e árvores (Mondin, 2006). Devido a seu
17 extraordinário poder de adaptação ambiental, pode ser encontrada nos mais diversos
18 habitats e em variadas condições climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais até
19 temperadas. Um dos fatores importantes para seu sucesso biológico deve-se a sua grande
20 capacidade de dispersão devido à presença de sementes com pápus plumosos, apêndices,
21 estruturas de aderência e metabólitos secundários (Venable & Levin, 1983).

22 Também conhecida como Compositae, é, reconhecidamente, a maior família do
23 reino vegetal, compreendendo 1.535 gêneros e cerca de 23.000 espécies (Bremer; Judd *et*
24 *al.*, 1999). A origem filogenética das Asteraceae e suas afinidades não são totalmente
25 esclarecidas. Bentham (1873) sugeriu seu parentesco com as Dipsacaceae; Turner (1977)
26 relacionou-as com as Calyceraceae, enquanto Cronquist (1988) considerou o complexo
27 Rubiales/Dipsacales como sendo aquele com maior possibilidade de representar o
28 provável ancestral das Asteraceae, entretanto, a maioria dos autores tenta identificar o
29 parentesco do grupo junto as Campanulaceae. No sistema mais recente de classificação
30 filogenética, a família encontra-se englobada dentro das Euasterids II, na ordem
31 Asterales, sendo considerada um grupo monofilético com inúmeras sinapomorfias
32 morfológicas e moleculares, dificultando a organização taxonômica em níveis inferiores
33 (Bremer, 1994; Judd *et al.*, 1999; APG III, 2009).

1 A América Latina é considerada um centro de diversidade de Asteraceae, sendo
2 que na América do Sul, em algumas regiões semi-áridas e na Patagônia, os representantes
3 de Asteraceae correspondem a 20% da flora (Cabrera & Ragonese, 1978). Os trabalhos
4 de Baker (1873, 1876, 1882, 1884) foram os primeiros grandes estudos das Asteraceae
5 em território brasileiro. Embora ainda bastante consultados, o grande número de espécies
6 descobertas recentemente e outras ainda não descritas fazem com que esses estudos
7 tenham fundamental importância (Nakajima 2000). Para o Brasil são estimados
8 aproximadamente 180 gêneros e 3.000 espécies (Hind, 1993) com distribuição desde as
9 regiões mais frias e úmidas, como as serras do Sudeste e Sul, até as áreas secas na região
10 do semi-árido nordestino (Pereira, 1989), sendo menos frequentes em formações
11 florestais (Hind, 1993).

12 Segundo Mondin (2006), Eupatorieae é a tribo com maior riqueza genérica no
13 Brasil, com 85 gêneros, seguida de Vernonieae (54), Heliantheae (41), Mutisieae (25),
14 Astereae (18), Gnaphalieae (10), Helenieae (8), Senecioneae (7), Plucheeae (5),
15 Barnadesieae (3), Lactuceae (2), Anthemideae (2), Cardueae e Liabeae (ambas com um
16 gênero cada). Outros estudos relevantes acerca de novos registros e revisões do táxon têm
17 sido realizados em todos os biomas brasileiros (Heiden et al. 2007, 2010; Schneider et al.
18 2009, Silva e Santos 2010, 2011).

19 O número de tribos, assim como o número de espécies, varia conforme a
20 classificação dos autores. Durante o período de 1812-1821, Henry Cassini publicou
21 dezenas de artigos descrevendo diversos gêneros, revisando outros e estabelecendo tribos.
22 No seu sistema de classificação, a família foi organizada em 20 tribos, muitas das quais
23 reconhecidas até hoje (1819). Outros sistemas que merecem destaque são os de Lessing
24 (1832); De Candolle (1836); Bentham (1873); Hoffmann (1890); Cronquist (1977);
25 Jeffrey (1978) e Bremer (1994). Bentham (1873) publicou um tratado dividindo a família
26 em 13 tribos. Segundo Bremer (1994), a família Asteraceae está dividida em 17 tribos:
27 Barnadesieae Bremer & Jansen, Mutisieae Cass., Cardueae Cass., Lactuceae Cass.,
28 Vernonieae Cass., Liabeae (Cass.) Rybd., Arctoteae Cass., Inuleae Cass., Plucheeae
29 Andreb., Gnaphaliinae Benth., Calenduleae Cass., Asteraeae Cass., Anthemideae Cass.,
30 Senecioneae Cass., Helenieae Benth, Heliantheae Cass. e Eupatorieae Cass.

31 Com os avanços da biologia molecular, na década de oitenta começaram os
32 estudos moleculares na família, sendo um dos primeiros o de Jansen & Palmer (1987), no
33 qual verificaram a semelhança entre a organização da estrutura do DNA do cloroplasto
34 dos membros da subtribo Barnadesiinae (tribo Mutisieae s.l.), com outros representantes

1 das Angiospermas. Observaram também que todos outros membros de Asteraceae
2 apresentam reversão nessa região do DNA. Desta forma, propuseram a subtribo
3 Barnadesiinae como o grupo irmão de todas as Asteraceae. Esta hipótese também teve
4 sustentação na análise cladística baseada em dados morfológicos, realizada por Bremer
5 (1987).

6 Posteriormente, Bremer & Jansen (1992) elevaram as Barnadesiinae à subfamília.
7 Em estudos subseqüentes (Bremer 1994; Jeffrey 1995), as subfamílias Barnadesioideae e
8 Asteroideae foram consideradas monofiléticas, enquanto que Cichorioideae aparece
9 como parafilética. Posteriormente, Bremer (1996) reconheceu quatro subfamílias em
10 Asteraceae: Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Asteroideae. Panero & Funk
11 (2002) realizaram um estudo filogenético com base em seqüências de DNA do cloroplasto
12 a fim de esclarecer as relações filogenéticas na subfamília Cichorioideae, ainda
13 considerada parafilética.

14 Os resultados obtidos forneceram suporte para propor uma nova classificação para
15 a família, que passou a abrigar 11 subfamílias e 35 tribos. Sendo que as mudanças mais
16 expressivas ocorreram na tribo Mutisieae sensu Bremer (1994), em que, vários de seus
17 táxons foram elevados à subfamília. Posteriormente, também com base em dados
18 moleculares foram estabelecidas mais duas subfamílias: Stifftioideae e
19 Wunderlichioideae, além de três tribos: Hyalideae, Onoserideae e Wunderlichieae
20 (Panero & Funk 2008).

21 Atualmente, Asteraceae está dividida em 12 subfamílias e 43 tribos, sendo que
22 alguns dos cladogramas basais, sustentados por dados moleculares, ainda são pouco
23 caracterizados morfológicamente, como as tribos Stifftieae, Hyalideae, Gochnatieae e a
24 subfamília Wunderlichioideae (APGIII 2009; Panero & Funk 2008; Funk et al. 2009).
25 Esta última subfamília abriga o gênero do presente estudo.

26

27 **Gênero *Wunderlichia***

28 *Wunderlichia* assemelha-se morfológicamente ao gênero *Stenopadus* S.F. Blake,
29 sendo que as principais diferenças estão relacionadas à densidade de indumento no
30 receptáculo e ao diâmetro da corola: em *Wunderlichia* o receptáculo é denso-paleáceo e
31 a corola é estreita, enquanto que em *Stenopadus* o receptáculo é esparso-paleáceo e a
32 corola é mais larga (Barroso & Maguire 1973). Tradicionalmente, o gênero *Wunderlichia*
33 é inserido na tribo Mutisieae s.l., por diversos autores, dentre os quais Jeffrey (1967);
34 Cabrera (1977) e Bremer (1994). Entretanto, nas filogenias recentes com base em dados

1 moleculares, o gênero é tratado como pertencente à tribo *Wunderlichieae* e tem como
2 gêneros irmãos *Stenopadus* e *Stomatochaeta* Maguire & Wurdack, (Ortiz et al. 2009).

3 *Wunderlichia* é um gênero endêmico do Brasil, possui seis espécies de
4 distribuição exclusiva nos ambientes xerofíticos, como os terrenos rochosos da Cadeia do
5 Espinhaço, campos rupestres e cerrados arenoso-pedregosos dos estados da Bahia, Goiás,
6 Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Barroso & Maguire 1973;
7 Roque & Pirani 1997; Hind & Semir 1998) (figura 1).

8 *W. mirabilis* Riedel ex Baker (sinonímia *W. tormentosa* Glaziou);

9 *W. azulensis* Maguire et Barroso nov.sp.;

10 *W. crulsiana* Taubert;

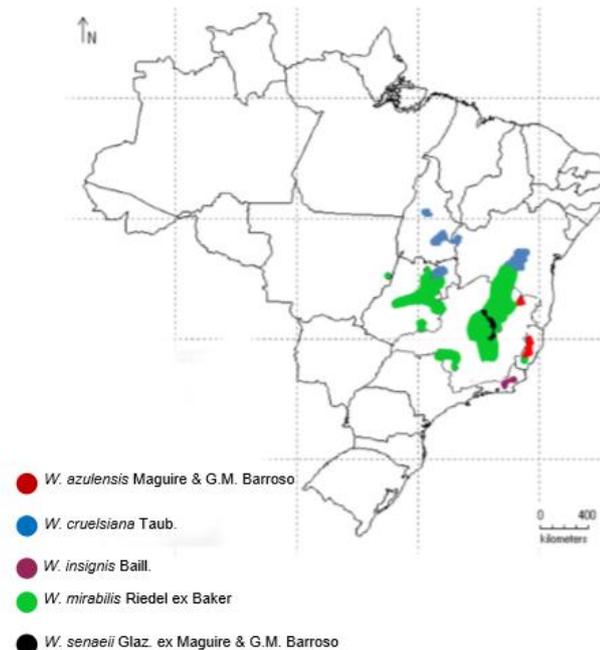
11 *W. bahiensis* Maguire et Barroso nov. sp.;

12 *W. insignis* Baillon (sinonímia *W. glaziouii* Baker)

13 *W. senaeii* Glaziou ex Maguire et Barroso

14 Entretanto recentes estudos relacionam o gênero apenas com 5 espécies, onde a
15 espécie *W. bahiensis*, a partir de correlações polínicas e anatômicas foliares pode ser
16 apenas um indivíduo de *W. crulsiana* (Souza-Buturi, F. O., 2013), podendo se tornar uma
17 sinonímia.

Geographical distribution of *Wunderlichia*



18

19 **Figura 1:** Distribuição geográfica do gênero *Wunderlichia* no Brasil (Souza-
20 Buturi, F. O., 2013)

21 O gênero *Wunderlichia*, por serem plantas adaptadas ao ambiente xerofítico
22 apresentam indumento geralmente tomentoso. As folhas são alternas e decíduas. As

1 inflorescências são curtas, condensadas ou laxas, constituídas de capítulos solitários ou
2 numerosos. Os capítulos são homógamos, discóides e multifloros com involúcro
3 campanulado, infundibuliforme ou globoso, composto de 5-10 séries de brácteas
4 involucrais; receptáculo é plano-convexo e paleáceo, as páleas são inteiras ou bifurcadas.
5 Flores com corola tubulosa, glabra, tubo estreito, curto ou longo e o limbo campanulado-
6 oblongo, 5-laciniado, com lacínios espiralados; anteras com base sagitada e apêndice
7 caudal livre; estilete cilíndrico, exserto com base clavada ou turbinado-bulbosa e ápice
8 retuso. Cipselas oblongas, glabras ou tomentosas, 10-nervadas, presença de um disco
9 colunar no ápice; pápus disposto em 3-4 séries, cerdas paleáceas e unidas em anel na base
10 (Souza, F. O., 2007).

11 As espécies são encontradas em afloramentos rochosos, como inselbergs, em
12 regiões com uma longa estação seca anual. Espécies de *Wunderlichia* são arbustos
13 decíduos ou pequenas árvores que perdem suas folhas em floração (Barroso e Maguire
14 1973; Feres et al. 2009). A perda de folhas é uma adaptação importante para evitar a perda
15 excessiva de água por meio da evapotranspiração, como resultado das condições
16 ambientais xerofíticas às quais estas plantas estão expostas em seu habitat rochoso. A
17 espécie estudada, *Wunderlichia azulensis* Maguire & G.M. Barroso foi coletado pela
18 primeira vez por J.G. Kuhlmann (número de coleção 6616, 05/12/1943, RB), e descrito
19 por Barroso e Maguire (1973), com poucos registros a partir de então. De fato, só foi
20 registrado em dez afloramentos rochosos nos estados da Bahia, Minas Gerais e Espírito
21 Santo (Souza-Buturi, 2013).

22 *Wunderlichia azulensis* é encontrada em pequenas comunidades de afloramentos
23 rochosos, compartilhando seu hábitat com algumas espécies de Velloziaceae, Cactaceae
24 e Bromeliaceae. Às vezes pode ser encontrado isolado em algumas fendas com substrato
25 raso. É comumente encontrado em lugares que têm um clima sazonal claro, com uma
26 curta estação chuvosa, e até oito meses secos a cada ano (Souza-Buturi, 2013). Todos
27 esses locais são caracterizados por afloramentos rochosos cercados por florestas
28 estacionais semidecíduais ou decíduas no domínio da Mata Atlântica, como o Maciço de
29 Itaoca (21 ° 47'31 " S, 41 ° 27'25 " W, com variação de altitude entre 8 e 420m.asl) na
30 cidade de Campos dos Goytacazes, norte do Rio de Janeiro. Estado de Janeiro (Mauad,
31 L. P et al., 2014).

32
33
34

1 **Afloramentos rochosos**

2 Afloramentos rochosos ou *inselbergs* são morros ou grupos de morros que
3 ocorrem em paisagens planas, com distribuição nos trópicos e subtropicais, bem como em
4 regiões temperadas. São formados por rochas graníticas ou gnáissicas de origem pré-
5 cambriana e possuem características edáficas e microclimáticas bem particulares
6 (Parmentier, 2003). Por isto, os *inselbergs* são ecossistemas muito distintos e
7 constituindo importantes refúgios para pesquisa em biodiversidade, já que apresentam
8 uma vegetação exclusiva e bem característica, associada a condições muito peculiares.

9 A flora de *Inselbergs* foi estudada em diversas regiões do mundo, particularmente
10 na África, na Costa do Marfim e Guiné e na América do Sul, especialmente Bolívia. Esse
11 interesse é justificado pela flora peculiar, submetida a condições físico-químicas
12 extremas, em contínuo perigo de destruição pelo pastoreamento extensivo e pela extração
13 de rochas para pavimentação pública. (França, F. *et al.*, 1997).

14 Os afloramentos rochosos são frequentes na paisagem da região sudeste do Brasil,
15 apresentando uma flora bastante peculiar. Representam uma barreira clara para muitas
16 espécies, devido à baixa retenção de água e nutrientes, às poucas alternativas para fixação
17 de raízes e sementes. Estes fatores podem ser considerados relevantes na biologia e no
18 processo evolutivo de espécies que ocorrem neste ambiente (Esgario, C. P *et al.*, 2008).
19 Os fatores ambientais mais expressivos nesse ecossistema são as baixas condições
20 hídricas, os altos níveis de radiação solar e pouca disponibilidade de substrato.
21 Essas condições abióticas severas são fatores determinantes na adaptação das espécies
22 encontradas nesses locais. Desta forma, os *inselbergs* caracterizam-se por formarem áreas
23 isoladas, com elevado endemismo, diversidade biológica e genética (Parmentier, 2003).

24 O Maciço do Itaoca, localizado no distrito de Ibitioca, Município de Campos dos
25 Goytacazes, caracteriza-se como um *inselberg*. Para entender a atual situação em que se
26 encontram os fragmentos de Mata Atlântica da região Norte Fluminense, faz-se
27 necessária uma abordagem dos aspectos históricos da ocupação antrópica e exploração
28 econômica da mesma

29 Esta região abrange os municípios de Campos dos Goytacazes, São João da Barra,
30 São Francisco do Itabapoana, São Fidélis, Cardoso Moreira, Macaé, Conceição de
31 Macabú e Quissamã. Os aspectos físicos e históricos da região, bem como a grande
32 transformação de seu território, são relatados em trabalhos que, citam os tabuleiros do

1 Norte e Noroeste Fluminense e as florestas estacionais. Onde atualmente, são encontrados
2 em seus últimos fragmentos (Lamego, 2007; Soffiati, 1998, 2005).

3 Os inselbergs encontrados na Mata Atlântica da costa brasileira sofrem ameaças
4 constantes com atividades de turismo, recreação, além de desmatamento e fragmentação
5 da paisagem. Para o Maciço do Itaoca a situação é semelhante e o mesmo se encontra em
6 constante degradação, sofrida principalmente por atividades de mineração com o
7 funcionamento de duas pedreiras de grande porte no local (Coutinho, 2007; Mauad,
8 2010).

9 O fato é que este é um dos últimos remanescentes do bioma de Mata Atlântica
10 contido no Município de Campos dos Goytacazes e possui escassa descrição científica.
11 Mauad (2010) descreve 65 famílias de plantas vasculares ocorrentes no Maciço do Itaoca.
12 Ademais, é importante destacar que o Maciço do Itaoca se observa três distintas paisagens
13 predominantes: floresta estacional semidecídua, afloramento rochoso, que abriga a
14 vegetação rupícola e, a paisagem de campo antrópico, que ocorre nas bordas dos morros
15 e que foi modificada para implantação de culturas de cana-de-açúcar e pastagens (Mauad,
16 2010). Dentro da vegetação de afloramento rochoso uma das famílias com grande
17 representatividade é a Asteraceae, com cerca de 15 espécies listadas (Mauad, 2010), detre
18 elas a *W. azulensis*.

19 **Morfoanatomia dos órgãos vegetativos da família Asteraceae:**

20 As Asteraceae apresentam grande plasticidade evidenciada pela ocupação de
21 diferentes nichos ecológicos, o que leva ao surgimento de padrões anatômicos muito
22 variados, não raras adaptações a condições muito particulares, o que reflete na anatomia
23 dos órgãos vegetativos (Cronquist, 1981). Podem ser encontradas como ervas, arbustos,
24 menos comum as lianas, raramente árvores, as vezes plantas latecentes e resiníferas.

25 As folhas são simples, alternadas, opostas ou verticiladas, inteiras, dentadas ou
26 lobadas e cortada de forma variada (Cronquist, 1981), frequentemente, conduplicada ou
27 revoluta (Judd *et al*, 1999). Metcalfe & Chalk (1950) relataram a grande variabilidade
28 anatômica e morfológica de Asteraceae. Destacando a constância de caracteres como
29 canais secretores, caules herbáceos, como feixes colaterais acompanhados por fibras,
30 presença de estômatos anomocíticos, ocorrência de crescimento secundário usual em
31 espécies lenhosas e o aparecimento de endoderme ao redor do sistema vascular, sendo
32 que no caule geralmente apresentam além de grãos de amido, estrias de Caspary. Estudos
33 sobre a anatomia foliar têm servido como base para morfogênese, fisiologia, ecologia e

1 evolução (Carlquist, 1959; Alencastro, 1973; Sajo & Menezes, 1994; Smiljanic, K. B. A.,
2 2005).

3 O indumento é variável, constituído de tricomas multicelulares unisseriados ou
4 multisseriados, composto de células uniformes ou células basais e terminais modificadas.
5 Geralmente apresentam tricomas tectores que podem ser simples, estrelados,
6 malpighiáceos ou escamiformes, também são comuns tricomas glandulares depressos na
7 face abaxial das folhas, e neste caso, aparecem como pontos pretos, translúcidos ou estrias
8 alongadas. Sua secreção é responsável pela aparência envernizada das folhas de alguns
9 gêneros, em especial de *Baccharis* L., *Eupatorium* L. sensu lato, *Gochnatia* Kunth e
10 *Symphypappus* Turcz. (Metcalf & Chalk, 1950). Tricomas unicelulares são raros, sendo
11 exclusivos da subfamília Barnadesoideae (Bremer, 1994).

12 Outra principal característica é a ocorrência de canais laticíferos e resiníferos,
13 sendo que sua distribuição nos membros da família tem valor taxonômico, uma vez que
14 canais ou cavidades de látex são característicos de Cichorioideae, especialmente na tribo
15 Lactuceae, enquanto que canais ou cavidades de resinas são comuns nos representantes
16 de Asteroideae (Bremer, 1994). Assim as estruturas secretoras variam quanto à
17 morfologia, função, posição e tipo de compostos que sintetizam e acumulam. As espécies
18 da família Asteraceae são ricas em diversas estruturas secretoras e apresentam uma
19 grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas (Vitto & Petenatti, 2009).

20 **Estruturas secretoras da família**

21 A atividade secretora é inerente a todas as células vivas (Roshchina & Roshchina,
22 1993), sendo esta característica mais evidente e intensa em alguns tipos celulares.
23 Podemos definir estruturas secretoras em plantas como, uma célula ou grupo de células
24 capazes de produzir exsudatos que exercem diferentes funções nas plantas, podendo ser
25 mantidos no interior da célula secretora ou serem externalizados (Fahn, 1979).

26 Assim, muitas células ou estruturas apresentam especializações decorrentes de
27 processos de diferenciação que auxiliam ou otimizam sua atividade secretora (Carvalho
28 & Recco-Pimentel, 2007). Estas estruturas estão presentes em diferentes órgãos das
29 plantas e são caracterizadas por suas distintas formas (Dickison, 2000). De acordo com
30 Fahn (1979), as estruturas secretoras se originam de diferentes tecidos meristemáticos e
31 devem ser classificados principalmente do ponto de vista funcional.

32 Em plantas, as estruturas secretoras são responsáveis pela produção de diversas
33 substâncias que desempenham funções como: defesa contra herbivoria e patógenos,
34 atração de polinizadores e adaptação ambiental (Esaú, 1976; Fahn, 1979; Cutter, 1978).

1 Em estudo realizado por Fahn (1988) foi organizada uma listagem dos diferentes tipos de
2 estruturas secretoras de plantas. Neste estudo, o autor classifica as estruturas secretoras
3 principalmente quanto à sua morfologia e à composição química da secreção. Além disso,
4 as estruturas secretoras formam um grupo polifilético, o que significa dizer que os
5 processos evolutivos levam as diferentes estratégias de síntese e externalização de
6 exsudados (Fahn, 1979; Laurence *et al.*, 2000).

7 Em Asteraceae, as investigações realizadas relataram a presença de diversas
8 estruturas secretoras e em diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos, desde raízes e
9 folhas a flores e frutos. Em folhas já foi descrito oito diferentes tipos de estruturas
10 secretoras: ductos (Castro, 1987), cavidades (Curtis & Lersten, 1986, 1990) idioblastos
11 (Castro, 1987), laticíferos (Vertrees & Mahlberg, 1978), hidatódios (Perrin, 1971),
12 nectários extraflorais (O'Dowd & Catchpole, 1983), tricomas e apêndices glandulares
13 (Carlquist, 1959). Estas estruturas variam amplamente em sua morfologia e anatomia, e
14 podem representar um importante caráter taxonômico devido, especialmente, à posição
15 constante que ocupam nas espécies e variedades em que ocorrem (Solereider, 1908;
16 Metcalfe & Chalk, 1950; Fahn, 1979, 1988).

17 Os produtos de secreção produzidos por espécies da família Asteraceae, em geral,
18 são acumulados em idioblastos e tricomas glandulares, podendo ainda em alguns gêneros,
19 estarem também depositados em canais, cavidades secretoras e laticíferos (Meltcalfe &
20 Chalk, 1950; Castro *et al.*, 1997). As espécies dessa família, em sua maioria, são grandes
21 produtoras de metabolitos especiais como flavonóides, terpenóides, alcalóides,
22 acetofenonas, floroglucinol, pironas, triterpenóides e sesquiterpenos (Lourens *et al.*,
23 2008; Pagni *et al.*, 2003).

24 **Metabolitos especiais da família**

25 Os metabólitos especiais apresentam funções importantes no organismo da planta,
26 estando envolvidos na defesa das plantas através de citotoxicidade para patógenos
27 microbianos, além de desempenhar um papel vital como mediadores de interações
28 ecológicas, refletindo diretamente na sobrevivência do organismo (Maraschin &
29 Verpoorte, 2001).

30 Estas substâncias são produzidas pelas plantas e são estocadas em seus diversos
31 órgãos: folhas, caules, frutos, flores, raízes etc. Cada diferente metabólito especial tem
32 sua distribuição relativamente restrita na natureza, sendo em alguns casos limitados a

1 espécie ou famílias. Por este motivo, podem ser utilizados algumas vezes para
2 caracterizar determinadas famílias de plantas (Robbers *et al.*, 1997).

3 A existência e as funções dos metabólitos especiais podem variar desde defesa
4 contra animais e insetos, invasão de microrganismos e vírus a produtos da detoxificação
5 de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário. Podem atuar como uma fonte
6 de reserva de nitrogênio, hormônios reguladores de crescimento, na manutenção do
7 equilíbrio iônico devido ao seu caráter alcalino e na defesa contra radiação UV (Jansen *et*
8 *al.*, 1998; Aniszewski *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2004).

9 Plantas da Família Asteraceae têm sido amplamente estudadas quanto à sua
10 composição química e atividade biológica, algumas têm proporcionado o
11 desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas (Zomlefer, 1994). No gênero *Baccharis*
12 as substâncias mais estudadas são os flavonóides e os terpenóides. Quanto às atividades
13 biológicas destacam-se os efeitos alelopáticos, citotóxicos, anti-inflamatórios e
14 antimicrobianos (Faini *et al.*, 1982; Jarvis *et al.*, 1991).

15 Estes metabólitos especiais podem ser explorados de forma a serem utilizados
16 pelo homem de várias formas, como inseticidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas
17 além de diversas outras funções (Souza Filho & Alves, 2002). O reino vegetal representa
18 desta forma, um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem
19 descobertas (Hostettmann *et al.*, 2003).

20 Uma das principais características das Asteraceae é a diversidade de substâncias
21 químicas, especialmente os polifrutanos inulinas e as lactonas sesquiterpênicas, além de
22 óleos voláteis terpenóides e algumas classes de alcalóides, principalmente alcalóides
23 pirrolizidínicos característicos do gênero *Senecio L.*, estando ausentes os iridóides e
24 taninos (Cronquist, 1981). A diversidade estrutural dos terpenos, em especial das
25 lactonas sesquiterpênicas e dos furanosesquiterpênicos levou Seaman (1982) a fazer um
26 estudo analisando as variedades destes terpenos na família e concluiu que estes compostos
27 podem ser aplicados nos diferentes níveis taxonômicos, podendo auxiliar nas análises
28 cladísticas, salientando, entretanto, que para delimitar espécies não são muito seguros,
29 uma vez que é comum a ocorrência de “quimiotipos”, podendo ser úteis no
30 reconhecimento de ecotipos, variedades ou subespécies.

31 Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição
32 química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento
33 de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Queiroga, et al., 1990, Onofre et al., 2004).

1 Dentre inúmeras plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina caseira está a
2 *Artemisia absinthium*, uma erva de sabor amargo conhecida popularmente como losna,
3 com benéficas funções digestivas, usada também na fabricação da bebida absinto.
4 Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae
5 apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque
6 aos flavonóides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (Barroso,
7 1976), além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção
8 de várias doenças (Verdi, et al., 2005).

9 Para o gênero *Wunderlichia* pouco se sabe sobre sua constituição química, sendo
10 na literatura, apenas descritos para as espécies *W. mirabilis* e *W. crulsiana*. Com relação
11 aos constituintes químicos são encontrados flavonóides, triterpenos, lactonas
12 sesquiterpênicas e sesquiterpeno para *W. crulsiana* (Nuñez *et al.*, 2003) e lactonas
13 sesquiterpênicas, triterpenos e poliacetileno para *W. mirabilis* (Bohlmann *et al.*, 1981,
14 1984). Entretanto, as demais espécies deste gênero não possuem descrição anatômica e
15 nem de sua composição química, ressaltando a importância destes estudos para o gênero.

16

1 **2. Objetivos:**

2 **2.1. Objetivo geral**

3 Caracterizar anatomicamente a espécie *Wunderlichia azulensis* ocorrente no
4 afloramento rochoso “Maciço do Itaoca”, bem como, analisar os compostos químicos
5 presentes na planta e a atividade biológica dos principais metabólitos encontrados nestes
6 órgãos.

7 **2.2. Objetivos específicos**

- 8 • Caracterizar a morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos (raiz, caule e folha),
9 caracterizando os sistemas de revestimento, fundamental e vascular da espécie *W.*
10 *azulensis*;
- 11 • Caracterizar por métodos histoquímicos as classes majoritárias de substâncias
12 presentes nos órgãos vegetativos;
- 13 • Caracterizar a morfologia e anatomia dos tricomas foliares da espécie em questão;
- 14 • Caracterizar histoquimicamente as classes majoritárias de substâncias que
15 constituem os exsudados dos tricomas glandulares da espécie *W. azulensis*;
- 16 • Isolar e identificar as principais classes de metabólitos especiais presente na
17 espécie *W. azulensis* através de métodos fitoquímicos;
- 18 • Identificar metabólitos especiais com possíveis atividades antifúngicas,
19 antiparasitária na espécie em questão;
- 20 • Correlacionar os aspectos fitoquímicos e anatômicos adaptativos das espécies em
21 estudo com o ambiente em que estão inseridas;

22

23

1 **Conclusões**

2 Embora *Wunderlichia* seja um gênero endêmico do Brasil, poucos estudos são
3 encontrados sobre ele, principalmente com relação a sua anatomia. No geral as adaptações
4 como cutícula espessa, camaras subestomáticas, cristais nas células parenquimáticas do
5 mesofilo são importantes estratégias para otimizar e proteger com relações hídricas e nas
6 trocas gasosas que ocorrem nas folhas.

7 Ademais as características de acúmulo de substâncias de natureza higroscópica nas
8 raízes e o crescimento diferenciado das células corticais são importantes contribuições da
9 planta em resposta ao ambiente xérico a qual estão inseridas.

10 Os resultados histoquímicos também são de grande valia com relação a elucidação
11 dos compostos presentes as folhas, como sua correlção a adaptação ao ambiente, como a
12 presença de lipídios, óleos essenciais e compostos fenólicos, todos com intensa relação
13 de proteção com estresse hidrico e alta irradiância.

14 No mais, são necessários mais estudos acerca dos órgãos vegetativos raiz e caule,
15 principalmente com relação a anatomia e histoquímica. O presente trabalho contribuiu de
16 forma significativa na ampliação e aprimoramento do conhecimento acerca do gênero
17 *Wunderlichia* e da espécie em questão.

18 Com relação a química, foram isoladas seis substancias de caracter terpenico dos
19 extratos particionado da raiz, são elas: Lactona sesquiterpenica dehydrobrachylaenolide,
20 Sesquiterpeno lasiodiplodine, tritripeno taraxerane e um acetil taraxerol e uma mistura de
21 sitosterol and stigmasterol.

22 As lactonas sesquiterpénicas são compostos de grande ocorrência na natureza e
23 representam um importante grupo de metabólitos secundários da família Asteraceae.
24 Embora o estudo químico da espécie *W. Azulensis* não tenha sido exaurido, nem tendo

1 resultados no isolamento de substâncias com estrutura química diferenciada, o estudo
2 trouxe uma importante contribuição para o conhecimento da espécie dentro do gênero.
3 Visto que a diversidade estrutural dos terpenos, em especial das lactonas são aplicadas
4 nos diferentes níveis taxonomicos, podendo auxiliar nas análises cladísticas. Podendo
5 ainda ser usado com base de dados para estudos interligados de morfologia, palinológicas
6 e filogenias moleculares.

7 Os compostos testados desempenham um papel valioso no que se trata de ação
8 biológica, os resultados toxicológicos para *T. cruzi* e espécies de *Candida* são
9 promissores, mas são necessários estudos adicionais de toxicidade in vivo para obter um
10 conhecimento aprofundado principalmente com relação à atividade biológica desejada, e
11 toxicidade sistêmica. Além de testes químicos se faz necessário para elucidar o
12 mecanismo de ação dessas moléculas frente ao agente patogênico. Isto representa o
13 primeiro relatório sobre a atividade antiparasitária e fungicida para a espécie *W. azulensis*.

14 Sendo assim, as plantas tradicionais podem representar novas fontes de
15 antimicrobianos com componentes estáveis e biologicamente ativos que podem
16 estabelecer uma base científica para o uso de plantas na medicina moderna. Entretanto
17 estudos complementares, como sinergismo, toxicologia e mecanismo de ação devem ser
18 realizados afim de evoluir para uso efetivamente medicinal.

19

20

21

22

1 **Referencias Bibliográficas:**

2 APG III. Angiosperm Phylogeny Group. 2009. An update of the Angiosperm
3 Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG
4 III. Botanical Journal

5 ALECASTRO, F. M. M. R. Contribuição do estudo de anatomia foliar das Vernônias
6 do Brasil 1- *Vernonia oppositifolia* Less. Arch Jard. Bot. RJ 19:109-123.

7 ANISZEWSKI T.; CIESIOLKA D.; GULEWICZ K. 2001. Equilibrium between
8 basic nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content.
9 Phytochemistry, 57: 43-50.

10 BAKER, J.G. 1873. Compositae I: Vernoniaceae. In Flora Brasiliensis (Martius,
11 C.F.P. & Eichler, A.G. eds.) 6(2): 1-183.

12 BAKER, J.G. 1876. Compositae II: Eupatoriaceae. In Flora Brasiliensis (Martius,
13 C.F.P. & Eichler, A.G. eds.) 6(2): 185-375.

14 BAKER, J.G. 1882. Compositae III: Asteroideae et Inuloideae. In Flora Brasiliensis
15 (Martius, C.F.P. & Eichler, A.G. Eds.) 6(3): 1-134.

16 BAKER, J.G. 1884. Compositae IV: Helianthoideae-Mutisiaceae. In Flora
17 Brasiliensis (Martius, C.F.P. & Eichler, A.G. eds.) 6(3): 136-398.

18 BARROSO, G. M.; MAGUIRE, B. 1973. A review of the genus *Wunderlichia*
19 (Mutisiae, Compositae). Revista Brasileira de Biologia, 33: 379-406.

20 BENTHAM, G. 1873. Compositae. In Genera Plantarum (Bentham, G. & Hooker,
21 J.D., eds.). London: Lovell Reeve & Co., vol. 2, parte I, p.163-533.

22 BOHLMANN, F., ZDERO, C., ROBINSON, H., KING, R.M. 1981. Naturally-
23 occurring terpene derivatives .337. Modified eudesmanolides and other sesquiterpene
24 lactones from *Wunderlichia mirabilis* and *Actinoseris-polymorpha*. Phytochemistry
25 20 (7), 1631–1634.

26 BREMER, K. 1987. Tribal interrelationships of Asteraceae. Cladistics 3: 210-256.

27 BREMER, K. 1994. Asteraceae- Cladistic & Classification. Portland: Timber press.
28 792p.

29 BREMER, K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. Pp.1-7. In: Hind,
30 D.J.N., Beentje, H.J. (Eds.). Compositae: Systematics. Proceedings of the
31 International Compositae, Conference, vol. 1. Kew: Royal Botanic Gardens.

32 BREMER, K. & JANSEN, R.K. 1992. A new subfamily of the Asteraceae. Annals of
33 the Missouri Botanical Garden 79: 414-415.

- 1 CABRERA, A. L. 1977. Mutisieae-Systematic review. Pp.1039-1066. *In*: Heywood,
2 V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (Eds.). The Biology and Chemistry of the
3 Compositae, vol. 2. London: Academic Press.
- 4 CABRERA, A.L. & RAGONESE, A.M. 1978. Revisión del género *Pterocaulon*
5 (Compositae). *Darwiniana* 21(2-4): 185-257.
- 6 CARLQUIST, S. 1959. The leaf of *Calycadenia* and its glandular appendages. *Am. J.*
7 *Bot.* 46:70-80.
- 8 CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2007. A célula. 2ª Ed. Barueri,
9 SP.
- 10 CASSINI, H. 1819. Sur la famille dès Synantherées, contant les caractères des tribus.
11 *Journal de Physique, de Chemie, D'Histoire Naturelle et des Arts* 88: 189-204.
- 12 CASTRO, M. de M. 1987. Estruturas secretoras em folhas de espécies da família
13 Asteraceae: aspectos estruturais e histoquímicos. Tese de doutorado, Universidade de
14 São Paulo, SP.
- 15 COUTINHO, R. R. 2007. Ecoturismo versus Extração de Granito: O Caso do Maciço
16 do Itaoca. Pluridoc.
- 17 CRONQUIST, A. 1977. The Compositae revisited. *Brittonia* 29: 137-153.
- 18 CRONQUIST, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants.
19 New York: Columbia Univesity Press. 1262p.
- 20 CRONQUIST, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. New
21 York: The New York Botanical Garden. 2a ed., 555p.
- 22 CURTIS, J.D. & LERSTEN, N.R. 1986. Development of bicellular foliar secretory
23 cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 73:79-86.
- 24 CURTIS, J.D. & LERSTEN, N.R. 1990. Oil reservoirs instem, rhizome, and root of
25 *Solidago Canadensis* (Asteraceae, tribe Astereae). *Nord. J. Bot.* 10:443-449.
- 26 CUTTER, E.G. 1978. Plant anatomy. Part I. Cells and tissues. Edward Arnold,
27 London.
- 28 DA SILVA, M. P., BARBOSA, F. S. Q., & DE BARROS, R. F. M. (2014). Estudo
29 taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae (Dumortier) em uma
30 comunidade rural no Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*, 8(2).
- 31 DE CANDOLE, A. P. 1836. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* vol 5,
32 Paris: Treuttel & Würtz. 692p.
- 33 ESAÚ, K. 1976. Anatomia vegetal. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 3ª. Ed.

1 ESGARIO, C. P., RIBEIRO, L. F., & SILVA, A. G. (2008). O Alto Misterioso e a
2 vegetação sobre rochas em meio à Mata Atlântica, no Sudeste do Brasil. *Natureza on*
3 *line*, 6(2), 55-62.

4 FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.

5 FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108:229-257.

6 FAINI, F. A.; CASTILLO, M. Y.; TORRES, M. R. Flavonoids of *Baccharis incarum*.
7 *J. Nat. Prod.*, v. 45, n. 4, p. 501-502, 1982.

8 FERES, F., ZUCCHI, M. I., DE SOUZA, A. P., AMARAL, M., & BITTRICH, V.
9 (2009). Phylogeographic studies of Brazilian "campo-rupestre" species: *Wunderlichia*
10 *mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas*, 22(1), 17-26.

11 FUNK, V.A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T.F. & ROBINSON, H. 2009.
12 Classification of Compositae. Pp.171-189. In: Funk, V.A.; Susanna A.; Stuessy, T.F.
13 & Bayer, R.J. (Eds.). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*.
14 Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy.

15 HEIDEN, G, BARBIERI, RL, WASUM, RA, SCUR, L, SARTORI, M. 2007. A
16 família Asteraceae em São Mateus do Sul, Paraná. *Revista Brasileira de Biociências*
17 5: 249-251.

18 HENRIQUES A.T., LOPES S.O., PARANHOS J.T., GREGIANINI T.S., VON
19 POSER G.L., FETT-NETO A.G. & SCHRIPISEMA J.N. 2004. β -D-Glucopyranosyl
20 vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*.
21 *Phytochemistry* 65: 449-454.

22 HIND, D.J.N. 1993. Notes on the Compositae of Bahia, Brazil. *Kew Bulletin* 48: 245-
23 277.

24 HIND, D. J. N. & SEMIR, J. 1998. Typification of *Wunderlichia* (Compositae-
25 Mutiseae). *Kew Bulletin* 53: 1011-1012.

26 HOFFMANN, O. 1890. Compositae. In: Engler, A. & Prantl. K. *Die Natürlichen*
27 *Pflanzenfamilien*. Verlag von Wilhelm Engelmann 4 (5): 87-391.

28 HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E. F & VIEIRA, P. C. 2003. *Princípios ativos de*
29 *plantas superiores*. EDUFSCAR. São Paulo.

30 JANSEN M.A.K., GABA V., GREENBERG B.M. 1998. Higher plants and UV-B
31 radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Science*, 3: 131-
32 135.

33 JEFFREY, C. 1967. Notes on Compositae II. The Mutisieae in east tropical Africa.
34 *Kew Bulletin* 21: 177-223.

- 1 JEFFREY, C. J. 1978. Compositae. Pp. 263-268. In: Flowering plants of the World.
2 Heywood, V.H. (Ed.). New York: Mayflower Books.
- 3 JEFFREY, C. J. 1995. Compositae systematics 1975-1993. Developments and
4 desiderata. In: Advances in Compositae Systematics. Hind, D.N.J.; Jeffrey, C & Pope,
5 G.V. (Eds.). Kew: Richmond. Royal Botanical Gardens. Pp. 3-21.
- 6 JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. & STEVES, P.F. 1999. Plants
7 Systematics- A Phylogenetic Approach. Sunderland. Massachusetts: Sinauer
8 Associates. 464p.
- 9 LAMEGO, A.R. 2007. O homem e o Brejo. IBGE, Rio de Janeiro.
- 10 LAURENCE, M. P.; MOTTE-FLORAC; MCKEY, D. B. 2000. Secretory structures
11 on the leaf rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): Implications for
12 the evolution of nectary glands. American. Journal of. Botany., 87: 327-338.
- 13 LOURENS, A. C. U., VILJOEN, A. M. & VAN HEERDEN, F. R. 2008. South
14 African Helichrysum species: A review of the traditional uses, biological activity and
15 phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology, 119, 630-652.
- 16 LESSING, C. F. 1832. Synopsis Generum Compositarum. Berlin: Duncker &
17 Humboldt. 473p.
- 18 LÜTTGE, U. 1971. Structure and function of plant glands. Annu. Rev. Pl. Physiol.
19 22:23-44.
- 20 MARASCHIN, M. & VERPOORTE, R. 2001. Engenharia do Metabolismo
21 Secundário. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 14: 24 – 28.
- 22 MAUAD, L. P., DE SOUZA BUTURI, F. O., DE SOUZA, T. P., NASCIMENTO,
23 M. T., & BRAGA, J. M. A. (2014). New distribution record and implications for
24 conservation of the endangered Wunderlichia azulensis Maguire & GM Barroso
25 (Asteraceae: Wunderlichieae). *Check List*, 10(3), 706-708.
- 26 METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem
27 and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Vols. I, II. Clarendon
28 Press, Oxford.
- 29 MONDIN, C.A. 2006. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas
30 brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia,
31 taxonomia, ecologia e genética. 1ed. Conferências Plenárias e Simpósios do 57°
32 Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre: Pallotti.

1 NAKAJIMA, J.N. 2000. A família Asteraceae no Parque Estadual da Serra da
2 Canastra, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de
3 Campinas, Campinas. 467p.

4 NAKAJIMA, JN, SEMIR, J. 2001. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da
5 Canastra, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 24: 471-478.

6 NUÑEZ, C. V. 2000. *Terpenos de Wunderlichia crulsiana e Mikania sp. nov.* Tese
7 de doutorado. (doutorado em ciências químicas) Instituto de química da Universidade
8 de São Paulo – SP, Brasil.

9 NUÑEZ, C. V., ZACHEU, F. M., PINTO, E., ROQUE, N. F., COLEPICOLO, P., &
10 BRIGAGÃO, M. R. P. L. 2003. Sesquiterpene lactone from *Wunderlichia crulsiana*
11 inhibits the respiratory burst of leukocytes triggered by distinct biochemical
12 pathways. *Life sciences*, 73(17), 2161-2169.

13 O'DOWD, D.J. & CATCHPOLE, E.A. 1983. Ants and extrafloral nectaries: no
14 evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. - ant interactions. *Oecologia*
15 59:191-200.

16 ORTIZ, S, BONIFACINO, M, CRISCI, J, FUNK, V, HIND, N, HANSEN, HV,
17 KATINAS, L, SANCHO, G, ROQUE, N, SUSANNA, A & TELLERIA, M. 2009,
18 'The basal grade of Compositae: Mutisieae (sensu Cabrera) and Carduoideae'.
19 in Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae. IAPT, Vienna,
20 Washington, pp. 193-213.

21 PAGNI, A. M., ORLANDO, R., MASINI, A. & CICCARELLI, D. (2003. Secretory
22 structures of *Santolina ligustica* Arrigoni (Asteraceae), an Italian endemic species.
23 Israel Journal of Plant Sciences, 51, 185-192.

24 PANERO, J.L. & FUNK, V. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification
25 for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of*
26 *Washington* 115(4): 909-922.

27 PANERO, J.L. & FUNK, V.A. 2008. The value of sampling anomalous taxa in
28 phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular*
29 *Phylogenetics and Evolution* 47: 757–782.

30 PEREIRA, R.C.A. 1989. A tribo Heliantheae Cassini (Asteraceae) no estado de
31 PernambucoBrasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de
32 Pernambuco, Recife. 306p.

33 PERRIN, A. 1971. Présence de “cellules de transfert” au sein de l'épithème de
34 quelques hydathodes. *Z. Pflanzenphysiol.* 65:39-51.

1 ROBBERS J.E., SPEEDIE M.K. & TYLER V.E. 1997. Farmacognosia-
2 Biotecnologia. Editorial Premier, São Paulo, 205.

3 ROQUE, N. & PIRANI, J.R. 1997. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais:
4 CompositaeBarnadesieae e Mutisieae. Boletim de Botânica da Universidade de São
5 Paulo 16: 151185.

6 ROSHCHINA, V. V. & ROSHCHINA, V.D. 1993. The excretory function of higher
7 plants. Springer- Verlag, Berlin.

8 SAJO, M. G. & MENEZES, N. L. 1994. Considerações sobre a anatomia foliar de
9 *Vernonia* Screb (compositae) da Serra do Cipó. MG. Naturalia 19:173-183.

10 SCHNEIDER, AA, HEIDEN, G, BOLDRINI, II. 2009. Notas nomenclaturais em
11 *Baccharis* L. sect. *Caulopterae* DC. (Asteraceae). Revista Brasileira de Biociências 7:
12 225-228.

13 SCHNEPF, E. 1974. Gland cells. In Dynamic aspects of plant ultrastructure (A.W.
14 Robards, ed.). McGraw-Hill Book Co. Ltd., Maidenhead, p.331-357.

15 SILVA, GAR, SANTOS, JUM. 2010. Novos registros de espécies da subtribo
16 *Ecliptinae* (*Heliantheae*-Asteraceae) para a Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica*,
17 40: 499-508.

18 SILVA, GAR, SANTOS, JUM.2011. *Acmella marajoensis* G.A.R. Silva &
19 J.U.M.Santos: Uma nova espécie de Asteraceae para a Amazônia brasileira. *Acta*
20 *Amazonica* 41:191-194.

21 SMILJANIC, K. B. A. Anatomia foliar de espécies de Asteraceae de um afloramento
22 rochoso no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG). Dissertação de Mestrado.
23 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2005.

24 SOFFIATI, A.A. 1998. Aspectos Históricos das Lagoas do Norte do Estado do Rio
25 de Janeiro in Esteves, F.A. (ed.). *Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional*
26 *da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*. Universidade Federal do
27 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

28 SOFFIATI, A.A. 2005. História das ações antrópicas sobre os ecossistemas vegetais
29 nativos das regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro. *Perspectivas* 4.

30 SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the Dicotyledons. A handbook for
31 laboratories of pure and applied Botany. Transl. by L. A. Boodle & F. G Fritsch. Vols.
32 I, II. Clarendon Press, Oxford.

33 SOUZA, F. O. 2007. Asteraceae no parque estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia,
34 sp. Dissertação de Mestrado.

1 SOUZA-BUTURI, F.O. 2013b. *Taxonomia, palinologia e anatomia de*
2 *Wunderlichia, Asteraceae*. PhD. Thesis. Campinas: Universidade Estadual de
3 Campinas. 156 pp.

4 STANGARLIN, J. R. ; KUHN, O J ; TOLEDO, M. V. ; PORTZ, R
5 L ; SCHWANESTRADA, K R F ; PASCHOLATI, S F . 2011. A defesa vegetal contra
6 fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 10, p. 18-46.

7 VENABLE, D.L. & LEVIN. D.A. 1983. Morphological dispersal structures in
8 relation to growth habit in the Compositae. *Plant Systematic Evolution* 143:1-16.

9 VERTREES, G.L. & MAHLBERG, P.G. 1978. Structure and ontogeny of laticifers
10 in *Cichorium intybus* (Compositae). *Am. J. Bot.* 65:764-771.

11 VITTO, L. A. & PETENATTI, E. M. 2009. Asteráceae de importancia económica y
12 ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica
13 y plantas de interés industrial. *Multequina*, 18, 87-115.

14
15
16
17
18
19
20
21

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

CAPÍTULO 1

Morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos

Este trabalho será submetido a revista
Journal of Plant Research

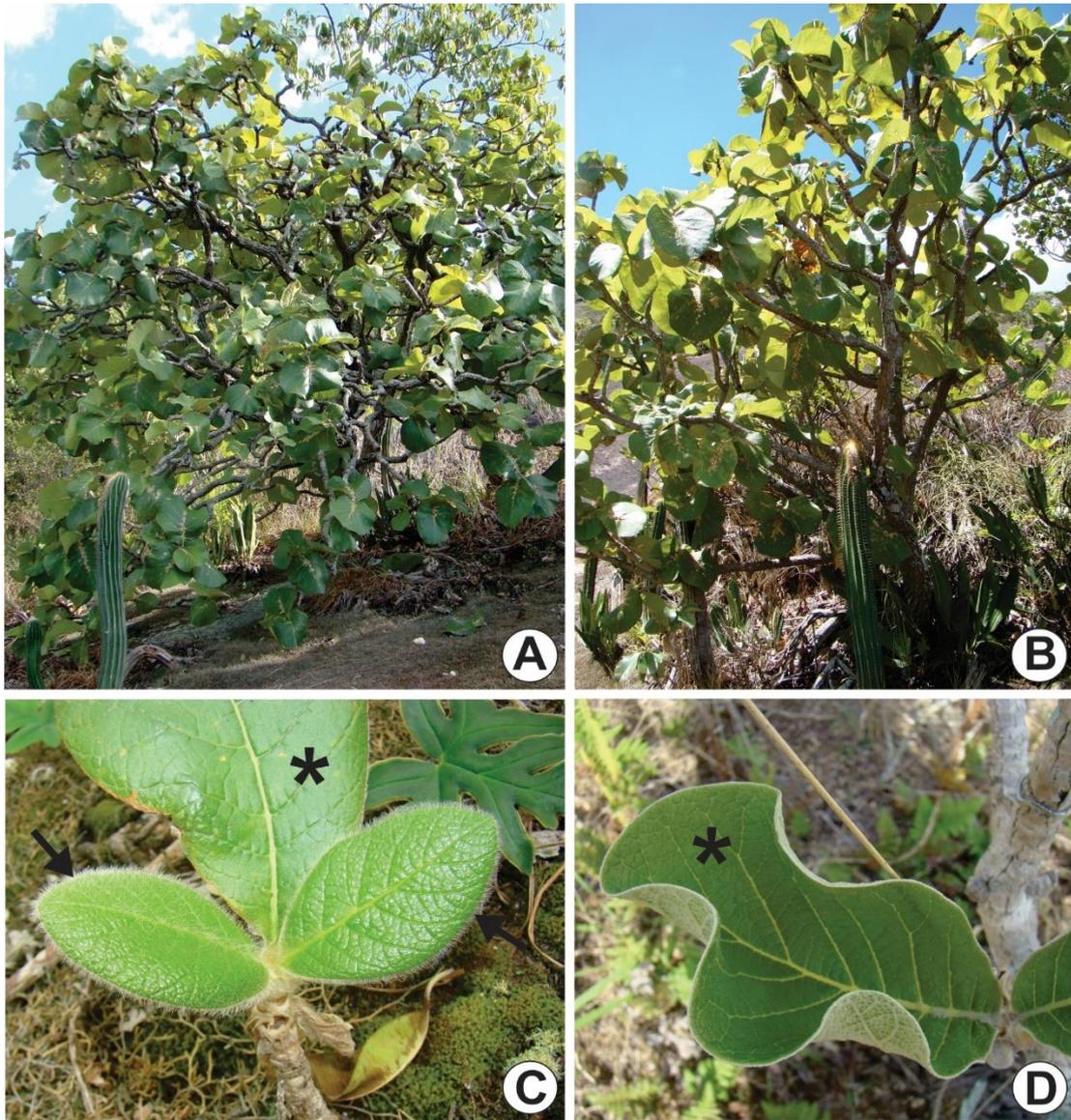
1	Sumário	
2		
3		
4	Lista de Imagens	
5	Imagem 1: A-B. Fotografia da espécie <i>W. azulensis</i> obtida no Morro do Itaoca. C. Folha	
6	jovem pubescente (seta), note a folha expandida sem aparência pilosa (*). D. Folha	
7	expandida (*). Imagem 2. Substâncias identificadas em <i>W. crulsiana</i> .	30
8	Imagem 2: Seção da filogenia Compositae que destaca o grau basal da família.	31
9	Imagem 3. Esquema dos tipos de tricomas encontrados na família Asteraceae.	32
10	Lista de figuras	
11	Figura 1: Fotografia por satélite mostrando a região de coleta	34
12	Figura 2: Fotografia mostrando a distribuição das amostras coletadas dos indivíduos na	
13	face leste	36
14	Figura 3: Fotografia mostrando a distribuição das amostras coletadas dos indivíduos na	
15	face oeste	36
16	Figuras 4 A-D: Caracterização morfológica por estereomicroscópio da lâmina foliar de	
17	<i>W. azulensis</i> .	40
18	Figura 5 A-D Caracterização anatômica por microscopia óptica da folha de <i>W.</i>	
19	<i>azulensis</i> .	41
20	Figura 6. Morfoanatomia dos tricomas foliares de <i>W. azulensis</i>	42
21	Figura 7. Anatomia e histoquímica da lâmina foliar	43
22	Figura 8. Secção transversal evidenciando a anatomia da raiz herbácea	44
23	Figura 9. Secção transversal evidenciando a anatomia da raiz lenhosa	45
24		
25	Lista de tabela	
26		
27	Tabela 1. Média microclima dos pontos de coleta dos indivíduos coletados durante o	
28	verão	34
29	Tabela 2. Localização por GPS dos pontos de coleta dos indivíduos	35
30	Tabela 3. Média da altura e da área foliar dos indivíduos coletados durante o período de	
31	verão	37
32		
33		

1 **Introdução**

2 A região Norte Fluminense apresenta uma fisionomia bem particular, possuindo
3 muitos sinais deixados pelas atividades históricas da ocupação antrópica e da exploração
4 econômica. Nesta região encontram-se vários tipos de vegetação que compõe o Bioma
5 Mata Atlântica, englobando a floresta ombrófila e estacional, além de mosaicos de outras
6 formações vegetais que se interconectam, como manguezais, dunas, restingas, ilhas de
7 vegetação rupestre nos *inselbergs* (Franke *et al.*, 2005).

8 O Maciço do Itaoca, localizado no distrito de Ibitioca, Município de Campos dos
9 Goytacazes, caracteriza-se como um *inselberg*. Mauad (2010) descreve 65 famílias de
10 plantas vasculares ocorrentes no Maciço do Itaoca, dentro da vegetação deste afloramento
11 rochoso uma das famílias com grande representatividade é a Asteraceae, na qual se
12 destaca a espécie *Wunderlichia azulensis* (fig 1 A e B) (Mauad *et al.*, 2014).

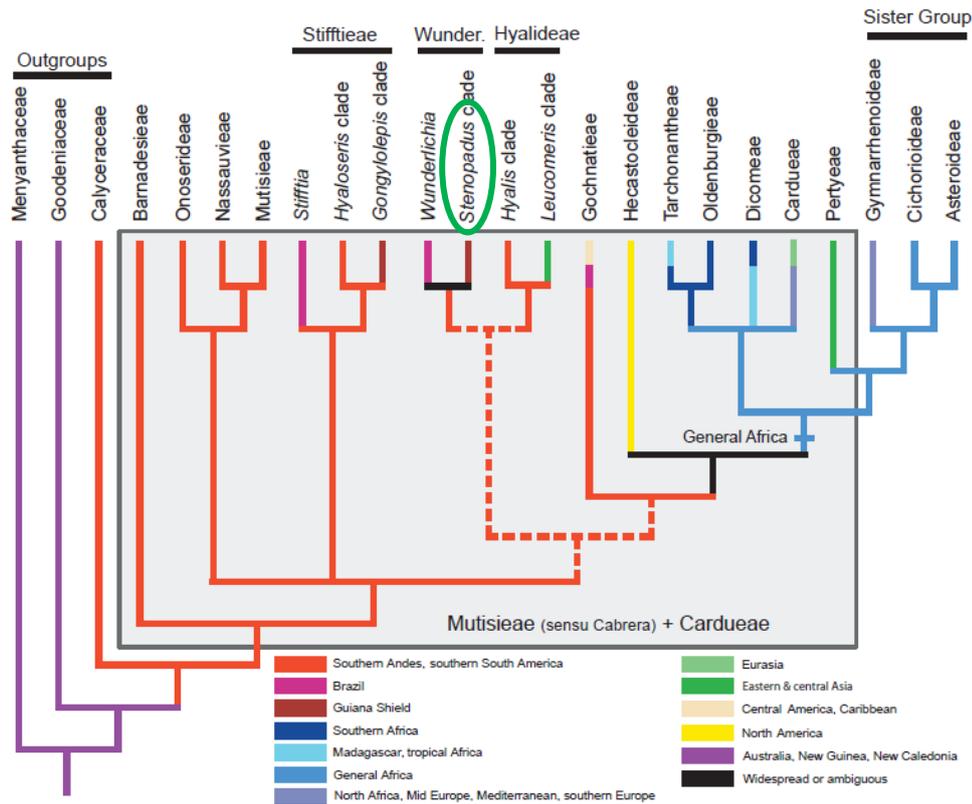
13 O gênero *Wunderlichia* é composto por cinco espécies restritas aos afloramentos
14 rochosos de Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (Barroso &
15 Maguire, 1973; Feres *et al.*, 2009; Souza-Buturi, F. O., 2013). Todas as espécies do
16 gênero *Wunderlichia* são caducifólias e adaptadas aos ambientes xéricos e rupestrial. As
17 folhas de todas as espécies são, inicialmente, densamente pubescentes, e depois estas se
18 tornam glabrescentes, ou seja, não possuem o aspecto piloso (figura 1 C e D). No
19 momento da floração, logo que as flores estão em desenvolvimento, as plantas se tornam
20 visivelmente desnudas (sem folhas) ajudando a dispersão dos aquênios (Barroso &
21 Maguire, 1973).



1

2 **Imagem 1:** A-B. Fotografia da espécie *W. azulensis* obtida no Morro do Itaoca. C. Folha
 3 jovem pubescente (seta), note a folha expandida sem aparência pilosa (*). D. Folha
 4 expandida (*). (Fonte F.G.Trindade)

5 *Wunderlichia* é um gênero endêmico do Brasil, tradicionalmente, este gênero é
 6 inserido na tribo Mutisieae *s.l.*, por diversos autores, dentre os quais Jeffrey (1967);
 7 Cabrera (1977) e Bremer (1994). Entretanto, nas filogenias recentes com base em dados
 8 moleculares, o gênero é tratado como pertencente à tribo Wunderlichieae (Fig. 2) e tem
 9 como gêneros irmãos *Stenopadus* e *Stomatochaeta* Maguire & Wurdack, (Ortiz *et al.*
 10 2009).

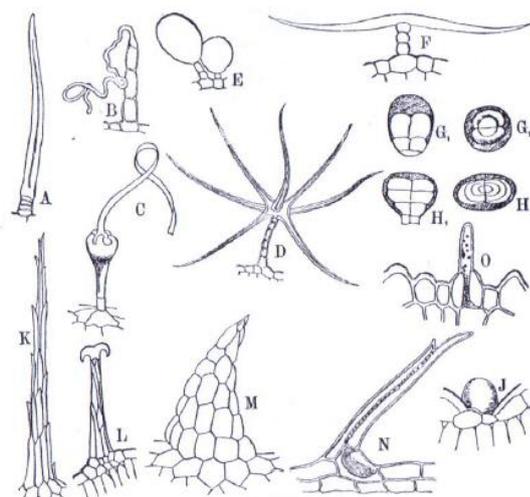


1

2 **Imagem 2:** Seção da filogenia Compositae que destaca o grau basal da família. Wunder.
 3 = Wunderlichieae; a caixa cinza denota Mutisieae (sensu Cabrera). Gênero *Wunderlichia*
 4 destacado por círculo verde. Árvore extraída de Ortiz *et al.* (2009), baseada nos estudos
 5 de Panero & Funk (2008).

6 Segundo Metcalfe & Chalk (1950), a tribo Mutisieae (Asteraceae) possui
 7 indumento variável, constituído de tricomas multicelulares unisseriados ou
 8 multisseriados, composto de células uniformes ou células basais e terminais modificadas
 9 (fig. E, L). Geralmente, apresentam tricomas tectores que podem ser simples (fig. 3 A),
 10 estrelados (fig. 3 D), malpiguiáceos (fig. 3 F) ou escamiformes, também são comuns
 11 tricomas glandulares depressos na face abaxial das folhas (fig. 3 J).

12



1

2 **Imagem 3.** Esquema dos tipos de tricomas encontrados na família Asteraceae. (Fonte:
3 Metcalfe & Chalk, 1950).

4 A função dos tricomas tectores é atribuída à proteção física contra o ataque de
5 insetos e patógenos, através da formação de uma barreira. Estes podem estar também
6 envolvidos na redução de perda de água e no aumento da tolerância a condições de
7 estresse abiótico, incluindo temperaturas extremas e de irradiação ultravioleta (UV)
8 (Yang & Ye, 2012). Já os tricomas glandulares, estão envolvidos na defesa estrutural e
9 química da planta. Segundo Uphof (1962), estes tricomas secretam uma variedade de
10 substâncias do metabolismo secundário, como taninos, substâncias resinosas, óleos
11 essenciais, e as características peculiares das células que as produzem variam de acordo
12 com as substâncias produzidas.

13 O estudo da anatomia e da natureza química do exsudato das estruturas secretoras
14 têm se mostrado relevante para a compreensão do papel que desempenham no corpo da
15 planta (Lüttge, 1971; Schnepf, 1974; Esau, 1976; Cutter, 1978; Fahn, 1979, 1988).
16 Concomitante, estudos sobre morfologia e distribuição das estruturas secretoras têm sido
17 utilizados para auxiliar na delimitação de alguns gêneros dentro das famílias botânicas,
18 como no caso da família Asteraceae (Castro *et al.*, 1997; Adedeji & Jewoola, 2008). Do
19 ponto de vista biotecnológico é importante caracterizar as estruturas glandulares, desde
20 sua anatomia até seus processos de síntese e acumulação dos compostos que constituem
21 os exsudados, geralmente ricos em moléculas bioativas.

22

1 **Objetivos:**

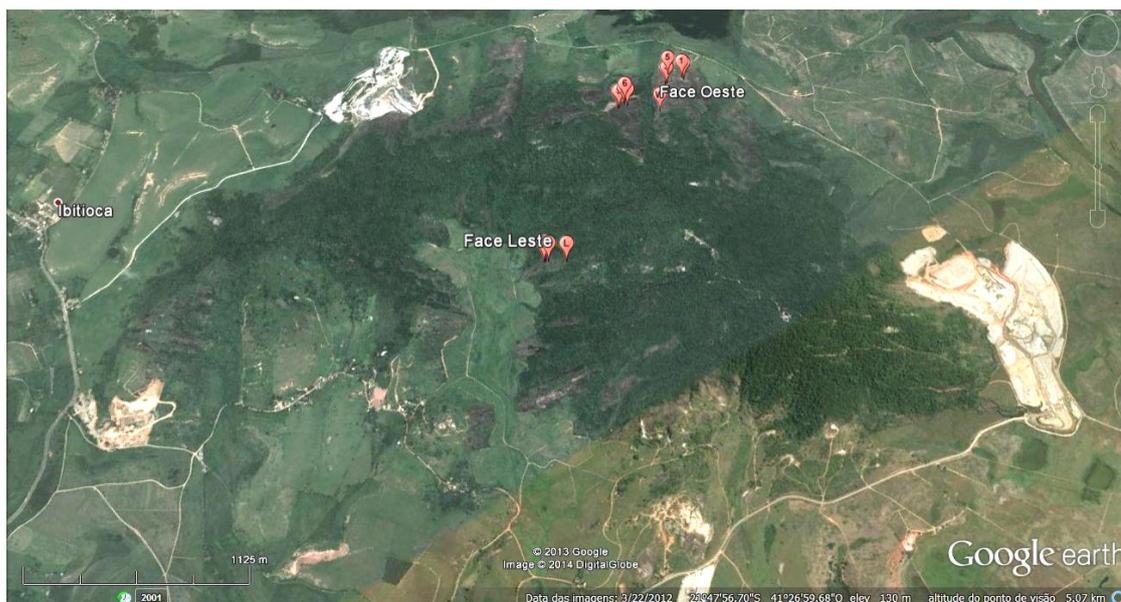
- 2 • Caracterizar a morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos (raiz, caule e folha),
3 caracterizando os sistemas de revestimento, fundamental e vascular da espécie *W.*
4 *azulensis*;
- 5 • Caracterizar por métodos histoquímicos as classes majoritárias de substâncias que
6 presentes nos órgãos vegetativos;
- 7 • Caracterizar a morfologia e anatomia dos tricomas foliares da espécie em questão;
- 8 • Caracterizar histoquimicamente as classes majoritárias de substâncias que
9 constituem os exsudados dos tricomas glandulares da espécie *W. azulensis*.
- 10

11 **Materiais e Métodos:**

12 **Caracterização da Área de Estudo:**

13 O presente estudo foi realizado no Maciço do Itaoca (21°48' S 41°26'W),
14 vulgarmente chamado de “morro do rato”. Este local é um afloramento rochoso com
15 900ha de Mata Atlântica e altura máxima de 420m, situado no distrito de Ibitioca,
16 Município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Ramos férteis
17 foram herborizados e depositados no Herbário da UENF com duplicata no Herbário do
18 Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

19 Foram escolhidas duas faces para coleta dos indivíduos, identificados como face
20 leste e face oeste (figura. 1). Em cada face foram feitas medições de temperatura, umidade
21 e radiação em quatro pontos distintos, com distância média de 3 metros de um ponto para
22 outro, ao redor dos indivíduos, em cada setor estudado. Medições de temperatura e
23 umidade foram realizadas com termohigrômetro (Termohigrômetro Digital Impac
24 TH01), ao passo que medidas de radiação foram feitas com radiômetro (LI-250A), às 12h,
25 ambos em período de coleta. Os dados estão indicados na tabela 1.



1

2 **Figura 1:** Fotografia por satélite mostrando a região de coleta. Os marcadores
 3 vermelhos indicam as faces de coleta e de medição e o ponto vermelho indica o
 4 distrito de Ibitioca (imagem obtida pelo Google Earth:
 5 <https://www.google.com/earth/>).

Tabela 1. Média microclima dos pontos de coleta dos indivíduos coletados durante o verão

Setor	Temperatura (°C)	Umidade (g / m ³)	Radiação (µM)
Face leste	33.5	54.2	1748.3
	36	50	2395.0
	38.5	45.5	1700.1
	37.5	47	2344.0
	37.3	47.2	2250.0
Média	36,6	48,8	2087,48
Face oeste	42.2	41	1918.9
	45.5	38.6	1882.8
	45.2	38.4	1882.5
	45.1	38.7	1905.1
	41.5	41.3	1797.5
Média	43,9	39,6	1877,36

6 **Coleta do material para microscopia para análise morfoanatômica:**

1 A coleta foi feita nos paredões rochosos do *inselberg* em questão. Os indivíduos
 2 escolhidos de *W. azulensis* tiveram seus locais de coleta determinados por GPS (Global
 3 Position System) (tabela 2). Foram coletados fragmentos de órgãos vegetativos no
 4 período da estação de verão, durante o mês de fevereiro de 2014. Serão ainda coletados
 5 novos fragmentos no meio do ano entre julho e agosto, durante o período de inverno, afim
 6 de, caracterizar se há variação na densidade de tricomas e na intensidade de metabólitos
 7 especiais.

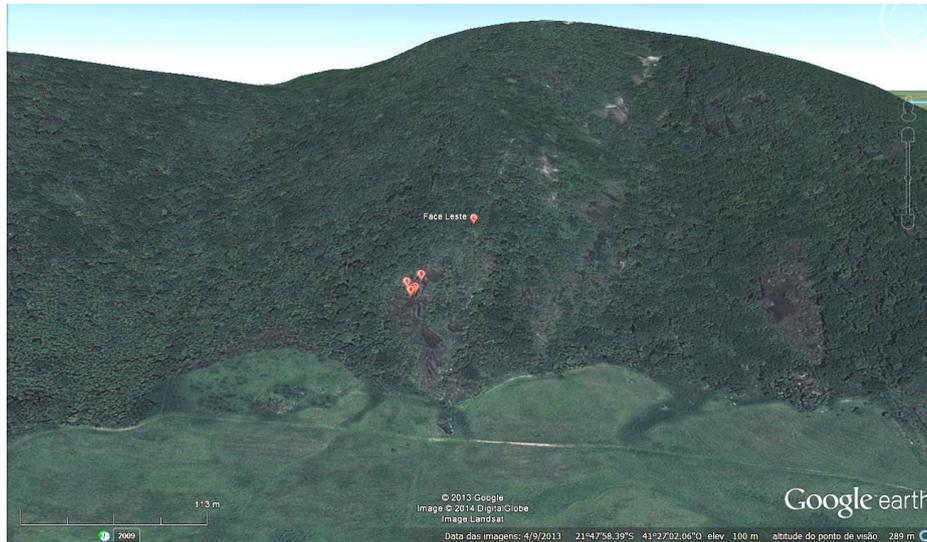
8 Foram coletados 5 indivíduos na face leste (figura 2) e 10 indivíduos na face oeste
 9 (figura 3). Todos os indivíduos coletados de ambos os setores foram medidos em altura e
 10 cinco folhas expandidas de cada indivíduo tiveram o limbo foliar medido em largura e
 11 comprimento, afim de obter a média do tamanho da área foliar dos indivíduos coletados
 12 (tabela 3).

Tabela 2. Localização por GPS dos pontos de coleta dos indivíduos

Setor	Indivíduo	Localização	Altitude (m)
Face leste	1	21°79'976"S 41°45'131"W	88
	2, 3 e 4	21°79'985"S 41°45'123"W	91
	5	21°79'970"S 41°45'115"W	113
Face oeste	1	21°78'732"S 41°45'723"W	13
	2	21°78'732"S 41°45'705"W	28
	3 e 4	21°78'832"S 41°45'729"W	45
	5	21°78'770"S 41°45'793"W	35
	6	21°79'109"S 41°45'737"W	100
	7	21°79'121"S 41°45'692"W	112

8	21°79'131"S 41°45'712"W	123
9 e 10	21°79'178"S 41°45'691"W	151

1



2

3 **Figura 2:** Fotografia mostrando a distribuição das amostras coletadas dos indivíduos na
4 face leste (imagem obtida pelo Google Earth: <https://www.google.com/earth/>)

5



6

7 **Figura 3:** Fotografia mostrando a distribuição das amostras coletadas dos indivíduos na
8 face oeste (imagem obtida pelo Google Earth: <https://www.google.com/earth/>).

9

Tabela 3. Média da altura e da área foliar dos indivíduos coletados durante o período de verão

Setor	Indivíduo	Altura (m)	Média A X L (cm) da folha
Face leste	1	4	26,7 X 25,5
	2	1,5	29 X 24,6
	3	1,8	24,7 X 19,9
	4	1,8	25,2 X 24,5
	5	1,9	24,6 X 21,2
Face oeste	8	2,1	20,7 X 19,8
	3	1,75	18,8 X 17,7
	4	2	21 X 20,6
	10	2,5	22,2 X 21,9
	9	1,9	23,5 X 20

1

2 **Preparo de Amostras para Microscopia Óptica:**

3 Fragmentos de raiz, caule e folha (pecíolo, terço médio e nervura central) de 5
4 indivíduos de cada face com altitude variadas entre 40 a 150m de altitude foram fixados
5 em uma solução de glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de
6 sódio 0,05 M em pH 7,2, por duas horas. Em seguida foram feitas três lavagens de uma
7 hora no mesmo tampão.

8 **Infiltração em resina epóxi:** Os fragmentos foram pós-fixados em uma solução
9 de tetróxido de Ósmio 1 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, à temperatura ambiente
10 por uma hora. As amostras foram lavadas, desidratadas em série cetônica crescente: 50
11 %, 70 %, 90 % e três vezes 100% por uma hora em cada etapa. Os fragmentos foram
12 infiltrados com resina epóxi (Epon®), utilizando-se série crescente de resina em acetona.
13 Posteriormente foram emblocados e a polimerização da resina foi realizada a 60°C. Em
14 ultramicrótomo foram retirados cortes semifinos, entre 0,60 e 0,70 µm de espessura com
15 o auxílio de faca de diamante. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1 % por 1
16 minuto. As lâminas foram seladas com Entelan® e observadas e capturadas em

1 microscópio de campo claro (Axioplan ZEISS), afim de, caracterizar a anatomia dos
2 órgãos em questão.

3 **Infiltração em historesina:** Os fragmentos foram desidratados em série alcoólica
4 crescente: 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100% por uma hora em cada etapa.
5 Posteriormente infiltradas em historesina (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg,
6 Alemanha) utilizando série crescente de resina em álcool etílico. A polimerização da
7 resina foi realizada em temperatura ambiente. Posteriormente, foram obtidas secções
8 transversais e longitudinais do material, (3,0-6,0 µm de espessura), através do micrótomo
9 de rotação (Leica RM2255). As secções foram dispostas em lâminas e foram submetidas
10 a diferentes reagentes segundo técnicas usuais de anatomia vegetal (Kraus & Arduin,
11 1997; Ascensão, 2003), afim de, evidenciar grupos químicos presentes nos órgãos
12 vegetativos e na secreção e nas células que compõem os tricomas.

13 **Métodos histoquímicos:** Reagentes para evidenciar diferentes grupos químicos
14 presentes nos órgãos vegetativos e na secreção e nas células que compõem os tricomas:
15 Vermelho de Rutênio 0,02 %; Reagente de Schiff (Periodic Acid-Schiff); Auramina O;
16 Sudan IV e Black B; Acetato de cobre e Ácido Rubeânico; Floroglucina e Ácido
17 Clorídrico; Lugol; Cloreto férrico; Dragendorff; Vanilina clorídrica; Reagente de Nadi;
18 Cloreto de alumínio a 5-15% e acetato de magnésio a 5% (Charrière-Ladreix, 1976);
19 Xylidine Ponceau e Azul de Comassie. (Kraus & Arduin, 1997; Ascensão, 2003;
20 Ascensão *et al.*, 2005).

21 **Microscopia Eletrônica de Varredura:**

22 Para análises em microscopia eletrônica de varredura, os fragmentos do caule, raiz
23 e folha (pecíolo, terço médio e nervura central) após a etapa de desidratação em série
24 cetônica crescente, as amostras foram submetidas ao ponto crítico com o auxílio do
25 aparelho Bal-Tec Critical Point Dryer CPD 030. Em seguida, os fragmentos secos foram
26 afixados com fita adesiva de carbono em suportes próprios e metalizados com uma fina
27 camada de ouro de 20 nm (Bal-Tec Sputer Coater SCD 050). As amostras foram
28 observadas e documentadas no microscópio eletrônico de varredura ZEISS - DSEM 962
29 a uma voltagem de 25 KV.

30

1 **Resultados:**

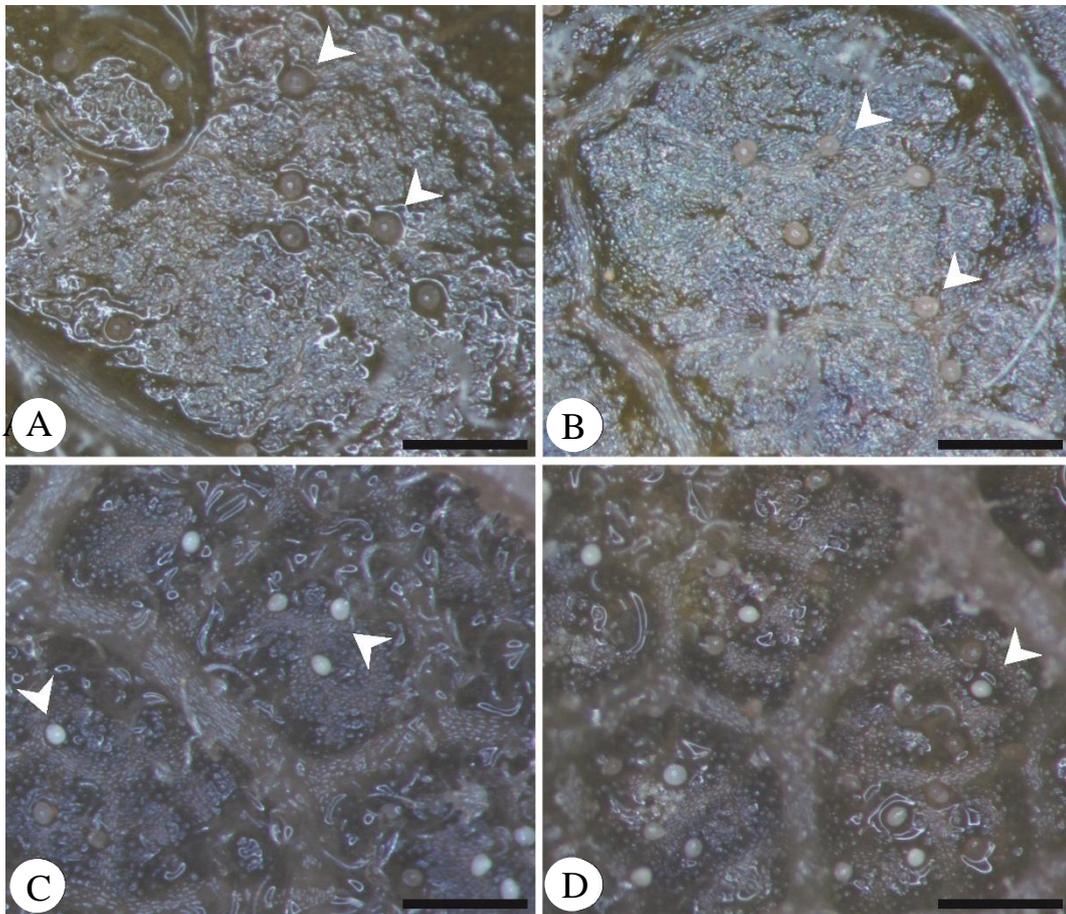
2 Após a realização da caracterização do ambiente e coleta do material botânico, os
3 fragmentos dos órgãos vegetativos foram fixados em uma solução aquosa de
4 glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2,
5 Cinco indivíduos de cada setor foram selecionados e a caracterização da micromorfologia
6 e anatomia dos órgãos vegetativos da *W. azulensis* foram realizadas com auxílio do
7 estereomicroscópio, microscopia óptica e eletrônica de varredura.

8 Relacionando os dados ambientais, é possível observar que a face oeste possui
9 valores de temperatura mais elevados que a face leste, tendo máxima de 45°C e a face
10 leste máxima de 37°C (tabela 1). Entretanto os valores de umidade e radiação foram mais
11 expressivos na face leste, com máxima de 54.2g/m² de umidade e 2.395,00μM de
12 radiação. Embora a face oeste tenha maior índice de temperatura, os valores de radiação
13 são menores quando comparados a face leste, máxima de 1.918,9μM. Assim como os
14 valores de umidade, máxima de 41.3g/m. Com relação a área foliar, aparentemente são
15 levemente reduzidas na face oeste quando comparada a face leste (tabela 3).

16 A partir da observação da lâmina foliar por estereomicroscópio foi possível
17 observar uma grande densidade de tricomas glandulares e tectores em ambas as faces
18 abaxial e adaxial (figura 4 A - D). Através da dissociação foi possível observar que os
19 tricomas tectores são longos, unicelulares e multisseriados, com base multicelular (figura
20 5 A e D). Já os tricomas glandulares aparentam ter a cabeça multicelular (figuras 5 B e
21 C).

22 Através das análises por microscopia óptica e eletrônica de varredura foi possível
23 observar tricomas tectores simples, de estrutura longa com corpo multicelular e
24 unisseriado (fig. 6 A e B). Os tricomas glandulares são multicelulares, uni e

- 1 multisseriados, com duas a quatro células na base, até quatro células no pedúnculo e até
- 2 três células apicais globóides (fig. 6 C-D).



3

- 4 **Figuras 4 A-D:** Caracterização morfológica por estereomicroscópio da lâmina foliar
5 de *W. azulensis*. A e B. Vista da superfície adaxial da face leste evidenciando tricomas
6 glandulares. C e D. Vista da superfície abaxial da face oeste evidenciando tricomas
7 glandulares. Tricomas glandulares (cabeça de seta). Barra: 0,5mm.

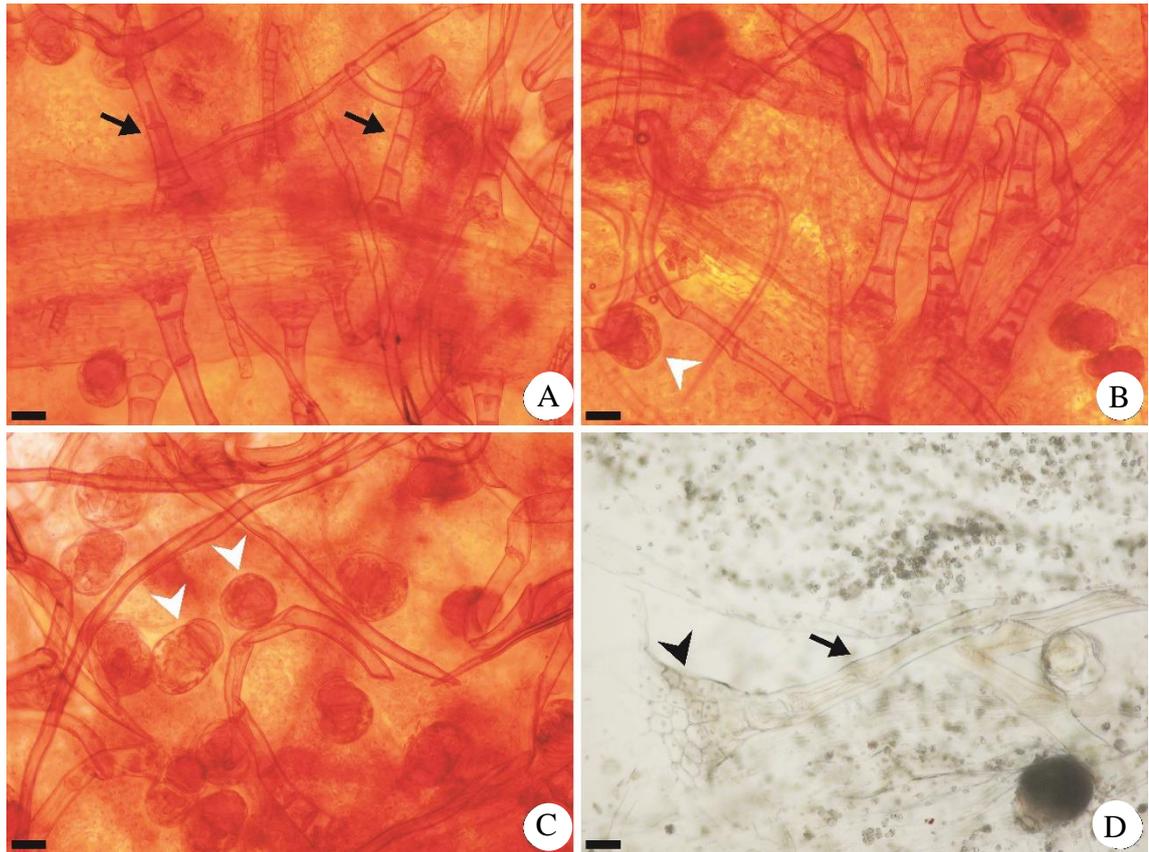


Figura 5 A-D Caracterização anatômica por microscopia óptica da folha de *W. azulensis*. A e B. Epiderme adaxial da face leste. C e D. Epiderme abaxial da face oeste. Tricoma tector unicelular, multisseriado (seta preta); Tricoma glandular (cabeça de seta branca); Base multicelular (cabeça de seta preta). Barra: 50µm.

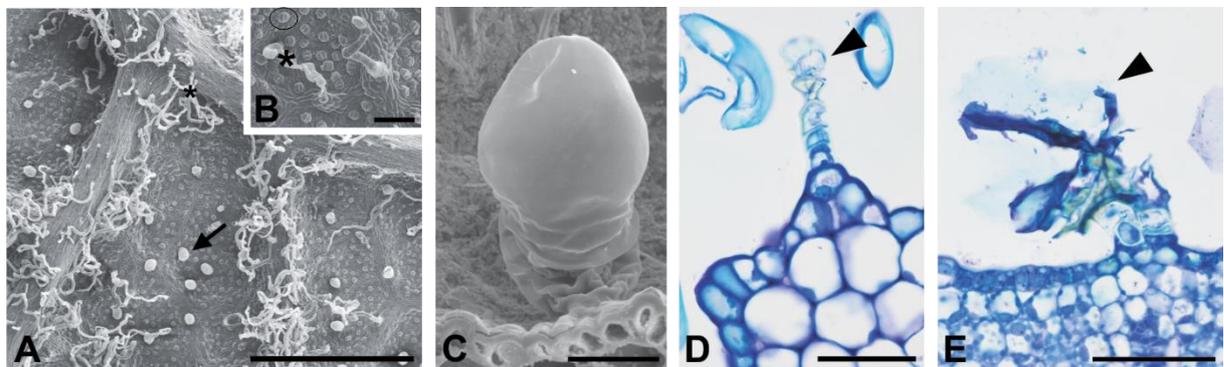
A partir de secções transversais foi possível identificar uma epiderme adaxial multiestratificada com camada cuticular espessa (fig. 7 A-C). As células da epiderme possuem tamanho variado e paredes anticlinais retas ou ligeiramente sinuosas, podendo ter aspecto circular ou retangular. As células de ambas as superfícies (abaxial e adaxial) são semelhantes e sendo as células na face abaxial mais protuberantes de formato convexo (fig. 7 D).

A lâmina foliar é do tipo hipoestomática, com estômatos anomacíticos e emergentes com ampla câmara subestomática (fig. 7 E). O mesofilo é dorsiventral, com parênquima diferenciado em paliçádico (Pp) e lacunoso (Pl) (fig. 7 E). Entretanto o parênquima paliçádico não apresenta disposição de células justapostas, ocorrendo alguns espaços celulares (fig. 7 A e E). A camada lacunosa apresenta número variável e com

1 células mais ovais (figura 7 E) Cristais do tipo drusa são observados nas células do
2 parênquima paliçádico e lacunoso (fig. 7 F). O feixe vascular apresenta bainha de células
3 perivasculares com extensão de células até a epiderme (fig 7 E). O sistema vascular está
4 organizado por numerosos feixes vasculares colaterais de diferentes tamanhos. Os feixes
5 vasculares estão envoltos por bainha parenquimática ou esclerenquimática (dados não
6 mostrados).

7 Testes com cloreto férrico marcaram positivamente as células da epiderme na face
8 adaxial, evidenciando presença de compostos fenólicos (fig. 7 G). A presença de
9 mucilagem foi detectada em ambas as faces da epiderme, além da marcação positiva das
10 células apicais dos tricomas glandulares (fig. 7 H e I). Testes com reagente de Nadi e
11 Sudan IV revelaram presença de óleo essencial e gotas de lipídio nas células do mesofilo
12 e epiderme (fig. 7 J e K).

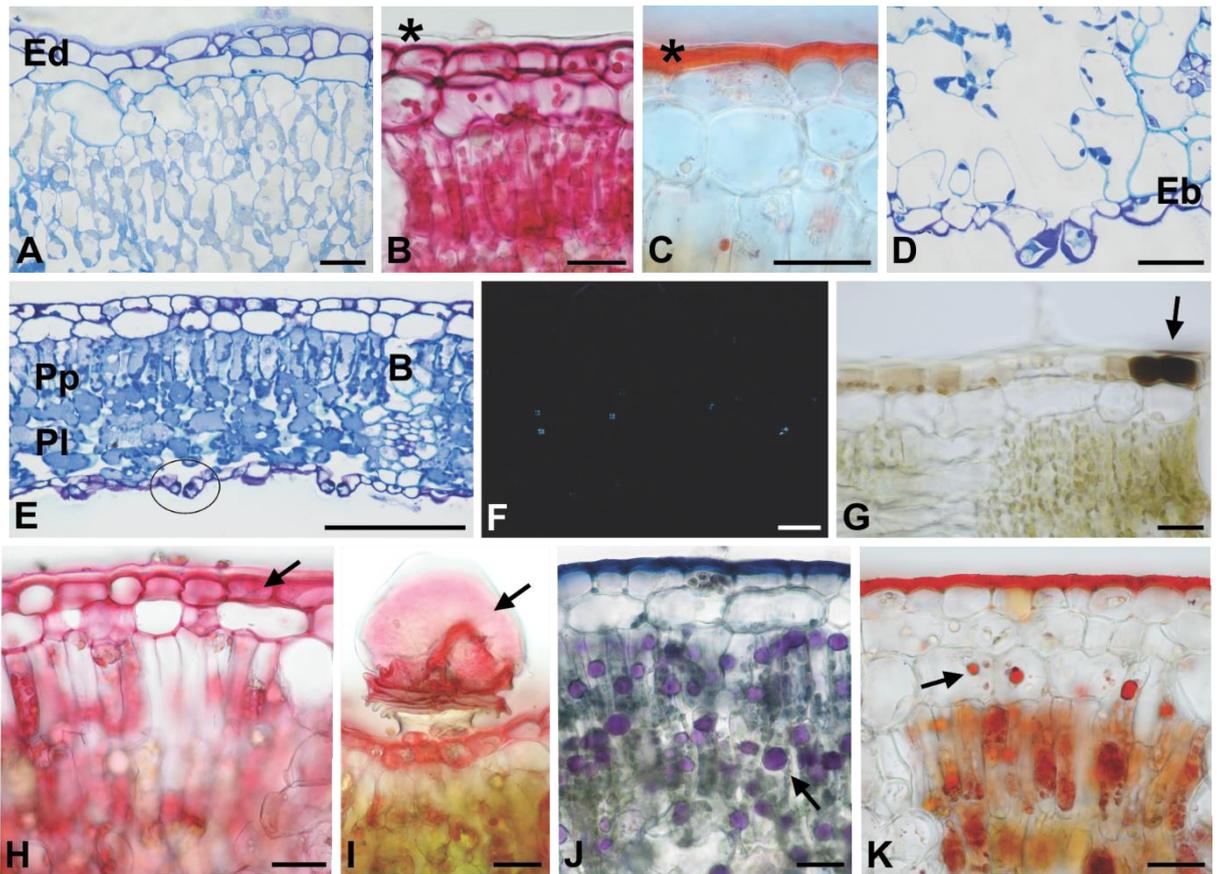
13



14

15 **Figura 6. Morfoanatomia dos tricomas foliares de *W. azulensis* (A-C, MEV; D e E, MO):**
16 A. Visão geral da superfície abaxial evidenciando tricomas tectores (*) e glandulares (seta); B.
17 Detalhe do tricoma tector e dos estômatos. Note como são protuberantes às células da epiderme
18 (círculo); C. Detalhe do tricoma glandular; D. Tricoma glandular com haste unisseriada e
19 multicelular e cabeça multicelular (cebeça de seta); E. Tricoma glandular com haste
20 multisseriada. Barras: A. 1mm; B-E. 50µm.

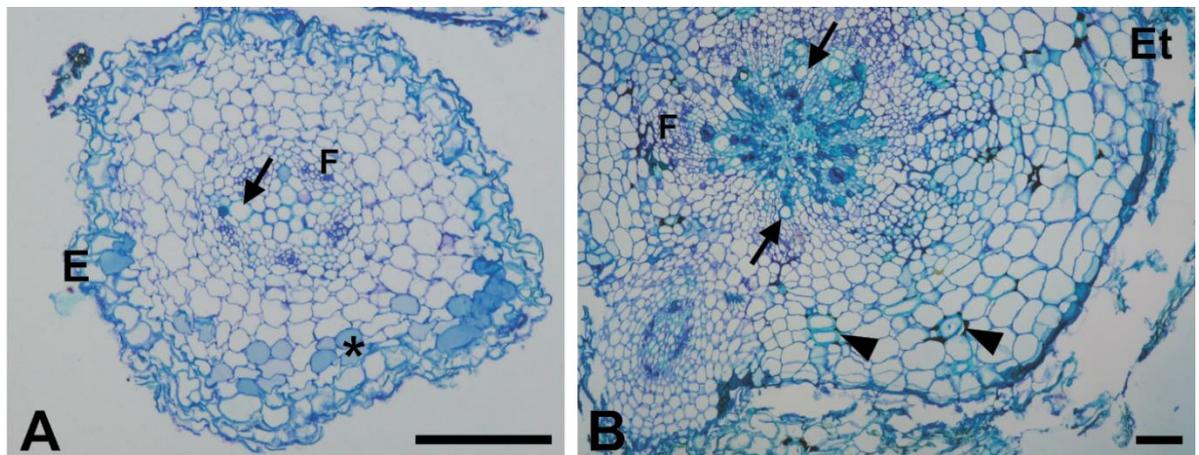
21



1 **Figura 7. Anatomia e histoquímica da lâmina foliar:** A. Detalhe da epiderme
 2 multiestratificada (Ed); B. Coloração com vermelho de Rutênio evidenciando os extratos
 3 cuticulares em rosa. Note que a cutícula tem reação negativa (*); C. Reação positiva para
 4 Sudan IV na cutícula (*); D. Detalhe da epiderme abaxial (Eb); E. Mesofilo foliar; F. Cristal
 5 do tipo drusa; G. Marcação positiva para composto fenólico (seta); H e I. Mucilagem (seta);
 6 J. Óleo essencial (seta); K. Gotas lipídicas (seta). Barras: A-D. 10µm; E. 50µm; F-K. 10µm.
 7
 8

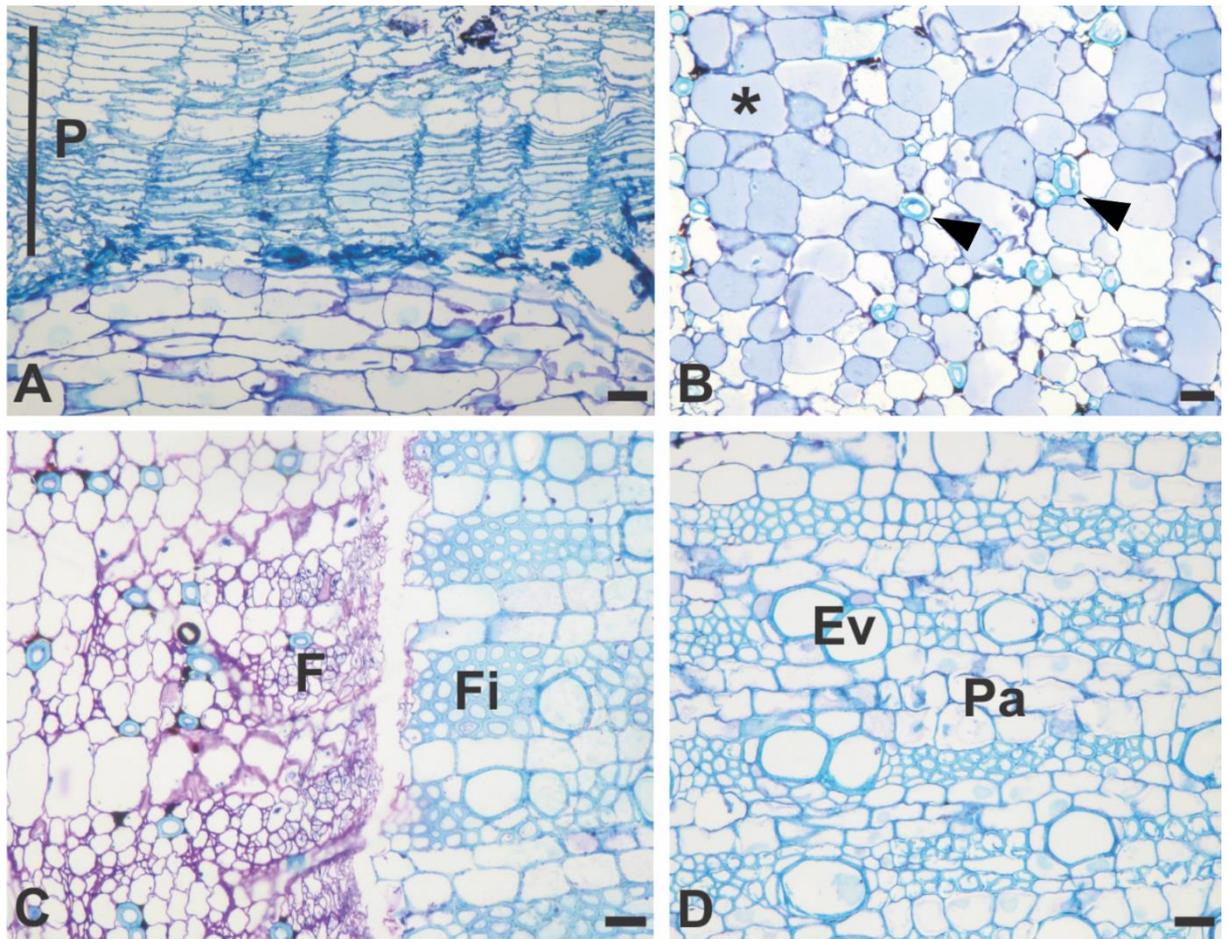
9 A raiz e caule coletados, mesmo jovens apresentam morfologia com ritidoma fissurado
 10 e facilmente destacável. Anatomicamente apresentam células parenquimáticas em
 11 diferenciação formando o felogênio e o câmbio. A epiderme apresenta células colapsadas e não
 12 há organização de uma camada unisseriada (figura 8, A e B). O córtex possui células
 13 parenquimáticas, e algumas apresentam acúmulo de substância além de paredes espessadas e o
 14 cilindro vascular apresenta células de floema e xilema primário (figura 8, A e B). Já cortes
 15 transversais em raízes com aspecto lenhoso apresentam periderme formada, córtex com células
 16 parenquimáticas e também células com paredes lignificadas e no cilindro vascular apresentam

1 floema e xilema secundários bem desenvolvidos (figura 9, A-D). A periderme apresenta várias
2 camadas celulares (figura 9, A), abaixo dessa ainda é observado o córtex constituído por células
3 parenquimáticas, e em sua maioria apresenta acúmulo de substância (figura 9 B) e
4 esclerênquima distribuídos de forma randômica. O sistema vascular é caracterizado pela
5 formação de um cilindro vascular, onde o floema secundário se localiza na periferia desse
6 cilindro, formando feixes ao redor do xilema secundário (figura 9, C). O xilema secundário está
7 localizado na parte interna desse cilindro, constituído por elementos de vaso isolados ou em
8 pares, fibras e células parenquimáticas (figura 9, D).



9

10 **Figura 8. Secção transversal evidenciando a anatomia da raiz herbácea:** A. Note a
11 desorganização das células da epiderme (E) e das células do córtex logo abaixo da epiderme.
12 Note as células parenquimáticas com acúmulo de substância (*). No centro temos o cilindro
13 vascular apresentando floema (F) e xilema (xilema) primário. B. A transição de primário para
14 secundário se torna mais evidente, note a formação da periderme (Et). O córtex apresenta
15 células com paredes lignificadas (cabeça de seta) e o cilindro vascular já apresenta células do
16 floema (F) e do xilema (seta) de origem secundária. Barras: 50 μ m



1

2 **Figura 9. Secção transversal evidenciando a anatomia da raiz lenhosa:** A. Periderme (P);
 3 B. Córtex evidenciando células parenquimáticas com acúmulo de substância (*) e
 4 esclerênquima (cabeça de seta); C. Observação do feixe vascular, floema secundário (F) e
 5 xilema secundário, note e fibras xilemáticas (Fi). D. Constituição celular do xilema secundário,
 6 note parênquima (Pa) e os elementos de vaso isolados e em pares (Ev). Barras: 50µm.

7

8 **Discussão:**

9 O gênero *Wunderlichia* é endêmico do Brasil e suas espécies apresentam
 10 distribuição geográfica restrita aos ambientes xeromórficos (Barroso & Maguire 1973;
 11 Roque & Pirani 1997; Hind & Semir 1998). No presente estudo verificou-se que a espécie
 12 apresentou algumas adaptações anatômicas comuns desse tipo de ambiente, como
 13 cutícula espessada, camada epidérmica multisseriada, idioblastos com cristais no
 14 mesófilo foliar, idioblastos com acúmulo possível acúmulo de água na raiz (Shields,

1 1950; Handro *et al.* 1970; Parkhust, 1978). Sendo os indivíduos analisados de ambas as
2 faces de coleta não apresentaram diferenças morfoanômicas.

3 A cutícula espessada foi observada na espécie de estudo em ambas as faces da
4 folha, essa característica está principalmente relacionada a respostas a altas incidências de
5 luz (Cutter, 1986). Segundo Pyykko (1966), a cutícula tende a ser mais espessa em
6 ambientes mais secos, como é o caso dos afloramentos rochosos. Esta estrutura tem papel
7 de minimizar a perda de água pela redução da transpiração (Schonherr & Riederer, 1989 ;
8 Gunning e Steer, 1996). Heredia *et al.* (1998) relacionam a espessura da cutícula à
9 proteção contra patógenos e que a relação com a perda de água deve-se também a
10 constituição química, estrutural e molecular dessa cutícula, associando a presença de
11 ceras, por exemplo. No caso da espécie *W. Azulensis*, a proteção esteja relacionada a
12 associação dessa adaptação cuticular espessa com as demais listadas acima.

13 A epiderme de *W. Azulensis* apresenta células da epiderme com tamanho variado
14 podendo ter aspecto circular ou retangular e as paredes ligeiramente sinuosas
15 protuberantes. As células de ambas as superfícies (abaxial e adaxial) são semelhantes e
16 apresentam epiderme multiestratificada. Essa característica também foi observada por
17 Smiljanic (2005) em outros táxons de Asteraceae de um afloramento rochoso em Minas
18 Geraes. Segundo Medri & Leras (1980), o grau de sinuosidade da parede celular está
19 relacionado à adaptação xeromórfica contra a perda de água, por isso, as paredes da
20 epiderme na superfície adaxial apresentam paredes anticlinais mais retas, uma vez que
21 sofrem incidência direta de luz.

22 Para a espécie de estudo ambas as superfícies apresentaram sinuosidade na parede
23 e irregularidade no formato das células. Haberlandt (1914) inferiu à presença de sinuosidade
24 na parede das células epidérmicas como função mecânica, uma vez que esse tipo de
25 morfologia aumenta a rigidez das células, evitando assim, o colapso da parede devido à

1 escassez de água. Com relação ao tamanho e formato das células é possível sugerir que
2 estas características podem ser influenciadas pelas condições ambientais, como a maior
3 disponibilidade de luz (Araujo & Mendonça, 1998; Alquini *et al.*, 2003), o que permite
4 explicar o tamanho reduzido e sinuoso, já que a disponibilidade de luz é intensa nesse
5 ambiente.

6 No presente trabalho não foram feitos experimentos de ontogenia para identificar
7 a origem da camada multisseriada da epiderme foliar, entretanto na literatura, Souza-
8 Buturi (2013) descreve para espécies do gênero *Wunderlichia* presença de camada
9 hipodérmica. Sugerindo então a origem pelo meristema fundamental das camadas
10 celulares abaixo da epidermes observadas na espécie *W. azulensis*, podendo ser descrita
11 como uma epiderme unisseriada com camada hipodérmica variando de duas a três
12 camadas. Daling (1989) constata que, em *Cereus giganteus* (Cactaceae), a epiderme
13 juntamente com a hipodérmica protegem o mesófilo das radiações alfa e beta e permitem
14 uma maior absorção da radiação fotossinteticamente ativa. Morretes (1958) descreve a
15 presença de hipodérmica em espécies da família Fabaceae e relaciona essa adaptação
16 também ao armazenamento de água (Metcalf e Chalk 1950; Bieras e Sajo 2009) A
17 estratificação da epiderme em espécies da família Malpighiaceae também são descritas
18 para restringir a transpiração e também são utilizados como caracteres taxonômicos para
19 separar espécies dentro dos gêneros (Metcalf e Chalk 1950; Araújo *et al.* 2010), mas que
20 também têm uma função adaptativa ao ambiente xéricos.

21 A epiderme é um tecido multifuncional formado por diferentes tipos de células
22 especializadas, como as que constituem os estômatos e os tricomas, cuja estrutura e
23 localização influenciam nas relações hídricas e nas trocas gasosas que ocorrem nas folhas.
24 Porém, a localização predominante na face abaxial, algumas vezes encobertos por
25 tricomas, ou a formação em câmara supraestomática, característica geralmente observada

1 em epífitas de ecossistemas secos, é considerada uma estratégia para reduzir a
2 transpiração (Rasmunssen 1987). Embora os estômatos observados na espécie *W.*
3 *Azulensis* sejam emergentes, ou seja, estão acima da linha das células epidérmicas, e tal
4 característica seja típica de plantas de ambientes mais úmidos, a funcionalidade dessa
5 adaptação para a espécie *W. Azulensis* pode estar relacionada a otimização de captação
6 de CO₂ (Ferreira *et al.*, 2013; Esaú, 1977). Embora seja antagônico o aumento da
7 captação de CO₂ e a perda de água para a atmosfera, essa discrepância possa ser
8 explicada pela densidade elevada de tricomas tanto tectores quanto glandulares na espécie
9 em questão, formando um indumento denso que recobre toda a epiderme tanto abaxial
10 quanto adaxial das folhas de *W. azulensis*, criando uma espécie de microclima nessa
11 região.

12 Característica essa descrita em espécies como *Curatella americana* (Dilleniaceae)
13 e *Miconia albicans* (Melastomataceae), onde a presença de densos indumentos na
14 epiderme representar uma importante adaptação a ambientes xéricos, tendo em vista que
15 essas estruturas aumentam a reflexão da irradiação solar (Holmes e Keiler 2002) e podem,
16 portanto, contribuir para a diminuição da temperatura foliar (Ehleringer e Mooney 1978;
17 Ehleringer 1983). A presença de tricomas na epiderme também contribui para um
18 aumento da espessura da camada de ar parado revestindo a superfície da folha e, como
19 consequência, restringe a perda de vapor de água dos estômatos para a atmosfera (Fahn e
20 Cutler 1992; Larcher 2006). Adicionalmente, pode oferecer proteção contra herbivoria
21 (Woodman e Fernandes 1991) ou ao ataque de patógenos (Valkama *et al.* 2005).

22 Se tratando do mesófilo foliar, para a espécie estudada foi observado que ambas as
23 camadas de células parenquimáticas estão frouxamente dispostas e com espaços
24 irregulares, além de apresentarem mais de uma camada de células. Segundo Shields
25 (1950), a intensidade luminosa e o déficit de água estão relacionados com o aumento do

1 parênquima paliçádico como uma forma de otimizar a taxa fotossintética. Estudos
2 realizados com plantas de savanas da Venezuela relatam que a alta eficiência intrínseca
3 no uso da água, especialmente nos períodos de maior déficit hídrico, serve, para manter
4 a taxa de fotossíntese elevada e resistir a baixos potenciais hídricos foliares (Medina e
5 Francisco 1994).

6 A análise anatômica das folhas de *W. azulensis* esclarece como o arranjo dos
7 tecidos pode auxiliar a enfrentar os estresses do ambiente. A relação da adaptação da
8 epiderme, da disposição dos estômatos, tamanho e intensidade de espaços intracelulares,
9 bem como a densidade de tricomas, pode influenciar na condutância estomática e
10 velocidade de perda de água pela planta. A proximidade entre os estômatos e, como
11 consequência, das câmaras subestomáticas pode causar uma sobreposição das rotas de
12 difusão de vapor de água, do interior do mesofilo para a atmosfera, dificultando a saída
13 de água da planta e, como consequência, reduzindo a transpiração (Larcher 2006).

14 A presença de cristais tipo drusa foi observada nas células parenquimática do
15 mesofilo foliar de *W. azulensis*. De acordo com Macnish *et al*, (2003) e Lersten & Honer
16 (2008), a ocorrência de cristais de oxalato de cálcio e drusas no interior das células
17 vegetais, muitas vezes, se origina da precipitação do cálcio decorrentes da perda de água
18 pela transpiração. Cristais do tipo drusas também são descritos em grande quantidade no
19 mesofilo da espécie *Vernonia discolor* (Asteraceae), planta de característica pioneira em
20 matas de araucária, tal adaptação provavelmente constitui uma estratégia contra
21 herbivoria. Larcher (2000) discute ainda que drusas, por serem estruturas que possuem
22 propriedades reflexivas, podem apresentar-se como uma adaptação responsável pela
23 reflexão uniforme da radiação solar entre as células do mesofilo. Entretanto, vale ressaltar
24 que o papel central dos cristais de oxalato de cálcio em plantas de ambientes sazonais
25 ainda não está totalmente elucidado (Franceschi e Nakata 2005), sendo provável que, para

1 as espécies em estudo, esteja relacionado a mais de uma função na proteção do tecido
2 foliar.

3 Testes histoquímicos feitos na lâmina foliar de *W. azulensis* indicaram presença
4 de diferentes compostos químicos, como por exemplo, compostos fenólicos nas células
5 da epiderme. Observamos forte marcação de lipídica na parede periclinal externa, além
6 de gotas lipídicas e de óleo essencial nas células parenquimáticas do mesofilo. E
7 substâncias mucilaginosas nas células da hipoderme. Os compostos fenólicos estão
8 relacionados com proteção das células contra radiação ultravioleta e ajudam a manter a
9 integridade do protoplasto sobre condições de estresse hídrico (Roshchina & Roshchina,
10 1993). A presença de lipídios na parede periclinal externa indica a presença de uma matriz
11 de cutina, substância lipofílica, que pode atuar como uma barreira para difusão de água e
12 solutos (Schreiber, 2005).

13 Com relação aos óleos essenciais detectados, estes normalmente apresentam
14 composição química complexa, com destaque para a presença de terpenos (Gonçalves *et*
15 *al.*, 2003). Terpenos e óleos essenciais são comuns na família Asteraceae, e já descritos
16 para o gênero *Wundelichia* (Fahn, 1979; Nunez, 2000). São descritos por atuar como uma
17 barreira química, produzindo compostos tóxicos ou repelentes (Johnson, 1975; Levin,
18 1976; Picman *et al.*, 1978) e atuando como importantes na adaptação à ambientes xéricos
19 (Fahn 1986, Fahn & Cutler, 1992), liberando exsudados que irão formar uma camada
20 contínua na superfície foliar, aumentando a refração de luz e diminuindo a temperatura,
21 além de auxiliar na economia de água na planta (Fahn, 1986; Larcher, 2000; Saltino *et*
22 *al.*, 1986).

23 A raiz e caule coletados, mesmo com aspecto morfológico herbáceo já apresentam
24 células parenquimáticas em diferenciação formando o felogênio e o câmbio. A epiderme
25 apresenta células colapsadas e não há organização de uma camada unisseriada. A morfologia

1 do caule descrita por Souza-Buturi (2013) para espécies do gênero *Wunderlichia* refere o caule
2 como cilindro e com espesso ritidoma e com fissuras. E para raízes há descrição para possíveis
3 formação de xilopódio. Outra característica notada, refere-se a frequência de idioblastos nas
4 células da raiz da espécie *W. azulensis*. Esses tipos de estruturas são comuns para espécies de
5 Cerrado e campo rupestre e já foi relatado em outros táxons de Asteraceae por Machado *et al.*
6 (2004), Magenta (2006) e Vilhalva & Appezzato-da-Glória (2006).

7 Segundo Munhoz e Felfili (2007), a seca afeta a fenologia das plantas do estrato
8 herbáceo e subarborescente do Cerrado, que determina a sazonalidade. Os mesmos autores
9 verificaram forte redução no florescimento durante a estação seca, e Appezzato-da-Glória *et al.*
10 (2008) observaram que xilopódios de espécies de Asteraceae perdem seus ramos caulinares no
11 período de seca e rebrotam na estação chuvosa. Para raízes há descrição de dois tipos de gemas
12 formadas em raízes: aquelas formadas naturalmente, denominadas gemas adicionais e, aquelas
13 formadas em resposta a danos mecânicos ou à senescência, denominadas reparativas (Raju *et*
14 *al.* 1966). Para *W. azulensis* são necessários mais estudos para elucidar tanto a morfologia quando
15 anatomia desse órgão, visto que há uma grande dificuldade de coleta e identificação de suas
16 partes.

17 O córtex da raiz de *W. azulensis* possui células parenquimáticas com acúmulo de
18 substância, e por vezes as células apresentam paredes espessadas e há presença de células
19 esclerenquimáticas estão distribuídas de forma randômica. Se tratando de células especializadas
20 em armazenamento de substâncias, em Cactaceae, estruturas secretoras de mucilagem são
21 mencionadas por diversos autores como um dos caracteres adaptativos desse grupo de plantas
22 ao ambiente xérico, uma vez que a mucilagem estaria relacionada ao armazenamento de água
23 (Metcalf & Chalk 1950, Gibson 1977, Gibson & Horak 1978, Mauseth & Ross 1988, Mauseth
24 1999, Silva & Alves 1999, Soffiatti & Angyalossy 2003). Não foram feitos testes histoquímicos
25 nas raízes de *W. azulensis*, mas se tratando do ambiente em que elas se encontram, e as

1 características observadas nas células do córtex, é possível inferir que essas células podem
2 conter substâncias higroscópicas, além das células esclerenquimáticas serem possíveis fibras
3 gelatinosas.

4 O cilindro vascular apresenta células de floema e xilema primário transversais em raízes
5 com aspecto lenhoso apresentam periderme formada, córtex com células parenquimáticas e
6 também células com paredes lignificadas e no cilindro vascular apresentam floema e xilema
7 secundários bem desenvolvidos em forma de faixas. São necessárias mais investigações sobre
8 o sistema vascular de *W. azulensis*, visto que na literatura não há relatos mais específicos sobre
9 sua anatomia. Pela base encontrada no presente estudo e comparando a literatura com espécies
10 de outros gêneros da família Asteraceae, é possível que as raízes dessa espécie possuam
11 crescimento “anômalo” que resulta na formação de faixas radiais de xilema e floema,
12 constituindo a estrutura secundária do xilopódio (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950).

13 No mais, as folhas da espécie em questão possuem características estruturais e
14 químicas que sugerem um caráter adaptativo ao ambiente a qual estão inseridas, além das
15 raízes e caule também serem responsáveis pelo sucesso de desenvolvimento da planta
16 nesses ambientes.

17 **Conclusão:**

18 Embora *Wunderlichia* seja um gênero endêmico do Brasil, poucos estudos são
19 encontrados sobre ele, principalmente com relação a sua anatomia. As análises
20 anatômicas foliares apresentarem importantes dados para a espécie e para a família
21 Asteraceae, além de evidenciar que as adaptações ocorrentes nos órgãos vegetativos são
22 parte fundamental para o sucesso da espécie *W. azulensis* ao ambiente xeromórfico que
23 elas são encontradas.

1 No geral as adaptações como cutícula espessa, camaras subestomaticas, cristais
2 nas células parenquimcas do mesofilo são importantes estrategias para otimizar e proteger
3 com relações hídricas e nas trocas gasosas que ocorrem nas folhas. Embora os estomatos
4 sejam emergentes, o papel dos tricomas tectores e glandulares encontrados nessa planta
5 são os possiveis beneficiadores para evitar a perda de agua, criando uma espécie de
6 microclima nessa região.

7 Ademais as características de acumulo de substancias de natureza higroscopica nas
8 raizes e o crescimento diferenciado das células corticais são importantes contribuições da
9 planta em resposta ao ambiente xérico a qual estão inseridas.

10 Os resultados histoquímicos também são de grande valia com relação a elucidação
11 dos compostos presentes as folhas, como sua correlção a adaptação ao ambiente, como a
12 presença de lipidios, oléos essenciais e compostos fenólicos, todos com intensa relação
13 de proteção com estresse hidrico e alta irradiancia.

14 Porém, são necessários mais estudos acerca dos órgaos vegetativos raiz e caule,
15 principalmente com relação a anatomia e histoquimica. Mas o presente trabalho contribuiu
16 de forma significativa na ampliação e aprimoramento do conhecimento acerca do genero
17 *Wunderlichia* e da especie em questão.

18

19 **Referencia Bibliográficas:**

- 20 ADEDEJI, O. & JEWOOLA, O. A. 2008. Importance of leaf epidermal characters in the
21 Asteraceae family. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36, 7-16.
22 Alencastro, F. M. M. R. (1973). Contribuição ao estudo da anatomia foliar das Vernonias
23 do Brasil 1 – *Vernonia oppositifolia* Less. *Arch. Jard. Bot. rJ.* 9: 109-123.
24 Alquini, Y., Bona, C., Boeger, M. R. T., Costa, C. G. & Barros, C. F., 2003. Epiderme

- 1 Anatomia Vegetal (B. Appezzato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro, eds.) UFV,
2 Viçosa, 87-107.
- 3 ANISZEWSKI T.; CIESIOLKA D.; GULEWICZ K. 2001. Equilibrium between basic
4 nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content.
5 *Phytochemistry*, 57: 43-50.
- 6 Appezzato-Da-Glória, B.; Hayashi, A. H.; Cury, G.; Misaki-Soares, M.K.; Rocha, R.
7 Occurrence of secretory structures in underground systems of seven Asteraceae
8 species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, London, 2008b. In press.
- 9 Araújo, MG.P., Mendonça, M.S., 1998. Escleromorfismo foliar de *Aldina heterophylla*
10 *Spruce ex Benth.* (Leguminosac-Papilionoideae) em três campinas da Amazônia
11 central. *Acta Amazonica* 28:353-371.
- 12 Araújo, J.S.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C.; Meira, R. M. S. A. 2010. Leaf anatomy as na
13 additional taxonomy tool for 16 species of *Malpighiaceae* found in the Cerrado
14 área (Brazil). *Plant Systematics and evolution*, 286: 117 – 131.
- 15 ASCENSÃO, L. 2003. Técnicas histoquímicas convencionais e de microscopia de
16 fluorescência aplicadas em espécies do cerrado. Instituto de biologia,
17 Departamento de botânica, Universidade estadual paulista, SP
- 18 ASCENSÃO, L.; FIGUEIREDO, A. C. S. F.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.
19 2005. *Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos*. Centro de
20 Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências/Universidade de Lisboa.
- 21 BARROSO, G. M.; MAGUIRE, B. 1973. A review of the genus *Wunderlichia* (Mutisiae,
22 Compositae). *Revista Brasileira de Biologia*, 33: 379-406.
- 23 BAKER, JG. 1873. Compositae I Vernoniaceae. In: Martius, C.F.P. von; Eichler, A. W.
24 & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig. Vol. 6, N. 2, Pp.1-179.
- 25 BAKER, JG. 1876. Compositae II Eupatoriaceae. In: Martius, C.F.P. von; Eichler, A. W.
26 & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig. Vol.6, N. 2, Pp. 181-374.
- 27 BAKER, JG. 1882. Compositae III Asteroideae, Inuloideae. In: Martius, C.F.P. von;
28 Eichler, A. W. & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig. Vol. 6, N.
29 3, Pp. 138-270.

- 1 BAKER, J.G. 1884. Compositae IV. Helianthoideae-Mutisiaceae. In: Martius, C.F.P. von;
2 Eichler, A. W. & Urban, I. Flora brasiliensis. Munchen, Wien, Leipzig. Vol. 6, N.
3 3, Pp.138-298.
- 4 Barroso, G.M. (1976). Compositae-subtribo Baccharidinae Houffmann-estudos das
5 espécies ocorrentes no Brasil. Rodriguésia XXVIII 40:3-273.
- 6 Bentham, G. (1873). Compositae. In: genera Plantarum. (G. Bentham & J.D. Hooker,
7 eds), V.2, London: L. Reeve & C.O., p. 163-533.
- 8 Bieras, A.C.; Sajo, M.G. 2009. Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody
9 plants. Trees, 23: 451-471.
- 10 Bohlmann, F.; Zdero, Ch.; Robinsons, H.; King, R.M. 1981. Modified eudesmanolides
11 and other sesquiterpene lactones from Wunderlichia mirabilis and Actinoseris
12 polymorpha Phytochemistry 20(7): 1631-1634.
- 13 BOHLMANN, F., LUDWIG, G.W., JAKUPOVIC, J., KING, R.M., ROBINSON, H.
14 1984. New spirosesquiterpenelactones, germacranolides, and eudesmanolides
15 from Wunderlichia mirabilis. Liebigs Annalen der Chemie 2, 228–239.
- 16 BREITMAIER, E.; VOELTER, W. 1987. Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-
17 Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry. 3o
18 ed. VCH, Weinheim.
- 19 Bremer, K. 1987. Tribal interrelationships of the Asteraceae. Cladistics 3: 210-253.
- 20 Bremer, K. & Jansen, R.K. 1992. A new subfamily of the Asteraceae. Annals of the
21 Missouri Botanical Garden 79: 414-415.
- 22 BREMER, K. 1994. Asteraceae- Cladistic & Classification. Portland: Timber press.
23 792p.
- 24 BREMER, K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. Pp.1-7. In: Hind, D.J.N.,
25 Beentje, H.J. (Eds.). Compositae: Systematics. Proceedings of the International
26 Compositae, Conference, vol. 1. Kew: Royal Botanic Gardens.
- 27 BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; VANDERLEYDEN, J.
28 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. FEMS
29 Microbiology Letters, v. 69, p. 55-60.

- 1 CABRERA, A. L. 1977. Mutisieae-Systematic review. Pp.1039-1066. In: Heywood,
2 V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (Eds.). The Biology and Chemistry of the
3 Compositae, vol. 2. London: Academic Press.
- 4 CABRERA, A.L. & RAGONESE, A.M. 1978. Revisión del género *Pterocaulon*
5 (Compositae). *Darwiniana* 21(2-4): 185-257.
- 6 Carlquist, S. (1959). The leaf of *Calycadenia* and its glandular appendages. *Amer. J. Bot.*
7 46: 70-80.
- 8 CASTRO, M. de M. 1987. Estruturas secretoras em folhas de espécies da família
9 Asteraceae: aspectos estruturais e histoquímicos. Tese de doutorado,
10 Universidade de São Paulo, SP.
- 11 CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2007. A célula. 2ª Ed. Barueri, SP.
- 12 CASTRO, M. M., LEITÃO-FILHO, H. F. & MONTEIRO, W. R. 1997. Utilização de
13 estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação
14 de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 20, 163-174.
- 15 CRONQUIST, A. 1977. The Compositae revisited. *Brittonia* 29: 137-153.
- 16 CRONQUIST, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New
17 York: Columbia University Press. 1262p.
- 18 CRONQUIST, A. 1988. An integrated system of classification of flowering plants. New
19 York: Columbia University Press, 1262p.
- 20 COUTINHO, R. R. 2007. Ecoturismo versus Extração de Granito: O Caso do Maciço do
21 Itaoca. *Pluridoc*.
- 22 Cutter, E. G. (1978). *Plant anatomy. Part I. Cells and tissues*. London: Edward Arnold.
23 315p.
- 24 Cutter, E. G., 1986. *Anatomia vegetal Parte I – Células e tecidos*. 2th edn. Roca, São
25 Paulo, Brazil.
- 26 DARLING, M.S. 1989. Epidermis and hypodermis of the Saguaro cactus (*Cereus*
27 *giganteus*): anatomy and spectral properties. *Amer. J. Bot.* 76: 1698-1706.
- 28 DE CANDOLE, A. P. 1836. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* vol 5, Paris:
29 Treuttel & Würtz. 692p.

- 1 Dickison, W. C., 2000. Integrative plant anatomy. San Diego. Harcourt Academic Press.
2 533p.
- 3 Ehleringer, J. R. 1983. Characterization of a glabrate *Encelia farinosa* mutant:
4 morphology, ecophysiology, and field observations *Oecologia*, 57: 303 – 310.
- 5 Ehleringer, J. R.; Mooney H.A. 1978. Leaf Hairs: Effects on Physiological Activity and
6 Adaptive value to a Desert Shrub. *Oecologia*, 37: 183-200.
- 7 Esau, K. 1977. Anatomy of the seed plants. John Wiley & Sons Inc., New York.
- 8 ESGARIO, C. P., RIBEIRO, L. F., & SILVA, A. G. (2008). O Alto Misterioso e a
9 vegetação sobre rochas em meio à Mata Atlântica, no Sudeste do Brasil. *Natureza on*
10 *line*, 6(2), 55-62.
- 11 ESAÚ, K. 1976. Anatomia vegetal. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 3ª. Ed.
- 12 FAINI, F. A.; CASTILLO, M. Y.; TORRES, M. R. Flavonoids of *Baccharis incarum*. J.
13 *Nat. Prod.*, v. 45, n. 4, p. 501-502, 1982.
- 14 Fahn, A. 1986. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves.
15 *Ann. Bot.* 57,631-637.
- 16 Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New phytol.* 108: 229-257
- 17 Fahn, A. & Cutler, D. (1992). *Xerophytes*. Berlin: Bruder Bomtraeger. 176 p.
- 18 FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.
- 19 FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108:229-25
- 20 FERES, F., ZUCCHI, M. I., DE SOUZA, A. P., AMARAL, M., & BITTRICH, V. (2009).
21 Phylogeographic studies of Brazilian " campo-rupestre" species: *Wunderlichia*
22 *mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas*, 22(1), 17-26
- 23 FERREIRA, N. N., FERREIRA, E. P., & DE SOUZA CARVALHO, I. (2013). Registro
24 de Cutículas com Estômatos em Associação Palinológica da Formação Itapecuru
25 (Albiano), Bacia do Parnaíba, Brasil. *Anuário do Instituto de Geociências*, 36(2),
26 16-24.
- 27 Franceschi, V.R.; Nakata, P.A. 2005. Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function.
28 *Annual review of Plants Biology*, 56: 41-71.

- 1 FRANKE, C. R.; ROCHA, P. L. B.; KLEIN, W.; GOMES, S. L. 2005. Mata Atlântica e
2 Biodiversidade. Ed. UFBA, Salvador.
- 3 FRIEBOLIN, H., (1993) Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. 2ed.
4 VCH, Weinheim.
- 5 Gibson, A.C. & Horak, K. E. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican cacti.
6 Ann. Missouri Bot. Gard. 65: 999-1057.
- 7 Gonçalves, L. A.; Brabosa, L. C. A.; Azevedo, A. A.; Casali, V. W. D.; Nascimento, E.
8 A. 2003. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum*
9 *selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. Revista brasileira de
10 Plantas Mediciniais. 6: 8-14.
- 11 GOTTLIEB, O. R.; BRAZ-FILHO, R.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; (1967)
12 de. Introducción a la Espectrometria de Masa de Sustancias Organicas. Secretaria
13 General de la Organización de los Estados Americanos - Programa Regional de
14 Desarrollo Cientifico y Tecnológico, Washington - D.C.
- 15 Gunning, B.E.S., Steer, M.W., 1996. Plant Cell Biology : structure and function. USA,
16 Jones and Bartlett Publishers. 134p.
- 17 Haberlandt, G. 1914. Physiological plant anatomy. Macmillan, London.
- 18 Handro, W., Campos, J.F.B.M., Oliveira, Z.M. 1970. Sobre a anatomia foliar de algumas
19 Compostas dos Campos Rupestres. Cienc. Cult. 22, 107-126.
- 20 HENRIQUES A.T., LOPES S.O., PARANHOS J.T., GREGIANINI T.S., VON POSER
21 G.L., FETT-NETO A.G. & SCHRIPEMA J.N. 2004. β -D-Glucopyranosyl
22 vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria*
23 *leiocarpa*. Phytochemistry 65: 449-454.
- 24 Heredia, A., Casado, C.G., Laguna, L., reina, J.J., Serrano, J.M., dominguez, E. 1998. La
25 cutícula vegetal : estructura y funciones. Ecologia 12, 293-305.
- 26 HIND, D. J. N. & SEMIR, J. 1998. Typification of *Wunderlichia* (Compositae-Mutiseae).
27 Kew Bulletin 53: 1011-1012.
- 28 HOFFMANN, O. 1890. Compositae. In: Engler, A. & Prantl. K. Die Natürlichen
29 Pflanzenfamilien. Verlag von Wilhelm Engelmann 4 (5): 87-391.

- 1 Holmes, M.G., Keiller, D.R., 2002. Effects of pubescence and waxes on the reflectance
2 of leaves in the ultraviolet and photosynthetic wavebands: a comparison of a
3 range of species. *Plant Cell Environ* 25: 85-93.
- 4 HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E. F & VIEIRA, P. C. 2003. Princípios ativos de
5 plantas superiores. EDUFSCAR. São Paulo.
- 6 JANSEN M.A.K., GABA V., GREENBERG B.M. 1998. Higher plants and UV-B
7 radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Science*, 3: 131-
8 135.
- 9 JEFFREY, C. 1967. Notes on Compositae II. The Mutisieae in east tropical Africa. *Kew*
10 *Bulletin* 21: 177-223.
- 11 Johnson, H. B. (1975). Plant pubescence: an ecological perspective. *Bot. Ver.* 41: 233-
12 258.
- 13 Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. (1999). *Plant Systematics: a*
14 *phylogenetic approach*. Sunderland – Massachusetts: Sinauer Associates, 464p.
- 15 JEFFREY, C. J. 1978. Compositae. Pp. 263-268. In: *Flowering plants of the World*.
16 Heywood, V.H. (Ed.). New York: Mayflower Books.
- 17 KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. 1997. *Manual básico em morfologia vegetal*, editora
18 Universidade Rural (EDUR), Seropédica, RJ
- 19 LAMBERT, J. B.; SHYRVELL H. F.; LIGHTNER, D.; COOKS, R. G. 1987.
20 *Introduction to Organic Spectroscopy*. Macmillan Publishing Company, New
21 York.
- 22 Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RIMA, São Carlos.
- 23 Larcher, W. 2006. *Ecofisiologia vegetal*. São Paulo, RIMA, 550p.
- 24 LAURENCE, M. P.; MOTTE-FLORAC; MCKEY, D. B. 2000. Secretory structures on
25 the leaf rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): Implications
26 for the evolution of nectary glands. *American Journal of Botany.*, 87: 327-338.
- 27 Lersten, N.R., Honer, H.T. 2008. Crystals macropatterns in leaves of Fagaceae and
28 Nothofagaceae: a comparative study. *Plant Syst. Evol.* 271,239-253.
- 29 LESSING, C. F. 1832. *Synopsis Generum Compositarum*. Berlin: Duncker & Humboldt.
30 473p.

- 1 Levin, D. A. (1976). The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Ann.*
2 *Rev. Ecol. Syst.* 7: 121-159.
- 3 LOURENS, A. C. U., VILJOEN, A. M. & VAN HEERDEN, F. R. 2008. South African
4 *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and
5 phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 630-652.
- 6 LÜTTGE, U. 1971. Structure and function of plant glands. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 22:23-
7 44.
- 8 Machado, S.R.; Oliveira, M.D.; Dip, M.R. 2004. Morfoanatomia do sistema subterrâneo
9 de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae). *Revista*
10 *Brasileira de Botânica* 27: 115-123.
- 11 MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin
12 precursor in roots of cotton seedlings. *Phytopathology*, v. 64, p. 1297-1302, 1974.
- 13 Mauseth, J.D. 1988. *Plant anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.,
14 Menlo Park, California, 560p.
- 15 Macnish, A., Dirving, D., Joyce, D., Vithanage, V., Wearing, A., Webb, R., Frost, R.L.
16 2003. Identification of intracellular calcium oxalate crystals in *Chamelaucium*
17 *uncinatum* (Myrtaceae). *Aust. J. Bot.* 51, 565-572.
- 18 Magenta, M.A.G. 2006. *Vigueira Kunth (asteraceae, heliantheae) na América do Sul e*
19 *Sistemática das Espécies do Brasil*. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade
20 de São Paulo.
- 21 MARASCHIN, M. & VERPOORTE, R. 2001. Engenharia do Metabolismo Secundário.
22 *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 14: 24 – 28.
- 23 MAUAD, L. P. 2010. Levantamento Florístico de um Remanescente Florestal de Mata
24 Atlântica no Maciço Do Itaoca, Campos Dos Goytacazes, RJ. Monografia
25 (Graduação em Ciências Biológicas). Campos dos Goytacazes, RJ. Universidade
26 Estadual do Norte Fluminense.
- 27 MAUAD, L. P., DE SOUZA BUTURI, F. O., DE SOUZA, T. P., NASCIMENTO, M.
28 T., & BRAGA, J. M. A. (2014). New distribution record and implications for
29 conservation of the endangered *Wunderlichia azulensis* Maguire & GM Barroso
30 (Asteraceae: Wunderlichieae). *Check List*, 10(3), 706-708.

- 1 Medri, M.E., Lleras, E. 1980. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea*
2 *brasiliensis* Muell. Arg. *Acta Amazônica* 10, 463-493.
- 3 METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem and*
4 *wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Vols. I, II. Clarendon*
5 *Press, Oxford.*
- 6 Medina, E.; Francisco, M. 1994. Photosynthesis and water relations of savanna tree
7 species differing in leaf phenology. *Tree Physiology*, 14: 1367-1381.
- 8 MONDIN, C.A. 2006. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas
9 brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia,
10 fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. 1ed. Conferências Plenárias e
11 Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre: Pallotti.
- 12 Morretes, B. L. 1958. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do
13 cerrado. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de*
14 *São Paulo*, 15: 7-70.
- 15 Munhos, C. B. R.; Felfili, J. M. reproductive phenology of na herbaceous-subshrub layer
16 of a Savannah (Campo sujo) in the Cerrado Biosphere Reserve I, Brazil. *Brazilian*
17 *Journal of Biology*, são Carlos, v. 67, p. 299-307,2007.
- 18 NAKANISHI, K. (editor).1990. *One-dimensional and Two-dimensional NMR*
19 *Spectroscopy by Modern Pulse Techniques, University Science Books,*
20 *California.*
- 21 NAKAJIMA, JN. 2000. A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra,
22 Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de
23 Campinas.São Paulo. 467p.
- 24 NUÑEZ, C. V. 2000. Terpenos de *Wunderlichia crulsiana* e *Mikania* sp. nov. Tese de
25 doutorado. (doutorado em ciências químicas) Instituto de química da
26 Universidade de São Paulo – SP, Brasil.
- 27 NUÑEZ, C. V., ZACHEU, F. M., PINTO, E., ROQUE, N. F., COLEPICCOLO, P., &
28 BRIGAGÃO, M. R. P. L. 2003. Sesquiterpene lactone from *Wunderlichia*
29 *crulsiana* inhibits the respiratory burst of leukocytes triggered by distinct
30 biochemical pathways. *Life sciences*, 73(17), 2161-2169

- 1 ORTIZ, S, BONIFACINO, M, CRISCI, J, FUNK, V, HIND, N, HANSEN, HV,
2 KATINAS, L, SANCHO, G, ROQUE, N, SUSANNA, A & TELLERIA, M. 2009,
3 'The basal grade of Compositae: Mutisieae (sensu Cabrera) and Carduoideae'.
4 in Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae. IAPT, Vienna,
5 Washington, pp. 193-213.
- 6 O'DOWD, D.J. & CATCHPOLE, E.A. 1983. Ants and extrafloral nectaries: no evidence
7 for plant protection in *Helichrysum* spp. - ant interactions. *Oecologia* 59:191-200.
8
- 9 PAGNI, A. M., ORLANDO, R., MASINI, A. & CICCARELLI, D. (2003). Secretary
10 structures of *Santolina ligustica* Arrigoni (Asteraceae), an Italian endemic species.
11 *Israel Journal of Plant Sciences*, 51, 185-192.
- 12 PANERO, J.L. & FUNK, V. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for
13 the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of*
14 *Washington* 115(4): 909-922.
- 15 PANERO, J.L. & FUNK, V.A. 2008. The value of sampling anomalous taxa in
16 phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular*
17 *Phylogenetics and Evolution* 47: 757–782.
- 18 PARMENTIER, I. 2003. Study of the vegetation composition in three inselbergs from
19 continental equatorial Guinea (western Central Africa): effects of site, soil
- 20 PEREIRA, R.C.A. 1989. A tribo Heliantheae Cassini (Asteraceae) no estado de
21 PernambucoBrasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de
22 Pernambuco, Recife. 306p.
- 23 Parkhurst, D.F. 1978. The adaptative significance of stomatal occurrence on one or both
24 surfaces of leaves. *J Ecol* 6, 367-383.
- 25 Perin, A. (1971). Présence de “cellules de transfert” au sein de l' épithème de quelques
26 hydathodes. *Z. Pflanzephiol.* 65: 39-51.
- 27 Picman, A. K. Elliott, R. H. & Towers, G. H. (1978). Insect feeding deterrent property of
28 alantolactone. *Biochem. Syst. Ecol.* 6: 333 – 335.
- 29 PIHLAJA, K.; KLEINPETER, E. 1994. Carbon-13 NMR Chemical Shifts in Structural
30 and Stereochemical Analysis. VCH, Weinheim

- 1 Pyykko, M. 1966. The leaf anatomy of East patagonian erophytic plants. *Annales*
2 *Botanici Fennici* 3 : 453-622.
- 3 Rasmussen, H. 1987. Orchid stomata – structure, differentiation, function, and
4 phylogeny. In: Arditti, J. (Ed.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*,
5 IV. Cornell University Press, New York, p. 105 – 138.
- 6 ROBBERS J.E., SPEEDIE M.K. & TYLER V.E. 1997. *Farmacognosia-Biotecnologia*.
7 Editorial Premier, São Paulo, 205.
- 8 ROQUE, N. & PIRANI, J.R. 1997. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais:
9 Compositae Barnadesieae e Mutisieae. *Boletim de Botânica da Universidade de*
10 *São Paulo* 16: 151-185.
- 11 Roshchina, V. V. & Roshchina V. D., 1993. The excretory function of higher plants.
12 Springer-Verlag, berlin, Germany.
- 13 SANDERS, J. K. M.; HUNTER, B. K. 1993. *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for*
14 *Chemists*. 2 ed. Oxford University Press, Oxford.
- 15 SAJO, M. G. & MENEZES, N. L. 1994. Considerações sobre a anatomia foliar de
16 *Vernonia Scrob* (compositae) da Serra do Cipó. *MG. Naturalia* 19:173-183.
- 17 Salatino, A., Montenegro, G. & Salatino, M. L. F. (1986). *Microscopia eletrônica de*
18 *varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado*. *Ver. Bras. De*
19 *Bot.* 9 : 117-124.
- 20 SCHNEPF, E. 1974. Gland cells. In *Dynamic aspects of plant ultrastructure* (A.W.
21 Robards, ed.). McGraw-Hill Book Co. Ltd., Maidenhead, p.331-357
- 22 Schreiber, Lukas., 2005. Polar paths of diffusion across Plant Cuticles: New Evidence for
23 an Old Hypothesis. *Annals of Botany* 95: 1069-1073.
- 24 Schonherr, J., Riederer, M., 1989. Foliar Penetration and accumulation of Organic
25 Chemicals in Plant Cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and*
26 *Toxicology* 108 : 1-70
- 27 Shields, L.M. 1950. Leaf xeromorphy as related to physiological and structural
28 influences. *Bot. Rev.* 16, 399-447.
- 29 SIZDAK, G. 1996. *Mass Spectrometry for Biotechnology*. Academic Press, New York.

- 1 Smiljanic, K.B.A. 2005. Anatomia foliar de espécies de Asteraceae de uma floramento
2 rochoso no Parque estadual da Serra do Brigadeiro (MG). Dissertação de
3 Mestrado. Universidade de Vçosa, Viçosa, Brasil, 79p.
- 4 Silva, B. A. O. 1999. Mosaicos Nutricionais na Interrelação Vegetação/Solos/Termiteiros
5 em um Ecossistema de Restinga – Formação Aberta de Ericácea, RJ. Tese de
6 Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- 7 Solereder, H. 1908. Systematic anatomy of the Dicotyledons. A handbook for laboratories
8 of pure and applied Botany. Trans. By L.A. Boodle & F.G. Fritsch. Vols. I, II.
9 Clarendon Press, Oxford.
- 10 SOUZA-BUTURI, F.O. 2013b. Taxonomia, palinologia e anatomia de Wunderlichia,
11 Asteraceae. PhD. Thesis. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 156 pp.
- 12 STANGARLIN, J. R. ; KUHN, O J ; TOLEDO, M. V. ; PORTZ, R
13 L ; SCHWANESTRADA, K R F ; PASCHOLATI, S F . 2011. A defesa vegetal
14 contra fitopatógenos. Scientia Agraria Paranaensis, v. 10, p. 18-46.
- 15 UPHOF, J.C. 1962. Plant hairs. Handbuch der Pflanzenanatomie. Berlin: Gebrüder
16 Borntraeger. Band IV (5).
- 17 Valkama, E.; Koricheva, J.; Salminen, J. P.; Helander, M.; Saloniemi, I.; Saikkonen, K.;
18 Pihlaja, K. 2005. Leaf surface traits: overlooked determinants of birch resistance
19 to herbivores and foliar micro-fungi? Trees, 19: 191-197.
- 20 VENABLE, D.L. & LEVIN. D.A. 1983. Morphological dispersal structures in relation to
21 growth habit in the Compositae. Plant Systematic Evolution 143:1-16.
- 22 VERTREES, G.L. & MAHLBERG, P.G. 1978. Structure and ontogeny of laticifers in
23 Cichorium intybus (Compositae). Am. J. Bot. 65:764-771.
- 24 Vilhalva, D. A.A. & apezzato-Da-Glória, B. 2006. Morfo-anatomia do sistema
25 subterrâneo de Calea verticillata (Klatt) Pruski e Isostigma megapotamicum
26 (spreng.) Sherff – asteraceae. Revista Brasileira de Botânica 29: 39-47.
- 27 VITTO, L. A. & PETENATTI, E. M. 2009. Asteráceae de importancia económica y
28 ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia
29 ecológica y plantas de interés industrial. Multequina, 18, 87-115.

1 Woodman, R.L.; fernandes, G. W. 1991. Diferential mechanical defense: herbivory,
2 evapotranspiration, and leaf-hairs. OIKOS, 60: 11 – 19.

3 YANG, C. & YE, Z. 2012. Trichomes as models for studying plant cell differentiation.
4 Cellular and Molecular Life Sciences, 1-12.

5

6

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

CAPÍTULO 2

Estudos químicos e biológicos

Parte desses dados foi submetido a revista *Journal of Natural Products*,
intitulado: The antifungal and antiparasitic activity of the dichloromethane roots from
Wunderlichia azulesis Maguire & G. M. Barroso (Asteraceae).

1	Sumário	
2		
3		
4	Lista de figuras	
5		
6	Imagem 1. Substâncias identificadas em <i>W. mirabilis</i> .	61
7	Imagem 2. Substâncias identificadas em <i>W. crulsiana</i> .	62
8	Imagem 3. Substâncias identificadas em <i>W. crulsiana</i> .	63-65
9		
10	Lista de fluxograma	
11		
12	Fluxograma 1: Partição do EBM do caule, raiz e folha de <i>W. azulensis</i> .	70
13		
14	Lista de tabela	
15		
16	Tabela 1. Peso das amostras secas	67
17	Tabela 2: Massa dos extratos brutos metanólicos de <i>W. azulensis</i>	70
18	Tabela 3: Massa dos extratos obtidos da partição do EBM do caule, raiz e folha de	
19	<i>W. azulensis</i>	71
20	Tabela 4: Estudo cromatográfico das frações obtidas da fração WRD	74
21	Tabela5: Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha C2H2	76
22		
23	Lista de gráficos	
24		
25	Gráfico 1: Efeito citotóxico dos extratos particionados	75
26	Gráfico 2: Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha diclorometano	
27	frente às leveduras de <i>C. tropicalis</i> . DMSO e meio de cultura foram utilizados como controle	
28		77
29	Gráfico 3: Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha diclorometano	
30	frente às leveduras de <i>C. buinensis</i> . DMSO e meio de cultura foram utilizados como controle.	
31		78
32		
33	Lista de abreviatura	
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		
43		
44		
45		

1. Introdução

Os processos metabólicos podem ser divididos em dois conjuntos, primário e o secundário (Duarte, 2012). Metabolismo primário corresponde a um conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial, como por exemplo, a fotossíntese, respiração e o transporte de solutos, possuindo distribuição universal nas plantas, como os aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e a clorofila (Lenhinger *et al.*, 2002).

O metabolismo secundário origina compostos que não são considerados essenciais, porém garantem vantagem para a sobrevivência da planta (Simões *et al.*, 2004). Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto, sua produção é associada à defesa da planta contra herbivoria, ataque de patógenos, radiação solar (Montanari Jr., 2002), ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes, micro-organismos simbiontes (Peres, 2008) e na alelopatia (Santos, 2002). A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada por diversos fatores ambientais, por representarem uma interface química entre as plantas e o meio ambiente (Kutchan, 2001).

As espécies da família Asteraceae, em sua maioria, são grandes produtoras de metabólitos secundários como flavonóides, terpenóides, alcalóides, acetofenonas, floroglucinol, pironas, triterpenóides e sesquiterpenos, substâncias estas envolvidas em diversas formas de proteção química da planta (Lourens *et al.*, 2008; Pagni *et al.*, 2003). E têm sido amplamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas (Zomlefer, 1994). No gênero *Baccharis* as substâncias mais estudadas são os flavonóides e os terpenóides. Quanto às atividades biológicas destacam-se os efeitos alelopáticos, citotóxicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (Faini *et al.*, 1982; Jarvis *et al.*, 1991).

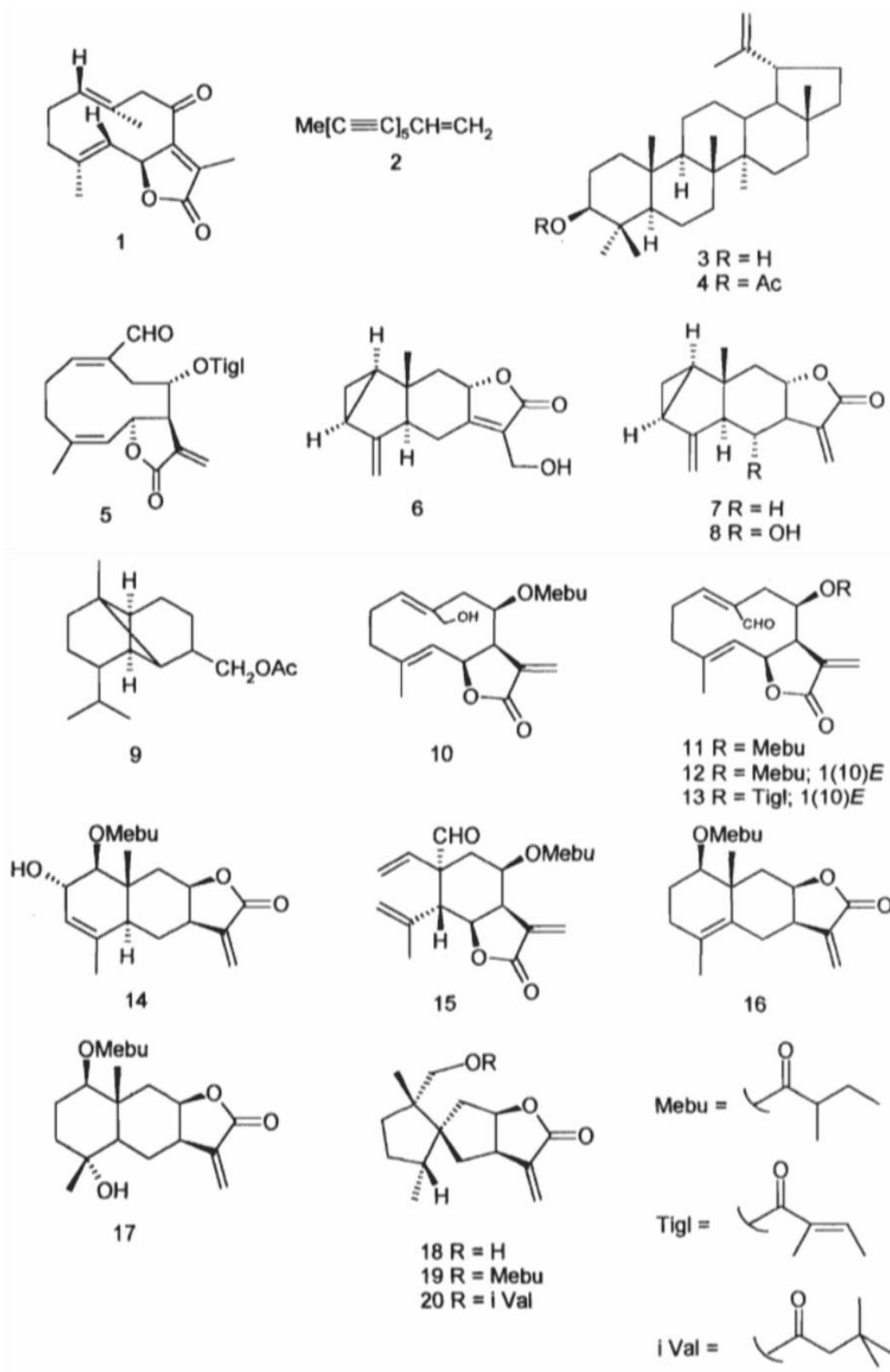
Estes metabólitos especiais podem ser explorados e utilizados pelo homem como inseticidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas além de diversas outras funções (Souza Filho & Alves, 2002). O reino vegetal representa desta forma, um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas (Hostettmann *et al.*, 2003).

1 Já para as plantas, apresentam funções importantes no seu organismo, estando
2 envolvidos na defesa das plantas através de citotoxicidade para patógenos microbianos,
3 além de desempenhar papéis vitais como mediadores de interações ecológicas, refletindo
4 diretamente na sobrevivência do organismo (Maraschin & Verpoorte, 2001). Estas
5 substâncias são produzidas pelas plantas e são estocadas em seus diversos órgãos: folhas,
6 caules, frutos, flores, raízes etc. Cada diferente metabólito especial tem sua distribuição
7 relativamente restrita na natureza, sendo em alguns casos limitados a espécies ou famílias.
8 Por este motivo, podem ser utilizados algumas vezes para caracterizar determinadas
9 famílias de plantas (Robbers *et al.*, 1997).

10 A existência e as funções dos metabólitos secundários podem variar desde defesa
11 contra animais e insetos, invasão de microrganismos e vírus, a produtos da detoxificação
12 de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário. Podem atuar como uma fonte
13 de reserva de nitrogênio, atuar como hormônios reguladores de crescimento, auxiliar na
14 manutenção do equilíbrio iônico devido ao seu caráter alcalino e atuar na defesa contra
15 radiação UV (Jansen *et al.*, 1998; Aniszewski *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2004).

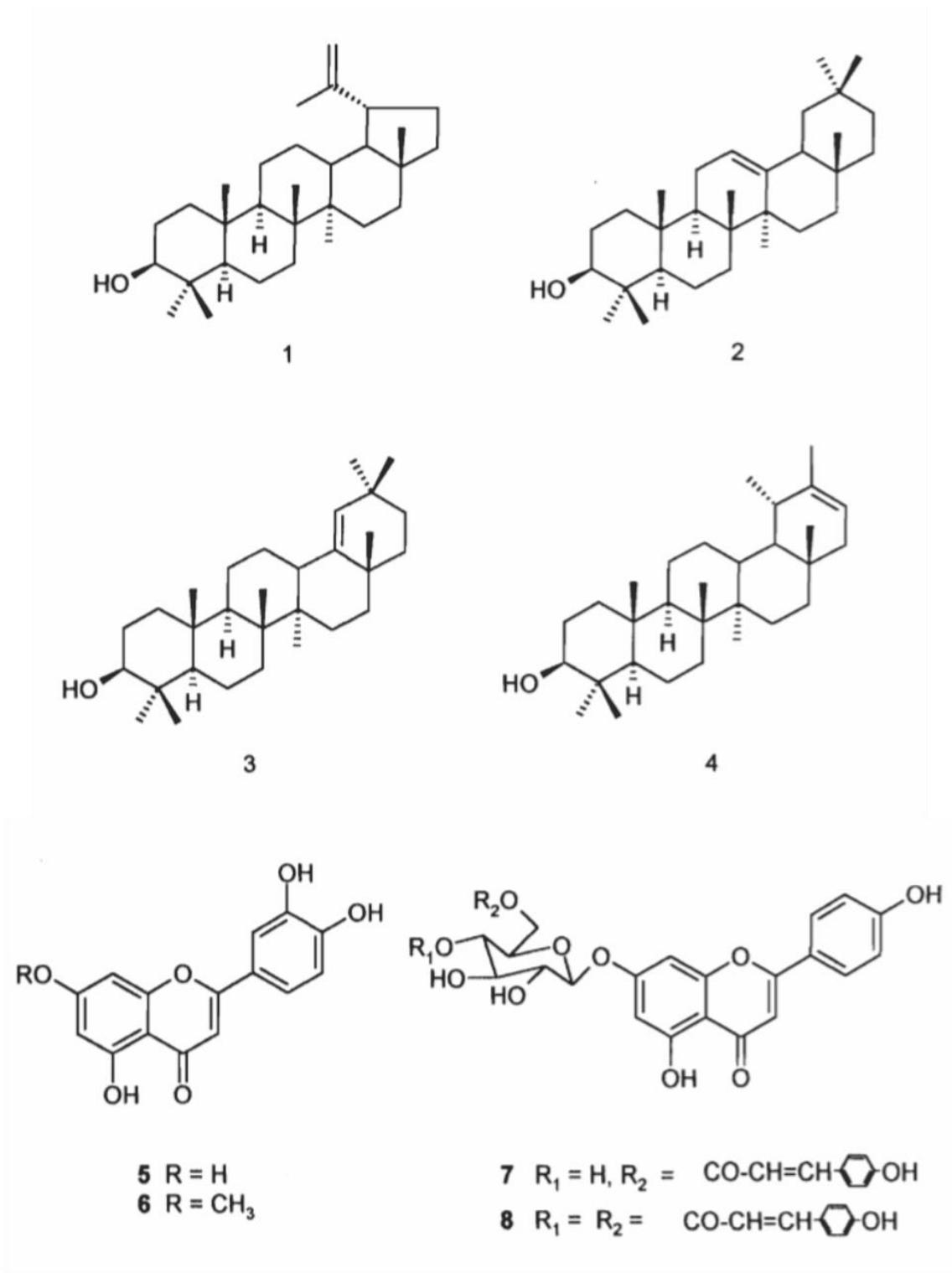
16 Dentro do gênero *Wunderlichia*, as espécies *W. mirabilis* e *W. crulsiana* são
17 quimicamente descritas. Com relação aos constituintes químicos são encontrados lactonas
18 sesquiterpênicas, triterpenos e poliacetileno para *W. mirabilis* (fig. 1) (Bohlmann *et al.*,
19 1981, 1984) e flavonóides, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas e sesquiterpeno para *W.*
20 *crulsiana* (fig. 2 e 3) (Nuñez *et al.*, 2003; Andre & Dias, 1999). Nuñez e colaboradores
21 (2003) relatam que as lactonas sesquiterpênicas possuem boa atividade anti-inflamatória.
22 Entretanto, as demais espécies deste gênero não possuem descrição anatômica e nem de
23 sua composição química, o que ressalta a importância destes estudos para o gênero.

24



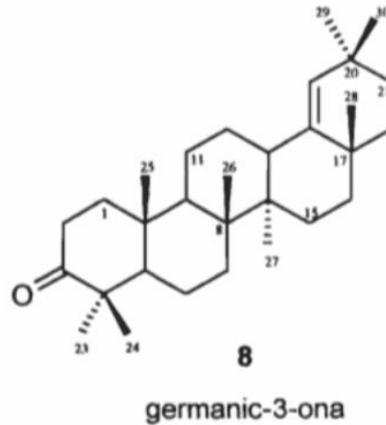
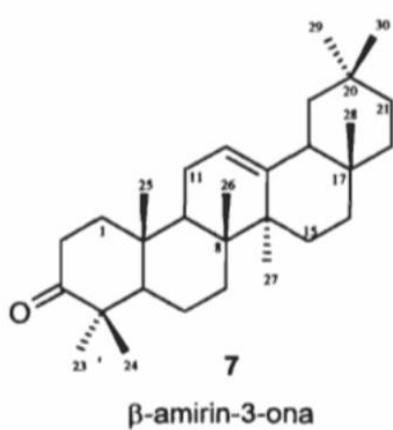
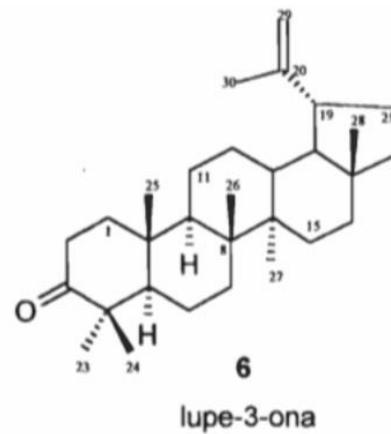
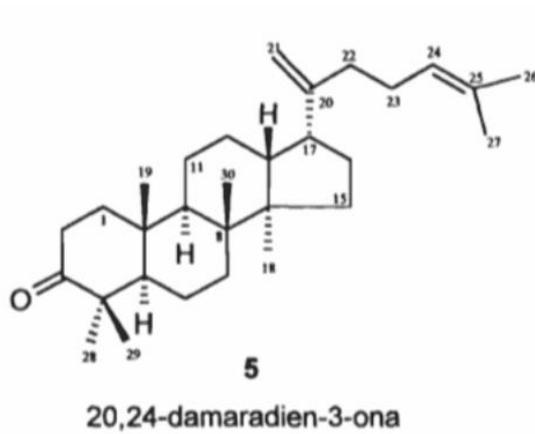
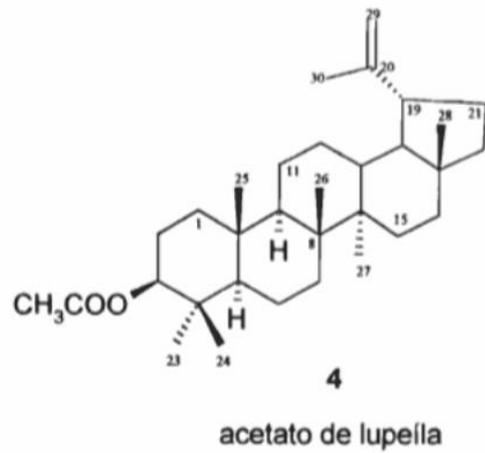
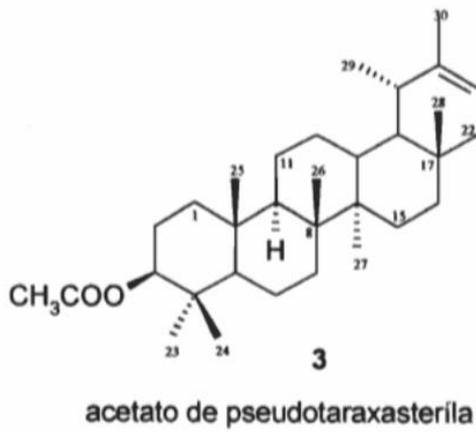
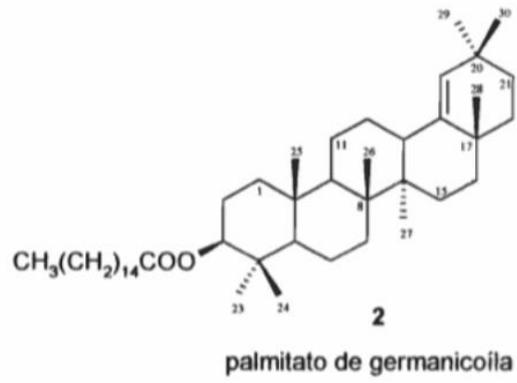
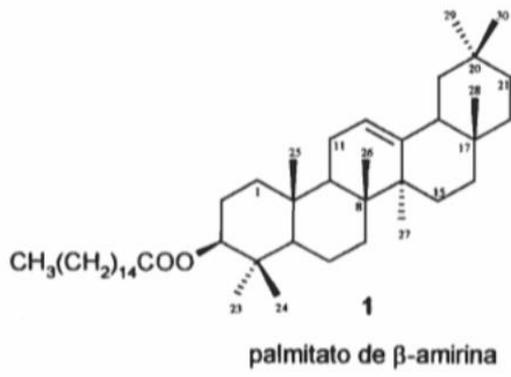
1

2 Imagem 1. Substâncias identificadas em *W. mirabilis*. (Fonte: Bolhmann *et al*, 1984).



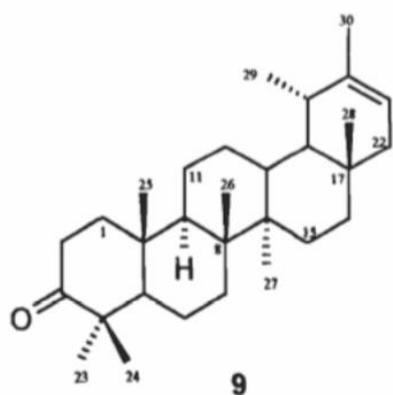
1

2 Imagem 2. Substâncias identificadas em *W. crulsiana*. (Fonte: Andre & Dias, 1999).

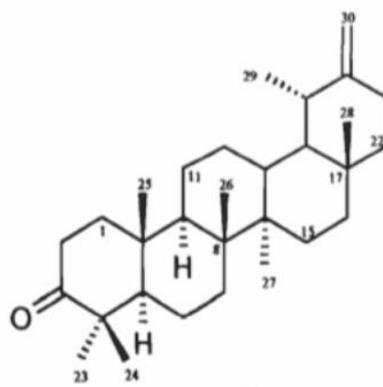


1

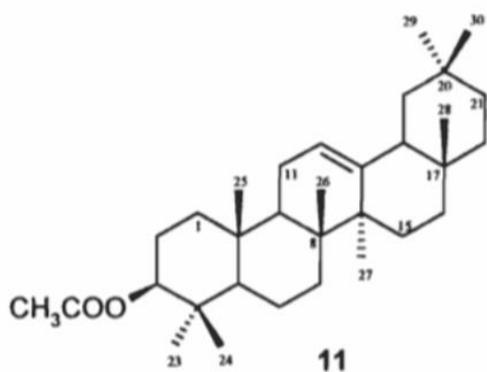
2



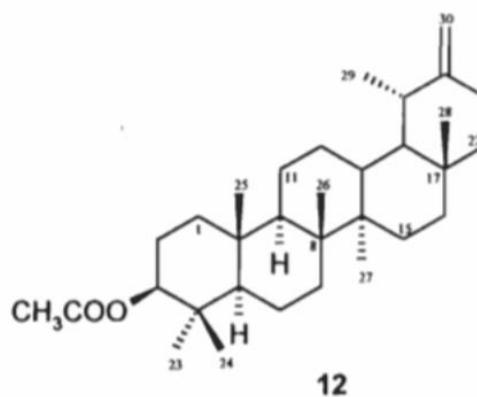
9
pseudotaraxaster-3-ona



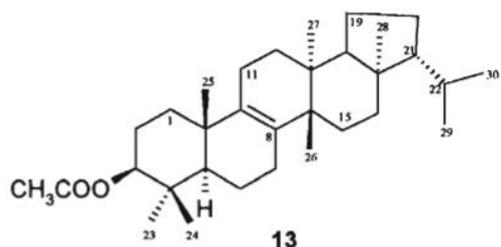
10
taraxaster-3-ona



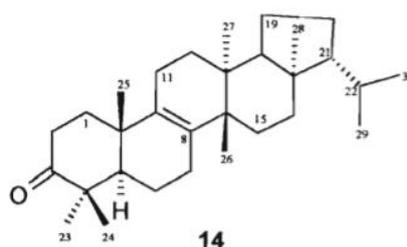
11
acetato de β -amirina



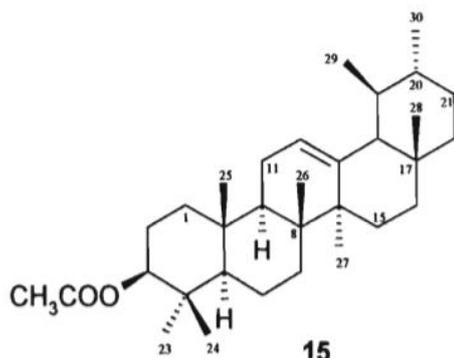
12
acetato de taraxasterila



13
acetato de isomotila



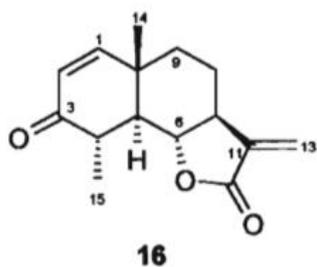
14
isomotiona



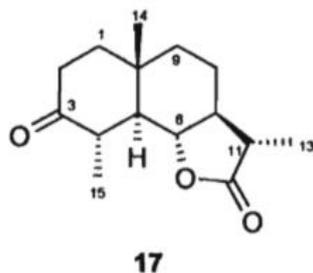
15
acetato de α -amirina

1

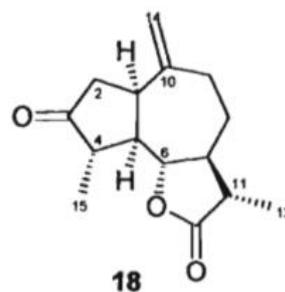
2



16
tubiferina

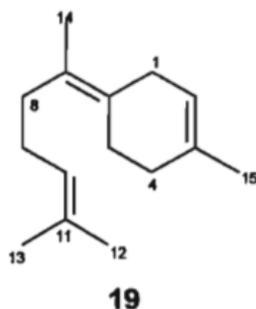


17
cadabicolona



18
4β(15), 11α(13)-tetrahydro-
3-desidrozaluzanina C

1



19
2,6,10-bisabolatrieno

2

3 Imagem 3. Substâncias identificadas em *W. crulsiana*. 1 - 15 Triterpenos, 16 – 18
4 Lactonas sesquiterpênicas e 19 sesquiterpeno (Fonte: Nuñez, 2000).

5 Nas últimas décadas os antimicrobianos de origem vegetal têm recebido uma
6 atenção especial, devido à resistência aos antibióticos tradicionais desenvolvida por
7 alguns micro-organismos e parasitas (Santos, T. G. *et al.*, 2012; M. Torrent, *et al.*, 2012).
8 Diversas espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* podem apresentar algum
9 tipo de patogenicidade aos humanos, por exemplo, infecções como a candidíase,
10 meningite, dentre outras (Alexopoulos, C. J. *et al.*, 1996). *Trypanosoma cruzi* é o agente
11 causador da doença de Chagas, que afeta cerca de 25 milhões de pessoas que vivem em
12 áreas de risco e cerca de 10 milhões de pessoas estão atualmente infectadas com o T.
13 cruzi, resultando em mais de 15.000 mortes e 50.000 novos casos a cada ano (Rassi, A.
14 J. R., *et al.*, 2012).

15 O câncer é uma doença que atinge uma porcentagem considerável da população
16 mundial, principalmente nos países desenvolvido. Por esta razão, diversos bioensaios
17 também vem sendo desenvolvidos para encontrar substancias ativas (Bohlmann *et al.*,
18 1981, 1984). Protozoários e leveduras são agentes causadores de diversas doenças com

1 riscos variáveis a saúde humana. Se por um lado infecções podem se manter
2 assintomáticas, outras podem causar sérios danos a saúde ou até a morte se não forem
3 tratadas. No entanto, uma crescente dificuldade no tratamento dessas infecções tem sido
4 observada seja pelos graves efeitos colaterais ou pela resistência desses micro-organismos
5 aos quimioterápicos utilizados atualmente (DONDORP et al. 2009; ALBERNAZ et al.
6 2010; TORRENT et al. 2012; PAPPAS 2011).

7 As espécies do gênero *Wunderlichia* apresentam uma variedade de atividades
8 biológicas que lhes conferem uma importância no que se refere à procura de compostos
9 bioativos (Nuñez et al., 2003; Bohlmann et al., 1981; Bohlmann et al 1984). No entanto,
10 pouco se sabe sobre a atividade biológica dos extratos deste gênero. Neste sentido,
11 *Trypanossoma. Cruzi*, *Candida buinensis* e *C. tropicalis* foram escolhidos como agentes
12 para teste de atividade antiparasitária e antifúngica e células U937 e THP1 foram
13 escolhidas para testes de atividade antitumoral.

14

15 **Objetivos:**

- 16 • Isolar e identificar substâncias de caráter terpenico da espécie *W. azulensis*
17 através de métodos fitoquímicos;
- 18 • Identificar extratos com atividade biológica antifúngica, antiparasitária e
19 antitumoral;
- 20 • Correlacionar os aspectos fitoquímicos e anatômicos adaptativos das espécies em
21 estudo com o ambiente em que estão inseridas;
- 22 • Fornecer dados à sistemática da família e contribuir com a conservação de
23 espécies deste ecossistema.

24

25 **Materiais e Métodos:**

26 **Prospecção fitoquímica:**

27 Após coleta na área de estudo, as amostras de raiz e caule foram secas em estufa
28 de circulação fechada a 30°C por 7 dias e as folhas foram secas em laboratório em
29 ambiente refrigerado durante 10 dias. Todas as amostras secas foram moídas em moinho
30 de martelo com granulação definida e foram pesados em balança digital (tabela 1). Elas
31 foram separadas e identificadas por órgão e também setor de coleta.

Tabela 1. Peso das amostras secas

Setor	Material	Peso seco (g)
Face leste	Raiz	731,75
	Caule	483,91
	Folha	519,09
Face oeste	Raiz	646,18
	Caule	720,75
	Folha	949,07

1

2 **Extração dos constituintes químicos**

3 Para a obtenção dos extratos brutos metanólicos (EBM) toda a quantidade de
4 amostra do material vegetal seco e moído foi acondicionada em Erlenmeyers contendo
5 álcool metílico P.A., que permaneceu em repouso por 6 dias. Após esta etapa, este
6 material foi filtrado em papel de filtro e transferido para o rotaevaporador sob 60 °C a
7 uma rotação de 60rpm. Em seguida, os materiais concentrados foram colocados em
8 pequenos recipientes de vidro e deixados em capela de exaustão. Esse procedimento foi
9 repetido por mais duas vezes, afim de obter todo o extrato vegetal bruto. Após as amostras
10 secas, as mesmas foram pesadas, a fim de, obter o peso seco final das amostras.
11 Posteriormente as amostras foram submetidas ao sistema de particionamento.

12 **Particionamento dos EBM**

13 A partição líquido-líquido se constitui na separação dos componentes dos extratos
14 brutos baseando-se nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis. Utilizada
15 para tornar as misturas das substâncias químicas presentes nos extratos metanólicos
16 brutos da espécie, mais simples, de acordo com a polaridade.

1 Os EBM foram particionados por meio de funil de separação utilizando solventes
2 em escala crescente de polaridade e água. Os solventes utilizados para a partição foram:
3 diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e álcool butílico (n-ButOH). Após esta
4 etapa, foram obtidos extratos fracionados separados em três diferentes polaridades e os
5 mesmos foram submetidos a análises para isolamento e identificação das substâncias
6 químicas por métodos espectrométricos, tais como, espectrometria no infravermelho, de
7 ressonância magnética nuclear e de massas; e métodos cromatográficos clássicos como,
8 cromatografia em coluna e em camada delgada (Breitmaier & Voelter, 1987; Friebolin,
9 1993; Gottlieb *et al.*, 1967; Lambert *et al.*, 1987; Nakanishi, 1990; Pihlaja & Kleinpeter,
10 1994; Sanders & Hunter, 1993; Sizdak, 1996). Assim como, alíquotas dos nove extratos
11 particionados foram separadas para os testes de atividade biológica (Broekaert *et al.* 1990;
12 Macedo *et al.*, 1993).

13 **Análises cromatográficas**

14 As análises de cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se gel de
15 sílica, da marca Merck, Darmstadt 60 (0,063–0,200 mm), Sephadex LH 20 e RP18. As
16 análises de cromatografia em camada delgada analítica foram realizadas em
17 cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254 Merck. As substâncias foram
18 visualizadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (Aldrich) a 254nm e 365nm e/ou
19 pulverizadas com o reagente cromogênicos H₂SO₄ conc./ Vanilina (Mace & Howell,
20 1974), seguido de aquecimento. As análises em cromatografia em camada delgada, em
21 escala preparativa foram realizadas utilizando-se placas de vidro 20 x 20 cm, com gel de
22 sílica 60 GF254. Para obtenção dessas placas, foi diluído 20g de gel de sílica em 70ml de
23 água destilada, e em seguida, foram distribuídas manualmente sobre as placas de vidro.

24 **Análises espectroscópicas**

25 As análises espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Ciências
26 Químicas (CTT/UENF). Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
27 (RMN 1H) e carbono-13 (RMN 13C) foram obtidos em espectrômetros Bruker (Ascend
28 500MHz). Os espectros de massas foram obtidos em aparelhos em espectrômetros
29 Shimadzu (CG/MS–QP– 5050). Os espectros infravermelhos foram obtidos em aparelho
30 Shimadzu (Iraffinity - 1).

31

32

1 **Atividade biológica:**

2 **Antitumoral:** Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados no Laboratório de
3 Biologia do Reconhecer (CBB/UENF).

4 Culturas das linhagens de células de origem neoplástica: As linhagens humanas
5 U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda) foram cultivadas em
6 meio DMEM F12 (Gibco, BLR). As células H460 (carcinoma de pulmão humano) foram
7 cultivadas em RPMI suplementados com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10%
8 de soro fetal bovino (Gibco BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e
9 mantidas em estufa (Forma Scientific Inc. 3159) a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade
10 controlada. Após esta etapa as culturas foram tratadas com os compostos e foi realizada
11 a avaliação do efeito citotóxico dos compostos frente às células tumorais.

12 Avaliação da viabilidade celular por MTT: As células U937, THP-1, foram
13 plaqueadas em volume de 100µL/poço (1x10⁵ cels/mL para B16F10 e 1x10⁶ cels/mL
14 para demais linhagens) em placas de 96 poços, tratadas com os compostos nas
15 concentrações finais de 25µM, 50µM, 100µM, 200µM e 400µM. Como controles
16 negativos todas as células foram incubadas com meio DMEM F12 (Gibco, BLR)
17 suplementados com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino
18 (Gibco BRL). Os controles positivos as células foram incubadas com Triton. Para
19 controle do meio de solubilização das alíquotas as células foram incubadas com DMSO
20 na mesma concentração.

21 A viabilidade celular foi determinada através do microensaio colorimétrico
22 utilizando MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). As
23 células foram incubadas por 24h com os compostos e após o tempo determinado foram
24 adicionados 10µL de MTT (Sigma, 5mg/mL) para cada 100µL de cultivo. As placas
25 foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período foram retirados 150µl do
26 sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100µL de uma solução de HCl com
27 isopropanol, homogeneizando até a completa dissolução dos cristais de sal formados nos
28 poços. As placas de 96 poços foram lidas em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX)
29 utilizando comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram analisados através da
30 absorvância de cada poço e os experimentos foram realizados em triplicatas.

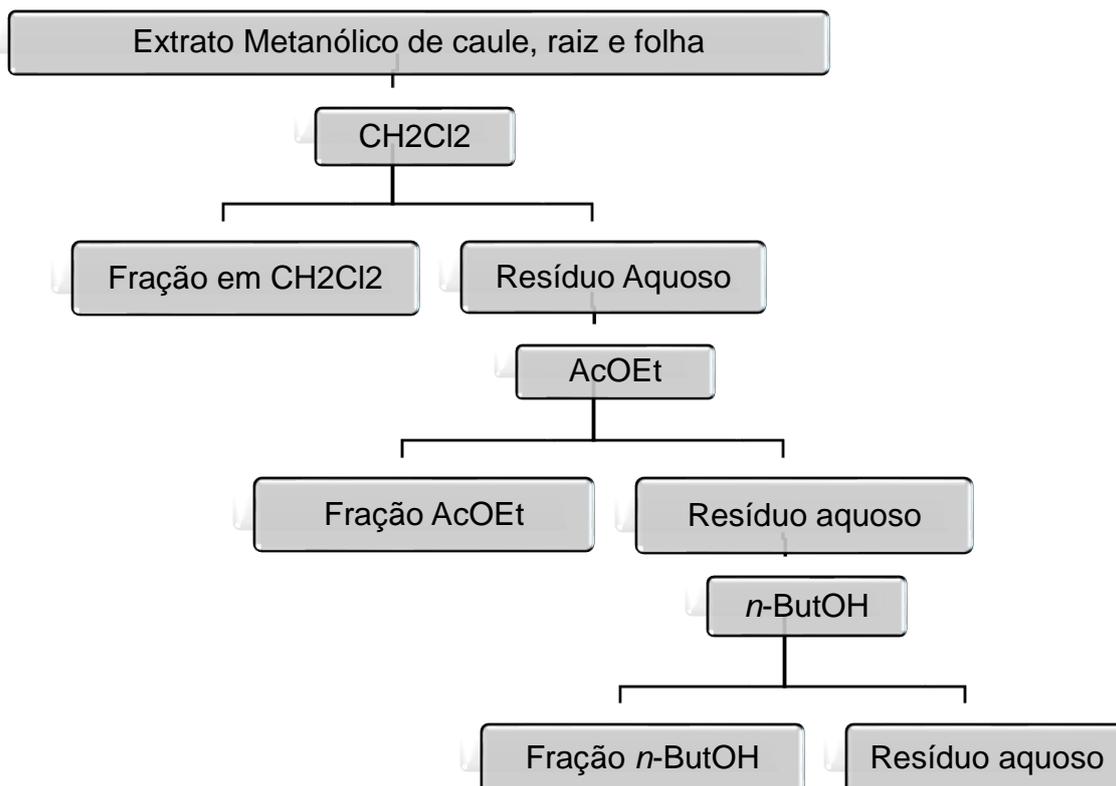
31

32

1 **Resultados:**

2 **Fitoquímica**

3 Após obtenção dos extratos brutos metanólicos do caule, da raiz e da folha (tabela
4 2), eles foram solubilizados individualmente em MeOH/H₂O (8:2) e submetidas a
5 partição com CH₂Cl₂, AcOEt e n-ButOH (Fluxograma 1). A realização da partição
6 forneceu 3 extratos de cada órgão da planta e a massa das mesmas estão ilustradas na
7 tabela 3.



8

9 **Fluxograma 1:** Partição do EBM do caule, raiz e folha de *W. azulensis*.

Tabela 2: Massa dos extratos brutos metanólicos de *W. azulensis*

Fração	Código	Massa (g)
Folha Leste	WFD	121,32
Folha Oeste	WFA	134,08
Caule Leste	WCD	44,72
Caule Oeste	WCA	69,44
Raiz Leste	WRD	98,01
Raiz Oeste	WRA	72,59

Tabela 3: Massa dos extratos obtidos da partição do EBM do caule, raiz e folha de *W.azulensis*

Fração	Código	Massa (g)
Oeste		
Folha CH ₂ Cl ₂	WFD	72,47
Folha AcOEt	WFA	0,64
Folha <i>n</i> -ButOH	WFN	1,95
Caule CH ₂ Cl ₂	WCD	6,86
Caule AcOEt	WCA	1,43
Caule <i>n</i> -ButOH	WCN	6,33
Raiz CH ₂ Cl ₂	WRD	14,53
Raiz AcOEt	WRA	1,43
Raiz <i>n</i> -ButOH	WRN	4,32
Leste		
Folha CH ₂ Cl ₂	WFD	22,37
Folha AcOEt	WFA	1,80
Folha <i>n</i> -ButOH	WFN	6,30
Caule CH ₂ Cl ₂	WCD	31,83
Caule AcOEt	WCA	0,23
Caule <i>n</i> -ButOH	WCN	2,36
Raiz CH ₂ Cl ₂	WRD	21,95
Raiz AcOEt	WRA	1,46
Raiz <i>n</i> -ButOH	WRN	4,42

1

2 Após a obtenção das frações, as mesmas foram analisadas primeiramente por
 3 cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para identificar as partições com
 4 maior diversidade de substâncias, seguido do início do fracionamento cromatográfico das
 5 frações mais promissoras. Sendo escolhido para continuação do estudo fitoquímico a
 6 fração WRD leste (tabela 3).

7 Nas análises fitoquímicas, o extrato particionado WRD leste foi submetido a uma
 8 cromatografia em coluna usando gel de sílica como fase estacionária e como eluentes

1 CH₂Cl₂ e MeOH em modo de gradiente de polaridade até 100% de MeOH, fornecendo
2 30 frações que posteriormente foram reunidas em 13 frações, através de comparação por
3 cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações
4 encontra-se na Tabela 4. Os resultados e isolamento e caracterização das moléculas estão
5 descritas no artigo científico submetido da tese a seguir (página 78).
6

Tabela 4: Estudo cromatográfico das frações obtidas da fração WRD

Frações reunidas	Código	Massa (g)
1 a 6	WRD 1	3,7
7 e 8	WRD 2	0,9
9 a 10	WRD 3	1,5
11 e 12	WRD 4	0,6
13	WRD 5	0,6
14 e 15	WRD 6	0,5
16 e 17	WRD 7	1,4
18 a 20	WRD 8	0,6
21 e 22	WRD 9	0,6
23 e 24	WRD 10	1,3
25 a 27	WRD 11	1,1
28	WRD 12	1,2
29 e 30	WRD 13	2,3

7

8 **Atividade Biológica:**

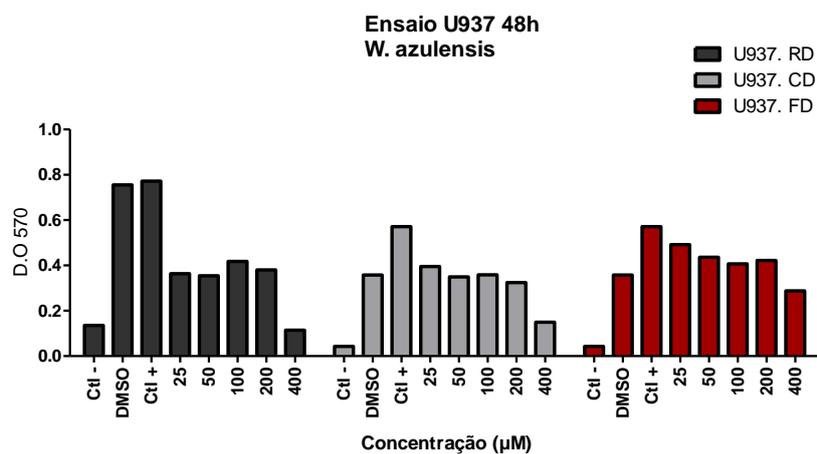
9 Os três testes de atividade biológica foram feitos com alíquotas dos extratos
10 particionados dos três órgãos vegetativos e foram separadas para análise preliminar de
11 ambos os testes. Para todos os ensaios nas três atividades propostas os extratos
12 diclorometano se mostram os mais promissores, sendo possível observar no gráfico 1 os
13 resultados para o teste antitumoral, tabelas cinco para atividade antiparasitária e gráficos
14 dois e três para atividade antifúngica. Cerca de 4mg de cada extrato (bruto metanólico,

1 extrato particionado com os três solventes e as frações WRD leste) foram separadas e
2 submetidas aos testes de atividade biológica.

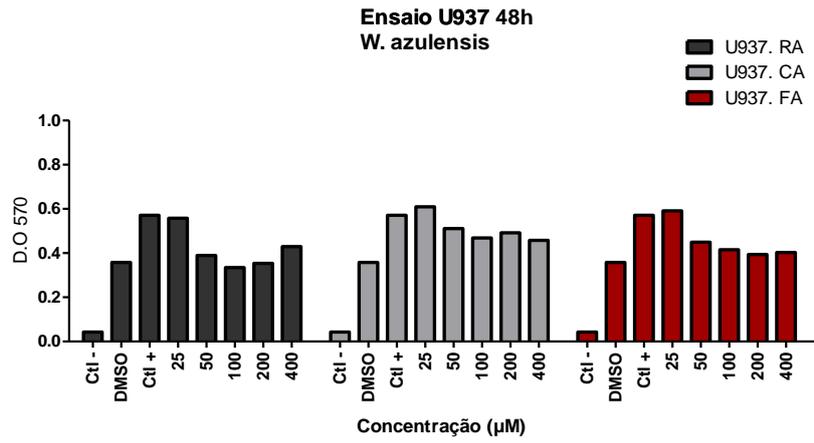
3 Antitumoral

4 Como *screening* inicial, a viabilidade das linhagens U937 e THP1 foi avaliada
5 frente aos extratos raiz, caule e folha diclorometano (RD, CD e FD, respectivamente),
6 acetato de etila (RA, DA e FA, respectivamente) e N-butanol (RN, CN e FN,
7 respectivamente) no tempo de 48h.

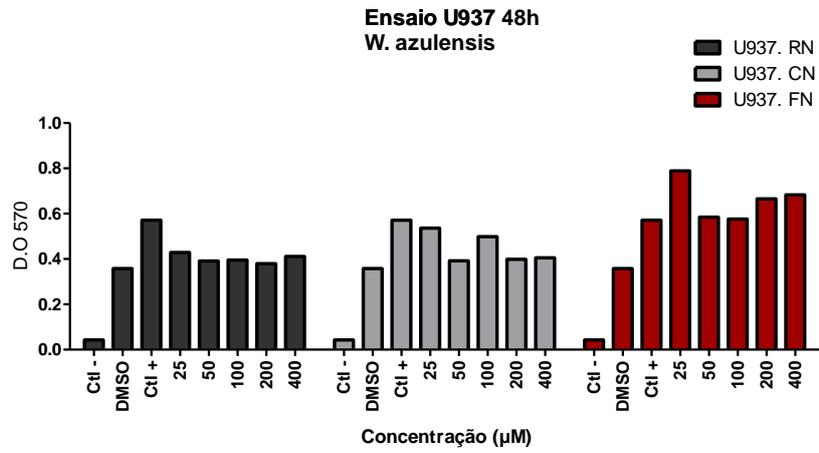
8 ,A maioria dos extratos testados foi capaz de reduzir a viabilidade das duas
9 linhagens de células, porém os extratos obtidos com diclorometano apresentaram o
10 melhor resultado, principalmente frente à linhagem THP1 (gráfico 1). O extrato de raiz e
11 caule foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento das linhagens THP1
12 em todas as concentrações e para a linhagem U937 o extrato de raiz inibiu de forma
13 significativa a partir da concentração de 25 μm . Já para o extrato de caule apenas na
14 concentração maior concentração do extrato. Os extratos de folha não se mostram
15 promissores para segmentos nos posteriores métodos de avaliação de potencial
16 antitumoral, já que não apresentou uma redução significativa das linhagens das células
17 testadas. Apresentando apenas uma inibição significativa da linhagem THP1 com o
18 extrato diclorometano. (gráfico 1)



19



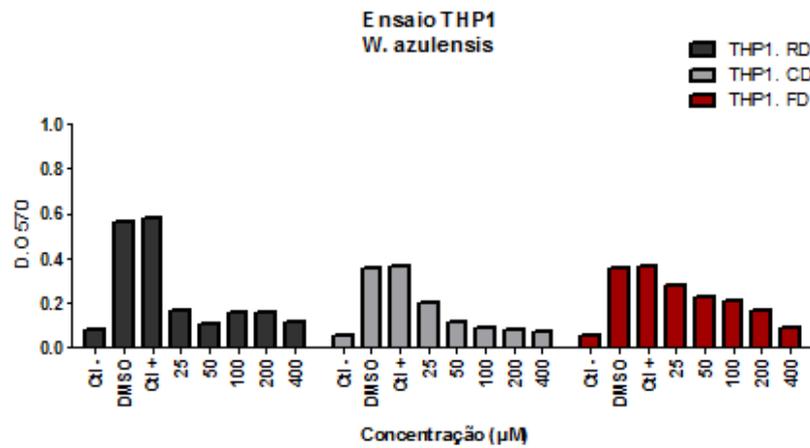
1



2

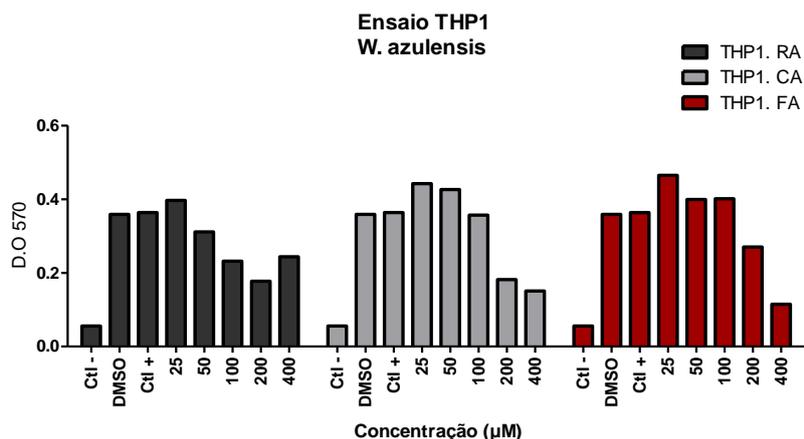
3

4

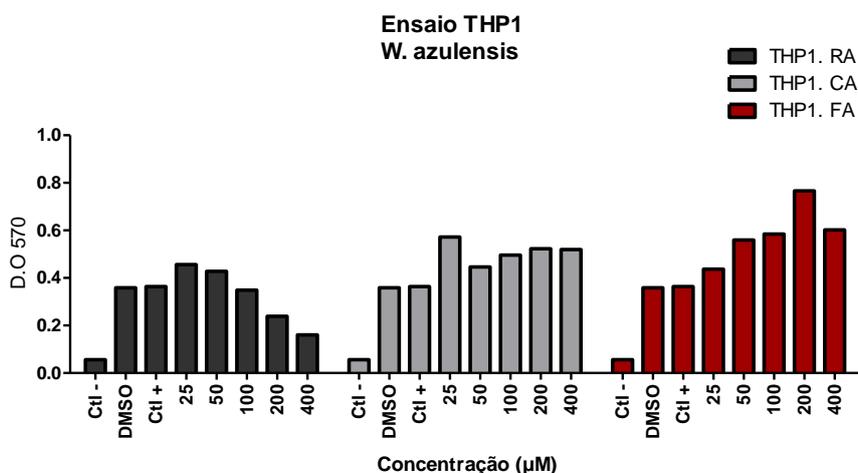


5

6



1



2

3 **Gráfico 1:** Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha
 4 diclorometano (RD, CD e FD respectivamente), acetato de etila (RA, DA e FA,
 5 respectivamente) e N-butanol (RN, CN e FN, respectivamente) frente às células U937 e
 6 THP1 após 48h de incubação. A avaliação foi feita através do ensaio colorimétrico
 7 utilizando MTT. DMSO, Triton e meio de cultura foram utilizados como controle.

8

9 Os testes antitumorais mostraram resultados promissores com os extratos de caule
 10 e raiz obtidos a partir da partição diclorometano. Com o andamento dos processamentos
 11 químicos foi possível identificar das frações obtidas de raiz diclorometano substancias da
 12 classe terpénica, que é amplamente descrita na literatura com atividade antitumoral
 13 (Raslan, D. S. *et al.*, 2014; Mc Dougal, P. G. *et al.*, 1989). Embora Nuzes, 2000, demonstre
 14 que os testes realizados com extrato diclorometano de flores da espécie *W. crulsiana* não
 15 foram promissoras, os testes realizados com *W. azulensis* apresentaram resultados
 16 contrários e promissores. Entretanto, são necessários mais testes para avaliar o grau de
 17 citotoxicidade desses extratos e o mecanismo de morte celular dessas células.

1 **Antiparasitaria:**

2 O teste de atividade antiparasitária foi realizado através da avaliação do efeito dos
3 extratos particionados e as frações em epimastigostas de *T. cruzi*. As frações foram
4 preparadas em DMSO a uma concentração de 4 mg/ 500 ul e submetidas aos testes
5 antiparasitários. Como *screening* inicial, as amostras foram quantificadas e o número de
6 epimastigota diminuiu após a incubação. Todas as frações apresentaram atividade,
7 havendo redução significativa na concentração de 25 ug / ml para o extrato de raiz
8 diclorometano, e conduzido para a completa eliminação dos parasitas em 50 ug / ml
9 (tabela 2s). Posteriormente ao *screening* inicial o extrato raiz diclorometano foi
10 selecionado e as frações obtidas a partir deste extrato (tabela 5) foram preparadas e
11 submetidas a novo teste com epimastigotas de *T. cruzi* e estão descritos no artigo
12 científico submetido dessa tese a seguir.

13

Tabela5: Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha C2H2 sobre epimastigostas de *T. cruzi*.

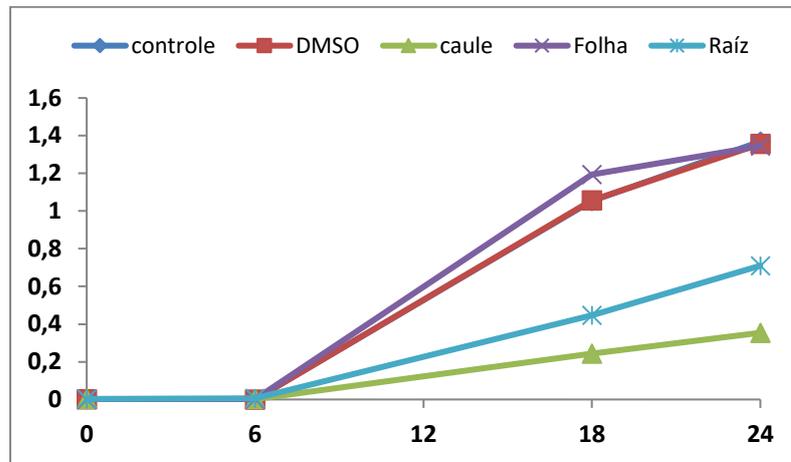
Teste preliminar - nº 92 : 4 / controle 142 células									
	Folha			Caule			Raiz		
	CH2Cl2	N-But	Acoet	CH2Cl2	N-but	Acoet	CH2Cl2	N-but	Acoet
25ul	71	61	57	30	29	35	9	31	39
50ul	40	47	35	11	17	33	0	16	36
100ul	21	45	47	20	0	36	0	29	38
200ul	0	57	38	0	0	47	0	35	40
400ul	0	49	39	0	0	43	0	37	35

14

15 **Antifungico:**

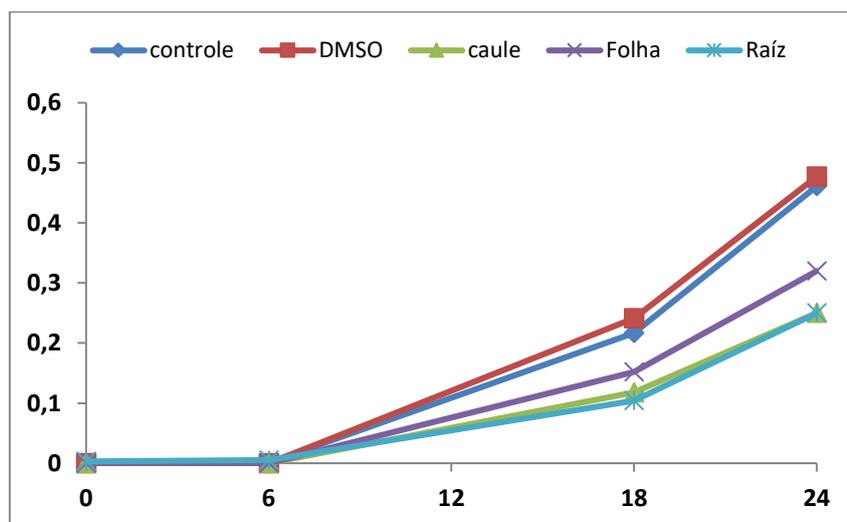
16 A atividade antifúngica foi realizada através da avaliação dos efeitos dos extratos
17 particionados e das frações sobre a permeabilização de membranas das células de
18 *Candida tropicalis* e *C. buinensis*. As frações foram preparadas em DMSO a uma
19 concentração de 4 mg / 500 ul e submetidas aos testes. Como *screening* inicial as
20 leveduras foram incubadas em 200 µL de caldo Sabouraud contendo 100 µL dos extratos
21 particionados, após o tempo de 24h foi possível observar que os extratos diclorometano

1 de caule e raiz foram capazes de inibir o crescimento em 73 e 48 %, respectivamente,
2 para das *C. tropicalis* e em 46% para *C. buinensis* (gráfico 2 e 3).



3

4 **Gráfico 2:** Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha
5 diclorometano frente às leveduras de *C. tropicalis*. DMSO e meio de cultura foram
6 utilizados como controle.



7

8 **Gráfico 3:** Efeito citotóxico dos extratos particionados de raiz, caule e folha
9 diclorometano frente às leveduras de *C. buinensis*. DMSO e meio de cultura foram
10 utilizados como controle.

11 A partir desde *screening* a partição de raiz diclorometano foi selecionado para
12 continuação nos testes, onde as frações obtidas a partir desta partição (tabela 4) foram
13 preparadas da mesma forma que os extratos particionados e submetidas a novo teste com
14 leveduras de *C. tropicalis*, esses dados estão descritos no artigo científico submetido
15 dessa tese a seguir.

16

The antifungal and antiparasitic activity of the roots from *Wunderlichia azulensis* Maguire & G. M. Barroso (Asteraceae)

**Fernanda Gomes Trindade¹, Gabriel Taveira², Laís Pessanha de Carvalho¹,
Almir Ribeiro de Carvalho Junior³, Vinícius Fernandes Moreira³, Valdirene
Moreira Gomes², Ivo José Curcino Vieira³, Raimundo Braz-Filho³, Edésio José
Tenório de Melo¹, Maura Da Cunha¹**

¹Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e
Biotecnologia (CBB); ²Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos,
CBB; ³Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciência e Tecnologia (CCT);
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos
Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil

(Received MonthDay, 201X; Revised Month Day, 201X; Accepted Month Day, 201X)

Abstract: The aim of this work was to evaluate the antifungal and antiparasitic activity of the roots from *Wunderlichia azulensis* Maguire & G. M. Barroso (Asteraceae). Dichloromethane partition of *W. azulensis* was test in *Candida tropicalis* and *C. buinensis* and *Trypanosoma cruzi* parasite. The 13 fractions were tested the most pronounced were fractions 5 and 7 for *Candida* yeasts, inhibiting the growth of *C. tropicalis* 75.2 and 64.5%, respectively, against the cells of *C. buinensis* 63.9 and 70, 3% and the fraction 7 an inhibition of 80.7 and 87.7% have the concentrations of 50 and 100 µg/mL. The species most susceptible to both treatments was *C. buinensis*, with 97.61 and 92.63% loss of viability for fractions 5 and 7, respectively. The least susceptible was *C. tropicalis*, with 18.75 and 82.45% loss of viability for fractions 5 and 7, respectively. Sytox green marker in *Candida* yeasts revealed positive results as green fluorescence as additional yeast species as fractions containing substances of the terpene class as in the present work. Suggesting that they take the extravasation of contents cytoplasmatic memory of cellular homeostasis, being indicative of mechanism for movement to destabilizing the alloy of the cells in the cellular membrane. The fraction 7, tested on *T. cruzi* epimastigotes, dubbed "drastic in parasite culture." No live epimastigotes were observed even at the shortest time and time of exposure of the 7 fraction (25µg/mL/24h). The chemical study of the CH₂Cl₂ partition resulted in the isolation and identification of the dehydrobrachylaenolide (**1**) (fraction 7-4), lasiodiplodine (**2**) taraxerane-type triterpene skeleton compatible with

1 those of acetyl taraxerol (**3**) (fraction 1). In addition to the isolation and identification of
2 mixture of sitosterol and stigmasterol (**4-5**) (fraction 4). From the above studies, we
3 conclude that traditional plants may represent new sources of antimicrobials with stable
4 and biologically active components that can establish a scientific basis for the use of
5 plants in modern medicine. However, complementary studies, such as synergism,
6 toxicology, and mechanism of action, must be carried out to effectively use medicinal
7 products.

8
9 **Keywords:** Asteraceae; Roots; Sesquiterpene lactone; *W. azulensis*; Anticandidal
10 activity; Antiparasitic activity. © 201X ACG Publications. All rights reserved.

11 12 13 **1. Introduction**

14 *Wunderlichia* (Asteraceae) comprises six species restricted to rocky outcrops in the
15 central-western and southeastern region from Brazil [1, 2]. Within the genus, the species
16 *W. mirabilis* Riedel ex Baker and *W. crulsiana* Taub. are chemically described, among
17 some chemical constituents found flavonoids, triterpenes, sesquiterpenes lactones and
18 sesquiterpenes [3-5]. Plants are promising sources of new active compounds. It is
19 interesting to investigate species belonging to families already described as having
20 chemotaxonomic markers, such as the Asteraceae [4].

21 Regarding the studies with *Wunderlichia*, although it is endemic in Brazil, it is still
22 little known and the only general treatment with this taxon refers to the revision of 1973
23 [1]. Besides studies related to its phylogeny and phylogeography [6-11] and few studies
24 on chemical composition restricted to only two species [3-5].

25 In the last decades, antimicrobials derived from plants have received special
26 attention due to the resistance to traditional antibiotics developed by some
27 microorganisms and parasites [12, 48]. Several species of yeast belonging to the genus
28 *Candida* may present some type of pathogenicity to humans, for example, infections such
29 as candidiasis, meningitis, among others [13]. *Trypanosoma cruzi* is the pathogen agent
30 of Chagas` disease, which affects about 25 million people living in high-risk areas and
31 about 10 million people are currently infected with *T. cruzi*, resulting in more than 15,000
32 deaths and 50,000 new cases every year [14].

33 Species of the genus *Wunderlichia* have a variety of biological activities giving
34 them importance regarding the search for bioactive compounds [3-5]. However, little is
35 known about the biological activity of extracts of this genus. In this sense, *T. cruzi*, *C.*
36 *buinensis*, and *C. tropicalis* were chosen agents for antiparasitic and antifungal activity
37 testing.

38 Considering the limited knowledge the effects of the bioactive compound of *W.*
39 *azulensis* on antifungal and antiparasitic activities, the present work aims to evaluate the
40 toxic effects of the dichloromethane partition in the *Wunderlichia azulensis* roots on the
41 epimastigote form of *T. cruzi* and to evaluate the antifungal activity of the fractions
42 against *Candida* species.

1 **2. Material and Methods**

2 *2.1. Plant sample*

3

4 The roots of *Wunderlichia azulensis* were collected out in February 2014 at the
5 Maciço do Itaoca in Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil (21°48' S 41°26'W) and identified
6 by MSc. Thatiane Pereira de Souza. A voucher specimen (H5580) was deposited in the
7 herbarium of the Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do
8 Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

9 *2.2 Extraction*

10 Dried and powdered roots (731 g) from *W. azulensis* were extracted with methanol
11 at room temperature, furnishing after solvent evaporation, 96.7 g of crude methanol
12 extract. The methanol extract was suspended in a MeOH:H₂O solution (1:3), and
13 partitioned with CH₂Cl₂, EtOAc, and *n*-butanol, successively. The CH₂Cl₂ fraction (21.9
14 g) was chromatographed on a silica gel column and eluted with a gradient of
15 hexane:OAcEt, yielding thirteen sub fractions [15].

16 The spectrometric analyzes were carried out in the apparatus of the Laboratório de
17 Ciências Químicas (CCT/ UENF). ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectra were
18 obtained using a Bruker NMR spectrometer [(500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C)], using
19 tetramethylsilane (TMS) as internal standard for chemical shift reference. The mass
20 spectra were obtained on devices in Shimadzu (CG /MS-QP-5050) spectrometers.
21 Infrared spectra were obtained in Shimadzu apparatus (Iraffinity-1).

22 *2.3 Microorganism Material*

23 Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (strain DM28) were maintained in glass tubes
24 containing 5 mL of LIT medium (Liver Infusion Tryptose, Liver Broth and Tryptose -
25 FLUKA ANALYTICA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), in a BOD
26 a 28 ° C. For culture maintenance, every 5 days 1 mL of the tube supernatant was
27 withdrawn and placed in a new tube, the volume of which was filled to 5 mL with fresh
28 medium.

29 The yeast of *Candida tropicalis* (CE017) obtained from Departamento de Biologia,
30 Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil. The yeast *Candida buinensis* (3982),
31 was obtained from Micoteca URM from Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
32 Pernambuco, Brazil. Yeasts were maintained on Sabouraud agar (1 % peptone, 2 %
33 glucose, and 1.7 % agar-agar) (Merck) in the Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de
34 Microrganismos (CBB/ UENF).

35 *2.4 Antiparasitic activity*

36 *Cytotoxicity test of total extracts in epimastigotes*

37 For the experiments, the content in the glass tube was centrifuged and the parasites
38 diluted in 1 ml of medium. A volume of 10 µL was withdrawn and mixed with 90 µL of
39 counting medium (40% formaldehyde + 60% PBS - phosphate buffer saline). Again,
40 10µL was withdrawn from this mixture and counted in the Neubauer chamber. The assays
41 were performed with an initial amount of approximately 2x10⁶parasitas.mL⁻¹.

1 The fractions were diluted in 1.5% v/v of DMSO (Dimethyl-Sulphoxide, MERCK)
2 and LIT medium to make a stock concentration. The parasites were plated in 96-well
3 plates in a volume of 100 μ L/well. The fractions samples were diluted to the
4 concentrations of use, again in LIT medium and placed in the wells of the plates, totalizing
5 a volume of 200 μ L/well. After 24 hours of treatment, the parasites were quantified in the
6 Neubauer chamber.

7 After one day of treatment, the cells were washed with PBS 3 times, fixed for 5
8 minutes in Bouin's solution (Picric acid: Acetic acid in 19: 1) and again washed with PBS
9 4 more times. Soon after, they were stained with Giemsa solution diluted in PBS (1:10)
10 at room temperature for 6 hours. The coverslips containing the cells were dehydrated in
11 decreasing solutions of acetone mixed with xylol. Coverslips were mounted on
12 histological slides using Entella® (MERCK) and incubated for 48 hours for drying.
13 Subsequently, they were observed under an optical microscope (Axiovision 4, Zeiss), all
14 procedures were following specific procedures for these analyzes [16].

15 For analysis of ultrastructure, the samples treated with 100 μ g/mL of aqueous extract
16 for 24h were centrifuged for 10 min at 1700 RPM, washed with PBS for 10 more min and
17 re-centrifuged at the same RPM. Fixation was performed using 4% formaldehyde, 1%
18 glutaraldehyde, 0.2 M sodium cacodylate buffer, 1.5 mL distilled water and 5% sucrose
19 for 1 h at room temperature. The samples were then centrifuged again for 10 min at 1700
20 RPM and washed with a 0.1 M solution of sodium cacodylate buffer. The resulting pellet
21 was post-fixed with 2% osmium tetroxide and 0.8% potassium Ferro cyanide for 1.5 h at
22 ambient temperature and protected from light. The post-fixed samples were washed in
23 sodium cacodylate buffer, centrifuged twice and dehydrated in an increasing series of
24 acetone. After dehydration, the samples were incubated in a solution of 100% acetone-
25 epon resin in proportions of 2:1, 1:1, 1:2 and pure epon resin, for 6 h each step. The
26 material was then embedded in epon (Epoxy Resin) and polymerized in a kiln at 60 °C
27 for 48 h. Ultrathin sections were obtained using an ultra microtome (Reichert Ultracuts
28 Leica Instruments®) and contrasted with 5% aqueous uranyl acetate for 20 min in the
29 dark and lead citrate for 5 min. The material was observed and photographed with a Zeiss
30 TEM 900 transmission electron microscope operating at an accelerating voltage of 80 kV.

31 32 2.5 Antifungal activity

33 Analysis of the inhibition of growth of yeast cells

34 Aliquots of the yeast species of *C. tropicalis* and *C. buinensis* were collected from
35 a Petri dish that had colonies grown and placed in new plates, containing Sabouraud agar,
36 and made streaks on the medium to obtain a homogeneous cell growth. This new plate
37 was left in the oven at 30 °C for 24 hours and then used to obtain the cells used in the
38 assay. With the aid of a sowing loop, a cell aliquot was removed and added to 10 mL of
39 liquid medium (Sabouraud broth, 1% peptone, 2% glucose, MERCK) so that they could
40 be quantified in a Neubauer (Optik Labor), with the aid of an optical microscope
41 (Axioplan.A2, ZEISS).

42 Initially, yeast cells *C. tropicalis* and *C. buinensis* (1×10^4 cells.mL⁻¹) were incubated
43 in Sabouraud broth containing different concentrations of the fractions (WRD1-WRD13),
44 the final assay volume is adjusted to 200 μ L. The assay was performed on cell culture

1 plates (96 wells) (NUNC) at 30 °C for a 24 hours. The cell growth reflex was determined
2 by the optical density, monitored every 6 hours, in a microplate reader at a wavelength of
3 620 nm. The entire procedure was performed under aseptic conditions, in a laminar flow
4 hood, according to an adapted method [17].

5 *Viability Assay*

6 To assay the effect of WRD 5 and WRD 7 on the cell viability of yeasts, 1×10^4
7 cells.mL⁻¹ in Sabouraud broth culture medium were incubated for 24 h at 30 °C with 100
8 µg.mL⁻¹ of WRD 5 and WRD 7 in 96-well microplates (Nunc). To determine the control
9 viability, the control cells (untreated cells) were washed once and diluted 1,000-fold in
10 Sabouraud broth culture medium, and aliquot of 100 µL from this dilution was spread
11 over the surface of a Sabouraud agar medium (contained in a Petri dish) with a Drigalski
12 loop and grown at 30 °C for 48 h. At the end of this period, colonies forming units (CFU)
13 were determined for each yeast species, and the Petri dishes were photographed. The same
14 procedure was followed with yeasts treated with WRD 5 and WRD 7. The experiments
15 were carried out in duplicate, and the results are shown assuming that the control
16 represents 0 % of viability loss.

17 *Sytox green uptake assay*

18 The yeast cells of *C. tropicalis* and *C. buinensis* (1×10^4 cel.mL⁻¹) were incubated in
19 Sabouraud broth containing 100 µg.mL⁻¹ of the fractions WRD5 e 7, the final assay
20 volume being adjusted to 200 µL. The assay was performed on cell culture plates (96
21 wells) at 30 °C for a period of 24 h. The membrane permeability of the yeast cells treated
22 with the fractions was evaluated by the use of the Sytox Green fluorescent dye [18].
23 Immediately after the 24 hours incubation with the fractions, 96 µL aliquots were
24 incubated, under the light and constant stirring at 500 rpm for 15 min, with the Sytox
25 green fluorescent dye at a final concentration of 0.2 µM, instructions provided by the
26 manufacturer. Control cells were incubated only with the Sytox Green dye under the same
27 conditions. The cells were analyzed by light microscope (Axioplan. A2, ZEISS) coupled
28 to a camera (AxioCAM MRc5, ZEISS) and the images were analyzed by Axiovision
29 software version 4.0 (ZEISS). The microscope was equipped with a set of fluorescent
30 filters for detection of fluorescein (excitation wavelength between 450 - 490 nm and
31 emission of 500 nm). The experiments were carried out in triplicate.

32 *Determining the induction of intracellular ROS in yeast cells*

33 To evaluate if the mechanism of action of WRD fractions 5 and 7 involves the
34 induction of oxidative stress, an experiment was performed as described in the item
35 "Sytox Green Uptake Assay", with the following differences: fluorescence probe 2', 7'-
36 dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) was used to measure intracellular reactive
37 oxygen species (ROS) [19]. After 24 hours of incubation in the presence and absence of
38 the respective WRD fractions 5 and 7, the samples were again incubated with 20 µM of
39 the H2DCFDA probe, protected from light, for 2 hours at room temperature and with
40 constant stirring at 500 rpm. Then the cells were analyzed on the optical microscope
41 equipped with a set of fluorescent filters for detecting fluorescein (excitation wavelength
42 between 450 - 490 nm and emission of 500 nm). The experiments were carried out in
43 triplicate.

3. Results

In phytochemical analyzes, the extract CH_2Cl_2 was subjected to a column chromatography using silica gel as the stationary phase and as eluents hexane and ethyl acetate in polarity gradient mode up to 100% of ethyl acetate, providing 13 fractions.

About 4mg of each fraction were separated and submitted to biological activity tests. The other aliquots were submitted to new phytochemical purification tests and subjected to spectroscopic analysis. The chemical study of the CH_2Cl_2 partition resulted in the isolation and identification of the dehydrobrachylaenolide (**1**) (fraction 7-4), lasiodiplodine (**2**) taraxerane-type triterpene skeleton compatible with those of acethyl taraxerol (**3**) (fraction 1). In addition to the isolation and identification of mixture of sitosterol and stigmasterol (**4-5**) (fraction 4).

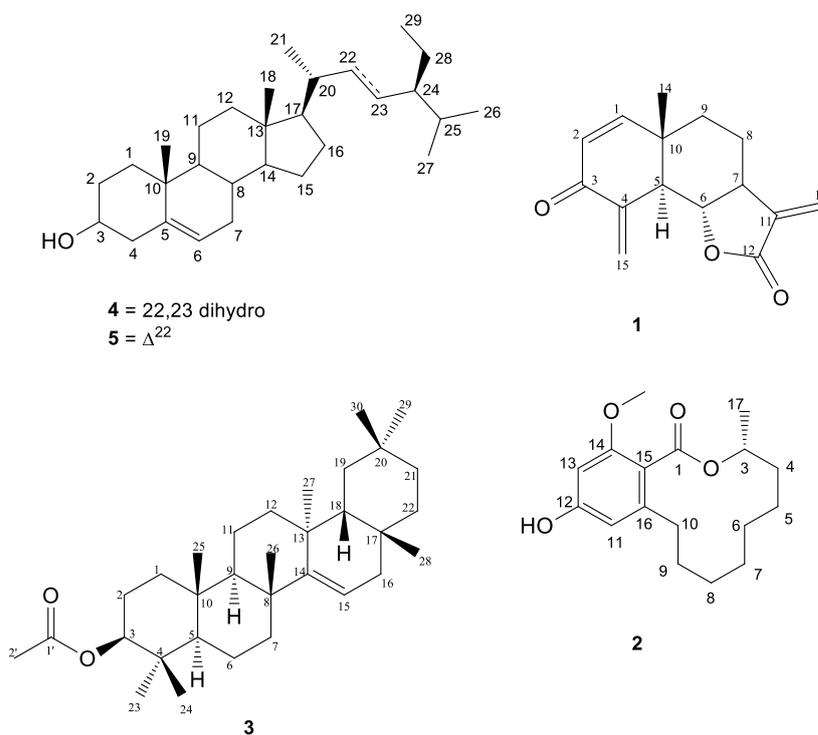


Figure 1. Chemical structures isolated from *Wunderlichia azulensis*.

Identification of compound 1 : The NMR spectrum (table S1, page 3; figures S5-S9, pages 8-12) showed characteristic signals of sesquiterpene lactone showing signals for two methylene olefinic groups in δ_{H} 6.15 and 5.47 (2H, *d*, 3.2 Hz, 2H-13) and in δ_{H} 6.28 and 5.73 (2H, *d*, 1.1Hz, 2H-15), as well as a triplet in δ_{H} 4.12 for a hydrogen of oxymethine, and of the methinic hydrogens in δ_{H} 6.82 (H-1) and δ_{H} 6.04 (H-2). The HSQC correlation spectrum (figure S8, page 11) show methylene carbon signals in δ_{CH} 117.7 (CH_2 -13) correlating with 2H-13 hydrogens, and in δ_{CH} 122.4 (CH_2 -15) correlating with 2H-15 hydrogens. Also the correlations between the carbons in δ_{CH} 158.4 (CH-1) with the hydrogen H-1 and the carbon in δ_{CH} 127.6 (CH-2) with the hydrogen H-2.

Analysis of the ^{13}C NMR spectrum (figure S6, page 9), and the HMBC heteronuclear correlation spectrum (Figure 9, page 12) showed carbonyl carbon signals

1 at δ_C 188.3 (C-3) correlating to $^3J_{HC}$ with the hydrogens in δ_H 6.82 (H-1) and in δ_H 6,28
2 and 5.73 (2H-15), and in δ_C 170 (C-12) correlating with $^3J_{HC}$ with the hydrogens in δ_H
3 6.15 and 5.47 (2H-13). Also the correlations between the carbon at δ_C 39.9 (C-10)
4 correlating with $^2J_{HC}$ with the hydrogens in δ_H 3.02 (H-5) and in δ_H 1.06 (3H-14). The
5 correlations between the carbons in δ_{CH} 79.2 (CH-6) characteristic of oxymethyl carbon
6 to $^2J_{HC}$ with the hydrogens in δ_H 3.02 (H-5), the carbon in δ_{CH} 48.5 (CH-7) and $^2J_{HC}$ with
7 the hydrogen at δ_H 2.15 (2H-8a) and at $^3J_{HC}$ with the hydrogen at δ_H 1.90 (2H-9a) and
8 with the hydrogens 2H-13, from the carbon at δ_{CH} 36.0 (CH₂-9) with hydrogen in δ_H 6.82
9 (H-1), methylinic carbon in δ_{CH} 19.7 (CH₃-14) and $^3J_{HC}$ with hydrogen in δ_H 1.82 (2H-
10 9b) corroborate to the structures of the sesquiterpene lactone. All these data, in
11 comparison with the literature data, allowed us to identify the compound as the
12 sesquiterpene lactone dehydrobrachylaenolide [20].

13 **Identification of compound 2:** GC/MS analysis of the sample allowed a signal
14 with retention time to be observed at 19.5 min, in $mz = 292$ (table S2, page4; figures S10-
15 14, pages 13-17). The 1H RMR spectrum showed an accumulation of signals in the region
16 between δ_H 0.87 and 2.67 are methylene and methynic hydrogens (S10, page 13). It also
17 showed signals at δ_H 6.29 (H-11) and δ_H 6.25 (H-13) of a tetrasubstituted aromatic system,
18 a signal at δ_H 3.72 (s, 3H) called the methoxyl hydrogen and a doublet at δ_H 1.34 (*d*, 6.3
19 Hz, 3H), a methyl-growing hydrogen attached to an oxymethyl carbon. The ^{13}C NMR
20 spectrum flagged the signal at δ_C 169.2 (C-1) of a conjugated carbonyl group, two signals
21 at δ_C 157.9 (C-12) and δ_C 157.9 (C-14) oxygenated aromatic carbons, and a signal in δ_{CH_3}
22 56.0 methoxyl group (figure S11, page 14).

23 Analysis of the HSQC spectrum, it was possible to observe the heteronuclear
24 between the hydrogen signal in δ_H 5.29 (*m*) (H-3) with the carbon in δ_{CH} 72.4 (CH-3) of
25 an oxymethyl carbon. A HMBC spectrum analysis of showed as correlations of the
26 carbons at δ_C 143.0 (C-16) at $^2J_{HC}$ δ 1.63 and 135.0 (C-2) and at $^3J_{HC}$ δ_H 1.63 and 135
27 (2H-9), from carbon in δ_C 117.16 to $^3J_{HC}$ with the hydrogens in δ_H 6.24 (H-11), δ_H 6.25
28 (H-13) and 2H-10, and the carbon in δ_C 157, 88 (C-14) to $^2J_{HC}$ with H-13 and to $^3J_{HC}$ with
29 the hydrogens in δ_H 3.72 of methoxyl. Also as correlations to 3H-10 and H-13, and of
30 carbon in δ_{CH} 97.0 (CH-13) with hydrogen H-11, and the correlations to $^2J_{HC}$ between the
31 carbon in δ_{CH_2} 30.1 (CH₂-9) with the hydrogens 2H-10, and the carbon in δ_{CH_2} 30.4 (CH₂-
32 10) and $^3J_{HC}$ with hydrogen H-11 (figure S13 and S14, pages 16 and 17). The articles of
33 data in comparison with the date of literature identified a compound **2** as being a
34 macrocyclic lactone lasiodiplodine [26].

35 **Identification of compound 3:** Analysis of the 1H NMR spectrum of the sample
36 showed a strong signal accumulation in the region of δ_H 0.60 to 2.06 relative to the various
37 methylene, methyl, and methine hydrogens of a terpene skeleton (figure S15, page 18).
38 A signal in δ_H 3.58 (1H, *s*, H-3), characteristic of carbinolic carbon-bound hydrogen, and
39 a signal in δ_H 5.61 (1H, *dd*, H-15) characteristic of olefinic hydrogen (table S3, page 5
40 and 6; Figures S15-S19, pages 18-22).

41 The presence of a double bond between C-14 and CH-15 carbon atoms can be
42 corroborated in the ^{13}C NMR spectrum (Figure S16, page 19) by chemical shifts relative
43 to the carbon atoms at δ_C 157.9 (C-14) and δ_{CH} 116.9 (CH-15), compatible with
44 pentacyclic triterpenes of the friedoean-14-ene series. The analysis of the $^2J_{HC}$ long-range

1 heteronuclear correlations presented in the HMBC spectrum (Figure S19, page 22),
 2 between the CH-15 carbon with the 2H-16 hydrogens in δ_H 2.02 and δ_H 1.68, together
 3 with the correlations $^3J_{HC}$ between C-14 and 2H-16 hydrogens confirm the presence of
 4 the double bond. The characteristic of ester group carbonyl carbon was corroborated by
 5 the correlations of this carbon in the HMBC spectrum (Figure 15, page 18) to $^2J_{HC}$ with
 6 the 3H-2' hydrogens in δ_H 2.07 (s) and the $^3J_{HC}$ with the hydrogen H-3 in δ_H 4.66 (*dd* ,
 7 11.6 and 4.8 Hz). The set of this data compared with the literature data allowed to identify
 8 the taraxerol acetate [54].

9 **Identification of mixture the 4 and 5:** The fraction 4 a whitish crystal, soluble in
 10 $CHCl_3$ and purple in color when heated with sulfuric vanillin in CCDA (data not
 11 shown). The analysis of the 1H NMR of the sample, showed a large accumulation of
 12 intense signs in the δ_H 0.69 to 2.52 relative to the various hydrogens of methyl, methylene
 13 and methine groups of a steroidal skeleton. It was also observed, a multiplet in δ_H 3,54-
 14 3,55 (1H, *m*, H-3), characteristic of hydrogen bonded to carbinolic carbon, and a doublet
 15 in δ_H 5,37 (1H, *d*, 1.9 Hz, H-6) characteristic of olefinic hydrogen (Table S4, page 6 and
 16 7; Figures S20 and S21, page 23 and 24). The presence of olefinic hydrogens of the side
 17 chain was observed by the signals in δ_H 5,04 (1H, *dd*, 15.1 and 8.8 Hz, H-23) and δ_H 5.16
 18 (1H, *dd*, 15.1 and 8.8 Hz, H-22). The distinction between steroids **4** and **5**, was confirmed
 19 by the signals observed in the DEPT Q NMR ^{13}C in δ_{CH} 121.8 (CH-6) and δ_C 140.8 (C-
 20 5) common for both structures, and in δ_{CH} 129.3 (CH-23) and δ_{CH} 138.4 (CH-22), gifts
 21 on steroids only **5**. It was also observed that the characteristic carbonic carbon δ_{CH} 71.8
 22 which indicates the presence of a hydroxyl attached to the carbon atom CH-3. All these
 23 data, in comparison with the literature data confirm both compounds [55].

24

25 3.1. Antiparasitic results

26 Epimastigotes were exposed to twelve fractions (table 1) at different concentrations
 27 (25, 50 and 100 μg / ml) for 24 h incubation (Table 1).

28 **Table1:** Epimastigotas tratadas por 24h ($\times 10^6$ mL)

Fractions	Control	100 ($\mu g/mL$)	25 ($\mu g/mL$)	50 ($\mu g/mL$)	100 ($\mu g/mL$)
1	110.7 \pm 6.5	15.7 \pm 2	3.3 \pm 2.3	0	
2	110.7 \pm 6.5	31 \pm 7.5	10 \pm 2	7.3 \pm 4.1	
3	110.7 \pm 6.5	17 \pm 4.6	6.7 \pm 2.3	0	
4	-	-	-	-	
5	110.7 \pm 6.5	0	0	0	
6	110.7 \pm 6.5	0	0	0	
7	110.7 \pm 6.5	0	0	0	
8	110.7 \pm 6.5	14.3 \pm 1.5	14.7 \pm 3.2	0	
9	110.7 \pm 6.5	3.3 \pm 0.6	13 \pm 4.6	0	

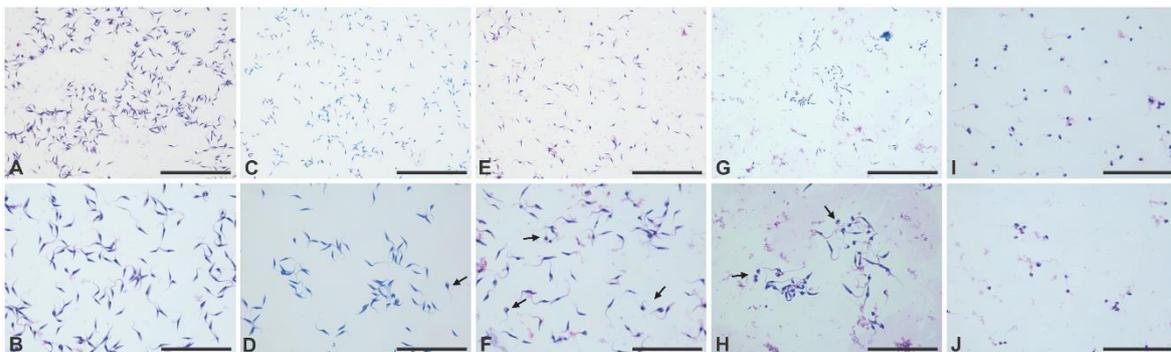
10	110.7 ± 6.5	13.3 ± 6.1	0	0
11	110.7 ± 6.5	18 ± 2.6	18.3 ± 5	10.3 ± 6.6
12	110.7 ± 6.5	10.7 ± 3.2	32.3 ± 2.3	16.7 ± 7.1
13	110.7 ± 6.5	16.7 ± 1.6	15.3 ± 0.6	21.7 ± 7.6

1

2 Our results using those fractions clearly show their potential lethality and ability
3 to alter the morphology of *T. cruzi* epimastigotes. Both light and transmission electron
4 microscopy revealed that untreated epimastigotes had a typical elongate shape, one
5 flagellum and no visible alterations (Figure 2 A and B; Figure 3 A).

6 Two fractions of the twelve tested were selected (WRD 2 and 8) and processed
7 for light microscopy and transmission electron [16]. The WRD 2 and 8 fractions reduced
8 74% and 87%, respectively, by 25 µg / mL, and the effects were progressive for WRD 2,
9 whereas for WRD 8 the toxicological effects were dramatic. Untreated epimastigotes
10 showed typical morphology (Figure 2, A), while epimastigotes treated with 25 µg / ml of
11 the WRD 2 fraction showed gradual morphological changes (Figure 2 B). Those treated
12 with WRD 8 showed drastic morphological alterations such as loss of cytoplasmic
13 volume and condensation of the parasite (Figure 2, C). Transmission electron microscopy
14 showed that controls showed intact organelles, cytoplasm and plasma membrane (Figure
15 3, A). The WRD 2-treated parasite presented high vacuolization cytoplasm and
16 disorganization of the kinetoplast (Figure 3, B and C), whereas the WRD 8 fraction also
17 showed microtubule disorganization, plasma membrane damage and organelles and
18 nuclear degradation (Figure 3, DF).

19

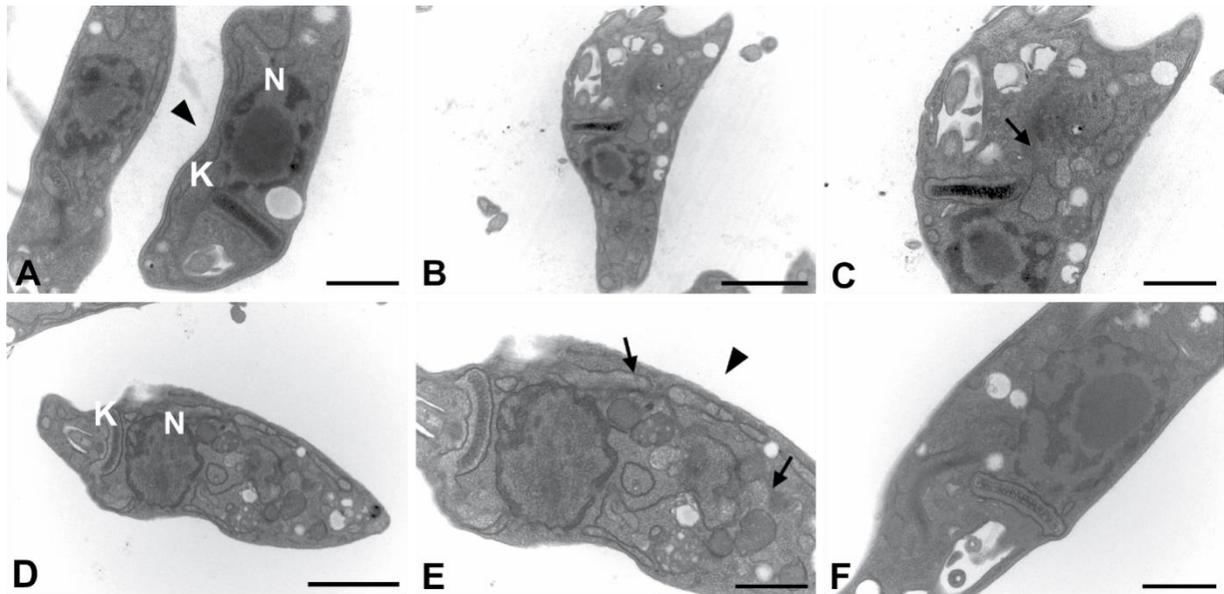


20

21

22 **Figura2.** Morphological observation of treated and untreated *T. cruzi* epimastigotes by
23 light microscopy. A and B untreated epimastigotes; C and D. Epimastigotes treated with
24 25 ug / ml of WRD2 showed some morphological changes; E and F. Epimastigotes
25 treated with 50 ug / ml of WRD2 showed morphological changes; G and H.
26 Epimastigotes treated with 25 ug / ml of WRD8; I and J. Epimastigotes treated with
27 WRD8 showed drastic change. Arrow, epimastigotes. Bars: A; W; AND; L; I. 50 µm
28 and B; D; F; H. 25 µm.

29

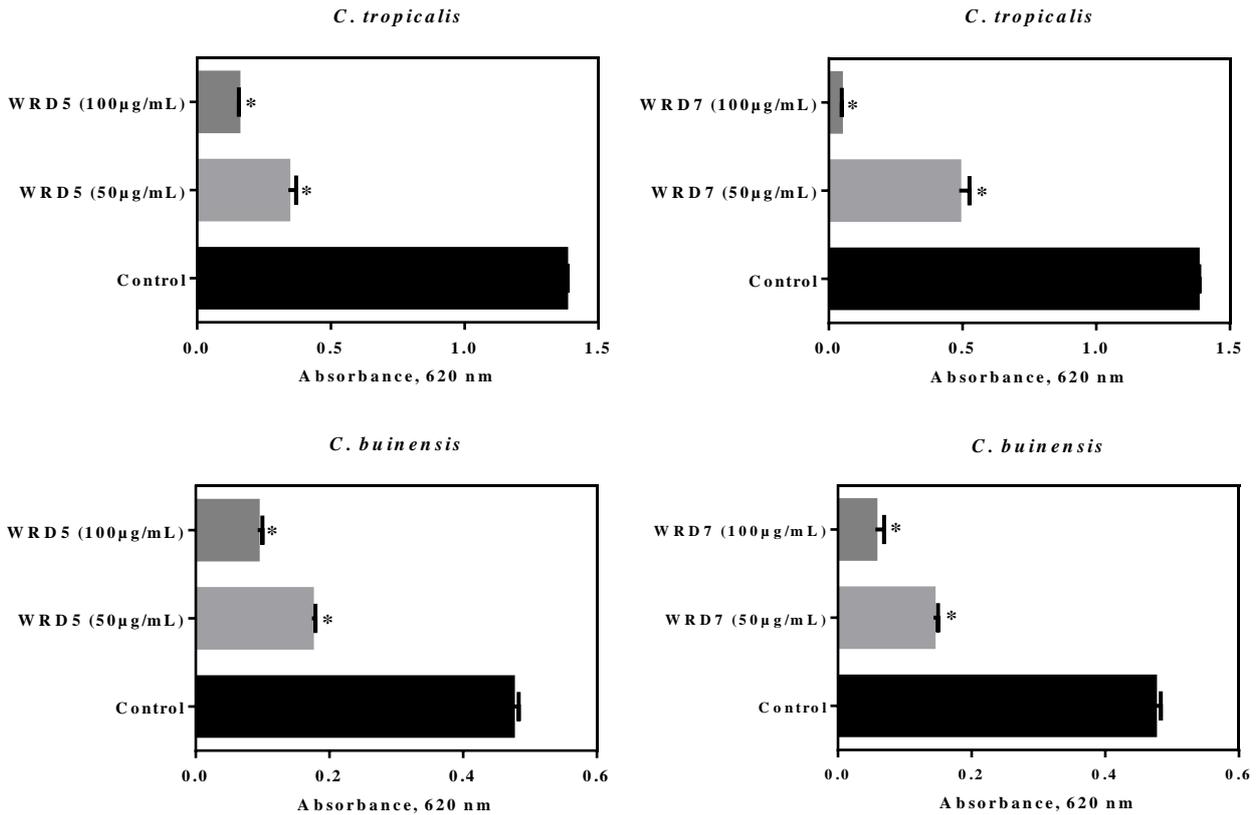


1
2
3 **Figura3.** Ultrastructure of treated and untreated *T. cruzi* epimastigotes by transmission
4 electron microscopy. A. untreated; B and C. Epimastigotes treated with WRD2 showing
5 high vacuolization of the cytoplasm (arrow); D-F. Epimastigotes treated with WRD8
6 showing nuclear degradation. N, nuclei; K, kinetoplast; Arrowhead, plasma membrane.
7 Bars: A, C, E and F, 1 μ m; B and D, 2 μ m.

8 3.2. Antifungal results

9 *Inhibition of growth of yeast cells*

11 Initially all thirteen fractions obtained from *W. azulensis* roots were tested against
12 *C. tropicalis* yeast using a single concentration of 100 μ g / mL (data not shown). All
13 fractions, except for the WRD 10 and 11 fractions, were able to cause an inhibition in the
14 growth of this yeast, however the WRD 5 and 7 fractions were those that presented the
15 greatest significant reduction of the growth, being observed an inhibition of 88.1 and 96.7
16 % respectively. Due to the high antimicrobial activity of these two fractions (WRD 5 and
17 WRD 7), these were tested again against *C. tropicalis* at a concentration of less than 50
18 μ g / mL and also against yeast *C. buinensis* at concentrations of 50 and 100 μ g / mL . We
19 observed that for both yeasts the inhibition occurred in a dose dependent manner. When
20 lowering the concentration of WRD 5 and 7 fractions to 50 μ g / mL, *C. tropicalis* cells
21 had a higher growth compared to 100 μ g / mL, causing a 75.2 and 64.5% growth reduction
22 respectively. Against *C. buinensis* cells this growth inhibition was also dose dependent,
23 where the WRD 5 fraction was able to inhibit 63.9 and 70.3% and the WRD 7 fraction an
24 80.7 and 87.7% inhibition respectively at concentrations of 50 and 100 μ g / mL (Figure
25 4).



1 **Figure 4:** Effect of fractions WRD5 and WRD7 on the growth of the yeasts *C.*
2 *tropicalis* and *C. buinensis*. The yeast cells were growth in the presence of 50 and 100
3 µg.mL⁻¹ of each fraction or absence (control). Experiments were performed in triplicate.
4 (*) Indicates significance by the One-way ANOVA test Tukey's (P<0.05), which was
5 calculated using by the absorbance values of experiment and its respective control.

6

7 *Viability*

8 WRD 5 and WRD 7 induced viability loss in all yeasts cells tested (Figure 5A e C).
9 The most susceptible species to both treatments was *C. buinensis*, with 97.61 and 92.63
10 % of viability loss to WRD 5 and WRD 7, respectively (Figure 5D). The less susceptible
11 was *C. tropicalis* with 18.75 and 82.45 % of viability loss to WRD 5 and WRD 7,
12 respectively (Figure 5B). These results indicated that inhibitory effect of to both
13 substances tested was candidacidal, however treatment with WRD 7 was more effective
14 against the two species analyzed.

15

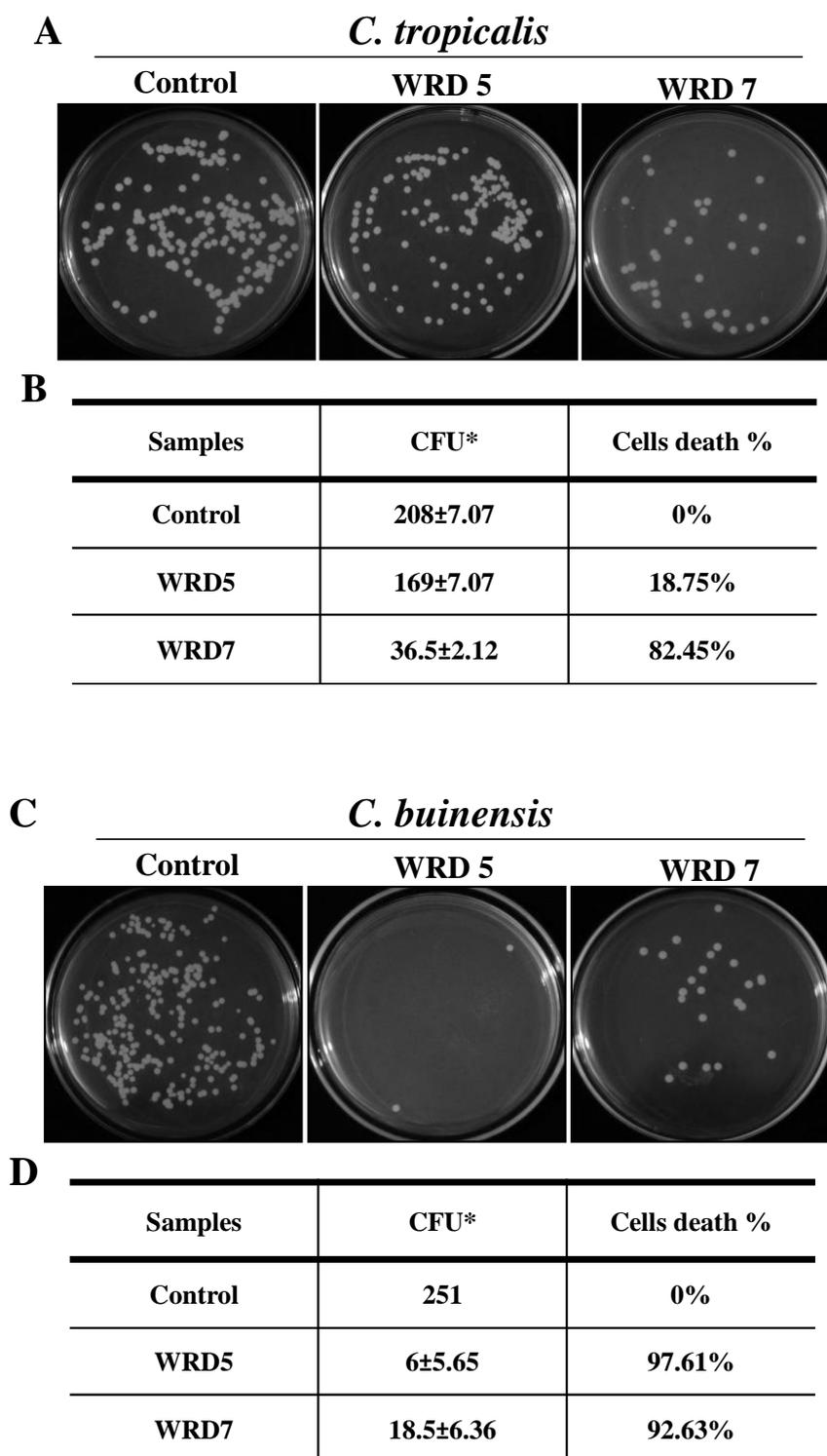
16

17

18

19

20



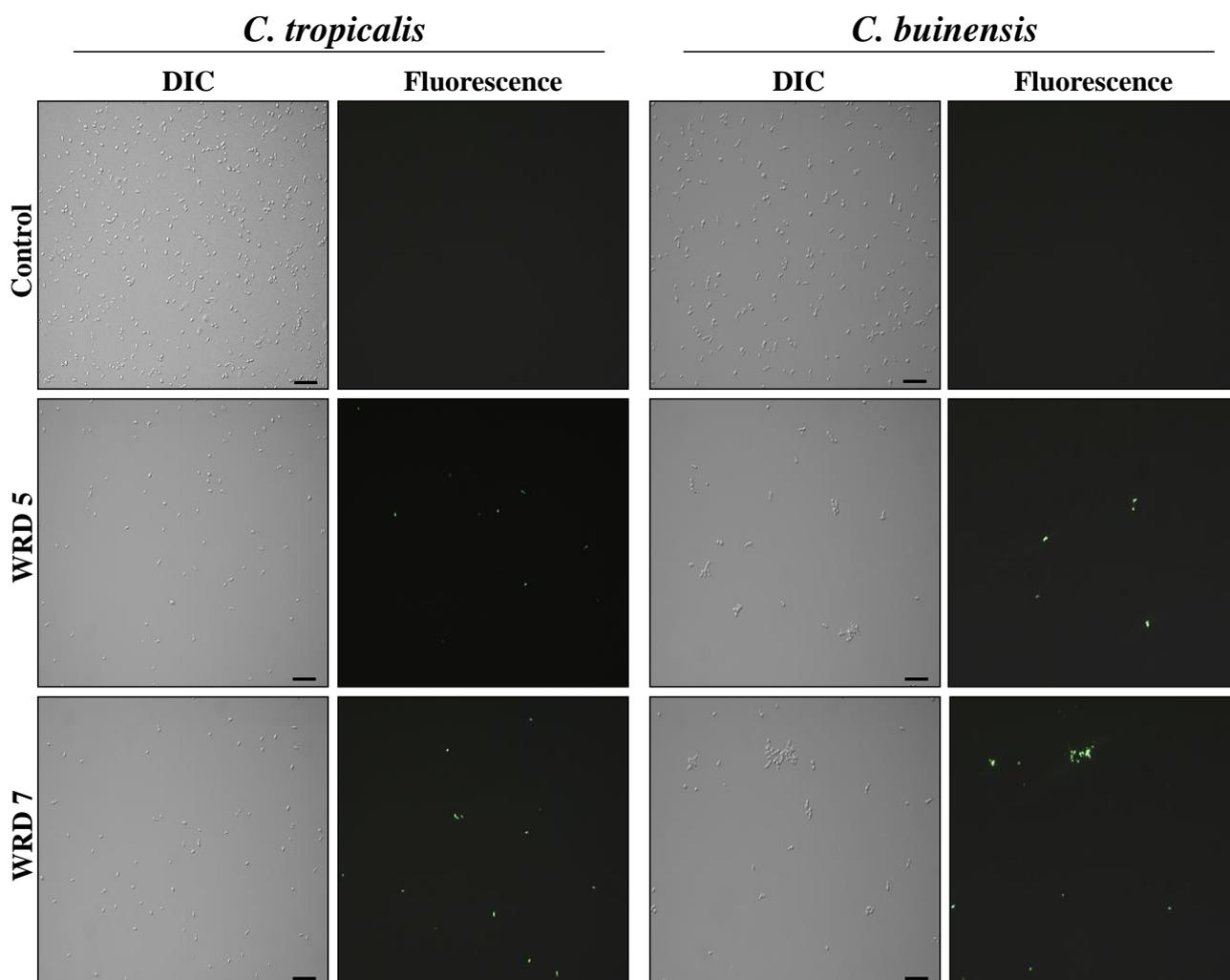
3 **Figure 5:** Lethal effect of WRD5 and WRD7 on yeasts cells of *C. tropicalis* and *C.*
 4 *buinensis*. A and C: Photographs of the Petri dishes showing the viability of *C.*
 5 *tropicalis* and *C. buinensis* after the treatment with 100 µg.mL⁻¹ of WRD5 and WRD7
 6 for 24 h, respectively. B and D: The table shows the percentage of cells death of *C.*
 7 *tropicalis* and *C. buinensis* after the treatment with 100 µg.mL⁻¹ of WRD5 and WRD7

1 for 24 h, respectively. *CFU = Colony forming unity. The experiments were carried out
2 in duplicate.

3 *Sytox green uptake assay*

4 Due to the strong inhibitory activity in yeast growth, *C. tropicalis*, and *C. buinensis*
5 cells were used for membrane permeability analysis using Sytox green dye after 24 h of
6 incubation with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of fractions WRD5 and WRD7 respectively. In Figure 6
7 fluorescent cells were observed in both yeasts tested for the two fractions tested,
8 suggesting that WRD5 and WRD7 were able to allow the entry and labeling of the probe,
9 suggesting the permeabilization of these membranes.

10



11 **Figure 6:** Membrane permeabilization assay. Images of different yeast cells after
12 membrane permeabilization assay by fluorescence microscopy using the fluorescent
13 probe Sytox green. Cells were treated with WRD5 and WRD7 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24h
14 and then assayed for membrane permeabilization. Control cells were treated only with
15 probe Sytox green. Bars 50 μm .

16

17 *Intracellular ROS in yeast cells*

1

2 Endogenous ROS production was analyzed by incubating yeasts of the genus
3 *Candida* for 24 h, incubated with 100 µg.mL⁻¹ of the WRD5 and WRD7 fractions
4 respectively for each yeast, however it was not possible to observe the ROS increase in
5 the conditions tested in both yeasts *C. tropicalis* and *C. buinensis* (data not shown).

6 **4. Discussion**

7 Several root extracts of the species *Wunderlichia azulensis* were tested against
8 epimastigotes of *T. cruzi* and yeasts of the genus *Candida*. The results were positive in
9 relation to the reduction of the growth and to the death of the causative agents of diseases
10 in humans, such as Chagas disease and candidiasis. Within the genus *Wunderlichia*, there
11 are chemical constituents such as flavonoids, triterpenes, sesquiterpene lactones and
12 sesquiterpene [3] and sesquiterpene lactones, triterpenes and polyacetylene [4,5]. Nuñez
13 et al. [3] report that sesquiterpene lactones have good anti-inflammatory activity. For the
14 species of study, lactones and sesquiterpene lactones were identified, as well as
15 triterpenes and two substances of the phytosterols class. In the class of lactones, the
16 substances dehydrobraquilaenolideo and lasiodiplodina, isolated in this work are
17 described for the family Asteraceae [20,21]. The hydrobraquilaenolide substance was also
18 isolated from the roots of *Dicomanomala* Sond. (Asteraceae), a type of herb that is widely
19 distributed in sub-Saharan Africa. This plant is reported with numerous ethnomedicinal
20 applications, including the treatment of coughs and colds, fevers, ulcers, diarrhea,
21 intestinal parasites, in wound healing and also analgesic anti-inflammatory agent [22-24].
22 In *W. azulensis*, the dehydrobraquilenenolide substance was isolated from the root
23 dichloromethane extract (WRD7-4) and the WRD7 fraction was used in both biological
24 activity tests.

25 The results of toxicological tests with dichloromethane fractions from the *W.*
26 *azulensis* plant root investigated in this study were promising. The WRD7 fraction, tested
27 on *T. cruzi* epimastigotes, showed drastic effects on parasite culture. In the literature there
28 are few studies related to antiprotozoal activity in *T. cruzi* epimastigotes, mainly related
29 to the substances isolated in the present work. However, work with other substances is
30 found within the class of sesquiterpene lactones and in tests against different pathogens.
31 As for example, artemisinin, a sesquiterpene lactone isolated from the plant of *Artemisia*
32 *annua* (Asteraceae) used to treat malaria [25]. De Souza et al. [26] show that in activity
33 tests with hexane extract of stems and branches and ethyl acetate extract of the roots of
34 *Macroptilium lathyroides* (Fabaceae) against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*
35 *aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* the results were
36 positive minimum inhibitory concentration in the presence of the compounds. In *T. cruzi*,
37 according to Ali (2002), the methanolic extract of *Gardenia lutea* caused 50% cell lysis
38 in the trypomastigote form of the parasites in 22 µg mL⁻¹, after 72 h of incubation.

39 The morphological and ultrastructural analysis of the epimastigotes submitted to
40 WRD fractions 2 and 8 revealed that in the presence of the compounds occur gradual
41 morphological changes, from the loss of cytoplasmic volume and condensation of the
42 parasite. In addition to high vacuolization of the cytoplasm and disorganization of
43 kinetoplast and microtubules, damage to the plasma membrane and nuclear degradation.

1 Alexandrino et al. [27] reported similar results, that leaf extracts from three species
2 of *Palicourea* (Rubiaceae) presented inhibitory growth potential and, consequently,
3 changes in the morphology of *T. cruzi* epimastigotes. The complete elimination was
4 reported from 100 µg / mL in the 24 h time, being positive for the extracts of the three
5 species, except for the hexane. In general, the butanolic extract of the three species was
6 the one that most eliminated the parasite after 24 hours of incubation, being the most
7 expressive result with complete elimination in the species *P. rudgeoides*. In microscopic
8 analyzes of the parasites treated with the different extracts, a loss of cytoplasmic content
9 is reported with parasite body retraction, nuclear decompacting chromatin and multiple
10 cytoplasmic vacuolations [27].

11 In general, the identified compounds of dichloromethane extracts of *W. azulensis*
12 roots are linked to the class of lactones and terpenes [30,31]. Both classes present
13 promising results in relation to the tests with *Candida* yeasts and *T. cruzi* epimastigote
14 parasite [32-34]. Compounds of sesquiterpenes and oxygenated diterpenes were the main
15 constituents of leaf essential oils (81.85% and 55.49%, respectively) and rhizomes
16 (64.3% and 52.2 %, respectively) *R. chrysotricha* and *R. nicolaioides*, whereas in *R.*
17 *breviscapa*, hydrogenated compounds were found in higher amounts in rhizomes
18 (71.94%), and in the same proportion of oxygen compounds in sheets(42.38%) were
19 described by Gevú, K.V. and collaborators [32]. When submitted to a biological activity
20 test, the essential oil extract of *R. chrysotricha* leaves reduced the parasite population of
21 *T. cruzi* in 28-59% at concentrations of 25, 100, 400 and 800 µg / mL after 24 h ; and 26-
22 53% at concentrations of 25, 100 and 400 µg / mL, with total death of the parasites at 800
23 µg / mL after 48 h [32].

24 In a bioassay against *T. cruzi* in the form of trypomastigote the sesquiterpene
25 lactones of the germacranolide classes extracted from *Lychnophora granmongolense*
26 (Duarte) Semir&Leitão-Filho (Asteraceae) showed intense activity, causing total lysis of
27 the parasites in concentrations up to 500 µg / ml, while those of the lower dose
28 guayanolide class (100 µg / ml) showed strong hemolytic activity [28,29]. The assays
29 performed on *T. cruzi* epismastigotes in this work obtained positive results at
30 concentrations of 25 µg / ml, compared with the literature showing promising results,
31 since in the majority of the studies the promising concentrations range from 100 to 800
32 µg / mL [27, 30 -34]

33 Dichloromethane extracts of leaves and fruits of different species of the families
34 Lamiaceae, Bignoniaceae, Myrtaceae, Lythraceae, Rubiaceae used in tests of antifungal
35 activity have shown positive results in the inhibition of yeast growth of the *Candida*
36 species [39-41]. Regarding the antifungal activity in the present study, all extracts tested,
37 with the exception of WRD fractions 10 and 11, were able to cause inhibition of yeast
38 growth of *Candida* using a single concentration of 100 µg / mL. Testing performed with
39 synthetic terpene substances also revealed promising results with filamentous fungus
40 *Phycomycesblakesleeanus*. In culture medium supplemented with different
41 concentrations of synthetic hydrocarbylenolide and tuberiferine sesquiterpene lactones
42 and amphotericin B (100-3 mg / mL) at the end of the 7-day incubation period, comparing
43 the weights of cultures containing the drug and synthetic lactone lactones, the reduction
44 of growth with the synthetic lactone dehydrobraquilaenolide reduced more than 50%
45 compared to the drug [38].

1 Rodrigues et al. [35] determined the antifungal activity of the extracts of several
2 species including two of the genus *Palicourea*. The aqueous and methanolic extracts of
3 *P. guianensis* and *P. corymbifera* were active against three strains of *Candida* sp., The
4 authors correlated the activity of these extracts with the possible presence of indole
5 triterpene alkaloids, since these substances are commonly found in species of family
6 Rubiaceae, whose antimicrobial activity has already been demonstrated [36, 37]. Toyang
7 et al. [45] evaluated antimicrobial activity with dichloromethane extracts of *V. guineans*
8 (Asteraceae) on bacterial and fungal strains of medical relevance, including *C. albicans*
9 and all extracts tested showed different bioactivities with minimal inhibitory concentration
10 varying between 200 and 1000 mg / ml. Although not satisfactory results for fungistatic
11 and fungistatic action.

12 Unsatisfactory tests on biological activities in preliminary tests against
13 *Cladosporium sphaerospermum* strains have also been reported [46] indicating that
14 fractions tested from other plant species, although with the same chemical polarity may
15 reveal different substances, and there is a need for further studies for isolation and
16 identification. For the fractions tested in the present work the results are promising, for
17 example, the evaluated natural products of fractions WRD 5 and WRD 7 tested in *C.*
18 *tropicalis* had a growth reduction of 75.2 and 64.5% in the concentrations of 50 and 100,
19 respectively. Against *C. buinensis* cells this growth inhibition was also dose dependent,
20 where the WRD 5 fraction was able to inhibit 63.9 and 70.3% and the WRD 7 fraction an
21 80.7 and 87.7% inhibition respectively at the concentrations of 50 and 100 µg / ml. One
22 of the expressive results was related to the cell viability of yeasts of the genus *Candida*.
23 The WRD 5 and WRD 7 fractions induced loss of viability in all yeast cells tested. The
24 species most susceptible to both treatments was *C. buinensis*, with 97.61 and 92.63% loss
25 of viability for WRD 5 and WRD 7, respectively. The least susceptible was *C. tropicalis*
26 with 18.75 and 82.45% loss of viability for WRD 5 and WRD 7, respectively. These
27 results indicated that the inhibitory effect of both substances tested was fungicidal for
28 *Candida*.

29 Studies above confirmed good activity with apolar substances, as well as isolated
30 substances in the *W. azulesis* [34-41, 45]. The dehydrated substance was taken from
31 WRD7, lasiodiplodine from WRD 5, taraxerane-type triterpene skeleton compatible with
32 those from WRD 1-4 taraxerol, all substances more nonpolar of terpenes grup. The class
33 of terpenes being the most representative influenced by photosynthesis, photoperiodic
34 modulation, seasonal and climate variation, nutritional relationships, plant growth
35 regulators and some abiotic stresses (light, moisture, salinity and temperature) [56, 57].
36 The species studied is a typical plant of Cerrado and also found in environments with
37 little availability of water and intense light. As is the Inselberg Maciço do Itaoca.

38 The antifungal activity of essential oils and different extracts of *Allium roseum*
39 (Jordan & Fourr.) (Alliaceae) has been described for various inhibition purposes
40 according to the type of solvent used for extraction [47]. Essential oils are composed of a
41 variety of different compounds, and the group of terpenes are also the majority class [33,
42 34] . For essential oils, promising results were obtained against *Fusarium solani* f. sp.
43 cucurbitae. The percentage inhibition of mycelial growth ranged from 28 to 56%
44 compared to the commercially available synthetic fungicidal compound, Benomyl
45 (69.80%). Ethyl Acetate and Chloroform extracts also showed efficacy to inhibit the

1 growth of the fungus in question, with a 36% inhibition value for each extract. In different
2 works in the literature tests of biological activity with isolated substances are morescarce
3 due to the difficulty of quantity of the natural substance or to the manufacture of a similar
4 synthetic. The sesquiterpene dehydrobraquilaenolide lactone was isolated and identified
5 from the WRD 7 fraction, as well as the lasiodiplodine from the WRD 5 fraction. Both
6 substances with a description related to the biological activity corroborated with the
7 positive results described in this study [30,31,38,44-44].

8 Positive results in inhibition of yeast growth and also antiparasitic through tests
9 with extracts of essential oils were also described, with extracts with terpene substances
10 being the most representative [32]. As for studies with essential oils, leaf extract exhibited
11 greater inhibition with 39.13%, followed by flower and stem. Inhibition of antifungal
12 growth varied from 30.43 to 52.17% for the organic extracts against *Botrytis cinerea*,
13 except for flower butane extracts, floral bud and stems and leaves that did not show effect
14 on this fungus. In contrast, the most active extracts were chloroform and ethyl acetate
15 against *B. cinerea* as well as leaf oil extract (52.50%). Another interesting inhibition was
16 with the fungus *Alternaria solani* was observed with butanolic extracts of stems and
17 leaves, where its action was as potent as of Benomyl. For *Pythium ultimum* fungus, its
18 inhibition was positive only for the butanolic extracts of buds (42.31%) and stems and
19 leaves (40.38%) [47].

20 The most significant results for the *Candida* species studied were for the
21 concentration of 1000 µg / mL of essential oil of leaves of *Renealmia chrysotricha* against
22 *C. buinenses* (56%), and extract of leaves of *R. nicolaioides* against *C. tropicalis*. The
23 significant activity for parasitic activity was with extract of rhizome oil of *R. chrysotricha*
24 against *T. cruzi*. Gevú et al. [32] suggest that the plant is a potential new source of agents
25 to aid in the control of trypanosomiasis. Essential oils are related to terpenoids, many
26 sesquiterpenes are also volatile and, like monoterpenes, are involved in defense against
27 pests and diseases. Two examples are gossypol (C15 dimer), which is associated with
28 pest resistance in some cotton varieties, and lactones, present in the Asteraceae family
29 and responsible for the bitter taste of their leaves [49]. The potential allelopathic activity
30 of sesquiterpene lactones is related to two factors, the presence of certain functional
31 groups, such as the presence of the α -methylene- γ -butyrolactone group, and the different
32 spatial arrangement that the molecule can adopt [50].

33 The dehydrobraquilenolide substance, isolated from the WRD 7 fraction,
34 classified in the class of lactones, is reported by Becker (2011) in structure-activity
35 relationship studies. Exocyclic methylene residues in both lactone and A-ring appear to
36 be responsible for the observed anti-malarial activity [30]. This methylenol lactone
37 moiety is absent in the antimalarial drugs Artemisinin, indicating a different mode of
38 action for artemisinins. In the present work the result for the strong inhibition of yeast
39 growth of the *Candida* species may be structural damage results in the plasma membrane,
40 since the experiments permeability through the use of Sytox Green dye after 24 h
41 incubation with 100 µg.mL⁻¹ of the WRD5 and WRD7 fractions revealed positive results
42 from the green fluorescence in both yeasts tested for the two fractions. Studies on changes
43 in the fluidity of fungal membranes caused by secondary metabolites are important tools
44 to elucidate the mechanisms of action between fungi and plants, contributing also to work
45 related to pharmacology. In tests with secondary metabolites of phenolic origin such as

1 a-chaconine of the plant *S. tuberosum* L (Solanaceae) [51], and of terpenoids like
2 carvacrol of the plant *O. vulgare* (Lamiaceae) exhibit potent antifungal activity against a
3 wide range of pathogens , including *Candida albicans* [52]. In tests with addition of
4 caffeic acid the a-chaconine, asolanine or solanidin extracted from the plant *S. tuberosum*
5 significantly diminished the membrane polarization for the fungi *F. graminearum*, *M.*
6 *Plumbeus* and *Al. Alternata*, of five strains. The results partially explained the synergistic
7 effect between caffeic acid and α -chaconine. Synergistic antifungal activity between the
8 secondary metabolites and the observed caffeic acid is probably related as a defense
9 mechanism of the plant against fungi. [51].

10 Rao and collaborators (2010) describe different possible profiles for the positive
11 effect of the fungicide action on species of *C. albicans* already seen in the literature.
12 Using the fungus *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism, when incubated with
13 the substance carvacrol was observed temporal changes in metabolic activity, as pH
14 changes were long lasting and followed, homeostasis was hypersensitive to the toxicity
15 of carvacrol. The genomic profile at 15 minutes of exposure revealed a robust
16 transcriptional response to carvacrol, much resembling calcium stress. The results point
17 to the activation of specific signaling pathways of cellular interaction with carvacrol,
18 rather than an unspecific lesion of membranes [52]. For *W. azulensis* compounds,
19 preliminary experiments using the Sytox green marker in *Candida* yeasts revealed
20 positive results observed from the green fluorescence in both yeast species supplemented
21 with the terpene class containing fractions identified in the present work. It is suggested
22 that in carrying the extravasation of cytoplasmic content there is a whole change in
23 cellular homeostasis, being an indication of mechanism of action for destabilizing the
24 connections of molecules in the cell membrane, as well as altering the cytoplasmic
25 functions as described by Rao and other authors [51- 53].

26 However, work on fungicidal and fungistatic activity with secondary metabolites
27 of species of the genus *Wunderlichia* is scarce in the literature. As there are also no reports
28 for antiparasitic action. The present work describes the existence of four new substances
29 for the species in question, as well as promising results in biological activity tests, such
30 as the identification of the terpenic substances isolated from the fractions tested in the
31 pathogens already seen in the literature with a description of biological activity [30-34,
32 38, 42-44].

33 It can be concluded that the compounds tested may play a valuable role in biological
34 action, toxicological results for *T. cruzi* and *Candida* species are promising, but further
35 in vivo toxicity studies are required to obtain in-depth knowledge with respect to the
36 desired biological activity, and systemic toxicity [30]. Besides chemical tests are
37 necessary to elucidate the mechanism of action of these molecules against the pathogen.
38 This represents the first preliminary report on antiparasitic and fungicidal activity for *W.*
39 *azulensis*. From the above studies, we conclude that traditional plants may represent new
40 sources of antimicrobials with stable and biologically active components that can
41 establish a scientific basis for the use of plants in modern medicine [53]. However,
42 complementary studies, such as synergism, toxicology and mechanism of action, must be
43 carried out in order to effectively use medicinal products.

44

1 Acknowledgments

2 The authorsthanksthe Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
3 (CAPES) for granting a scholarship. The authorswouldliketothankthe Conselho Nacional
4 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) andthe Fundação de Amparo à
5 Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) for their financial support. This study was part of
6 the first author's PhD thesis to the UniversidadeEstadual do Norte Fluminense Darcy
7 Ribeiro (UENF).

8

9 Supporting Information

10

11 Supporting information accompanies this paper on <http://www.acgpubs.org/RNP>

12

13 ORCID

14

15 Fernanda Gomes Trindade:

16 Gabriel B. Taveira: [0000-0002-1733-3034](https://orcid.org/0000-0002-1733-3034)

17 Laís P. Carvalho: [0000-0002-3857-5462](https://orcid.org/0000-0002-3857-5462)

18 Almir Ribeiro de Carvalho Junior

19 Vinícius Fernandes Moreira

20 Valdirene M. Gomes: [0000-0003-4145-428X](https://orcid.org/0000-0003-4145-428X)

21 Ivo Jose Curcino Vieira [0000-0002-2724-0106](https://orcid.org/0000-0002-2724-0106)

22 Edésio J.T. Melo: [0000-0003-4210-7749](https://orcid.org/0000-0003-4210-7749)

23 Maura Da Cunha: [0000-0003-1078-3742](https://orcid.org/0000-0003-1078-3742)

24 References

25 [1] G.M. Barroso, B. Maguire (1973). A review of the genus *Wunderlichia* (Mutisiae,
26 Compositae). *Rev. Bras. Biol.*, 33, 379-406.

27 [2] F. Feres, M.I. Zucchi, A.P. De Souza, M. Amaral and V. Bittrich(2009).
28 Phylogeographic studies of Brazilian" campo-rupestre" species: *Wunderlichiamirabilis*
29 Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas.* 22, 17-26.

30 [3] C.V. Nuñez, F.M. Zacheu, E. Pinto, N.F. Roque, P. Colepicolo, and M.R.P.L.
31 Brigagão (2003). Sesquiterpene lactone from *Wunderlichiacrulsiana* inhibits the
32 respiratory burst of leukocytes triggered by distinct biochemical pathways. *Life sciences*
33 73, 2161-2169.

34 [4] F. Bohlmann, C.Zdero, H. Robinson and R.M. King (1981). Naturally-occurring
35 terpene derivatives 337. Modified eudesmanolides and other sesquiterpene lactones from
36 *Wunderlichiamirabilis* and *Actinoseris-polymorpha*, *Phytochemistry* 20, 1631-1634.

- 1 [5] F. Bohlmann, G.W. Ludwig, J. Jakupovic, R.M. King, H. Robinson (1984). New
2 spirosesquiterpenelactones, germacranolides, and eudesmanolides from *Wunderlichia*
3 *mirabilis*. *Liebigs Annalen der Chemie* 2, 228–239.
- 4 [6] C. Jeffrey (1967). Notes on Compositae II. The Mutisieae in east tropical Africa.
5 *Kew Bulletin* 21: 177-223.
- 6 [7] A.L. Cabrera (1977). Mutisieae-Systematic review, In: The Biology and
7 Chemistry of the Compositae, ed: V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Turner. vol. 2.
8 Academic Press, London. Pp.1039-1066
- 9 [8] K. Bremer (1994). Asteraceae- Cladistic & Classification. Timber press, Portland.
- 10 [9] F. Feres, M. I. Zucchi, A. P. de Souza, M. D. C. E. do Amaral, and V. Bittrich
11 (2009). Phylogeographic studies of Brazilian “campo-rupestre” species: *Wunderlichia*
12 *mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas*, 22(1), 17-26.;
- 13 [10] N. Roque, and J. R. Pirani, 1997. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais:
14 Compositae - Barnadesieae e Mutisieae. *Boletim de Botânica da Universidade de São*
15 *Paulo* 16:151-185.
- 16 [11] Hind & Semir 1998)
- 17 [12] T.G. Santos, R.A.Rebello, E.M.Dalmarco, A. Guedes, A.L. De Gasper, A.B. Cruz,
18 A.P.Schmit, R.C.B. Cruz, M.Steindel, S.S. Semenya and A. Maroyi (2012) Medicinal
19 Plants Used by the Bapedi Traditional Healers to Treat Diarrhoea in the Limpopo
20 Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 144, 395-401.
- 21 [13] C.J.Alexopoulos, C.W.E. Mins and M. Blackwell (1996). Introductory Mycology.
22 4th ed. John Wiley & Sons Inc., New York.
- 23 [14] A.J.R. Rassi, A. Rassi and J. Marcondes De Rezende (2012). American
24 trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 26:275-91.
- 25 [15] W.L. Barbosa (2001). Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de
26 extratos vegetais. Revista Científica da UFPA, Edição revisada, Belém/PA.
- 27 [16] L.P. Carvalho, M.A.G.B.Gomes, B.S. Rocha, R.R.Oliveira, E.Maria, J. Edmilson
28 and E.J.T. Melo (2014). Anti-Parasite effects of new Thiosemicarbazones and their
29 Products Thiazolidinone including Cellular aspects of Intracellular Elimination of
30 *Trypanosoma Cruzi* in Vitro. *J Dev Drugs*. 3, 1-7.
- 31 [17] W.F. Broekaert; F.R.G. Terras, B.P.A. Cammue and J. Vanderleyden (1990). An
32 automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*.
33 69, 55-60.
- 34 [18] K. Thevissen, F. R. Terras & W. F. Broekaert, (1999). Permeabilization of fungal
35 membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental*
36 *Microbiology*, 65(12), 5451-5458.
- 37 [19] E.O. Mello, S.F.F. Ribeiro, A.O. Carvalho, I.S. Santos, M. DA cunha, C. Santa-
38 catarina and V.M. Gomes (2011). Antifungal Activity of PvD1 Defensin Involves Plasma
39 Membrane Permeabilization, Inhibition of Medium Acidification, and Induction of ROS
40 in Fungi Cells. *Curr Biol* 62, 1209–1217.
- 41 [20] Y. Higuchi, F. Shimoma, R. Koyanagi, K. Suda, T. Mitsui, T. Kataoka, K. Nagai and
42 M. Ando (2003) Synthetic Approach to Exo-Endo Cross-Conjugated Cyclohexadienones
43 and Its Application to the Syntheses of Dehydrobrachylaenolide,
44 Isodehydrochamaecynone, and Trans Isodehydrochamaecynone. *J Nat Prod*. 66, 588-594.
- 45 [21] M. Rademeyer, F.R. van Heerden, M.M. van der Merwe (2009).
46 Dehydrobrachylaenolide: An Eudesmane-Type Sesquiterpene Lactone. *Acta Cryst.* E65,
47 o196.
- 48 [22] T.L. Shale, W.A. Stirk and J. Van. Staden, (1999). Screening of Medicinal Plants
49 Used in Lesotho for Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Activity *J Ethnopharmacol*.
50 67, 347–354.

- 1 [23] V. Steenkamp, E. Mathivha, M.C. Gouws and C.E.J. van Rensburg, (2004). Studies
2 on Antibacterial, Antioxidant and Fibroblast Growth Stimulation of Wound Healing
3 Remedies from South Africa. *J Ethnopharmacol.* 95, 353–357.
- 4 [24] S. S. Semenya & A. Maroyi (2012). Medicinal plants used by the Bapedi traditional
5 healers to treat diarrhoea in the Limpopo Province, South Africa. *Journal of*
6 *ethnopharmacology*, 144(2), 395-401.
- 7 [25] S. Hoet, F. Opperdoes, R. Brun and J. Quetin-Leclercq (2004). Natural products
8 active against African trypanosomes: a step towards new drugs. *NatProd Rep.*, 21, 353-
9 364.
- 10 [26] L.M. De Sousa, R.W.D.S. Gois, T.L. Lemos, Â.M. Arriaga, M. Andrade-Neto,
11 G.M. Santiago, R. Braz-Filho, J.G.M. Costa, F.F.G. Rodrigues (2013). Constituintes
12 químicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Macroptilium lathyroides* (L.)
13 Urb. (Fabaceae). *Quim Nova.* 36, 1370-1374.
- 14 [27] C.R. Alexandrino, L.P. Carvalho, E.J.T. Melo, E. O. Mello, V.M. Gomes, C.H.
15 Callado and M. Da Cunha (2016). Bioactivity of leaf extracts from species of *Palicourea*
16 (Rubiaceae) on *Trypanosoma cruzi*, *Candida* sp. and *fungus solani*. *European Journal*
17 *of Biomedical and Pharmaceutical sciences.* 3, 489-496.
- 18 [28] R. Takeara, S. Albuquerque, N.P. Lopes and J.L.C. Lopes, (2003).
19 Trypanocidal activity of *Lychnophorastaavioides* Mart. (Veroniceae,
20 Asteraceae). *Phytomedicine.* 10, 490-493.
- 21 [29] C.F.F. Graef, W. Vichnewski, G.E.P. Souza, J.L.C. Lopes, S. Albuquerque and W.R.
22 Cunha (2000). A study of the trypanocidal and analgesic properties from
23 *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir and Leitão Filho. *Phytother Res* 14, 203–
24 206
- 25 [30] J. V. Becker, M. M. Van der Merwe, A. C. van Brummelen, P. Pillay, B.
26 G. Crampton, E. M. Mmutlane, C. Parkinson, F. R. V. Heerden, N. R. Crouch, P. J. Smith,
27 D. T. Mancama and J. V. Maharaj (2011). In vitro anti-plasmodial activity of
28 *Dicoma anomala* subsp. *gerrardii* (Asteraceae): identification of its main active
29 constituent, structure-activity relationship studies and gene expression profiling. *Malaria*
30 *journal*, 10(1), 295.
- 31 [31] E. Rodriguez, G.H.N. Towers and J.C. Mitchell (1976). Biological activities of
32 sesquiterpene lactones. *Phytochemistry.* 15, 1573-1580.
- 33 [32] K.T. Gevú, H.R.P. Lima, I.A. Neves, E.O. Mello., G.B. Taveira, L.P. Carvalho, G.
34 Mário, M.G. Carvalho, V.M. Gomes, E.J.T. Melo, M. Da Cunha, (in press)
35 (2018). Chemical Composition and Anti-*Candida* and Anti-*Trypanosoma cruzi* Activities
36 of Essential Oils from the Rhizomes and Leaves of Brazilian Species of *Renealmia* L. fil.,
37 *Rec. Nat. Prod* DOI: <http://doi.org/10.25135/rnp.105.18.08.125>
- 38 [33] F.C. Klopell, M. Lemos, J.P.B. Sousa, E. Comunello, E.L. Maistro, J.K. Bastos
39 and S.F. De Andrade (2007). Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil
40 of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), *Zeitschrift fur Naturforsch. Sect. C. J.*
41 *Biosci.* 62, 537-542.
- 42 [34] M. Soković; P.D. Marin; D. Brkić and L.J.L.D. Griensven (2007). Chemical
43 composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against
44 human pathogenic bacteria, *Glob. Sci. Books* 1, 220-226.
- 45 [35] K. Rodrigues, D.F. Ramos, L.L. Carrion, L.M.C. Cursino, M.F. Jefreys, L.S.
46 Pedroza, M.I.C. Osório, J.L. Oliveira, J.I.A. Andrade, C.C. Fernandes, C.V. Nunez
47 and P.E.A. Silva (2014) Antifungal activity of Brazilian amazon plants extracts against
48 some species of *Candida* SPP, *Int. J. Phytopharmacol.* 5, 445-453.
- 49 [36] A.D.L. Figueiredo, K.G.L. Bustamante, M.L. Soares, F.C. Pimenta, M.T.F. Bara,
50 T.S. Fiuza, L.M.F. Tresvenzol and J.R. De Paula (2009) Avaliação da atividade

- 1 antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis*
2 Gomez (Rubiaceae). *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* 30, 193–196.
- 3 [37] R.K. Nunes. (2012). Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana
4 do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. *Quim. Nova.*
5 35, 477-481.
- 6 [38] J. Justicia, L.A. Cienfuegos, R. E. Estevez, M. Paradas, A.M. Lasanta, J.L.Oller,
7 A. Rosales, J.M Cuervaand J.E. Oltra (2008). Ti-catalyzed transannular cyclization of
8 epoxygermacrolides. Synthesis of antifungal (+)-tuberiferine and (+)-
9 dehydrobrachylaenolide. *Tetrahedron*, 64, 11938-11943.
- 10 [39] J.F. Höfling, P.C. Anibal, G.A. Obando-Pereda, I.A. Peixoto, V.F. Furletti, M.A.
11 FoglioandR.B. Gonçalves (2010). Antimicrobial potential of some plant extracts against
12 *Candida* species. *Braz J Biol.*, 70, 1065-1068.
- 13 [40] T. Alcerito, F.E.Barbo, G. Negri, D.Y.A.C. Santos, C.I.Meda, M.C.C. Young, D.
14 Chávez and C.T.T. Blatt(2002). Folicular epicuticular wax of Arrabidaeabrachypoda:
15 flavonoids and antifungal activity. *BiochemSyst Ecol.* 30, 677-683.
- 16 [41] M. Chandrasekaran and V. Venkatesalu (2004). Antibacterial and antifungal
17 activity of *Syzygiumjambolonum* seeds. *JEthnopharmacol.* 91, 105-108.
- 18 [42] S. D. Kanchan&Jayachandra. (1980). Allelopathic effects of
19 *Partheniumhysterophorus* L. Part IV. Identification of inhibitors. *Plant Soil* 55:67–
20 75.A.K.
- 21 [43] Picman (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol.*
22 14, 255-281.
- 23 [44] N. Sultana, A. J. Afolayan and P. J. Houghton (2003). Bioactive sesquiterpene
24 lactones isolated from the shoots of *Arctotisarctotooides*. *South African journal of botany.*
25 69, 158-160.
- 26 [45] N.J. Toyang, E.N. Ateh, J. Keiser, M. Vargas, H. Bach, P. Tane, L.B. Sondengam,
27 H. Davis, J. Bryant and R. Verpoorte (2012) Toxicity, antimicrobial and anthelmintic
28 activities of *Vernonia guineensis*Benth. (Asteraceae) crude extracts. *J*
29 *Ethnopharmacol.* 144, 700-704.
- 30 [46] C.V. Nuñez (2000). Terpenos de *Wunderlichia crulsiana* e *Mikania* sp. nov. Tese
31 de doutorado. (Doutorado em Ciências Químicas). Instituto de química da Universidade
32 de São Paulo (USP)/SP, Brasil.
- 33 [47] L. S.Rouis-Soussi, A. El Ayeab-Zakhama, A. Mahjoub, G. Flamini, H. B.
34 Jannet&F. Harzallah-Skhiri, (2014). Chemical composition and antibacterial activity of
35 essential oils from the *Tunisian Allium nigrum* L. *EXCLI journal*, 13, 526.
- 36 [48] M.Torrent,, Pulido, D., Rivas, L., &Andreu, D. (2012). Antimicrobial peptide
37 action on parasites. *Currentdrugtargets*, 13(9), 1138-1147.
- 38 [49] Grusak, M. A. (2000). Strategies for improving the iron nutritional quality of seed
39 crops: lessons learned from the study of unique iron-hyperaccumulating pea
40 mutants. *PisumGenetics*, 32, 1-5.
- 41 [50] F. A. Macias, J. C. G. Galindo, G. M. Massanet. (1992) Potential allelopathic
42 activity of several Sesquiterpene Lactona Models. *Phytochemistry*, v. 31, n.6, p. 1969-
43 1977.
- 44 [51] A. F. Sánchez-Maldonado, A. Schieber & M. G. Gänzle (2016). Antifungal
45 activity of secondary plant metabolites from potatoes (*Solanum tuberosum* L.):
46 Glycoalkaloids and phenolic acids show synergistic
47 effects. *Journalofappliedmicrobiology*, 120(4), 955-965.
- 48 [52] A. Rao, Y. Zhang, S. Muend&R. Rao (2010). Mechanism of antifungal activity of
49 terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR
50 pathway. *Antimicrobialagentsandchemotherapy*, 54(12), 5062-5069.

- 1 [53] H. Hussain, A. Badawy, A. Elshazly, A. Elsayed, K. Krohn, M. Riaz & B. Schulz
2 (2011). Chemical constituents and antimicrobial activity of *Salix subserrata*. Records of
3 Natural Products, 5(2), 133.
- 4 [54] S. B. Mahato & A. P. Kundu (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic
5 triterpenoids—a compilation and some salient features. phytochemistry, 37(6), 1517-
6 1575.
- 7 [55] V. S. P. Chaturvedula, I. Prakash (2012) Isolation of Stigmasterol and β- Sitosterol
8 from the dichloromethane extract of *Rubussuavissimus* International Current
9 Pharmaceutical Journal, V.1, n. 9, p. 239-242.
- 10 [56] N. S. Sangwan; A.H.A. Farooqi; F. Shabih and R.S. Sangwan (2001). Regulation of
11 essential oil production in plants, *Plant Growth Regulation* 34, 3–21.
- 12 [57] H.R.P. Lima; M.A.C. Kaplan and A.V.M. Cruz (2003). Influência dos fatores abióticos na
13 produção e variabilidade de terpenoides em plantas, *Floresta e Ambiente* 10(2), 71–77.

14

A C G
publications

© 201X ACG Publications

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

1 **Supporting Information**

2 *Rec. Nat. Prod.* X:X (201X) XX-XX

3 **The antifungal and antiparasitic activity of the roots**
4 **from *Wunderlichia azulensis* Maguire & G. M. Barroso**
5 **(Asteraceae)**

6
7
8 **Fernanda Gomes Trindade¹, Gabriel Taveira², Laís Pessanha de**
9 **Carvalho¹, Almir Ribeiro de Carvalho Junior³, Vinícius Fernandes**
10 **Moreira³, Valdirene Moreira Gomes², Ivo Jose Curcino Vieira³,**
11 **Raimundo Braz-Filho³, Edésio José Tenório de Melo¹, Maura Da**
12 **Cunha^{1*}**

13
14 ¹*Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia*
15 *(CBB);* ²*Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, CBB;*
16 ³*Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciência e Tecnologia (CCT);*
17 *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos*
18 *Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil*

19 Table of Contents	Page
20 S1:	3
21 S2:	4
22 S3:	5 and 6
23 S4:	6 and 7
24 S5:	8
25 S6:	9
26 S7:	10

* Corresponding author: E-Mail: maurauenf@gmail.com; Phone:055-22-27397263

1	S8	11
2	S9	12
3	S10	13
4	S11	14
5	S12	15
6	S13	16
7	S14	17
8	S15	18
9	S16	19
10	S17	20
11	S18	21
12	S19	22
13	S20	23
14	S21	24
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		

1 **S1.** ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) data for **1** [20].

C	HSQC		HMBC		Literatura
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
3	188.30	-		H-1; 2H-15	187.7
4	140.43	-	H5; H-15a	H-2	140.4
10	40*	-	H-5; 3H-14		39.7
11	138.20	-	H-13a		1348.1
12	169.98	-		2H-13	170.0
CH					
1	158.43	6.82 (d, 9.9)		3H-14	158.4
2	127.55	6.04 (d, 9.9)			127.5
5	52.61	3.02 (dt, 10.8)		H-9a; 3H-14; 2H-15	52.6
6	79.19	4.12 (t, 10.8)	H-5		79.1
7	49.48	2.64 (m)	H-8a	H-9a; 2H-13	49.4
CH₂					
8	21.22	2,15 (m), 1.80 (m)	H-9b		21.1
9	36.08	1,90 (m), 1.82 (m)	H-8b	H-1	36.0
13	117.73	6.15 (d 3.2) 5.47 (d, 3.2)			117.7
15	122.36	6.28 (d, 1.1) 5.73 (d, 1.1)			122.3
CH₃					
14	19.68	1.06 (s)		H-9b	19.6

2
3
4
5
6

1 **S2.** ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) data for **2** [26]

HSQC			HMBC		Literatura
C	δ _c	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	169.2	-			169.4
12	157.9	-			158.2
14	157.9	-	H-13	MeO-14	157.9
15	117.2	-		2H-10; H-11; H-13	117.6
16	142.9	-	2H-10	H-9	143.2
CH					
3	72.4	5.29 (m)	3H-17		72.6
11	108.4	6.24 (sl)		2H-10; H-13	108.58
13	97.0	6.25 (sl)		H-11	97.2
CH₂					
4	32.3	1.94 (m); 1.64 (m)		3H-17H	32.6
5	21.3	1.50 (m)			21.6
6	24.1	1.45 (m)			24.4
7	26.4	1.35 (m)			26.6
8	25.4	1.63 (m); 1.35 (m)			25.6
9	30.1	1.63 (m); 1.35 (m)	2H-10		30.3
10	30.4	2.65 (m); 2.48 (m)		H-11	30.6
CH₃					
17	19.5	1.34 (d, 6.3)			19.7
MeO	55.8	3.72 (s)			56.00

2

3

4

5

6

7

8

9

1 **S3.** ^1H NMR (500 MHz, Piridine- d_5) and ^{13}C NMR (125 MHz, Piridine- d_5) data for **3** [54]

		HSQC		HMBC	Literatura
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
4	38.91				39.1
8	38.9				38.9
10	37.49	-			37.9
13	37.76	-	3H-27		37.9
14	157.97	-		H-16b; 3H-26; 3H-27	158.1
17	38.20	-			38.1
20	29.74	-	3H-29; 3H-30		29.0
1'	170.45	-	3H-2'		-
CH					
3	80.54	4.66 (dd, 11.6, 4.8)		3H-23; 3H-24	79.2
5	55.42	0.80		3H-23; 3H-24; 3H-25	55.7
9	48.84	1.02		3H-25; 3H-26	48.9
15	116.97	5.61 (dd, 8.0, 3.2)	H-16b		117.0
18	49.01	1.40		3H-27; 3H-28	49.4
CH₂					
1	37.64	1.46, 1.35		3H-25	38.1
2	23.57	1.10, 1.00			27.3
6	18.61	1.50, 1.40			19.0
7	35.07	1.52, 1.50			35.3
11	17.50	1.53, 1.48			17.7
12	41.15	2.01 (m), 1.35 (m)		3H-27	35.9
16	37.64	2.02 (m), 1.68 (m)		3H-28	36.9
19	36.63	1.45, 1.00		3H-29; 3H-30	41.4
21	33.64	1.40, 1.30		3H-29; 3H-30	33.9
22	33.16				33.2
CH₃					
23	27.77	0.93 (s)		3H-24	28.1

24	16.59	0.92 (s)	3H-23	15.6
25	15.31	0.94 (s)		15.6
26	29.79	1.00 (s)		30.1
27	25.84	1.11 (s)		26.0
28	29.79	0.92 (s)		30.1
29	33.17	1.03 (s)		33.5
30	21.22	1.01 (s)		21.5
2'	20.92	2.07 (s)		-

1

2 **S4.** ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) data for **4** and **5** [55].

	4	5	Mo-1	Mo-2
	δC	δC	δC	δC
C				
5	140,75	140,75	140,9	141,1
10	36,52	36,52	36,7	36,6
13	42,30	42,30	42,6	42,4
CH				
3	71,84	71,84	72,0	72,1
6	121,75	121,75	121,9	121,8
8	31,90	31,90	32,1	31,8
9	50,14	50,14	50,3	50,2
14	56,87	56,87	56,9	56,8
17	55,94	55,94	56,3	56,2
20	38,83	38,83	36,3	40,6
22	-	138,36	-	138,7
23	-	129,26	-	129,6
24	45,82	45,82	46,1	46,1
25	31,90	31,90	29,4	29,6
CH₂				
1	37,25	37,25	37,5	37,6
2	31,66	31,66	31,9	32,1

4	42,22	42,22	42,5	42,4
7	34,13	34,13	32,1	31,8
11	21,08	21,08	21,3	21,5
12	39,68	39,68	39,9	39,9
15	24,32	24,32	26,3	24,4
16	28,96	28,96	28,5	29,3
22	31,95	-	34,2	-
23	27,24	-	26,3	-
28	24,38	24,91	23,3	25,4

CH₃

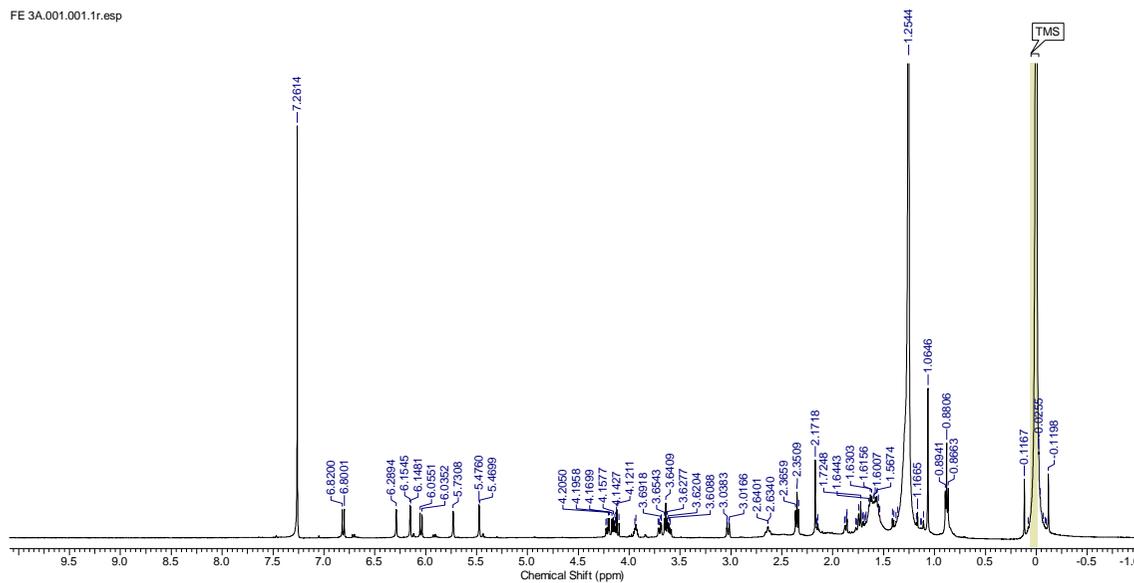
18	12,29	12,29	12,0	12,2
19	19,43	19,43	19,0	18,9
21	18,79	20,23	19,2	21,7
26	20,15	21,23	20,1	20,2
27	19,85	19,85	19,6	19,8
29	11,88	11,88	12,2	12,1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

1
2
3
4
5
6
7

FE 3A.001.001.1r.esp

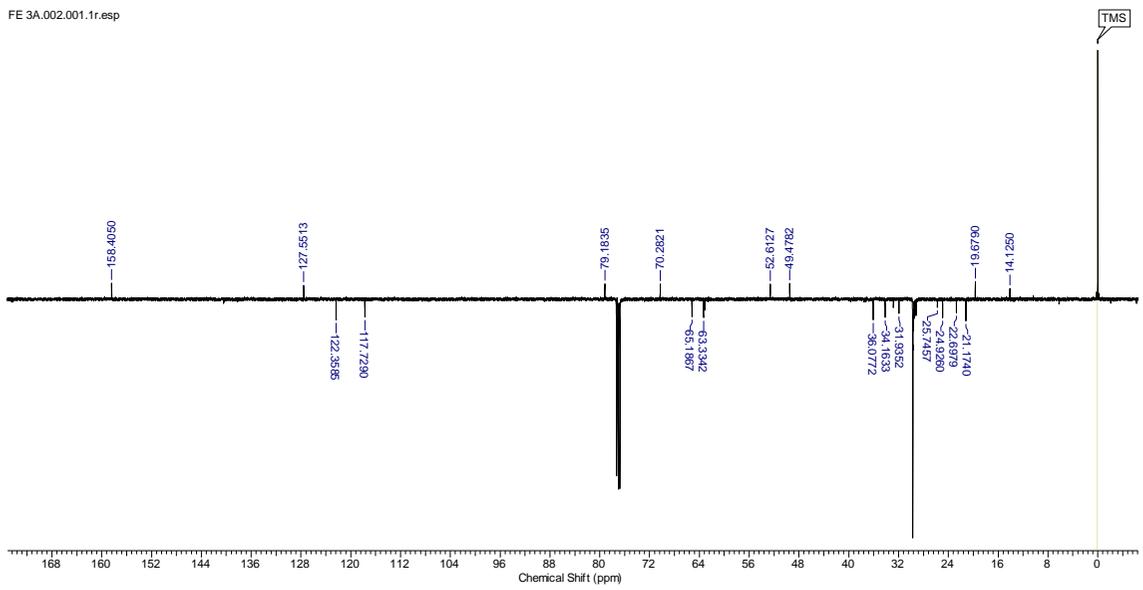
S5. ^1H -NMR (500 MHz,



CDCl_3) spectrum for **1**.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

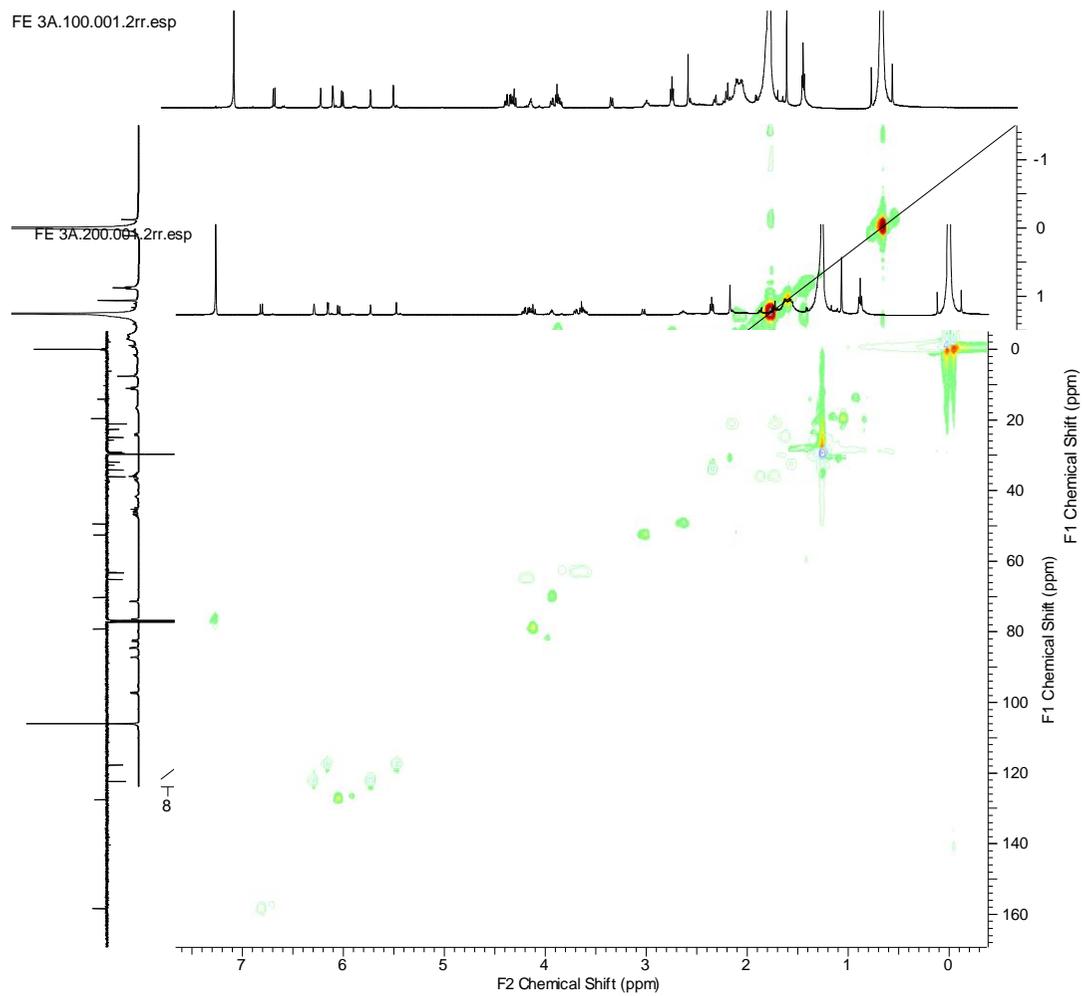
S6. ¹³C-NMR (125 MHz,



CDCl₃) spectrum of the **1**.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

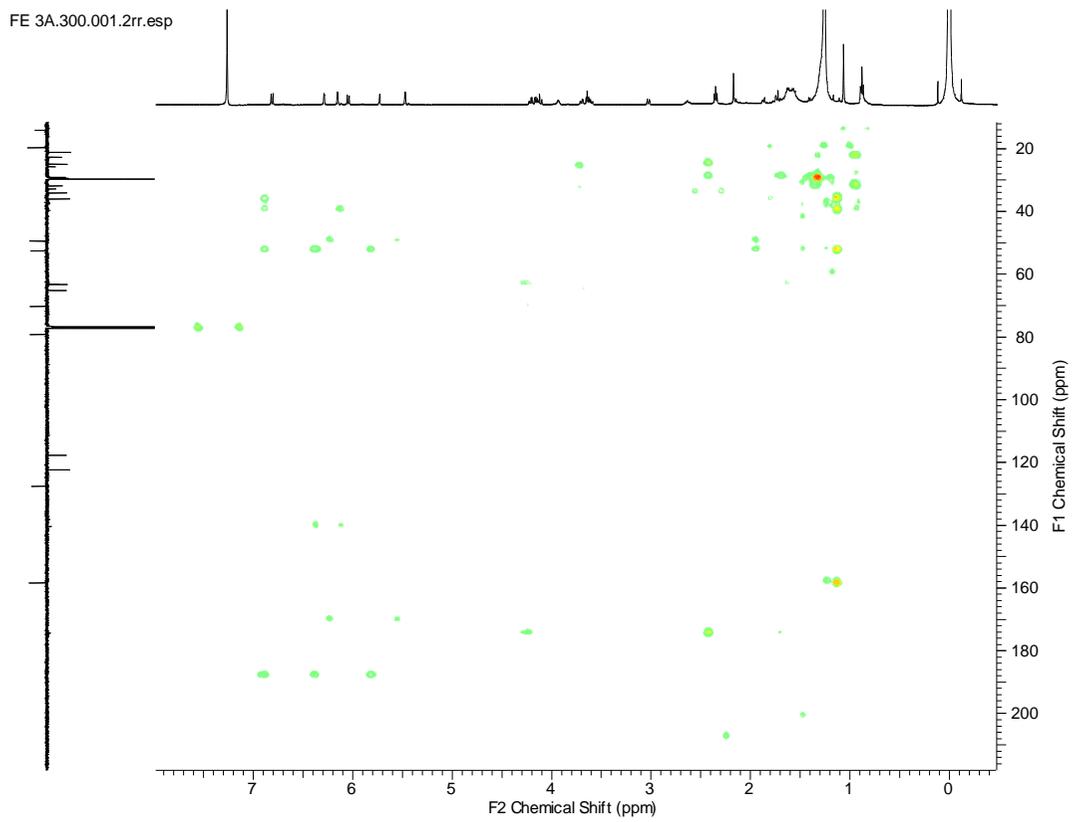
S7. ^1H - ^1H -COSY spectrum for **1**.

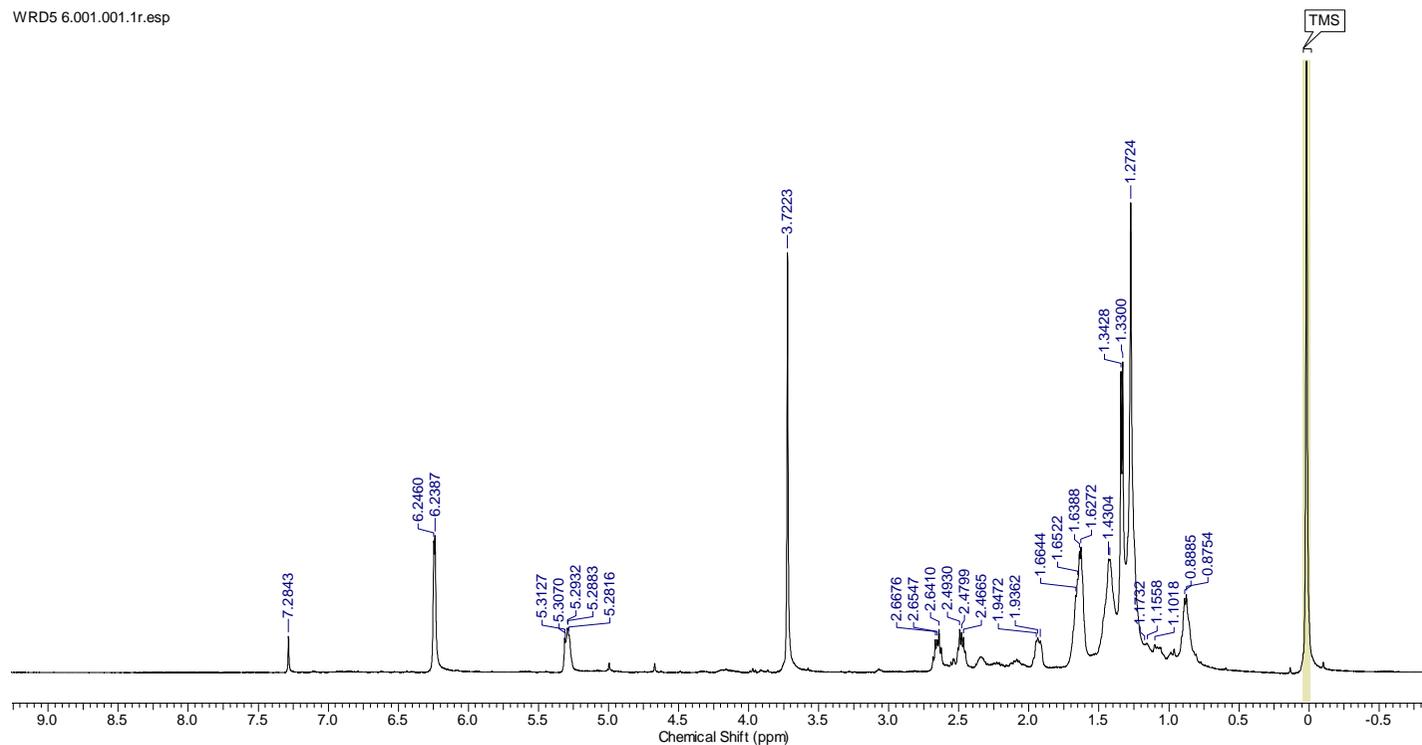


S8. HSQC spectrum for **1**.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

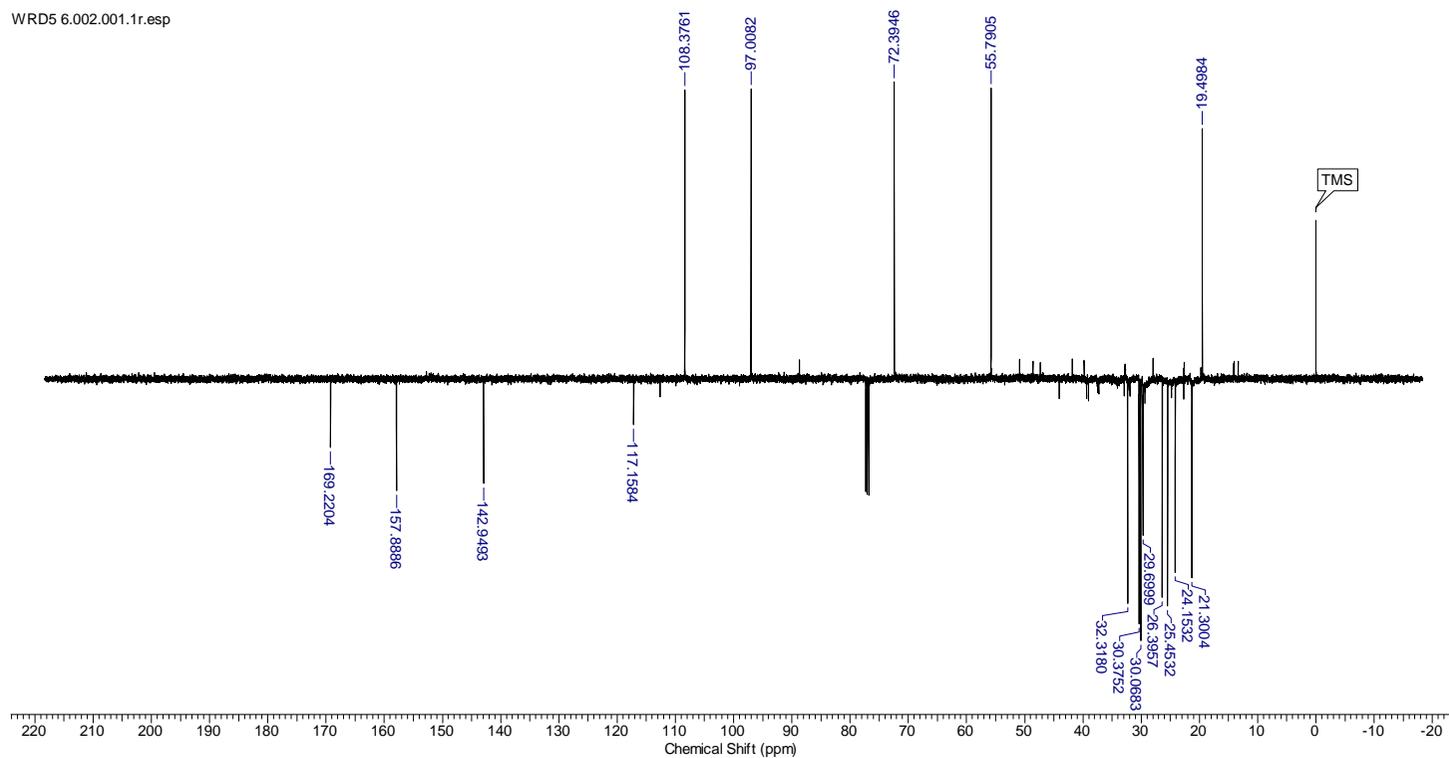
S9. HMBC spectrum for 1.





1
2
3
4
5
6
7

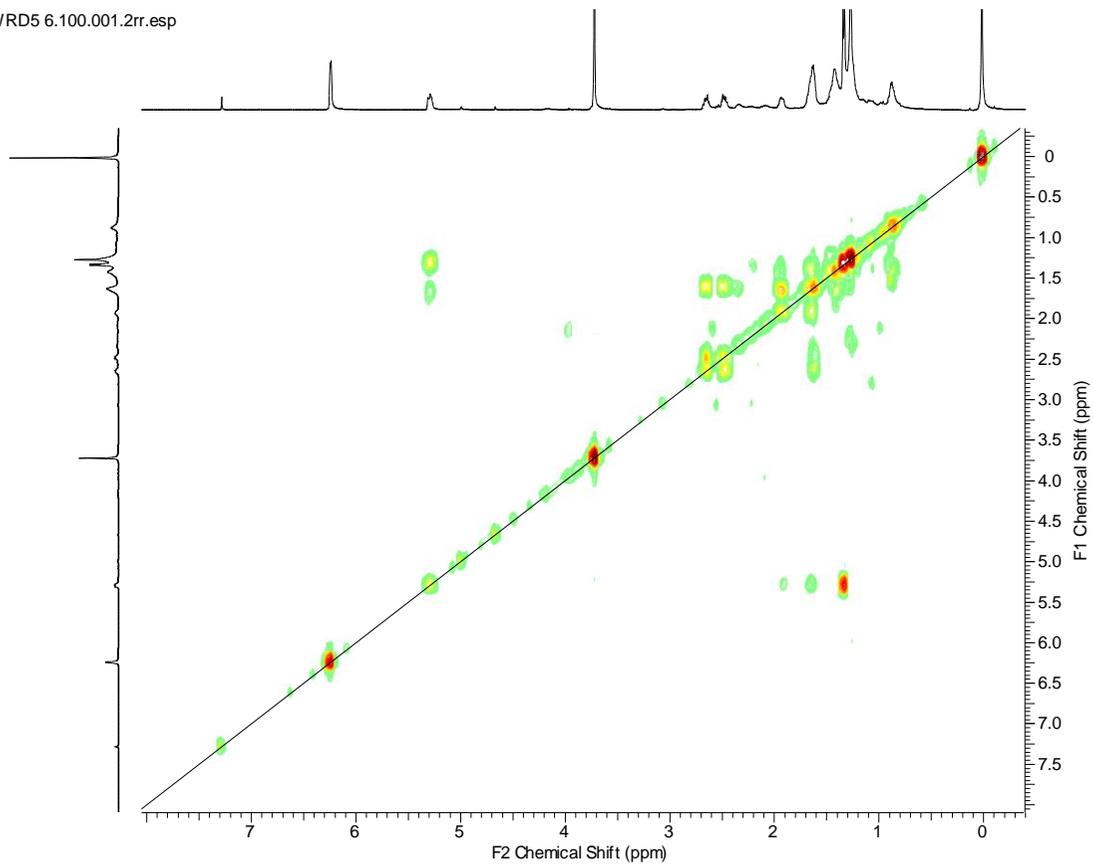
S10. ¹H NMR spectrum (500 MHz, CDCl₃) for **2**



1
2
3
4
5
6
7

S11. ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, CDCl₃) data for 2

WRD5 6.100.001.2rr.esp

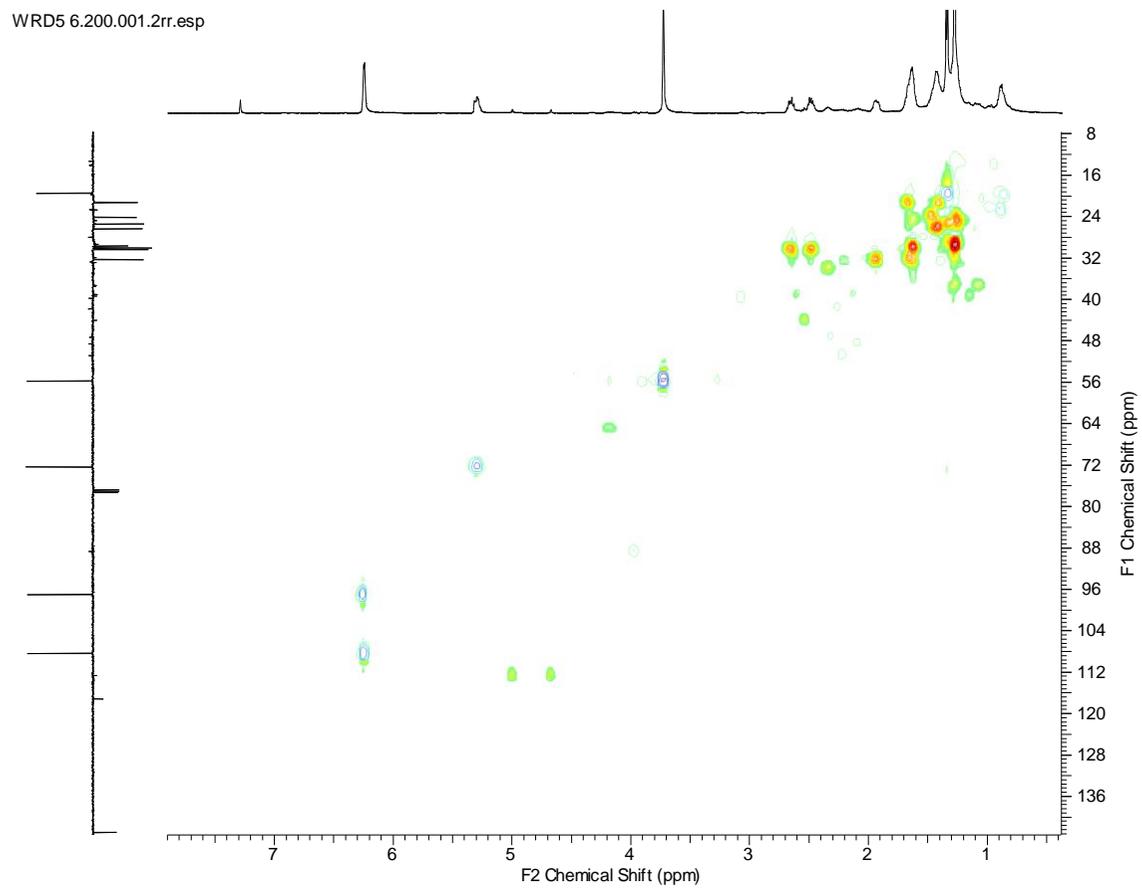


S12. ^1H - ^1H -COSY spectrum for **2**.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

1

2



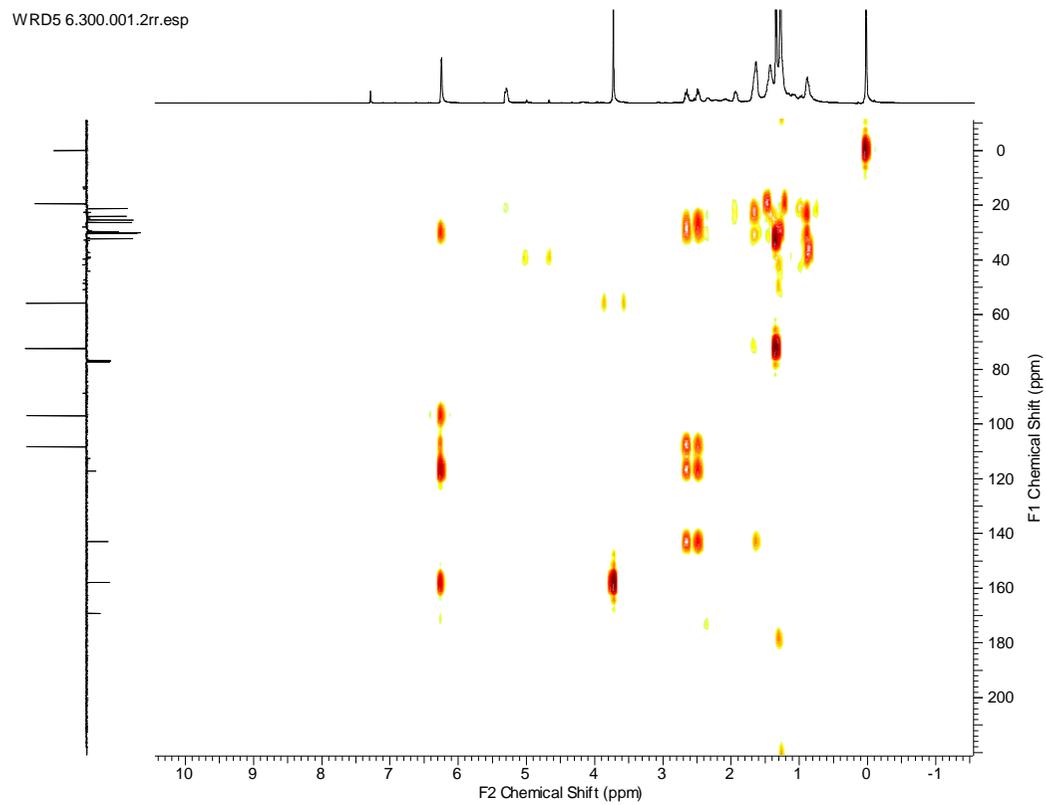
3

4

5

S13. HSQC spectrum for **2**.

1
2
3

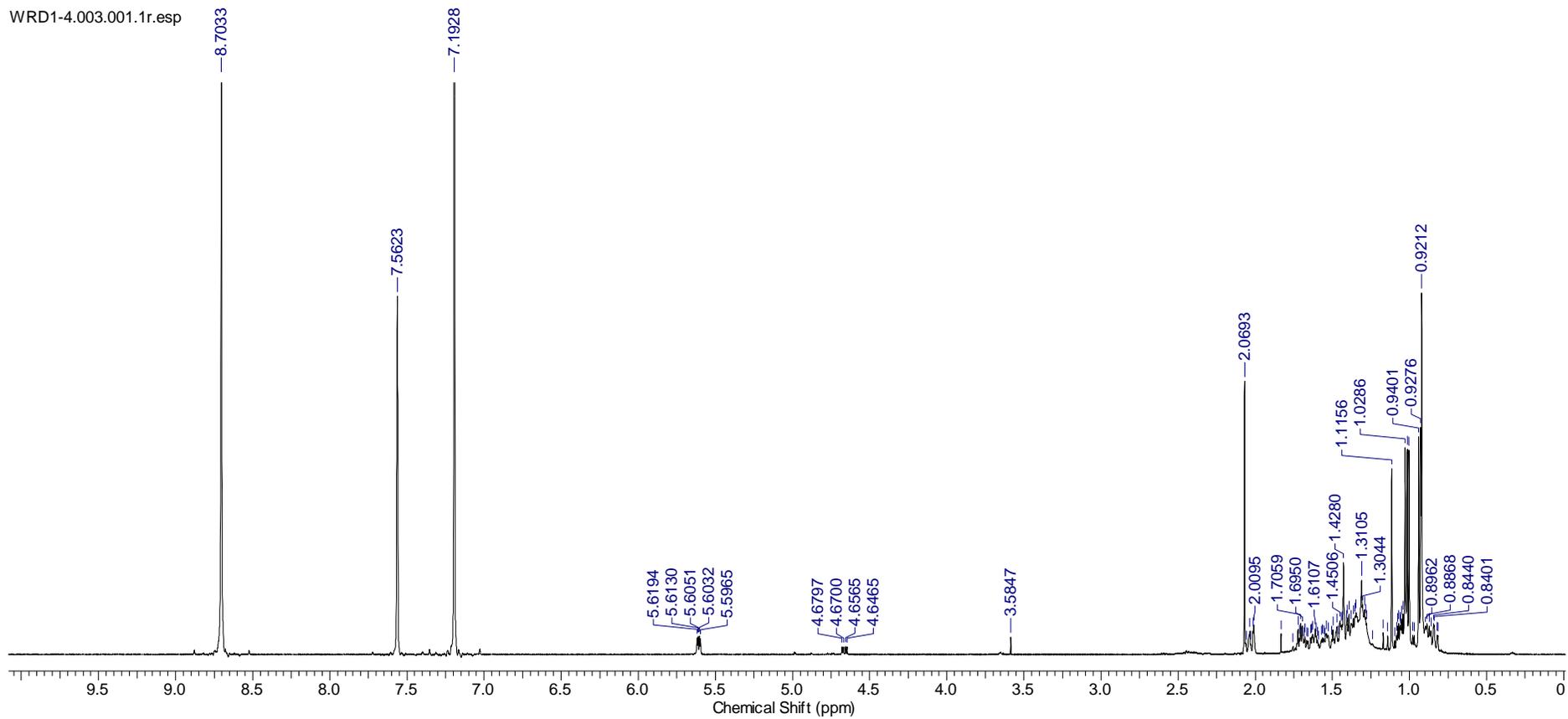


4
5
6

S14. HMBC spectrum for **2**.

1
2

WRD1-4.003.001.1r.esp

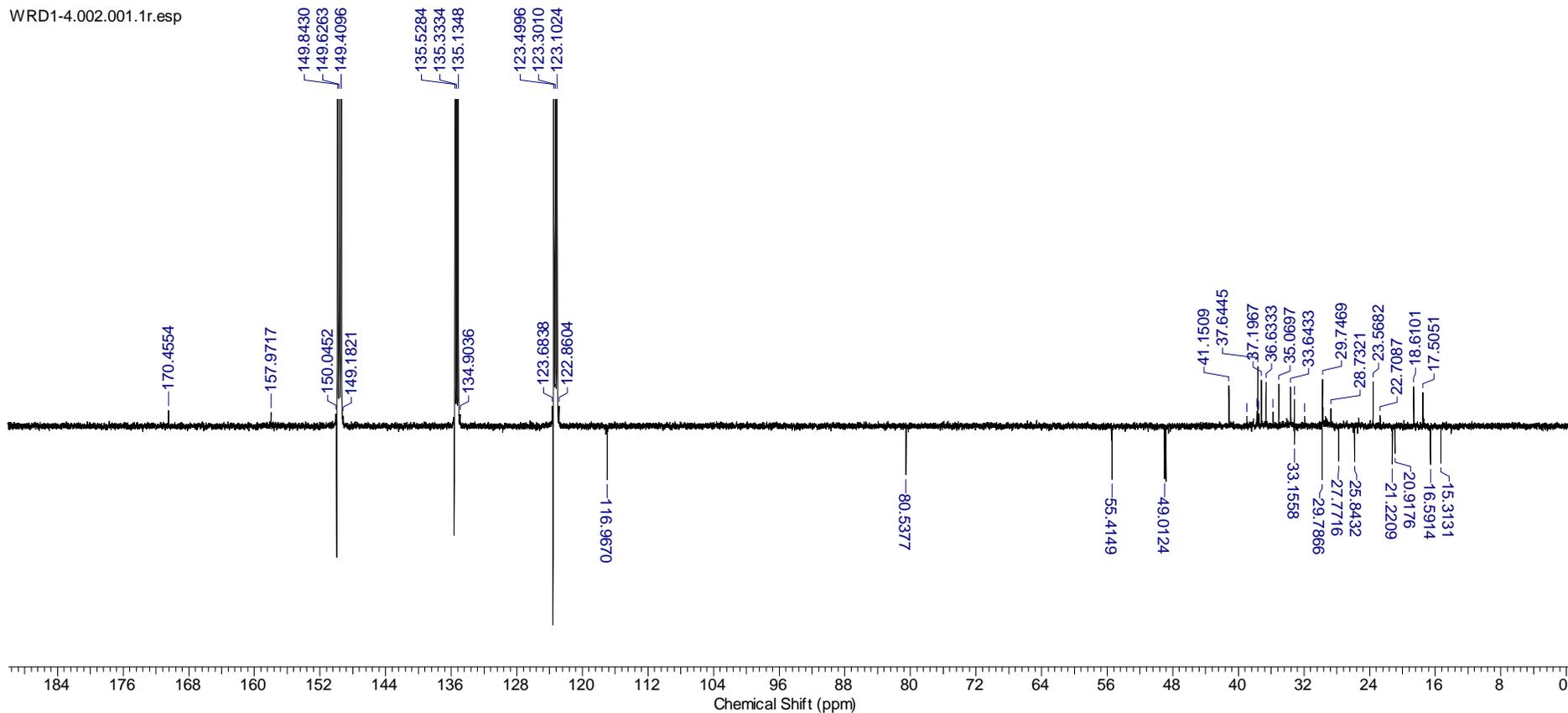


3
4
5

S15. ¹H -NMR spectrum (500 MHz, Piridine-d₅) for 3.

1

WRD1-4.002.001.1r.esp



2

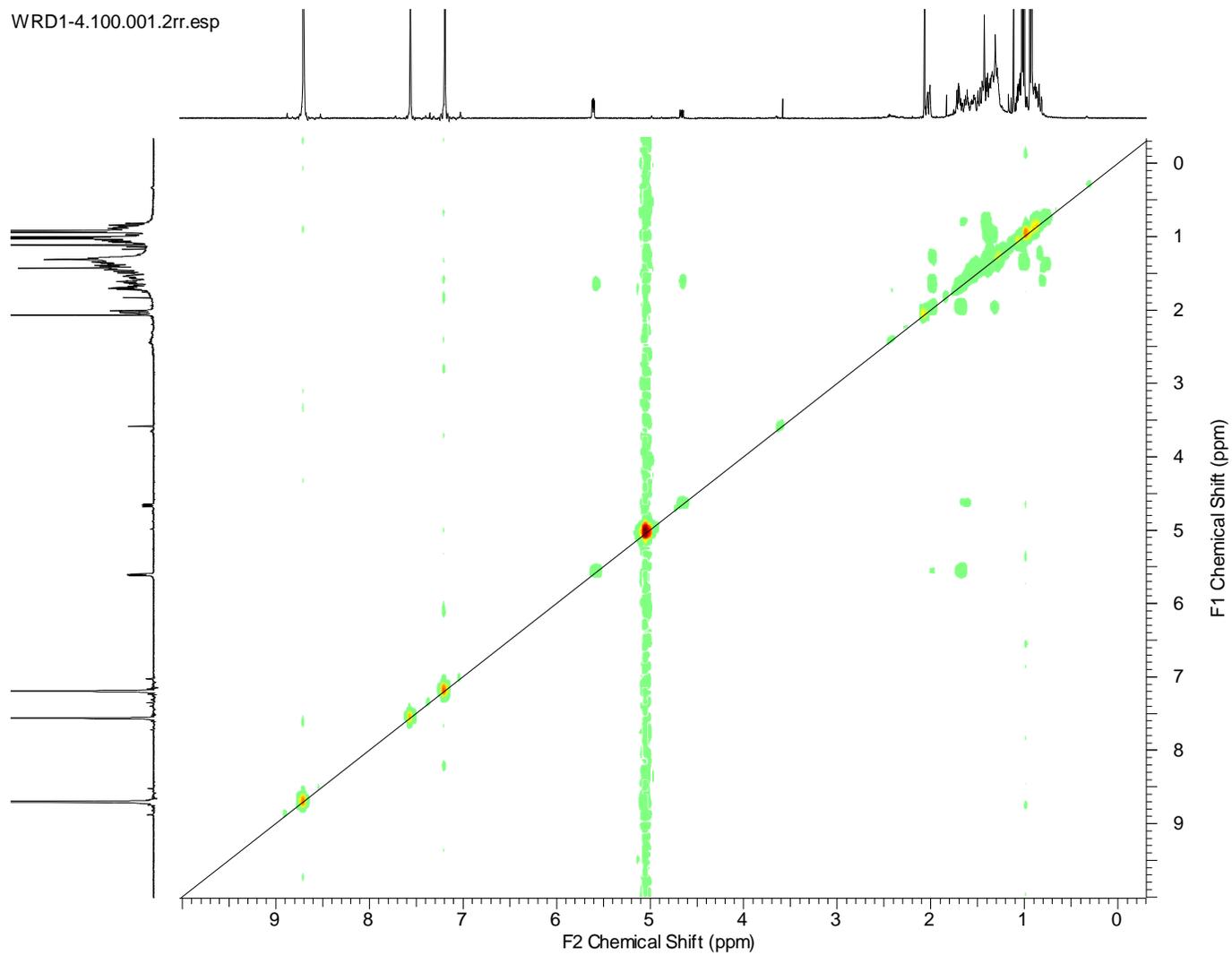
3

4

5

S16. ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, Piridina-d₅) for 3.

WRD1-4.100.001.2rr.esp

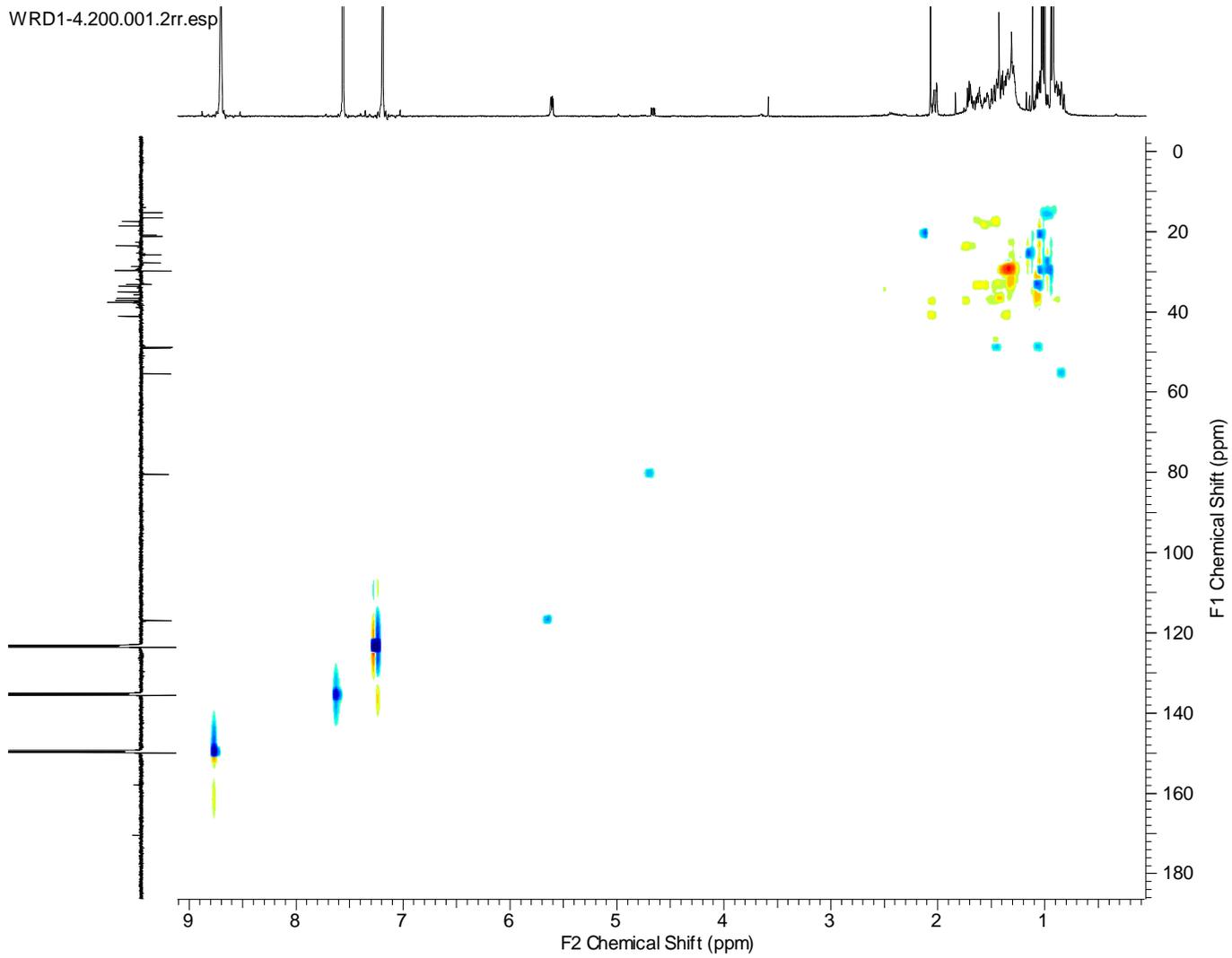


1

2

S17. ^1H - ^1H -COSY spectrum for 3.

WRD1-4.200.001.2rr.esp

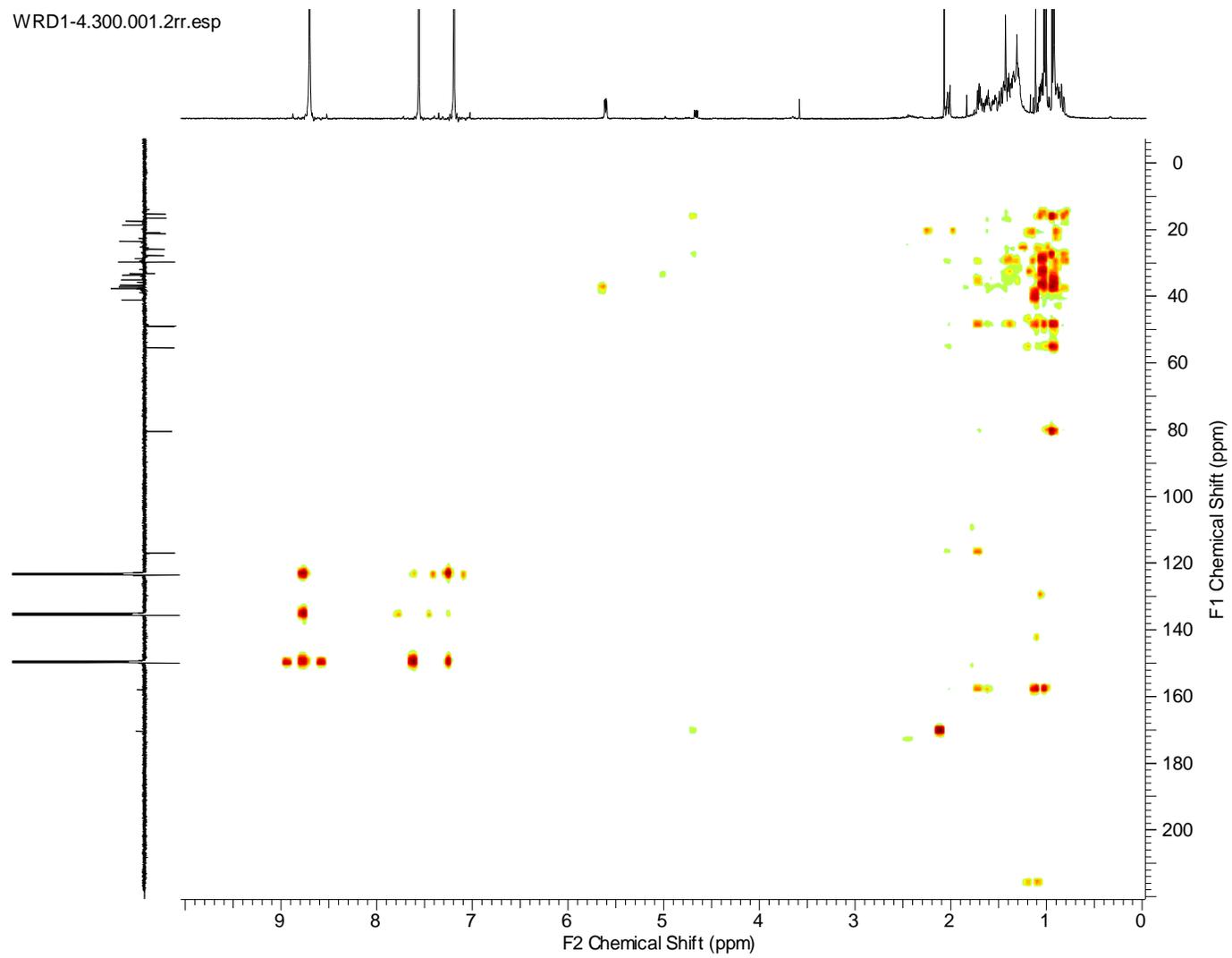


1

2

S18. HSQC spectrum for **3**.

WRD1-4.300.001.2rr.esp



1

2

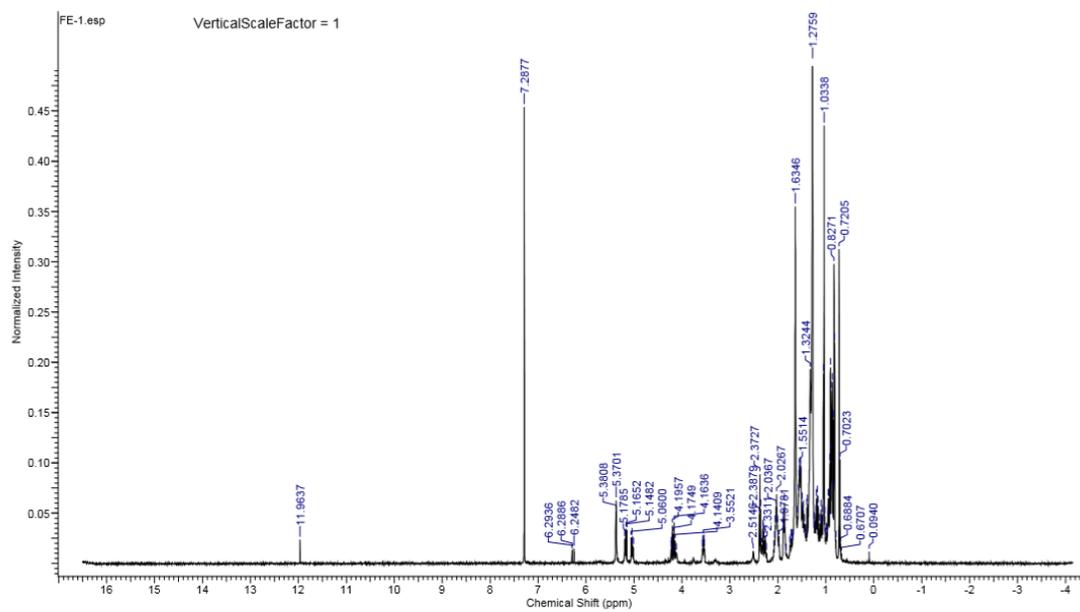
S19. HMBC spectrum for 3.

1

2

3

4



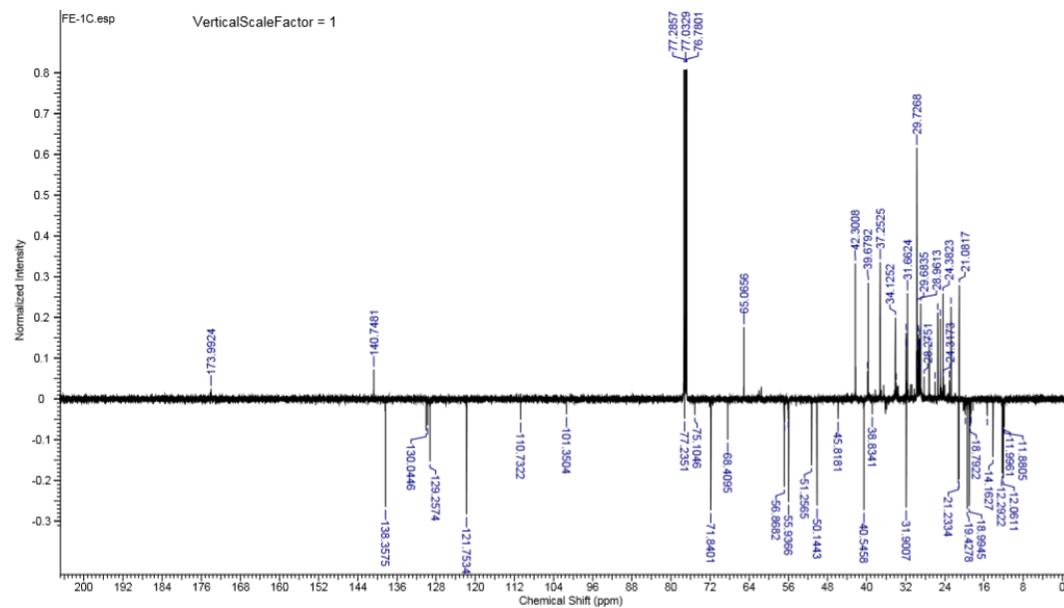
5

6

7

S20. ^1H -NMR spectrum (500 MHz, CDCl_3) for **4**.

1
2
3
4
5



6
7

S21. ^{13}C -NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) for **4**.

Referencias bibliográficas:

- A.J.R. Rassi, A. Rassi and J. Marcondes De Rezende (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 26:275-91.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, C. W. E.; BLACKWELL, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4ª edição. p 272-291.
- ANISZEWSKI T.; CIESIOLKA D.; GULEWICZ K. 2001. Equilibrium between basic nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content. *Phytochemistry*, 57: 43-50.
- BOHLMANN, F., ZDERO, C., ROBINSON, H., KING, R.M. 1981. Naturally-occurring terpene derivatives .337. Modified eudesmanolides and other sesquiterpene lactones from *Wunderlichia mirabilis* and *Actinoseris polymorpha*. *Phytochemistry* 20 (7), 1631–1634.
- Bohlmann, F., Ludwig, G.W., Jakupovic, J., King, R.M., Robinson, H., 1984. *Ann. Chem.*, 228–239.
- C.J. Alexopoulos, C.W.E. Mins and M. Blackwell (1996). *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Duarte, M.C.T.; Figueira G.M.; Sartoratto A.; Rehder V.L.G. e Delarmelina C. (2005) Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 305-311.
- HENRIQUES A.T., LOPES S.O., PARANHOS J.T., GREGIANINI T.S., VON POSER G.L., FETT-NETO A.G. & SCHRIPEMA J.N. 2004. β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry* 65: 449-454.
- HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E. F & VIEIRA, P. C. 2003. *Princípios ativos de plantas superiores*. EDUFSCAR. São Paulo.
- LOURENS, A. C. U., VILJOEN, A. M. & VAN HEERDEN, F. R. 2008. South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 630-652.
- MARASCHIN, M. & VERPOORTE, R. 2001. *Engenharia do Metabolismo Secundário*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 14: 24 – 28.
- MC DOUGAL, P.G.; OH, Y.I.; VAN DERVEER, D. Synthesis of the Furanoheliangolide Ring Skeleton. *Journal of Organic Chemistry*, v.54, n.1, 91-97, 1989.
- M. Torrent,, Pulido, D., Rivas, L., & Andreu, D. (2012). Antimicrobial peptide action on parasites. *Current drug targets*, 13(9), 1138-1147.

- NUÑEZ, C. V. 2000. *Terpenos de Wunderlichia crulsiana e Mikania sp. nov.* Tese de doutorado. (doutorado em ciências químicas) Instituto de química da Universidade de São Paulo – SP, Brasil.
- PAGNI, A. M., ORLANDO, R., MASINI, A. & CICCARELLI, D. (2003). Secretory structures of *Santolina ligustica* Arrigoni (Asteraceae), an Italian endemic species. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51, 185-192.
- Peres, L.E.P. METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba, São Paulo – 2008
- Raslan, D. S., & Oliveira, A. B. D. (2014). In vitro antitumor activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(2), 275-282.
- RASSI A JR, RASSI A, MARCONDES DE REZENDE J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Chagas disease in. Infect Dis Clin North Am* 2012;26:275-91.
- ROBBERS, J. E.; SSPEEDIE, M. K.; WARRS, E. T. *Farmacognosia e Biotecnologia*. Colombia: Premier, 1997.
- SIMÕES, O. C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*.
- T.G. Santos, R.A.Rebelo, E.M.Dalmarco, A. Guedes,A.L. De Gasper, A.B. Cruz, A.P.Schmit, R.C.B. Cruz, M.Steindel, S.S. Semenya andA. Maroyi (2012) Medicinal Plants Used by the Bapedi Traditional Healers to Treat Diarrhoea in the Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 144, 395-401.