

Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões

Rolf Junior Ferreira SILVA^{1*}, Ana Cristina Andrade de AGUIAR-DIAS², Maria Sílvia de MENDONÇA³

1 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Botânica. Av. André Araujo, 2936, Aleixo, CEP: 69060-001. Manaus, AM, Brasil.

2 Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. Av. Perimetral, 2501, Montese, CEP: 66077-530. Belém, PA, Brasil.

3 Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Setor Sul, Coroado I, CEP: 69077-000. Manaus, AM, Brasil.

* Autor Correspondente: rolfr@hotmail.com

RESUMO

Piper L. (Piperaceae) é monofilético, com espécies de difícil distinção taxonômica, sendo necessários ferramentas que auxiliem a identificação interespecífica. Os objetivos do trabalho foram descrever os macropadrões e caracterizar *in situ* a composição química dos cristais caulinares e foliares de *Piper arboreum* Aubl. var. *arboreum*, *P. callosum* Ruiz & Pav. e *P. tuberculatum* Jacq., visando avaliar o uso dos cristais para a separação interespecífica. Para tanto, amostras foram submetidas à análise em microscopias de luz e eletrônica de varredura, microanálises espectroscópicas de raios-X por dispersão de energia e testes histoquímicos. Foram observados cristais prismáticos cuneiformes, tabulares, cúbicos e bipiramidais; ráfides; estiloides; drusas de cristais em bloco; rosetas cristalinas de estiloides e concreções cristalinas. Foram descritos 15 macropadrões cristalinos reunidos em três categorias. Os cristais foram classificados quimicamente como: puros de oxalato de cálcio e misturas entre oxalatos e sulfatos e entre oxalatos, sulfatos e sílica. Rosetas cristalinas, concreções cristalinas silicificadas e 14 dos 15 macropadrões cristalinos descritos são registros inéditos para inclusões biominerais de *Piper* e Piperaceae. Os macropadrões cristalinos caulinares e foliares observados são constitutivos e úteis à separação interespecífica das espécies estudadas. Ademais, os cristais desempenham funções relevantes para a autoecologia dos *taxa* de *Piper* analisados.

PALAVRAS-CHAVE: Cristais, MEV-EDS, Histoquímica, Quimiometria.

Silicified crystal concretions and rosettes in *Piper* (Piperaceae): unpublished reports on their macropatterns

ABSTRACT

Piper L. (Piperaceae) is monophyletic, with species of difficult taxonomic distinction, and thus tools that facilitate interspecific identification are needed. The aims of this study were to describe the macropatterns and characterize *in situ* the chemical composition of leaf and stem crystals of *Piper arboreum* Aubl. var. *arboreum*, *P. callosum* Ruiz & Pav. and *P. tuberculatum* Jacq., in order to evaluate the use of the crystals on interspecific distinction. Samples were submitted to analyses under light and scanning electron microscopies, energy-dispersive x-ray spectroscopic microanalyses, and histochemical tests. We observed cuneiform, tabular, cubic, and bipiramidal prismatic crystals; raphides; styloids; blocky crystal druses; styloid crystal rosettes; and crystal concretions. We described 15 crystal macropatterns, which were distributed along three categories. The crystals were chemically classified as: pure calcium oxalate; and mixtures of oxalates and sulfates, and of oxalates, sulfates and silica. Crystal rosettes, silicified crystal concretions, and 14 out of the 15 macropatterns described are unpublished reports on biomineral inclusions in *Piper* and Piperaceae. The stem and leaf crystal macropatterns observed are constitutive and useful for interspecific separation of the studied species. Moreover, the crystals present relevant functions for the autecology of the analyzed *taxa* from *Piper*.

KEYWORDS: Crystals, SEM-EDS, Histochemistry, Chemometrics.

INTRODUÇÃO

A biomineralização é um processo comum nos vegetais e ocorre no interior da câmara vacuolar dos idioblastos cristalíferos (Franceschi e Nakata 2005). Em geral, apenas um morfotipo cristalino ocorre por idioblasto, mas a coexistência de dois morfotipos cristalinos no mesmo idioblasto (idioblastos cristalíferos duplos) foi relatada (Lersten e Horner 2011). O cálcio é predominante na biomineralização vegetal e minerais de cálcio compreendem cerca de 50% dos biominais conhecidos (Weiner e Dove 2003). Sílica e cristais de oxalato e carbonato de cálcio estão entre os biominais mais abundantes nos vegetais (Weiner e Dove 2003). Em contraste, cristais de sulfato de cálcio e oxalato de magnésio são citados como raros nos vegetais (He *et al.* 2012).

Funções de balanço iônico celular; regulação osmótica; defesa vegetal contra herbivoria; suporte mecânico tissular; detoxificação de alumínio e metais pesados; captação e reflexão da energia solar são atribuídas aos cristais de oxalato de cálcio (Franceschi e Nakata 2005). Funções de remoção do excesso citosólico de magnésio e enxofre para cristais de oxalato de magnésio e sulfato de cálcio, respectivamente, e de defesa vegetal contra patógenos para cristais de sulfato de cálcio têm sido sugeridas (Pritchard *et al.* 2000; He *et al.* 2012).

Os macropadrões cristalinos, por serem *taxa* específicos e determinados pela expressão gênica durante a ontogenia vegetal, são relevantes em investigações sistemáticas, filogenéticas e ecofisiológicas de várias famílias vegetais (Lersten e Horner 2011). No entanto, para Piperaceae, particularmente em *Piper L.*, os cristais são descritos de forma genérica ou como observações incidentais. Estudos de Horner *et al.* (2012) demonstram que os macropadrões cristalinos possuem significância taxonômica e filogenética para *Piper*, além do valor funcional. Nesses estudos, análises *in situ* da composição química dos cristais são escassas ou ausentes embora sejam fundamentais para se compreender o significado funcional que possuem para a biologia das espécies.

Piper é monofilético, com partes florais diminutas e uniformidade morfológica dos órgãos vegetativos que geram problemas taxonômicos ao grupo (Jaramillo e Manos 2001; Gogosz *et al.* 2012). Portanto, outras ferramentas podem ser úteis para a identificação específica. Deste modo, o presente trabalho objetivou descrever os macropadrões e caracterizar *in situ* a composição química dos cristais caulinares e foliares de *Piper arboreum* Aubl. var. *arboreum*, *P. callosum* Ruiz & Pav. e *P. tuberculatum* Jacq., visando avaliar o uso potencial dos cristais para a separação interespecífica. As possíveis funções biológicas dos cristais nessas três espécies foram também propostas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras férteis de *Piper arboreum* var. *arboreum*, *P. callosum* e *P. tuberculatum* foram coletadas nas cidades de Manaus (AM) e Belém (PA). Foram analisados 14 indivíduos por espécie, sendo sete para cada área amostrada. Material testemunho foi depositado no herbário João Murça Pires (MG) do Museu Paraense Emílio Goeldi com as seguintes especificações: *P. arboreum* var. *arboreum* (MG 206890), *P. callosum* (MG 206892) e *P. tuberculatum* (MG 206891). Duplicatas foram também depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Herbário INPA).

Para o estudo dos biominais, amostras retiradas ao longo da lâmina (nervura central, margem e região entre nervura central e margem), do pecíolo e da bainha (regiões proximal, distal e mediana) de folhas totalmente expandidas do 4º nó, bem como da região mediana de caules do 4º entrenó, foram lavadas exaustivamente com água ultrapura após coleta e, em seguida, fixadas em F.A.A.₇₀ (formaldeído PA, ácido acético PA e etanol 70%, 1:1:18 (v/v)) por 24 horas, sob vácuo, lavadas e conservadas em etanol 70% (Johansen 1940).

Para a análise em microscopia de luz, amostras desidratadas em série butílica terciária, infiltradas e incluídas em Paraplast® (Johansen 1940) foram seccionadas transversalmente, com 14 µm de espessura, em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica® RM 2245, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), sendo parte das secções montada sem coloração em resina sintética Permount® entre lâmina e lamínula e a outra, destinada aos testes histoquímicos. As fotomicrografias por luz transmissível e polarizada foram obtidas com câmera fotográfica digital (Motic 2.500, Motic Group Co., LTD., Hong Kong, China) acoplada ao microscópio óptico (Motic BA 310, Motic Group Co., LTD., Hong Kong, China).

Para a caracterização da natureza aniônica dos cristais, foram utilizados testes histoquímicos de solubilidade ácida (Chamberlain 1932), submetendo-se secções ao ácido acético PA e ao ácido nítrico aquoso 10% (v/v) específicos para carbonato e oxalato, respectivamente, e de precipitação para sulfato (Johansen 1940), tratando-se secções com ácido clorídrico aquoso 10% (v/v), seguido de cloreto de bário aquoso 10% (p/v). Para a identificação de oxalato de cálcio na estrutura cristalina e verificação da pureza dos cristais em relação a esse mineral, foi utilizada a reação de Yasue (1969), tratando-se secções com ácido acético aquoso 5% (v/v) por 30 minutos, seguido da lavagem com água ultrapura e imersão em nitrato de prata aquoso 5% (p/v) por 15 minutos. Posteriormente, as secções foram lavadas com água ultrapura; passadas pela série etanólica (de 30% a 70%); tratadas com ácido rubeânico (etanoditioamida) saturado em etanol 70% (p/v), contendo duas gotas de solução aquosa de amônia 28% (v/v) para cada 100 mL da solução, por 1 minuto e lavadas

com etanol 70%. Testes-controle foram feitos, assim como observações de secções sem tratamento para a verificação do aspecto natural dos cristais (branco).

Para a análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microanálises químicas espectroscópicas de raios-X por dispersão de energia (EDS: Energy Dispersive Spectroscopy), amostras desidratadas pela série etanólica crescente (Johansen 1940) foram processadas em ponto crítico de CO₂, montadas em suportes metálicos através de fita de carbono dupla face e metalizadas com camada de ouro de 20 nm de espessura, por 150 segundos em corrente de 25 mA. As eletromicrografias de varredura foram obtidas por captura em microscópio eletrônico (Leo 1450 VP, Leo Electron Microscopy LTD., Cambridge, Reino Unido), utilizando-se detector de elétrons secundários, aceleração eletrônica de 25 kV, distância de trabalho de 15 mm e alto vácuo. As microanálises químicas por EDS, realizadas nos cristais e em células sem cristais (controle) amostrados aleatoriamente, foram feitas com detector de raios-X Gresham de Si(Li) (Sirius 10/7.5, Gresham Scientific Instruments, London, Reino Unido) acoplado ao mesmo MEV e nas mesmas condições de operacionalidade para a captura das eletromicrografias. Foram considerados significativos, os picos de absorbância (Pa) que indicavam concentração química elementar relativa $\geq 0,5\%$ e intervalo de erro 0-1. Foram analisados de 20 a 30 cristais para cada morfotipo observado e os espectros apresentados foram os mais representativos para os padrões de composição química elementar (PCE) verificados.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O preparo de todas as soluções utilizadas e as lavagens realizadas durante os protocolos foram feitas com água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω -cm a 25 °C) obtida por sistema Milli-Q (Direct-Q³ UV-R, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Para avaliar o grau de similaridade entre os morfotipos de cristais observados, foi realizada uma análise quimiométrica com base nos dados de EDS e histoquímicos obtidos *in situ*, utilizando-se o método de análise hierárquica de agrupamento (HCA: Hierarchical Cluster Analysis) feito com o auxílio do programa Minitab versão 14 (Minitab Inc., USA).

Para a nomenclatura dos macropadrões cristalinos, foram utilizadas siglas. Os tecidos e as regiões dos órgãos e/ou estruturas vegetais, nos quais os morfotipos cristalinos ocorrem, foram sobrescritos ao morfotipo cristalino. Os tecidos foram relatados fora de parênteses e separados por ponto. As regiões dos órgãos e/ou estruturas vegetais foram relatadas entre parênteses e separadas por ponto e vírgula. Macropadrões cristalinos sucessivos foram separados por barra horizontal, correspondendo a uma categoria (Tabela 2).

A tipificação morfológica dos cristais foi feita segundo Metcalfe (1983), Lersten e Horner (2011) e He *et al.* (2012).

A notação científica e classificação dos cristais com base nos PCE por EDS seguiram He *et al.* (2012).

RESULTADOS

Cristais com formas variadas foram visualizados em idioblastos cristalíferos caulinares e foliares das espécies de *Piper* analisadas, exceto no caule de *P. callosum* (Figura 1). Foram observados ráfides (Figura 1A); estiloides (Figura 1B); cristais prismáticos cuneiformes (Figura 1C), tabulares (Figura 1D), cúbicos (Figura 1E) e bipiramidais (Figura 1F); drusas de cristais em bloco (Figura 1G); rosetas cristalinas de estiloides (Figura 1H) e concreções cristalinas (Figura 1I).

Concreções cristalinas, ráfides, cristais prismáticos bipiramidais e rosetas cristalinas de estiloides foram específicos para *P. arboreum* var. *arboreum*, *P. callosum* e *P. tuberculatum* respectivamente. Entre as três espécies de *Piper*, *P. tuberculatum* foi a que teve maior diversidade estrutural de cristais (Tabela 1). Idioblastos cristalíferos duplos foram observados, não havendo um padrão de associação entre morfotipos cristalinos, e.g. estiloides com cristais prismáticos cúbicos ou cuneiformes (Figuras 1E, 3H). Ráfides, drusas de cristais em bloco, rosetas cristalinas de estiloides e concreções cristalinas não coexistiram com outro morfotipo cristalino. Os demais cristais observados estavam ou não associados a outros morfotipos cristalinos.

Quinze macropadrões cristalinos, reunidos em três categorias, foram reconhecidos dentre os cristais caulinares e foliares das três espécies de *Piper* (Tabelas 1, 2). Em geral, os macropadrões cristalinos foram característicos para cada espécie, salvo os macropadrões ET^{PF(BfPc;Nc;Mo)}, comum entre *P. arboreum* var. *arboreum* e *P. tuberculatum*, e DCB^{Ms}, comum entre *P. callosum* e *P. tuberculatum*. As categorias dos macropadrões cristalinos foram espécie-específicas. Ráfides e drusas de cristais em bloco foram os únicos morfotipos cristalinos que não possuíram localização restrita ao parênquima fundamental, pois ocorreram também na hipoderme da lâmina foliar e no mesofilo respectivamente (Tabelas 1, 2).

As microanálises por EDS mostraram cinco PCE aos cristais caulinares e foliares das espécies de *Piper* analisadas (Figura 2, Tabela 3). O PCE 1 (Ca;C;O) consistiu de Pa de cálcio (Ca) elevado, de oxigênio (O) intermediário e de carbono (C) discreto (Figura 2A). O PCE 2 (Ca;Mg;C;O) apresentou Pa de Ca e C elevados, de O intermediário e de magnésio (Mg) baixo (Figura 2B). O PCE 3 (Ca;S;C;O) mostrou Pa de C elevado, de Ca e O discretos e de enxofre (S) baixo (Figura 2C). O PCE 4 (Ca;Mg;S;C;O) consistiu de Pa de C elevado, de Ca e O discretos, de S e Mg baixos (Figura 2D). O PCE 5 (Ca;Mg;K;Si;S;C;O) apresentou Pa de Mg elevado, de O intermediário, de potássio (K) discreto, de Ca,

Tabela 1. Morfotipos, padrões de composição química elementar e macropadrões dos cristais caulinares e foliares observados em *Piper* (Piperaceae). Hipoderme (Hp). Mesofilo (Ms). Parênquima fundamental (Pf). 1 (Ca;C;O). 2 (Ca;Mg;C;O). 3 (Ca;S;C;O). 4 (Ca;Mg;S;C;O). 5 (Ca;Mg;K;Si;S;C;O). Cálcio (Ca). Magnésio (Mg). Potássio (K). Silício (Si). Enxofre (S). Carbono (C). Oxigênio (O).

Morfotipos cristalinos (Padrão de composição química elementar)	Distribuição tissular por espécie		
	<i>P. arboreum</i> Aubl. var. <i>arboreum</i>	<i>P. callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>P. tuberculatum</i> Jacq.
Ráfides (1)	Ausentes	Hp: face abaxial da lâmina foliar e nervura central	Ausentes
Ráfides (2)	Ausentes	Pf: bainha foliar e pecíolo	Ausentes
Ráfides (4)	Ausentes	Hp: face abaxial da lâmina foliar	Ausentes
Estiloides (1)	Pf: bainha foliar, pecíolo e nervura central	Pf: pecíolo	Pf: pecíolo, nervura central e medula caulinar
Estiloides (2)	Ausentes	Pf: bainha foliar	Pf: bainha foliar
Estiloides (3)	Pf: medula caulinar	Ausentes	Ausentes
Cristal prismático cuneiforme (1)	Pf: pecíolo e nervura central	Pf: bainha foliar	Pf: bainha foliar, nervura central e medula caulinar
Cristal prismático cuneiforme (2)	Ausentes	Ausentes	Pf: bainha foliar e pecíolo
Cristal prismático cuneiforme (4)	Ausentes	Pf: bainha foliar	Ausentes
Cristal prismático tabular (1)	Pf: bainha foliar, pecíolo e nervura central	Ausentes	Pf: pecíolo, nervura central e medula caulinar
Cristal prismático tabular (4)	Ausentes	Ausentes	Pf: bainha foliar
Cristal prismático cúbico (1)	Ausentes	Ausentes	Pf: bainha foliar e estruturas secretoras da bainha foliar
Cristal prismático cúbico (2)	Ausentes	Pf: bainha foliar	Ausentes
Cristal prismático bipiramidal (1)	Ausentes	Ausentes	Pf: bainha foliar, pecíolo e nervura central
Drusa de cristais em bloco (1)	Ms: clorênquimas paliçádico e lacunoso; Pf: bainha foliar	Ms: clorênquimas paliçádico e lacunoso	Ms: clorênquimas paliçádico e lacunoso
Roseta cristalina de estiloides (1)	Ausentes	Ausentes	Pf: nervura central
Concreção cristalina (5)	Pf: medula caulinar	Ausentes	Ausentes

Tabela 2. Categorias dos macropadrões cristalinos caulinares e foliares observados em *Piper* (Piperaceae). Ráfides (RF). Estiloides (ET). Cristal prismático cuneiforme (CC). Cristal prismático tabular (CT). Cristal prismático cúbico (CCU). Cristal prismático bipiramidal (CBP). Drusa de cristais em bloco (DCB). Roseta cristalina de estiloides (RET). Concreção cristalina (CCR). Bainha foliar (Bf). Hipoderme (Hp). Lâmina foliar (Lf). Medula caulinar (Mc). Mesofilo (Ms). Nervura central (Nc). Pecíolo (Pc). Parênquima fundamental (Pf).

Categorias dos macropadrões cristalinos	Espécies
1- ET ^{Pf(Bf;Pc;Nc;Mc)} CC ^{Pf(Pc;Nc)} CT ^{Pf(Bf;Pc;Nc)} DCB ^{Pf(Bf;Ms)} CCR ^{Pf(Mc)}	<i>P. arboreum</i> Aubl. var. <i>arboreum</i>
2- RF ^{Pf(Bf;Pc;Nc;Hp(Lf))} ET ^{Pf(Bf;Pc)} CC ^{Pf(Bf)} CCU ^{Pf(Bf)} DCB ^{Ms}	<i>P. callosum</i> Ruiz & Pav.
3- ET ^{Pf(Bf;Pc;Nc;Mc)} CC ^{Pf(Bf;Pc;Nc;Mc)} CT ^{Pf(Bf;Pc;Nc;Mc)} CCU ^{Pf(Bf;Es(Bf))} CBP ^{Pf(Bf;Pc;Nc)} DCB ^{Ms} RET ^{Pf(Nc)}	<i>P. tuberculatum</i> Jacq.

Tabela 3. Composição química elementar e caracterização histoquímica dos morfotipos de cristais caulinares e foliares observados em *Piper* (Piperaceae). Não solúvel (NS). Parcialmente solúvel (PS). Solúvel (S). Solúvel com posterior formação de precipitado branco (SP). Cristais de composição química mista com presença de oxalato de cálcio na estrutura cristalina ((+)). Cristais puros de oxalato de cálcio ((++)). Ânion presente (+). Ânion ausente (-). Ráfides (RF). Estiloides (ET). Cristal prismático cuneiforme (CC). Cristal prismático tabular (CT). Cristal prismático cúbico (CCU). Cristal prismático bipiramidal (CBP). Drusa de cristais em bloco (DCB). Roseta cristalina de estiloides (RET). Concreção cristalina (CCR). Cálcio (Ca). Magnésio (Mg). Potássio (K). Silício (Si). Enxofre (S). Carbono (C). Oxigênio (O). Ácido acético pró-análise (C₂H₄O₂ PA). Ácido nítrico (HNO₃). Ácido clorídrico (HCl). Cloreto de bário (BaCl₂). Volume por volume (v/v). Peso por volume (p/v).

Morfotipos cristalinos									Composição química elementar (Padrão)	Testes histoquímicos			Natureza aniônica			
RF	ET	CC	CT	CCU	CBP	DCB	RET	CCR		C ₂ H ₄ O ₂ PA	HNO ₃ 10% (v/v)	HCl 10% (v/v)/ BaCl ₂ 10% (p/v)	Reação de Yasue	Carbonato	Oxalato	Sulfato
X	X	X	X	X	X	X	X		Ca;C;O (1)	NS	S	S	(++)	-	+	-
X	X	X		X					Ca;Mg;C;O (2)	NS	S	S	(+)	-	+	-
	X								Ca;S;C;O (3)	NS	PS	SP	(+)	-	+	+
X		X	X						Ca;Mg;S;C;O (4)	NS	PS	SP	(+)	-	+	+
							X		Ca;Mg;K;Si;S;C;O (5)	NS	PS	SP	(+)	-	+	+

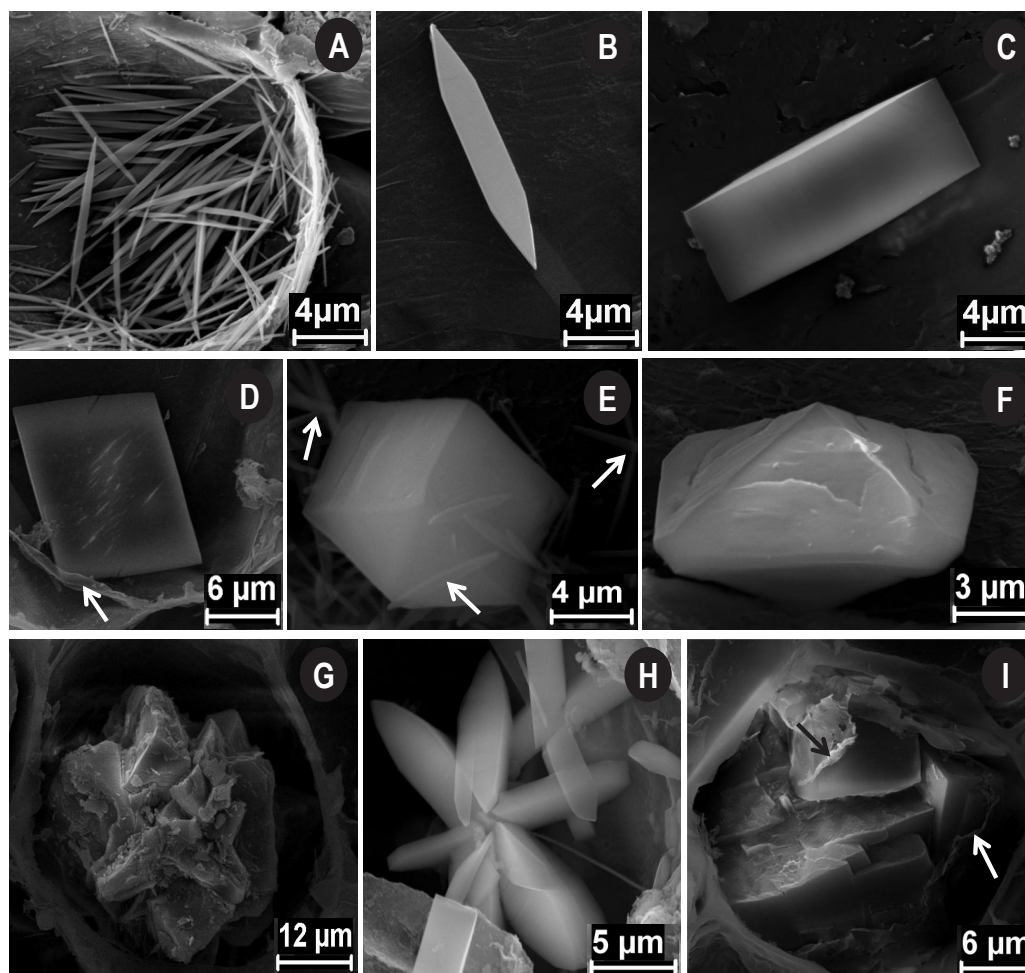


Figura 1. Eletromicrografias de varredura dos morfotipos de cristais observados nas seções transversais dos órgãos vegetativos aéreos de *Piper* (Piperaceae). *P. arboreum* Aubl. var. *arboreum* (D; G e I). *P. callosum* Ruiz & Pav. (A e E). *P. tuberculatum* Jacq. (B; C; F e H). Hipoderme abaxial da lâmina foliar (A). Parênquima fundamental da bainha foliar (C-G), da nervura central (B e H) e da medula caulinar (I). A. Ráfides. B. Estiloide. C. Cristal prismático cuneiforme. D. Cristal prismático tabular, notar a membrana da câmara vacuolar (seta). E. Cristal prismático cúbico, notar estiloides (setas). F. Cristal prismático bipiramidal. G. Drusa de cristais em bloco. H. Roseta cristalina de estiloides. I. Concreção cristalina, notar a membrana da câmara vacuolar (setas).

S, C e silício (Si) baixos, havendo ainda o registro de baixos Pa para manganês (Mn), titânio (Ti) e alumínio (Al) (Figura 2E).

O espectro do EDS das células sem cristais (controle) mostraram Pa de C elevado, de O discreto e de ouro (Au) baixo (Figura 2F, padrão controle), confirmando que os Pa de Ca, Mg, K, Si, S, Mn, Ti e Al foram oriundos apenas dos cristais e os Pa de C e O resultaram tanto dos cristais como das células-controle. Os Pa de Au foram provenientes da metalização das amostras.

O PCE 1 ocorreu em quase todos morfotipos cristalinos, com exceção das concreções cristalinas. Os PCE 2 e 4 foram observados nos cristais de *P. callosum* e *P. tuberculatum*. Os PCE 3 e 5 foram específicos aos cristais de *P. arboreum* var. *arboreum*. Os cristais nos idioblastos cristalíferos duplos tiveram PCE iguais. Cristais do mesmo morfotipo de

alguns idioblastos cristalíferos adjacentes, como as ráfides da hipoderme abaxial da lâmina foliar de *P. callosum*, possuíram PCE diferentes (Tabelas 1, 3).

Os testes histoquímicos indicaram que os cristais caulinares e foliares das três espécies de *Piper* pertenciam a duas naturezas aniônicas, oxalato e sulfato (Tabela 3). Os morfotipos cristalinos com PCE 1 e oxalato positivos foram classificados como oxalato de cálcio. Os morfotipos cristalinos com PCE 2 e oxalato positivos foram possíveis misturas entre oxalato de cálcio e oxalato de magnésio, sendo classificados como oxalato de cálcio.oxalato de magnésio. Os morfotipos cristalinos com PCE 3, 4 e 5 e oxalato-sulfato positivos foram possivelmente misturas complexas entre oxalatos e sulfatos (cristais com PCE 3 e 4) e entre oxalatos, sulfatos e sílica (cristais com PCE 5), sendo classificados como oxalato.sulfato

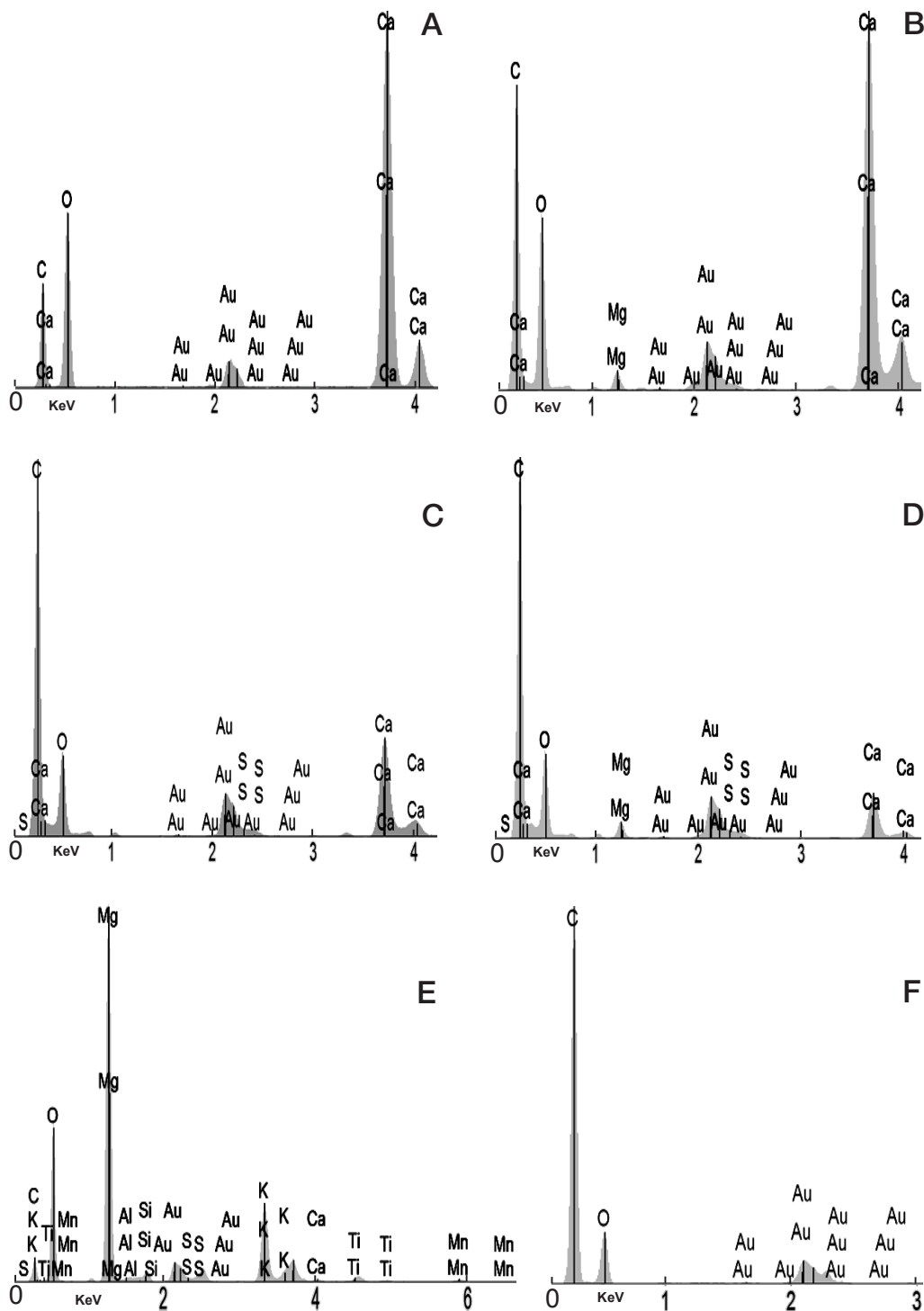


Figura 2. Espectros das microanálises químicas por EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) feitas nos cristais (A-E) e em células sem cristais (F) dos órgãos vegetativos aéreos de *Piper* (Piperaceae), mostrando os padrões de composição química elementar (PCE). A. PCE 1 (Ca;C;O). B. PCE 2 (Ca;Mg;C;O). C. PCE 3 (Ca;S;C;O). D. PCE 4 (Ca;Mg;S;C;O). E. PCE 5 (Ca;Mg;K;Si;S;C;O), notar Pa de Ti, Mn e Al. F. Padrão das células sem cristais (controle). Picos de absorvância (Pa). Pa de Au são resultantes da metalização das amostras. Cálcio (Ca). Magnésio (Mg). Potássio (K). Silício (Si). Enxofre (S). Carbono (C). Oxigênio (O). Titânio (Ti). Manganês (Mn). Alumínio (Al). Ouro (Au). Os espectros A, C, B, D e E foram obtidos dos cristais das figuras 1A, 1B, 1C, 1D e 1E respectivamente.

de cálcio (cristais com PCE 3), oxalato.sulfato de cálcio.oxalato de magnésio (cristais com PCE 4) e oxalato.sulfato de cálcio.oxalato de magnésio.sílica (cristais com PCE 5).

Cristais de todos os morfotipos e PCE apresentaram reação de Yasue positiva (Figura 3A-E, Tabela 3). A reação foi fortemente positiva, com coloração preta intensa, nos cristais com PCE 1 e oxalato positivos, caracterizando-os como cristais puros de oxalato de cálcio (Figuras 3A, 3B), e fracamente positiva, com coloração em tons de marrom, nos cristais com PCE 2 e oxalato positivos, PCE 3, 4 e 5 e oxalato-sulfato positivos, caracterizando-os como cristais de composição química mista com presença de oxalato de cálcio na estrutura cristalina (Figura 3C-E).

Os cristais caulinares e foliares das três espécies de *Piper*, exceto a concreção cristalina, apresentaram anisotropia óptica ao serem analisados com luz polarizada, birrefringindo com diferentes cores de interferência ao giro de 360° do polarizador analisador (Figura 3F-J). Cristais puros de oxalato de cálcio birrefringiram com cor branca de alta luminosidade (Figuras 3F, 3G). Cristais de composição química mista birrefringiram com cores de interferência variadas (Figura 3H-J).

A quimiometria por HCA organizou os morfotipos cristalinos caulinares e foliares das espécies de *Piper* analisadas em oito grupos (Figura 4). Os níveis de distanciamento Euclidiano variaram entre 0,00 e 3,76 com valores de similaridade entre 27,28 e 100,00. Entre os morfotipos cristalinos, cristais prismáticos bipiramidais, drusas de cristais em bloco e rosetas cristalinas de estiloides tiveram a maior similaridade (100,00). A menor similaridade (27,28) ocorreu para as concreções cristalinas.

DISCUSSÃO

Piper arboreum var. *arboreum*, *P. callosum* e *P. tuberculatum* possuem cristais com formas diversificadas nos órgãos vegetativos aéreos, citados como padrões morfológicos aos cristais (Metcalf 1983). Entre as formas cristalinas descritas, concreções cristalinas não são consideradas morfotipos padrões, mas sim uma nova forma de agregado cristalino com estrutura atípica (Lersten e Horner 2011).

Rosetas e concreções cristalinas são registradas pela primeira vez para *Piper* e Piperaceae, não sendo relatadas em descrições anatômicas anteriores (Solereder 1908; Metcalf e Chalk 1950; Gogosz *et al.* 2012). *Piper* carece de informações taxonômicas adicionais, pois apenas a morfologia das partes reprodutivas e vegetativas não é suficiente à distinção das espécies e, tais achados, se somarão as demais características micromorfológicas com fins taxonômicos. Similarmente, são as descrições morfológicas *stricto sensu* feitas para as drusas e aos cristais prismáticos, geralmente negligenciados ao grupo.

Os idioblastos cristalíferos duplos observados nas três espécies de *Piper* analisadas já foram mencionados para outras espécies de *Piper* (Horner *et al.* 2012), bem como para espécies pertencentes a famílias filogeneticamente distintas (Solereder 1908; Lersten e Horner 2004; Lersten e Horner 2011), sugerindo que idioblastos cristalíferos duplos não são meros eventos de desenvolvimento, raro ou anômalo, mas sim células cristalíferas altamente especializadas e com capacidade genética de produzirem duas formas cristalinas distintas, atuando como marcadores anatômicos nas espécies em que ocorrem (Lersten e Horner 2011; Horner *et al.* 2012).

A ocorrência de macropadrões cristalinos comuns entre as espécies de *Piper* em questão refutam a afirmação que cristais com formas variadas, quando localizados no mesmo órgão, ocorrem em diferentes tecidos ou regiões (Franceschi e Nakata 2005). Características semelhantes foram observadas em espécies de *Peperomia* Ruiz e Pav. (Horner *et al.* 2009), *Piper* (Horner *et al.* 2012), Fagaceae (Lersten e Horner 2008) e Fabaceae (Cervantes-Martinez *et al.* 2005; Lersten e Horner 2007; He *et al.* 2012).

Entre os 15 macropadrões cristalinos aqui reconhecidos para as espécies de *Piper* estudadas, apenas o macropadrão DCB^{Ms} foi anteriormente descrito para *Piper* (Horner *et al.* 2012). Os macropadrões cristalinos nas Angiospermas são característicos para famílias, subfamílias, tribos, gêneros e espécies por estarem sob forte regulação genética (Franceschi e Nakata 2005; Lersten e Horner 2011; Horner *et al.* 2012). Para Piperaceae, estudos sobre macropadrões cristalinos estão em fase inicial e, ao lado da presente contribuição, há apenas duas publicações (Horner *et al.* 2009; Horner *et al.* 2012), uma delas sobre *Piper* (Horner *et al.* 2012) em que são descritos 10 macropadrões cristalinos distribuídos em três categorias.

A precisão das estruturas e macropadrões cristalinos, assim como a constatação dos idioblastos cristalíferos duplos nas espécies de *Piper* estudadas corroboram a hipótese da imposição do genoma vegetal sobre o desenvolvimento morfológico dos cristais e reforçam a ideia que as espécies devem possuir programas específicos para fazê-lo, nos diversos órgãos vegetativos e reprodutivos e, até mesmo, em diferentes células do mesmo tecido e/ou órgão (Franceschi e Nakata 2005).

O fato dos cristais das espécies de *Piper* em questão serem quimicamente puros ou misturas revela que mais de um hábito cristalino, com base na composição química, pode ocorrer na mesma planta e que os biominerais não são necessariamente de sílica, carbonato e oxalato de cálcio (He *et al.* 2012).

Cálcio é o elemento químico prevalente nos cristais das espécies de *Piper* analisadas e oxalato de cálcio, o mineral em comum, independe se os cristais são puros ou não. Isto porque o cálcio na forma divalente (Ca²⁺) constitui o principal cátion disponível nos vacúolos ao processo de biomineralização, estando os biominerais de cálcio entre os mais citados, *e.g.*

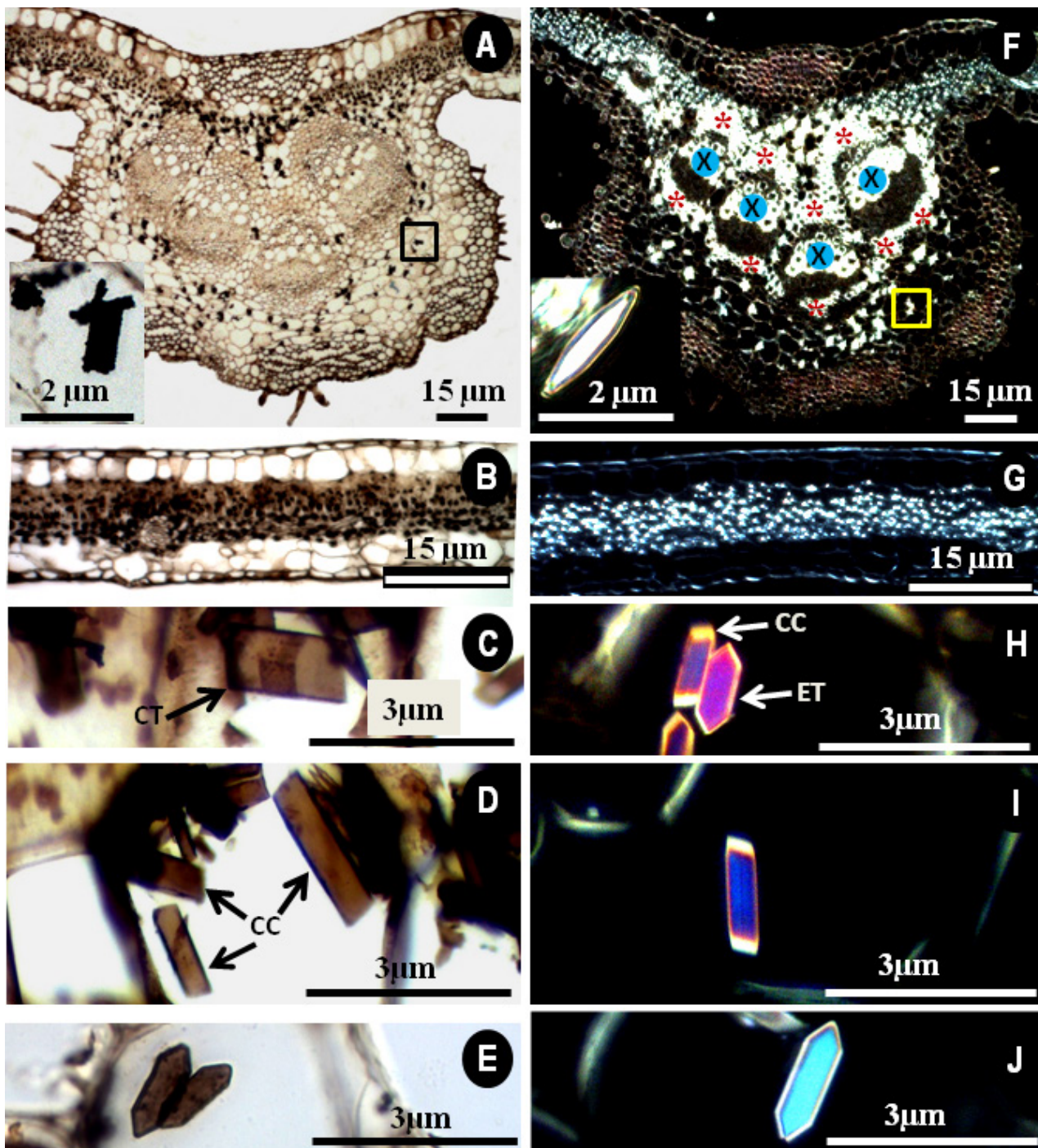


Figura 3. Fotomicrografias de seções transversais dos órgãos vegetativos aéreos de *Piper* (Piperaceae), evidenciando cristais com reação de Yasue positiva (A-E, luz transmissível) e anisotropia óptica (F-J, luz polarizada). *P. arboreum* Aubl. var. *arboreum* (E e J). *P. callosum* Ruiz & Pav. (D e I). *P. tuberculatum* Jacq. (A-C; F-H). Lâmina foliar, região do mesófilo (B e G). Parênquima fundamental da bainha foliar (C; D; H e I), da lâmina foliar na região da nervura central (A e F) e da medula caulinar (E e J). A, B, F e G. Cristais puros de oxalato de cálcio, notar no inset estiloides com coloração preta intensa (A) e birrefringência branca de alta luminosidade (F), características desse padrão composicional. C-E e H-J. Cristais de composição química mista com presença de oxalato de cálcio na estrutura cristalina, notar coloração em tons de marrom (C-E) e birrefringência com cores de interferência variadas (H-J), características desse padrão composicional. Cristal prismático cuneiforme (CC). Cristal prismático tabular (CT). Estilóide (ET). Xilema birrefringente (X). Esclerenquima birrefringente (*). Esta figura é colorida na versão eletrônica.

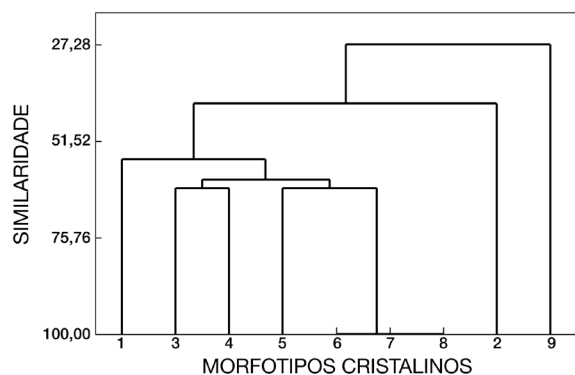


Figura 4. Dendrograma da quimiometria por HCA (Hierarchical Cluster Analysis) realizada nos morfotipos cristalinos dos órgãos vegetativos aéreos de *Piper* (Piperaceae). 1. Ráfides. 2. Estiloides. 3. Cristal prismático cuneiforme. 4. Cristal prismático tabular. 5. Cristal prismático cúbico. 6. Cristal prismático bipiramidal. 7. Drusa de cristais em bloco. 8. Roseta cristalina de estiloides. 9. Concreção cristalina.

os cristais de oxalato de cálcio estão presentes em no mínimo 75% das Angiospermas (Weiner e Dove 2003; Franceschi e Nakata 2005; He *et al.* 2012).

Os cristais de sulfato de cálcio e oxalato de magnésio presentes nas espécies de *Piper* estudadas podem ser considerados naturais, pois foram coletadas amostras foliares e caulinares em excelente estado de fitossanidade, provenientes de ambiente no qual não há ocorrência de chuva ácida. Tal tipo de formação é rara, e havia sido anteriormente atribuída como precipitações secundárias decorrentes de chuva ácida e infecções patogênicas respectivamente (Pritchard *et al.* 2000; He *et al.* 2012).

Afora as especulações ecofisiológicas sobre a natureza química de minerais biogênicos, as diferenças de solubilidade entre os sais podem explicar a presença dos cristais de sulfato e oxalato identificados nas espécies de *Piper* estudadas. O sulfato de cálcio, com constante do produto de solubilidade (Kps) igual a $4,93 \cdot 10^{-5}$ (Lide 2005), é cerca de 20.000 vezes mais solúvel que o oxalato de cálcio, com $kps = 2,32 \cdot 10^{-9}$ (Lide 2005), o que pode justificar a prevalência dos cristais de oxalato de cálcio nas Angiospermas como citado por Weiner e Dove (2003), Franceschi e Nakata (2005) e He *et al.* (2012). De maneira análoga, o sulfato de magnésio, com solubilidade (s) de $0,357 \text{ g mL}^{-1}$ de água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Lide 2005), é cerca de 900 vezes mais solúvel que o oxalato de magnésio, com $s = 0,00038 \text{ g mL}^{-1}$ de água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Lide 2005), o que explica a não constatação, até então, de cristais de sulfato de magnésio nos vegetais quando presentes, no mesmo padrão espectral, Pa de Ca, Mg, S, C e O. Como a solubilidade do sulfato de cálcio, $s = 0,00205 \text{ g mL}^{-1}$ de água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Lide 2005), tem valor próximo, embora cerca de cinco vezes maior,

à solubilidade do oxalato de magnésio e mesmo não sendo mensuradas as concentrações de Ca, Mg, oxalato e sulfato nos cristais analisados, em razão da natureza semiquantitativa do EDS, os dados aqui apresentados corroboram que os cátions cálcio e magnésio e os ânions correspondentes oxalato e sulfato sejam precipitados como cristais de sais mais insolúveis, seguindo uma ordem crescente de solubilidade (oxalato de cálcio << oxalato de magnésio < sulfato de cálcio << sulfato de magnésio) e independente de fatores antropomórficos e/ou fitopatológicos.

As birrefringências mostradas pelos cristais das três espécies de *Piper* são características anisotrópicas de cristais com os padrões químicos composicionais verificados (Hammond 2009). Cristais de composição química mista são referidos como não birrefringentes (He *et al.* 2012), devido a serem analisados sem rotação do polarizador analisador, impossibilitando, assim, avaliar os diferentes índices de refração que possuem, pois apresentam alterações de propriedades ópticas em relação aos cristais puros (Hammond 2009).

Concreções cristalinas foram os únicos cristais que não mostraram birrefringência. Possivelmente, o conteúdo silicoso da sua composição química ocasionou opalescência da estrutura cristalina. A ocorrência de sílica nas inclusões biominerais de *Piper* é uma característica conflitante. Células silicosas na epiderme da lâmina foliar foram citadas para algumas espécies do gênero (Solleder 1908; Metcalfe e Chalk 1950) embora sem comprovações químicas. Picos de absorvância de silício verificados nos cristais de 63 espécies de *Piper* foram considerados inconclusivos, pois poderiam ser provenientes de paredes celulares (Horner *et al.* 2012). No presente estudo, a ausência de picos de absorvância de elementos químicos catiônicos no padrão espectral controle e a não birrefringência das concreções cristalinas confirmam que esses cristais contêm sílica.

A presença de sílica nas inclusões biominerais celulares de Piperaceae pode ser indicativa de simplesiomorfia com monocotiledôneas e plesiomorfia com eudicotiledôneas. Inclusões biominerais mistas entre oxalato de cálcio e sílica são somadas aos caracteres que sustentam a monofilia de várias famílias de Zingiberales (Baran *et al.* 2010), o que suscita a relevância de estudos direcionados para melhor investigar a ocorrência e elucidar os significados evolutivo e sistemático da sílica nos biominerais de *Piper* e Piperaceae.

O agrupamento quimiométrico com grau de similaridade máxima entre morfotipos cristalinos distintos de mesma composição química evidencia que estrutura e composição química de cristais independem entre si. Se a estrutura de um cristal estivesse em função da sua composição química, distanciamentos Euclidianos mínimos seriam esperados entre morfotipos cristalinos de composição química idêntica tais como ráfides, cristais prismáticos cúbicos e cuneiformes, o

que não ocorreu. A forma dos cristais é imposta pelo genoma vegetal e a composição química resultado da interação entre atividade biológica e meio ambiente (Weiner e Dove 2003; Franceschi e Nakata 2005), afirmações pela primeira vez constatadas através de análise estatística multivariada no presente estudo. O grau de maior dissimilaridade das concreções cristalinas (27,28) foi ocasionado pela peculiaridade da sua composição química.

Os cristais nas espécies de *Piper* estudadas podem estar atuando como auxiliares da rigidez tissular e defensores contra patógenos e herbívoros, pois os espécimes amostrados não tinham sinais de predação e infecção (observações de campo), e a bainha e lâmina foliares possuem poucos tecidos mecânicos (dados não publicados). Funções de remoção do excesso citosólico de cálcio, magnésio e enxofre nas três espécies de *Piper*; de potássio e silício em *P. arboreum* var. *arboreum*, assim como de detoxificação de alumínio, manganês e titânio em *P. arboreum* var. *arboreum* são prováveis aos cristais com base na composição química elementar observada. Para as drusas do mesofilo, funções de captação da energia solar em *P. arboreum* var. *arboreum* e *P. callosum*, oriundas de ambiente umbrófilo, e reflexão em *P. tuberculatum*, desenvolvidas a pleno sol, são possíveis e já foram atribuídas para cristais de Piperaceae (Horner 2012; Horner *et al.* 2012).

CONCLUSÕES

A precisão estrutural e localização caulinar e foliar dos cristais das espécies de *Piper* em questão sugerem a imposição genética sobre o controle da biomineralização nessas espécies, o que faz dos macropadrões cristalinos observados caracteres úteis à separação interespecífica. Os cristais atuam como componentes anatômico e fisiológico relevantes para a autoecologia dos *taxa* de *Piper* analisados.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor. Ao Dr. Hilton Tulio Costi e à Dra. Alba Lins, por permitirem, respectivamente, o uso dos Laboratórios de Microscopia Eletrônica de Varredura e de Anatomia Vegetal pertencentes ao Museu Paraense Emílio Goeldi para a realização das análises. À Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela identificação botânica das espécies estudadas. Aos editores e revisores da Revista Acta Amazonica, pelas contribuições dadas ao artigo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Baran, E.J.; González-Baró, A.C.; Ciciarelli, M.M.; Rolleri, C.H. 2010. Characterization of biominerals in species of *Canna* (Cannaceae). *Revista de Biologia Tropical*, 58: 1507-1515.

- Cervantes-Martinez, T.; Horner, H.T.; Palmer, R.G.; Hymowitz, T.; Brown, A.H.D. 2005. Calcium oxalate crystal macropattern in leaves of species from groups Glycine and Shuteria (Glycininae; Phaseoleae; Papilionoideae; Fabaceae). *Canadian Journal of Botany*, 83: 1410-1421.
- Chamberlain, C.J. 1932. *Methods in plant histology*. The University of Chicago Press, Chicago, 1932, 416p.
- Franceschi, V.R.; Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 41-71.
- Gogosz, A.M.; Boeger, M.R.T.; Negrelle, R.R.B.; Berço, C. 2012. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). *Rodriguésia*, 63: 405-417.
- Hammond, C. 2009. *The basics of crystallography and diffraction*. 3 ed. Oxford University Press, New York, 2009, 421p.
- He, H.; Bleby, T.M.; Veneklaas, E.J.; Lambers, H.; Kuo, J. 2012. Morphologies and elemental compositions of calcium crystals in phyllodes and branchlets of *Acacia robeorum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Annals of Botany*, 109: 887-896.
- Horner, H.T. 2012. *Peperomia* leaf cell wall interface between the multiple hypodermis and crystal-containing photosynthetic layer displays unusual pit fields. *Annals of Botany*, 109: 1307-1315.
- Horner, H.T.; Wanke, S.; Samain, M-S. 2009. Evolution and systematic value of leaf crystal macropatterns: a phylogenetic approach in the genus *Peperomia* (Piperaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 170: 343-354.
- Horner, H.T.; Wanke, S.; Samain, M-S. 2012. A comparison of leaf crystal macropatterns in the two sister genera *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 99: 983-997.
- Jaramillo, M.A.; Manos, P.S. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 88: 706-716.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book, New York, 1940, 523p.
- Lersten, N.R.; Horner, H.T. 2004. Calcium oxalate crystal macropattern development during *Prunus virginiana* (Rosaceae) leaf growth. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1800-1808.
- Lersten, N.R.; Horner, H.T. 2007. Calcium oxalate crystals in tribe Galegeae (Leguminosae) including foliar crystal macropattern development in *Caragana frutex*. *Canadian Journal of Botany*, 85: 394-403.
- Lersten, N.R.; Horner, H.T. 2008. Crystal macropatterns in leaves of Fagaceae and Nothofagaceae: a comparative study. *Plant Systematics and Evolution*, 271: 239-253.
- Lersten, N.R.; Horner, H.T. 2011. Unique calcium oxalate "duplex" and "concretion" idioblasts in leaves of tribe Naucleae (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 98: 1-11.
- Lide, D.R. 2005. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 85 ed. CRC Press, Boca Raton, 2005, 2660p (www.hbcpnetbase.com). Acesso em 10/03/2014.
- Metcalfe, C.R. 1983. Secreted mineral substances-crystals. In: Metcalfe, C.R.; Chalk L. (Ed.). *Anatomy of the dicotyledons*. 2da ed. v.2. Clarendon Press, Oxford, p.83-97.

- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. v.2. Clarendon Press, Oxford, 1950, 1500p.
- Pritchard, S.G.; Prior, S.A.; Rogers, H.H.; Peterson, C.M. 2000. Calcium sulfate deposits associated with needle substomatal cavities of container-grown longleaf pine (*Pinus palustris*) seedlings. *International Journal of Plant Sciences*, 161: 917–923.
- Solereder, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. v.2. Clarendon Press, Oxford, 1908, 1182p.
- Weiner, S.; Dove, P. 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54: 1–29.
- Yasue, T. 1969. Histochemical identification of calcium oxalate. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2: 83–95.

Recebido em 29/11/2013

Aceito em 24/03/2014

