

WELLINGTON GERALDO OLIVEIRA CARVALHO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE HISTOLOCALIZAÇÃO DO ALUMÍNIO EM
FOLHAS DE ESPÉCIES DE CERRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

WELLINGTON GERALDO OLIVEIRA CARVALHO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE HISTOLOCALIZAÇÃO DO ALUMÍNIO EM
FOLHAS DE ESPÉCIES DE CERRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2012.

Cleberon Ribeiro

Renata Maria Strozi Alves Meira

Aristéa Alves Azevedo
(Orientadora)

Aos meus pais, Morgana e Wellington, as pessoas mais especiais e importantes da minha vida. À Aristéa e ao Bruno, que tornaram possível a realização desse sonho.

DEDICO.

À Laila, minha afilhada, e ao Pedro, meu sobrinho e afilhado. Para que um sonho seja alcançado, lutem por ele, sem jamais perder a graça e a magia de sonhar.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pelo dom da vida, pelas pessoas que a mim ofereceu como família, amigas e companheiras, pela minha personalidade e por abençoar o meu caminho;

À Nossa Senhora, presença constante em minha vida, por me proteger e apontar os melhores caminhos e por fazer do meu coração a Sua morada. “Eu me ofereço inteiramente todo a Vós”;

À minha família, que não poderia ser melhor e mais bonita. Amo imensamente cada um de vocês. Obrigado por confiarem em mim e por me apoiarem;

Aos professores e pesquisadores Élder Antônio Sousa Paiva (UFMG), Fernando Henrique Aguiar Vale (UFMG), Claudia Franca Barrros (IP/JBRJ) e Renata Maria Strozi Alves Meira (UFV), por terem aceitado a mim como estagiário em seus laboratórios de Anatomia Vegetal, de forma tão inspiradora e estimulante. Sem essas oportunidades eu não teria conseguido realizar o meu sonho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, palco da realização do meu sonho de estudar Botânica e Anatomia Vegetal profunda e intensamente;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa “Acúmulo de alumínio em espécies de diferentes grupos funcionais edáficos de plantas do Cerrado”, coordenado pelo Prof. Dr. João Augusto Alves Meira Neto;

Ao Bruno Francisco Sant’Anna-Santos, amigo e companheiro, por ter surgido em minha vida pessoal e profissional de forma tão intensa, por ter guiado a minha escolha da pós-graduação, por ter me acompanhado durante todo esse tempo, me estimulando e me apoiando em cada decisão que eu tomava, por ter me ajudado imensamente em todos os momentos, por ter atuado como um co-orientador, na prática, e por me permitir fazer parte de sua vida pessoal e profissional;

À Aristéa Alves Azevedo, minha orientadora, amiga e conselheira. Obrigado por ter me aceitado, por ter me permitido conviver com você de forma tão intensa, por me receber sempre com aquele sorriso e com a frase

“Diga, meu caro!”, tão acolhedores. Obrigado pelas disciplinas, as melhores que já cursei, pela atenção e pela confiança. Você é exemplo de dedicação e paixão pela Anatomia Vegetal, mas também exemplo de vida e competência;

Aos primeiros companheiros de campo na Floresta Nacional de Paraopeba (FLONA), Carol, Gláucia, Luiz, Márcia e Vanessa. Foi quase um mês de imersão profunda no Cerrado e no espírito de equipe. Aprendi muito com vocês! Minha Dinda Carol, você se tornou uma pessoa especial, obrigado por me presentear com sua amizade e acolhimento como “afilhado”;

Ao Gilmar Valente, pela identificação das espécies vegetais deste trabalho, pela imensurável ajuda e companhia nas coletas, por estimular a minha paixão pelo Cerrado e pela conservação desse bioma, pelo carinho e pela atenção;

Ao Victor e ao Pedro Paulo, companheiros de república. Obrigado, Victor, por me receber em Viçosa, e obrigado Pedro Paulo, pela companhia agradabilíssima nos lanches e jantares;

À Dayana Francino (Day) e à Valdneá Casagrande (Dya), companheiras, amigas e irmãs mais velhas de laboratório, com as quais aprendi muito. “Daday”, você é um anjinho que caiu do céu para tornar a vida ainda mais bonita! Dya, minha irmãzinha na UFV, obrigado por me aturar e por aguentar meus abraços carentes-esmagadores;

À Larisse de Freitas Silva, o que dizer dessa que foi a melhor das surpresas? Uma inicial colega que não entendeu minhas amargas críticas. Uma colega que sonhou casar-se comigo e, depois disso, virou minha “wife” e eu seu “HusbanD”. Uma amiga que passou a me acompanhar, a me suportar e a me entender. Uma amiga que depois de tanta “coisa” já é eterna e essencial. Tudo bem, eu aceito te dividir com o “The other guy”, mas apenas com ele, tá? (rs...). Obrigado, “Larys”, pela imensurável ajuda e companhia nas horas de trabalho e de lazer; pela sinceridade, paciência, meiguice e “rostinho de coração”; enfim, por ter aparecido e permanecido na minha vida!

À Talita Oliveira de Araújo, a pequena “Tets”, que apareceu de forma também surpreendente em minha vida, se tornando, a cada dia que

passava, mais presente e amiga. Obrigado pela ajuda no laboratório, por me suportar na “Pensão” e por cuidar de mim quando ficava doente;

À Jaqueline Vasconcelos, a “Jaque”, por também ser uma colega sempre presente, por doar sua humildade e jeito amável a cada momento na “Pensão” e pela ajuda nos trabalhos de laboratório;

À “Pensão”, morrerei de saudades de todos os momentos que vivemos naquele apartamento, que se tornou nosso lar, lugar de compartilhar angústias, alegrias, comemorar aniversários, testar “Petit Gateau’s” sempre frustrados (rs...), jogar vídeo game (revivendo a infância em pleno mestrado), assistir a filmes e/ou dormir durante esses, etc... Obrigado, Tets, Larys e Jaque! Tornamos momentos eternos;

Aos demais colegas e professores do Laboratório de Anatomia Vegetal, especialmente à Nívea Moreira (Técnica na época que estive presente no Laboratório), com os quais tive a oportunidade de desenvolver ainda mais o espírito de equipe, amizade, convivência e aprendizagem.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1. Obtenção das plantas.....	4
2.2. Determinação do teor de Al nos tecidos foliares	4
2.3. Histolocalização do Al e dos compostos fenólicos	5
2.3.1. Histolocalização do Al	5
2.3.2. Histolocalização dos compostos fenólicos	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1. Identificação de espécies acumuladoras e teor de alumínio em espécies de Cerrado.....	9
3.2. Histolocalização do alumínio acumulado.....	10
3.3. Eficiência de reagentes e comparação de técnicas de processamento	13
3.4. Histolocalização de compostos fenólicos e possível complexação com o alumínio acumulado.....	17
4. CONCLUSÕES.....	19
5. REFERÊNCIAS	36

RESUMO

CARVALHO JÚNIOR, Wellington Geraldo Oliveira, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Avaliação de técnicas de histolocalização do alumínio em folhas de espécies de Cerrado.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo.

As técnicas de histolocalização são ferramentas importantes para o entendimento das estratégias de acúmulo de alumínio em espécies vegetais com ocorrência em solos ácidos, condição comum no Cerrado. Objetivou-se identificar a presença dessa estratégia em espécies de Cerrado, detectar e quantificar os sítios de acúmulo, testando a eficiência de cinco reagentes (aluminon, azurine, chrome azurol S, hematoxilina e pirocatecol violeta) e duas técnicas de processamento (sem inclusão e com inclusão em metacrilato), além de avaliar a presença de alumínio nos sítios de acúmulo de compostos fenólicos. Amostras foliares de nove espécies selecionadas foram submetidas à quantificação de alumínio. Para estudo anatômico, os fragmentos foram fixados em FAA₅₀ e seccionados transversalmente, sem e com inclusão em metacrilato. Os cortes foram submetidos aos reagentes para detecção de alumínio e compostos fenólicos. Entre as espécies estudadas, *Miconia albicans*, *Palicourea rigida*, *Qualea grandiflora*, *Salvertia convallariodora* e *Symplocos nitens* podem ser consideradas acumuladoras de alumínio, sendo notada variação no teor do elemento de 1 292,0 a 4 852,4 mg.kg⁻¹. No entanto, não há relação entre o teor de alumínio e a intensidade da reação conferida pelos reagentes, bem como do número de sítios evidenciados. As paredes pecto-celulósicas e os cloroplastos são os principais sítios de acúmulo. Além de mais eficazes, a hematoxilina, o chrome azurol S e o pirocatecol violeta fornecem resultados mais homogêneos, sendo mais indicados para uso. A inclusão em metacrilato não prejudicou a histolocalização do alumínio. Das espécies acumuladoras de alumínio, somente *P. rigida* não possui compostos fenólicos. Nas demais espécies, os sítios de acúmulo de compostos fenólicos diferem dos do alumínio, sugerindo a não complexação entre essas substâncias nas espécies estudadas.

ABSTRACT

CARVALHO JÚNIOR, Wellington Geraldo Oliveira, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Analysis of histolocalization techniques of aluminum in leaves of Cerrado species**. Advisor: Aristéa Alves Azevedo.

Histolocalization techniques are important tools for understanding the accumulation strategies of aluminum in plant species occurring in acid soils, a common condition in Cerrado. The objective of this work was to identify the presence of this strategy in Cerrado species, detect and quantify the sites of accumulation, testing the effectiveness of five reagents (aluminon, azurine, chrome azurol S, hematoxylin and pyrocatechol violet) and two processing techniques (without inclusion and with inclusion in methacrylate), and to evaluate the presence of aluminum at the site of accumulation of phenolic compounds. Leaf samples of nine selected species were subjected to quantification of aluminum. For anatomical study, the fragments were fixed in FAA₅₀ and sectioned, with and without inclusion in methacrylate. The sections were submitted to reagents for detection of aluminum and phenolic compounds. Among the studied species *Miconia albicans*, *Palicourea rigida*, *Qualea grandiflora*, *Symplocos nitens* and *Salvertia convallariodora* can be considered as aluminum-accumulating species, with a variation in the content of the element from 1 292.0 to 4 852.4 mg.kg⁻¹. However, there is no relation between the content of aluminum and the intensity of the response afforded by the reagents and the number of sites shown. The pectin-cellulosic walls and chloroplasts are the main sites of accumulation. Besides being more effective, hematoxylin, chrome azurol S and pyrocatechol violet provides more homogeneous results, being more suitable for use. The inclusion in methacrylate did not harm aluminum histolocalization. Among aluminum-accumulating species, only *P. rigida* does not present any phenolic compounds. In the other species, the sites of accumulation of phenolic compounds differ from those of aluminum, not suggesting the complexation of these substances in the studied species.

1. INTRODUÇÃO

O alumínio, metal mais abundante e terceiro elemento químico mais comum na crosta terrestre, ocorre na litosfera, em sua maioria, em formas não-fitotóxicas, como aluminossilicatos e óxidos de alumínio (WILLIAMS, 1999). No entanto, em solos acidificados o alumínio pode se solubilizar, tornando-se potencialmente tóxico para muitas espécies de plantas, principalmente as sensíveis a baixas concentrações desse elemento (KOCHIAN, 1995; VITORELLO et al., 2005).

O Cerrado, bioma que se estende por cerca de dois milhões de quilômetros quadrados e ocupa 22% do território brasileiro, é caracterizado por diferentes fitofisionomias (campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado *sensu stricto* e cerradão) sobre solos, em sua maioria, distróficos, com baixos valores de pH, baixos teores de cálcio e magnésio e alto teor de alumínio (FURLEY e RATTER, 1998; OLIVEIRA-FILHO e RATTER, 2002). Há de se esperar, portanto, que a maioria das espécies nativas desse bioma seja resistente a esse metal utilizando estratégias de não absorver o Al (exclutoras) ou de absorver e acumular nos tecidos sob uma forma não tóxica (acumuladoras) (OLIVEIRA-FILHO e RATTER, 2002). Várias espécies de Cerrado foram relatadas como acumuladoras de alumínio (HARIDASAN, 1982; 1988; MEDEIROS e HARIDASAN, 1985) e representam grande porcentagem em uma determinada fitofisionomia, dada a vantagem competitiva que essas plantas apresentam em relação às demais (HARIDASAN, 2008).

As plantas acumuladoras de alumínio são aquelas que estocam mais de 1000 ppm (mg.kg^{-1}) nas folhas, em contraste com a maioria das plantas que possuem menos de 300 mg.kg^{-1} de alumínio em seus tecidos foliares (CHENERY, 1948). O estudo da localização do alumínio no corpo vegetal é importante para o entendimento da estratégia de tolerância ao metal, visto que algumas espécies acumuladoras apresentam padrão diferenciado de distribuição interna de alumínio, tanto ao nível tecidual, quanto ao nível celular (HARIDASAN et al., 1986; WATANABE et al., 1998; BRITEZ et al., 2002; SHEN et al., 2002; CARR et al., 2003; ANDRADE et al., 2011), e é

provável que esses padrões estejam correlacionados com diferentes mecanismos de tolerância. Dessa forma, torna-se essencial a identificação dos sítios de acúmulo do alumínio em diferentes espécies acumuladoras.

Vários reagentes têm sido utilizados para a detecção de alumínio nos tecidos vegetais, como o aluminon (ácido aurintricarboxílico amoníaco) (CHENERY, 1948; HARIDASAN et al., 1986; HARIDASAN, 2008), o chrome azurol S (KUKACHKA e MILLER, 1980; WEHR et al., 2010), a hematoxilina (ANDRADE et al., 2011) e o pirocatecol violeta (WATANABE et al., 1998; BRITEZ et al., 2002; WATANABE e OKADA, 2005). Em tecidos animais comumente utiliza-se solochrome azurine (azurine B ou chrome azurol B) na localização de alumínio (DENTON et al., 1984; FERNÁNDEZ-MARTÍN et al., 1996), entretanto em tecidos vegetais o reagente foi pouco testado (DENTON E OUGHTON, 1993). O chrome azurol S, o solochrome azurine e o aluminon pertencem à mesma classe de corantes, os hidroxitrifenilmetanos ou ácidos rosólicos, derivados do trifenilmetano e não são muito utilizados como corantes, tendo maior importância como indicadores ácido-base (LILLIE, 1977). A hematoxilina por sua vez é enquadrada na classe dos corantes naturais, podendo ser extraída do lenho de *Haematoxylon campechianum* (Fabaceae) e utilizada, na ausência de mordente metálico, como reagente para histolocalização de metais (LILLIE, 1977).

Para o estudo de histolocalização de alumínio, é comum o uso de um único reagente para detecção dos sítios de acúmulo (HARIDASAN et al., 1986; WATANABE et al., 1998; BRITEZ et al., 2002; ANDRADE et al., 2011). No entanto, o emprego de um único reagente pode sub ou superestimar o número de sítios e/ou a intensidade da reação de acordo com a afinidade do reagente, tornando essenciais abordagens mais amplas, com uso de diferentes reagentes e análise comparada. Em estudos histoquímicos a prática de aplicação de mais de um teste é recomendada, de modo que resultados falsos positivos e/ou negativos possam ser evitados.

Além do tipo de reagente, diferentes técnicas de processamento têm sido empregadas. Em alguns estudos, as amostras não são incluídas (WATANABE et al., 1998; BRITEZ et al., 2002), sendo diretamente seccionadas em micrótomo com uso de um suporte como isopor ou pecíolo de embaúba. Contudo, a inclusão das amostras têm sido adotada por

autores como Andrade et al. (2011), que utilizaram paraplast como meio de inclusão. Partindo-se do pressuposto que diferentes tipos de processamento possam influenciar nos resultados de trabalhos de histolocalização, a comparação de diferentes técnicas assumem papel relevante. Atualmente as historesinas, em especial o etileno-glicol-metacrilato, vem sendo amplamente utilizadas, como meio de inclusão em estudos de Anatomia Vegetal, por possibilitarem a obtenção de secções mais delgadas, em comparação com os outros métodos. Entretanto, não foram encontrados na literatura dados sobre os efeitos dessa técnica na histolocalização do alumínio.

As espécies de Cerrado comumente possuem expressivo teor de compostos fenólicos em suas folhas (MARQUIS et al., 2002; BIERAS e SAJO, 2009). Em geral, esses compostos estão associados a estratégias de defesa contra patógenos e herbívoros (NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT, 1992; SILVA e BATALHA, 2011) e ainda às propriedades medicinais dessas plantas (HIRUMA-LIMA et al., 2006). Considerando-se a possível quelação do alumínio pelos compostos fenólicos, como mecanismo de desintoxicação interna (NAGATA et al., 2002), torna-se relevante investigar a ocorrência e distribuição desses compostos em plantas acumuladoras de alumínio.

Diante do exposto, objetivou-se identificar, dentre as espécies vegetais selecionadas, a presença da estratégia de acúmulo de alumínio e os sítios de acúmulo nas espécies acumuladoras; avaliar a eficiência dos reagentes e das técnicas adotadas na histolocalização desse elemento; e verificar se há superposição entre os sítios de acúmulo de compostos fenólicos e de alumínio.

Serão testadas as hipóteses de que o tipo de reagente utilizado e a técnica de processamento das amostras influenciam na quantidade de sítios detectados e na intensidade da reação e de que o alumínio acumulado esteja complexado com os compostos fenólicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das plantas

Foram selecionadas nove espécies vegetais, a saber, *Magonia pubescens* A. St.-Hil. (Sapindaceae), *Miconia albicans* (Sw.) Steud. (Melastomataceae), *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae), *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. (Euphorbiaceae), *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), *Salvertia convallariodora* A. St.-Hill. (Vochysiaceae), *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae), *Symplocos nitens* (Pohl) Benth. (Symplocaceae) e *Terminalia argentea* Mart. (Combretaceae). A seleção foi realizada utilizando-se os critérios de maior abundância dentre levantamentos florísticos executados no bioma Cerrado (RATTER et al., 2003) e na área específica selecionada para coleta (NERI et al., 2012), a citação de algumas dessas espécies como acumuladoras de alumínio (HARIDASAN et al., 1986) e a prospecção inicial a campo, via detecção de acúmulo de alumínio em folhas e caules de várias espécies vegetais, utilizando o reagente chrome azurol S 0,5% (IAWA COMMITTEE, 1989).

As plantas foram coletadas em novembro de 2010 na Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba-MG (19°20'S, 44°20'W), com altitude variando de 740 a 760 metros e área aproximada de 200 hectares (FIG. 1A). O clima da região é tropical, com verões chuvosos e invernos secos, tipo Aw de Köppen (1948). A vegetação é típica do bioma Cerrado, sendo que as fitofisionomias variam desde formas savânicas (Cerrado *sensu stricto*) até os cerradões. A área selecionada para coleta das espécies vegetais é caracterizada pela presença de Cerrado *sensu stricto* sobre cambissolo háplico Tb distrófico (NERI et al., 2012).

2.2. Determinação do teor de Al nos tecidos foliares

Folhas totalmente expandidas do terceiro nó, a partir do ápice caulinar, foram coletadas e secas em estufa de ventilação forçada, a 70°C, por aproximadamente 78 horas, para quantificação do teor de alumínio. Foram amostrados três indivíduos adultos de cada espécie selecionada.

Após secagem, as folhas foram trituradas em moinho tipo Wiley (3383-L10, Thomas Scientific, EUA), sendo as amostras (0,5g) adicionadas a tubos contendo solução nitroperclórica (2:1) e submetidas à pré-digestão à temperatura ambiente (TEDESCO et al., 1995). Os teores de alumínio foram, então, determinados utilizando espectrômetro de absorção atômica (SPECTRAA 55B, Varian Techtron, Victoria, Austrália), no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

2.3. Histolocalização do Al e dos compostos fenólicos

Para os estudos de histolocalização foram selecionadas folhas totalmente expandidas do terceiro nó, a partir do ápice caulinar, de três indivíduos adultos de cada espécie. Foram retirados fragmentos da nervura mediana e da região entre a margem e a nervura, no terço médio da folha. Após fixação em FAA (formaldeído - ácido acético - etanol 50%, 1:1:18), por 48 horas, as amostras foram estocadas em etanol 70%.

2.3.1. Histolocalização do Al

Para verificar a influência da técnica de processamento das amostras na detecção de alumínio, foram adotados dois procedimentos: sem inclusão e com inclusão em historesina (etileno-glicol-metacrilato, Historesin, Leica). No procedimento sem inclusão, secções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação Ltda, Belo Horizonte, Brasil) a partir de metodologia usual. Para inclusão, os fragmentos foliares foram desidratados em série etanólica e após infiltração, incluídos em historesina. As secções transversais, com 7 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems, Deerfiels, Illinois, USA).

Os reagentes utilizados para detecção de alumínio (TAB. 1) e a coloração da reação positiva para este elemento estão na Tabela 1.

A avaliação da eficiência dos cinco reagentes testados foi baseada em dois critérios:

a) intensidade de reação, de acordo com a seguinte escala: ++ (reação positiva forte), + (reação positiva fraca) e – (reação negativa);

b) número de sítios de acúmulo de alumínio: considerando as substâncias ergásticas, tipos e/ou estruturas celulares da epiderme, tecidos fundamentais e vasculares como possíveis sítios de acúmulo.

TABELA 1. Reagentes utilizados para detecção do alumínio nas amostras foliares vegetais e colorações obtidas quando da presença do elemento em contato com o reagente.

Reagente	Coloração positiva para alumínio	Referência
Aluminon 0,1%	Vermelho	Haridasan et al. (1986)
Chrome azurol S 0,5%	Azul	Kukachka e Miller (1980)
Hematoxilina 0,2%	Roxo	Andrade et al. (2011)
Pirocatecol violeta 0,02%	Azul claro	Watanabe et al. (1998)
Solochrome azurine 1%	Azul	Denton e Oughton (1993)

O preparo dos reagentes seguiu as etapas discriminadas abaixo.

O aluminon (ácido aurintricarboxílico amoníaco) foi preparado a 0,1%, em tampão acetato de amônio a 3,2N, pH 5,2 (24,64 g de acetato/100 mL de solução e 10 mL de HCl 32%), sob temperatura de 60 a 80°C. Após filtragem do reagente, também sob temperatura de 60 a 80°C, as secções foliares foram submetidas à solução de aluminon por 60 minutos e, posteriormente, lavadas em água destilada por 5 minutos em temperatura ambiente (HARIDASAN et al., 1986).

O chrome azurol S foi preparado a 0,5% (0,5 g de chrome azurol S e 5,0g de acetato de sódio, completando o volume para 100 mL com água destilada). As secções foliares foram submetidas a essa solução por 60 minutos (KUKACHKA e MILLER, 1980).

A hematoxilina foi preparada a 0,2%, utilizando-se 0,2 g de hematoxilina e 0,02 g de IO₃K (iodato de potássio), completando o volume para 100 mL com água destilada. As secções foliares foram submetidas à solução por 40 minutos, sendo, posteriormente, lavadas em água destilada por 2 minutos. Quando em historesina, a diferenciação em etanol 95% fez-se

necessária para eliminação do excesso da solução do reagente (ANDRADE et al., 2011).

O pirocatecol violeta foi preparado a 0,02%, utilizando-se 0,02 g de pirocatecol violeta em tampão 2,5% hexamina-NH₄OH (pH 6,2). O preparo dessa solução tampão foi feito mediante prévio preparo de solução estoque de tampão hexamina a 15%, dissolvendo 75 g de hexamina em água deionizada (aproximadamente 400 mL), adicionando-se 16 mL de hidróxido de amônio e ajustando-se o pH para 6,2 com solução de HCl 5M. Completou-se o volume para 500 mL com água deionizada e conservou-se a solução em geladeira. A diluição com água deionizada para 2,5% faz-se necessária somente no momento do preparo da solução final. As secções foliares eram, então, submetidas ao reagente por 15 minutos, sendo, em seguida, lavadas em tampão 2,5% hexamina-NH₄OH (pH 6,2) (WATANABE et al., 1998).

O solochrome azurine foi preparado a 1% em pH 5,0, utilizando 1 g de solochrome azurine para 100 mL de solução em água destilada. Para ajuste do pH, utilizou-se solução de ácido acético a 25% (v/v) em água destilada. As secções foliares permaneceram por 60 minutos no reagente e, em seguida, foi realizada a diferenciação em álcool etílico 95% por 5 minutos (DENTON e OUGHTON, 1993).

2.3.2. Histolocalização dos compostos fenólicos

Para detecção de compostos fenólicos nas espécies acumuladoras e para a análise da complexação desses compostos com o alumínio, parte das amostras foi fixada em solução de sulfato ferroso a 10% em formalina 4%, (JOHANSEN, 1940). Outra parte das amostras foi submetida a metanol, durante 48 horas, e, em seguida, imersa em solução de sulfato ferroso a 10% em formalina 4%, como controle do teste para compostos fenólicos e para extração da clorofila, a fim de eliminar a interferência desse pigmento na possível localização do alumínio nos cloroplastos.

Para detecção de compostos fenólicos, a mesma metodologia de inclusão em historesina foi adotada. Após as reações histoquímicas, as

lâminas foram montadas em água destilada para observação e documentação.

Lâminas histológicas obtidas do controle do teste para detecção de fenólicos foram submetidas aos reagentes utilizados na detecção de alumínio para comparação dos sítios de acúmulo. A análise do material em microscopia de luz e a captura de imagens foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se microscópio modelo Olympus AX70TRF (Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo e câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc, New York, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação de espécies acumuladoras e teor de alumínio em espécies de Cerrado

Tanto o teste de prospecção em campo, quanto as análises de teor de alumínio (FIG. 2), demonstraram que cinco dentre as nove espécies avaliadas são acumuladoras (FIG. 1B-D), de acordo com o critério proposto por Chenery (1948), já que apresentaram teores acima de 1000,0 mg.kg⁻¹. Dentre essas, *Miconia albicans*, *Palicourea rigida* e *Qualea grandiflora* já haviam sido identificadas como acumuladoras (HARIDASAN, 1982; MEDEIROS e HARIDASAN, 1985; OLIVARES et al., 2010; ANDRADE et al., 2011), ao contrário de *Salvertia convallariodora* e *Symplocos nitens*.

Para *M. albicans*, o teor de alumínio detectado foi inferior aos anteriormente relatados para espécie. Teores entre 6250,0 mg.kg⁻¹ (HARIDASAN e ARAUJO, 1988) e 11000,0 mg.kg⁻¹ (MEDEIROS e HARIDASAN, 1985) foram detectados, o que pode ser consequência direta das diferenças do tipo de solo entre os pontos de coleta e do estágio de desenvolvimento das folhas, embora a coleta das amostras tenha sido padronizada.

Em *P. rigida*, o teor de alumínio detectado (FIG. 2) foi inferior à metade do observado por Haridasan (1982), onde as amostras apresentaram teor médio equivalente a 9910,0 mg.kg⁻¹. Em *Q. grandiflora*, o teor de alumínio observado pelo mesmo autor foi quase quatro vezes maior do registrado no presente estudo. Ainda para *Q. grandiflora*, Andrade et al. (2011) registraram aumento no teor de 3900,0 para 5000,0 mg.kg⁻¹, verificando que quanto mais velhas as folhas, maior o teor de alumínio acumulado. Adicionalmente, Medeiros e Haridasan (1985) observaram, nos mesmos indivíduos de *P. rigida*, teores mais elevados de alumínio em folhas maduras em comparação com folhas jovens. Esses mesmos autores afirmam que a variação sazonal na concentração de alumínio, entre folhas jovens e maduras, é bem mais proeminente entre as espécies não-acumuladoras. Na presente pesquisa, as amostras foram coletadas em uma

única época, novembro de 2010, e em uma única área, FLONA de Paraopeba, sendo importante, com base no discutido anteriormente, que futuros trabalhos possam vir a contribuir no sentido de fazer amostragens ao longo do ano, em diferentes estações, em folhas de diferentes estádios de desenvolvimento e em solos distintos para avaliar se há variação significativa no teor de alumínio dependendo destes fatores.

No presente estudo, as espécies não-acumuladoras de alumínio, como *Magonia pubescens* (FIG. 1E), apresentaram teores médios entre 19,3 e 208,0 mg.kg⁻¹ (FIG. 2), corroborando o relatado por Haridasan (1982) para espécies que não acumulam esse elemento. Entretanto, os teores de alumínio encontrados para *Terminalia argentea*, *Magonia pubescens* e *Siparuna guianensis*, estão abaixo do registrado na literatura para espécies de Cerrado, entre 150,0 e 200,0 mg.kg⁻¹ (HARIDASAN, 1982). De acordo com o mesmo autor, dentre as espécies não-acumuladoras de alumínio, aquelas que se desenvolvem em solos ácidos, como as de Cerrado em geral, apresentam teores de alumínio em seus tecidos mais elevados que aquelas que se desenvolvem em solos não-ácidos. Entretanto, o presente estudo mostra que nem sempre essa afirmação é válida, tendo-se em vista que teores muito baixos, como aqueles obtidos em *T. argentea*, *M. pubescens* e *S. guianensis*, podem ser encontrados mesmo em espécies vivendo sobre solos ácidos.

3.2. Histolocalização do alumínio acumulado

Em *M. pubescens*, *P. glabrata* (FIG. 3A-B), *S. guianensis* e *T. argentea* (FIG. 3C-D), todos os testes para evidenciar o alumínio acumulado, independente da modalidade de processamento, bem como do reagente utilizado, foram negativos, ou seja, não apresentaram coloração típica para reação do alumínio com o reagente utilizado. Nas espécies acumuladoras de alumínio, os testes para histolocalização do alumínio foram positivos (FIG. 3F-H), e são inéditos para *S. convallariodora* e *S. nitens*. Porém, existem diferenças em relação ao número de sítios de acúmulo e à intensidade da reação de acordo com a espécie, reagente e/ou técnica de processamento (TAB. 3-7).

Os principais sítios de acúmulo evidenciados foram as paredes celulares de natureza pecto-celulósica da epiderme (FIG. 4A-B-D), do colênquima (FIG. 4B), do floema (FIG. 4C), dos parênquimas lacunoso (FIG. 4D), paliçádico (FIG. 4E) e fundamental (FIG. 4F-G-H). Dados que corroboram aqueles relatados por Haridasan et al. (1986), Cuenca et al. (1991), Watanabe et al. (1998), Britez et al. (2002) e Andrade et al. (2011), em demais espécies não necessariamente pertencentes ao bioma Cerrado, mas que crescem naturalmente em solos ácidos, principalmente no tocante à constante presença de alumínio nas paredes celulares da epiderme. Em *Richeria grandis* não houve acúmulo no floema e no parênquima lacunoso, no entanto Cuenca et al. (1991) relatou reação positiva para os elementos de vaso, ao contrário do observado nas espécies do presente estudo, onde não foi observado o acúmulo de alumínio em paredes lignificadas.

Os resultados obtidos neste trabalho quanto à afinidade do alumínio por paredes pecto-celulósicas corroboram os dados relatados na literatura para outras espécies. Nas espécies sensíveis ao alumínio, as paredes celulares estão constantemente associadas ao mecanismo de toxidez, desempenhando papéis importantes, como a percepção e a expressão da toxidez pelo elemento (YANG et al., 2011), sendo seus principais componentes, pectinas e hemiceluloses, responsáveis pela associação com o alumínio. Grupos carboxílicos livres das substâncias pécticas (CHANG et al., 1999; WEHR et al., 2003, 2010) e de hemiceluloses (YANG et al., 2011) são apontados como sítios de ligação com o alumínio. Yang et al. (2008) confirmaram que paredes celulares com menores teores de polissacarídeos tem menor quantidade de grupos carboxílicos livres e estariam associadas ao mecanismo de exclusão do Al, uma vez que não permitem e/ou dificultam a interação celular com o elemento tóxico, não sendo esse incorporado às células. Dessa forma, não é de surpreender que, nas espécies acumuladoras, as paredes pecto-celulósicas sejam os principais sítios de acúmulo de alumínio.

Não houve reação positiva para as substâncias ergásticas (FIG. 4A, F-H), para a cutícula (FIG. 4A e D), para os tricomas (FIG. 4C e D) e para as paredes celulares lignificadas, tais como, fibras do floema e do xilema (FIG. 4F), elementos de vaso (FIG. 4C) e células do esclerênquima (FIG. 4F). O

mesmo padrão negativo para o acúmulo de Al em células lignificadas e para a cutícula também foi observado por Britez et al. (2002), em *Faramea marginata*. Contrariamente, em relação aos elementos de vaso, Cuenca et al. (1991), utilizando metodologia de detecção de alumínio via microanálise por raio-X, relataram acúmulo de alumínio nessas células. Entretanto, essa conclusão pode estar equivocada, uma vez que o xilema é um tecido composto por diferentes tipos celulares e o alumínio pode estar acumulado em outros tipos celulares do mesmo tecido, como as células parenquimáticas.

Embora os cloroplastos não sejam comumente associados ao acúmulo de substâncias, essas organelas também foram identificadas como sítios de acúmulo de alumínio (FIG. 5A-E), exceto em *S. nitens* (FIG. 5F-G). Esse registro é inédito para *P. rigida* (FIG. 5A-B), *S. convallariodora* (FIG. 5C-D) e *M. albicans* (FIG. 5E). Haridasan et al. (1986) estudaram os sítios de acúmulo de alumínio em *P. rigida* e em *M. albicans*, mas não relataram a presença desse elemento nos cloroplastos.

Cabe ressaltar que o alumínio foi detectado em cloroplastos de folhas maduras sem indícios de pré-senescência ou senescência. Contudo, o relato pioneiro do acúmulo de alumínio nos cloroplastos, em *Richeria grandis* (CUENCA et al., 1991), destaca que este elemento só era acumulado nas organelas de folhas pré-senescentes. Dessa forma, percebe-se com os dados do presente trabalho, que o alumínio não é carregado para os cloroplastos apenas como resultado do processo de senescência das folhas, como sugerido por Cuenca et al. (1991).

Para *Q. grandiflora*, o acúmulo de alumínio nos cloroplastos, evidenciado pela hematoxilina e relatado por Andrade et al. (2011), foi confirmado por meio da utilização de outros quatro reagentes (TAB. 7).

A detecção de cloroplastos como sítios de acúmulo de alumínio em folhas fotossinteticamente ativas, indica a necessidade de estudos posteriores para elucidação das possíveis interferências desse elemento na ultraestrutura dos cloroplastos e no processo fotossintético com um todo.

3.3. Eficiência de reagentes e comparação de técnicas de processamento

Em *S. convallariodora*, *P. rigida* e *M. albicans*, 11 sítios de acúmulo de alumínio foram detectados (TAB. 2-5), havendo variação quanto à presença e à intensidade da reação de acordo com o reagente e a técnica adotados. Para *S. nitens* e *Q. grandiflora*, foram identificados nove sítios de acúmulo (TAB. 6 e 7). Em *S. nitens*, não houve reação positiva nos cloroplastos (TAB. 6), e em *Q. grandiflora*, a menor quantidade de sítios detectados foi decorrência da ausência de parênquima lacunoso (TAB. 7), já que as folhas desta espécie são constituídas apenas por parênquima paliçádico (FIG. 3H).

Não há relação entre a intensidade de reação e o teor de alumínio nas folhas, visto que em *Q. grandiflora*, espécie acumuladora com menor teor de alumínio (FIG. 2), foram notadas reações positivas fortes nos sítios de acúmulo (TAB. 7), assim como em *S. convallariodora* (TAB. 3), espécie com maior teor de alumínio (FIG. 2). A maior intensidade de reação, nesse caso, certamente está ligada à maior alocação do elemento no sítio e não ao teor de alumínio nas folhas, que variou consideravelmente de espécie para espécie (FIG. 2).

Em *S. convallariodora*, todos os sítios de acúmulo de alumínio são identificados independentemente da técnica de processamento utilizada (TAB. 2-3), ou seja, a inclusão das amostras foliares em historesina permite a obtenção dos mesmos resultados obtidos quando da não inclusão das amostras (FIG. 6A-J) em relação ao número de sítios, variando somente quanto à intensidade de reação para um único sítio (parênquima do floema), quando da utilização de três reagentes, azurine, chrome azurol S e hematoxilina (TAB. 3). Para o reagente pirocatecol violeta, os resultados obtidos foram idênticos nas duas técnicas de processamento testadas, tanto em relação ao número de sítios identificados, quanto em relação à intensidade de reação em cada um dos sítios (TAB. 2). No material sem inclusão, todos os sítios coraram-se intensamente com todos os reagentes utilizados. Já no material incluído e no reagente aluminon, seis sítios (paredes celulares dos parênquimas fundamental, do xilema e do floema,

elementos de tubo crivado, células companheiras e colênquima) foram marcados com menor intensidade.

Em *P. rigida*, a inclusão do material em historesina reduziu acentuadamente, de 11 para cinco, o número de sítios identificados pelo aluminon (TAB. 2 e 4), principalmente para o floema (FIG. 7A-B). Nos demais reagentes, a técnica de processamento não influenciou a identificação do número de sítios de acúmulo de alumínio. No material não incluído, somente o aluminon foi capaz de evidenciar o mesmo número de sítios (11) de acúmulo de alumínio evidenciados em *S. convallariodora* (TAB. 2). A utilização do aluminon, independente da espécie avaliada, apresenta uma grande desvantagem, uma vez que é o único reagente, dentre os utilizados, cuja reação com alumínio apresenta a mesma cor do reagente em solução (vermelho). Esse fato acarreta dificuldades na interpretação dos resultados obtidos, face à dúvida em se distinguir entre o que poderia ser a impregnação do reagente e a reação propriamente dita do aluminon com o alumínio acumulado. A simples lavagem do material em água destilada, conforme o protocolo utilizado, pode não ser suficiente para execução da diferenciação da reação. Outro fator negativo em relação à utilização do aluminon é a complexidade da metodologia, uma vez que exige aquecimento, filtragem da solução e reação em estufa.

Para *M. albicans* (TAB. 2 e 5), quando foram utilizados os reagentes azurine, chrome azurol S e pirocatecol violeta, o número de sítios de acúmulo, no material sem inclusão, foi reduzido para cinco, em contraste com a identificação de 11 sítios no material incluído, sendo a reação intensa em nove desses sítios. Para reação com hematoxilina, independentemente da técnica de processamento utilizada (FIG. 7C-D), foram identificados 11 sítios de acúmulos, sendo a reação intensa em nove sítios.

Em *S. nitens*, todos os reagentes, a exceção do aluminon, que apresenta dificuldades de interpretação, conforme já analisado, atuaram de maneira eficiente apenas no material incluído (TAB. 6), identificando nove sítios de acúmulo. Apenas um sítio (parede celular da epiderme), mediante utilização de azurine (FIG. 8A-B), chrome azurol S e hematoxilina, ou dois sítios (parede celular da epiderme e do colênquima), mediante utilização de

pirocatecol violeta, puderam ser identificados no material não incluído (TAB. 2).

Em *Q. grandiflora* (TAB. 2 e 7), foram identificados de oito a nove sítios de acúmulo e não foram notadas diferenças entre o material incluído e não incluído em historesina. Entretanto, utilizando o azurine, somente três sítios foram detectados no material sem inclusão, dos nove identificados no material incluído, assim como notado para o floema (FIG. 8C-D). Esses resultados nos levam a crer que a utilização do azurine é eficaz apenas quando da inclusão das amostras, que permite a obtenção de secções mais delgadas e a exposição dos sítios de acúmulo de alumínio, sendo, portanto, a técnica mais recomendada para *Q. grandiflora*. Também para *M. albicans* e *S. nitens* a detecção de alumínio utilizando o reagente azurine foi mais eficiente em amostras foliares incluídas em historesina (TAB. 2). Tal resultado pode testemunhar contra a utilização do azurine, tendo em vista a necessidade de inclusão, técnica mais laboriosa, e o elevado custo do reagente.

Ainda para *Q. grandiflora*, o pirocatecol violeta não foi capaz de identificar o alumínio acumulado nos cloroplastos, conforme pode ser confirmado quando da utilização dos demais reagentes (TAB. 7). Apenas no material sem inclusão, o chrome azurol S e o azurine não detectaram o alumínio no parênquima do xilema (TAB. 7).

A comparação de reagentes para a detecção de alumínio tem sido pouco estudada e Andrade et al. (2011) observaram variações importantes nos resultados obtidos em trabalhos com a mesma espécie mas com a utilização de diferentes reagentes. Segundo esses autores, as discrepâncias observadas poderiam ser em função de diferenças na permeabilidade de membranas a determinado reagente. Entretanto, diversos outros fatores podem estar associados a essas variações, como a afinidade do reagente pelo alumínio, a forma como o alumínio está ligado à célula, a presença de estruturas, como paredes celulares espessas, que possam dificultar a infiltração de determinado reagente, sendo de fundamental importância a realização de trabalhos que possam identificar e avaliar cada um desses fatores.

Com base nos resultados obtidos e considerando todas as espécies avaliadas é possível observar que nenhum reagente fornece reações intensas em todos os sítios de acúmulo. Nota-se, ainda, que a técnica de processamento a ser utilizada depende da espécie estudada, uma vez que, para *S. convallariodora*, *P. rigida* e *Q. grandiflora*, a não inclusão das amostras demonstrou ser mais eficaz para identificação de sítios, enquanto para *M. albicans* e *S. nitens*, a inclusão do material foi mais eficiente para atingir o objetivo de histolocalizar o alumínio acumulado. Para materiais que necessitam de inclusão, não houve diferenças na eficiência dos reagentes, excluindo-se o aluminon, em função das dificuldades de interpretação dos resultados.

De um modo geral, poderíamos indicar a utilização dos reagentes hematoxilina e chrome azurol S, em materiais não incluídos, dada a facilidade no preparo, obtenção e estoque das respectivas soluções em laboratório, aliado aos bons resultados obtidos para histolocalização de alumínio, e todos os reagentes, à exceção do aluminon (por possuir a mesma cor que a reação para alumínio), nos materiais onde a inclusão não seja prejudicial.

3.4. Histolocalização de compostos fenólicos e possível complexação com o alumínio acumulado

Das cinco espécies acumuladoras de alumínio foco deste trabalho, quatro apresentaram reação positiva em seus tecidos foliares para compostos fenólicos: *M. albicans*, *Q. grandiflora*, *S. convallariodora* e *S. nitens* (FIG. 9A-H). Apenas *P. rigida* demonstrou não acumular compostos fenólicos em suas folhas, como ratificado por Morel et al. (2011), quando comprovaram que o composto secundário com maior abundância nas folhas dessa espécie é a loganina, um monoterpenóide.

Em *M. albicans*, os compostos fenólicos, que por meio do teste histoquímico utilizado podem apresentar coloração de negro a verde escuro, foram identificados nos conteúdos das células epidérmicas (FIG. 9A-B), do colênquima, do parênquima fundamental e do floema (FIG. 9A-B). Para *Q. grandiflora*, os compostos fenólicos foram identificados nos mesmos tecidos, mas nas células epidérmicas estavam presentes apenas na nervura mediana (FIG. 9C). Em *S. convallariodora*, notória concentração de compostos fenólicos foi evidenciada nas células do parênquima paliádico, e em menor intensidade no parênquima lacunoso, colênquima e floema (FIG. 9E-F). Os compostos fenólicos, em *S. nitens*, foram identificados como parte do conteúdo das células dos parênquimas clorofiliano (paliádico e lacunoso) e fundamental, do floema e do colênquima. Para o conteúdo das células epidérmicas, apesar de intensamente marcado pelo sulfato ferroso, o controle do teste não permite a comprovação da existência de compostos fenólicos, uma vez que o extrator não foi capaz de excluir as substâncias presentes (FIG. 9G-H).

Para *M. albicans*, os resultados obtidos, tanto no controle do teste, utilizando metanol como extrator, como nas secções transversais sem qualquer coloração (branco), permitem inferir que os compostos acumulados no parênquima paliádico não são de natureza fenólica (FIG. 9B). No entanto, existem relatos da ocorrência de compostos fenólicos nas folhas dessa espécie (RIBEIRO et al. 1999, BEDETTI et al. 2011, PIERONI et al. 2011). Em especial no trabalho de Bedetti et al. (2011), foram evidenciados compostos fenólicos no parênquima clorofiliano, por meio da utilização de cloreto férrico como teste histoquímico, porém esses autores não utilizaram nenhum tratamento controle. Ribeiro et al. (1999) e Pieroni et al. (2011) confirmaram, por meio de extrações

e análises químicas, altos teores de compostos fenólicos presentes nas folhas de *M. albicans*, identificando-os como taninos, quercetina, rutina, ácidos ursólicos, dentre outros. Assim, apesar de existirem compostos fenólicos acumulados nas folhas de *M. albicans*, esses não foram histolocalizados de maneira inequívoca nas células do parênquima paliçádico.

As reações para histolocalização do alumínio feitas nas amostras submetidas ao extrator de compostos fenólicos (controle da reação) permitiram a obtenção do mesmo padrão obtido quando dos testes em material fixado em FAA₅₀, ou seja, não foram notadas alterações na identificação dos sítios de acúmulo de alumínio (FIG. 10A-F). Percebe-se, portanto, que nas espécies em que foram identificados compostos fenólicos em seus tecidos foliares, os sítios de acúmulo desses não coincidem com os identificados para o alumínio, de forma que os compostos fenólicos localizam-se nos conteúdos celulares de vários tecidos, enquanto o alumínio predomina acumulado nas paredes celulares e nos cloroplastos (FIG. 4, 9 e 10). Assim, a hipótese de complexação do alumínio com compostos fenólicos para as espécies estudadas não nos parece plausível.

4. CONCLUSÕES

- Cinco espécies, das nove selecionadas, são classificadas como acumuladoras de alumínio: *Miconia albicans* (Sw.) Steud. (Melastomataceae), *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae), *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), *Salvertia convallariodora* A. St.-Hill. (Vochysiaceae) e *Symplocos nitens* (Pohl) Benth. (Symplocaceae).

- As paredes pecto-celulósicas dos diversos tecidos e os cloroplastos são os principais sítios de acúmulo de alumínio.

- A intensidade de reação e a eficiência na identificação dos sítios de acúmulo de alumínio variam conforme a espécie, o reagente e a técnica de processamento das amostras.

- Não existe relação direta entre a quantidade de alumínio acumulado e a intensidade de reação.

- A hematoxilina, o chrome azurol S e o pirocatecol violeta são os reagentes mais eficazes para amostras incluídas em historesina, enquanto a hematoxilina foi o mais eficaz para material não incluído, fornecendo resultados mais homogêneos, sendo, portanto, mais indicados para a histolocalização do alumínio.

- A técnica de inclusão em historesina pode tornar a histolocalização do alumínio mais eficiente, em comparação com o material não incluído, ou, até mesmo, ser essencial para detecção dos sítios de acúmulo, em algumas espécies.

- Quatro, das cinco espécies acumuladoras de alumínio, apresentam compostos fenólicos em seus tecidos foliares em sítios diferentes daqueles próprios do alumínio, indicando que não ocorre complexação do alumínio com compostos fenólicos.

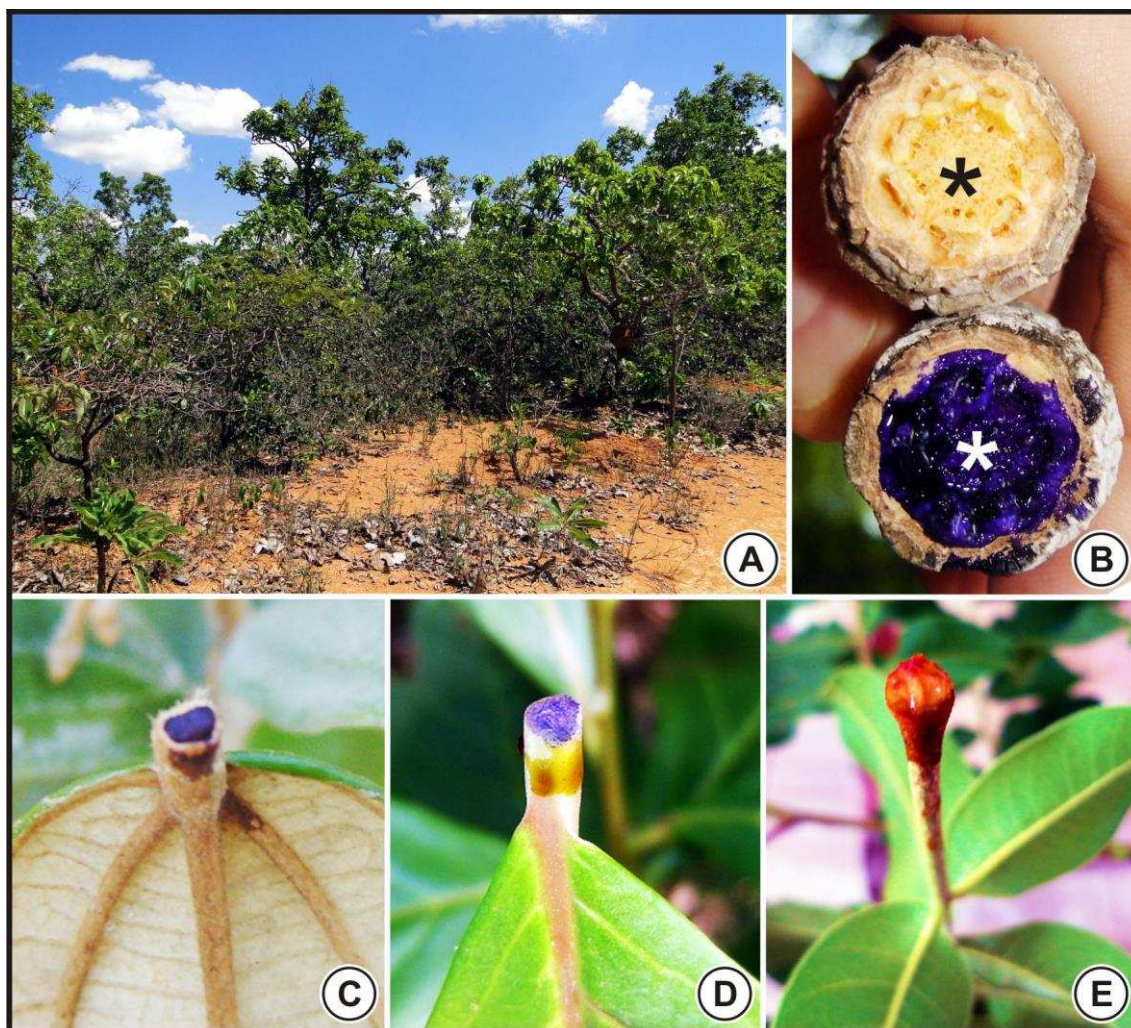


FIGURA 1. Aspecto geral da área de coleta e identificação em campo de plantas acumuladoras de alumínio. **A.** Floresta Nacional de Paraopeba/MG. **B-E.** Teste com chrome azurol S **B.** Caule de *Salvertia convallariodora*. Asterisco preto indica coloração natural do caule e asterisco branco indica coloração positiva para alumínio. **C-E.** Pecíolos de *Miconia albicans* (**C**), *Symplocos nitens* (**D**) e *Magonia pubescens* (**E**): reação positiva para alumínio em **C** e **D**; e reação negativa em **E**.

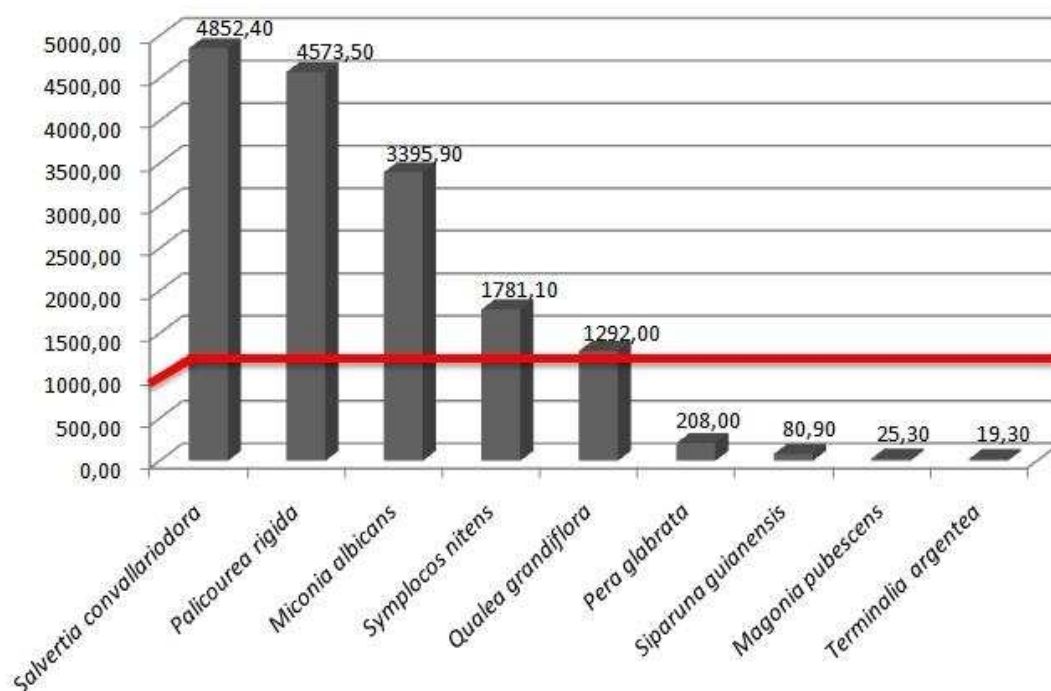


FIGURA 2. Teor de alumínio (mg.kg⁻¹) nas folhas das espécies vegetais estudadas no Cerrado de Paraopeba/MG. Linha vermelha indica o teor mínimo de alumínio para que dada espécie vegetal seja classificada como acumuladora.

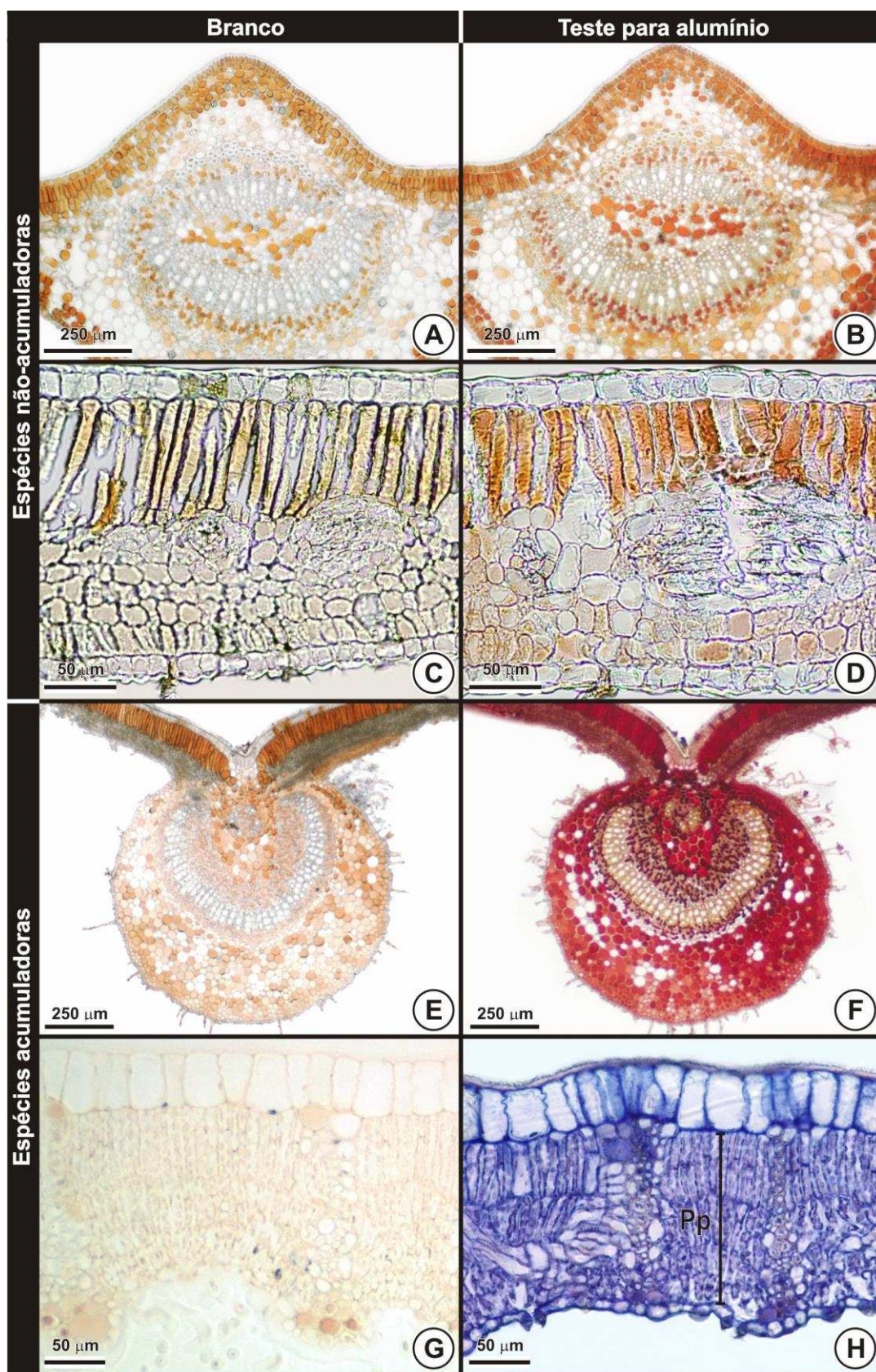


FIGURA 3. Detecção de alumínio em folhas de espécies de Cerrado (secções transversais). **A-B**; **E-F**. Amostras não incluídas. **C-D**; **G-H**. Amostras incluídas em historesina. **A-B**. *Pera glabrata*: reação negativa com hematoxilina em **B**. **C-D**. *Terminalia argentea*: reação negativa com azurine em **D**. **E-F**. *Miconia albicans*: reação positiva com hematoxilina (**F**). **G-H**. *Qualea grandiflora*: reação positiva com azurine (**H**).

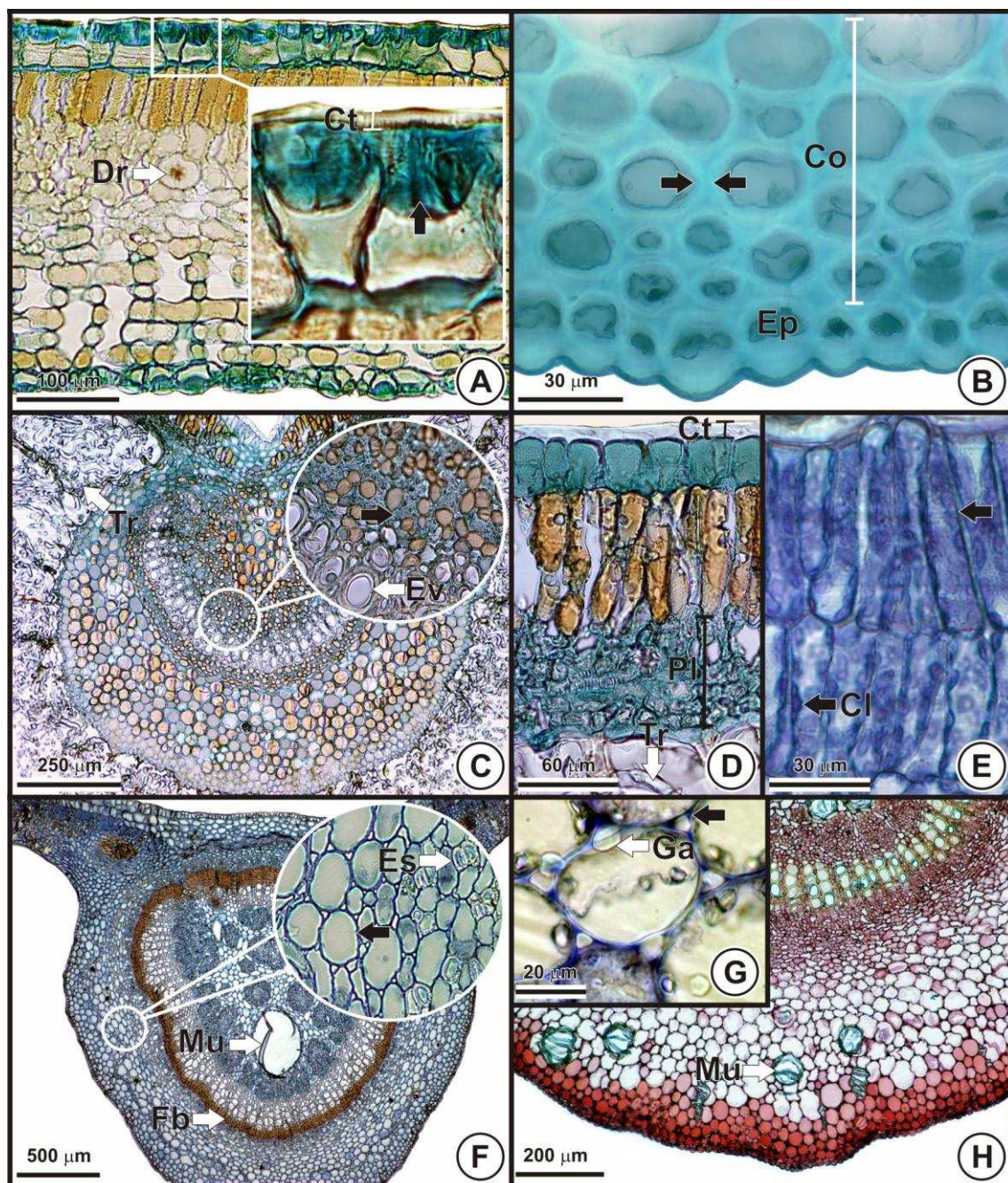


FIGURA 4. Histolocalização de alumínio em folhas de espécies acumuladoras desse elemento (secções transversais). **A.** *Symplocos nitens*: parede das células epidérmicas. **B.** *Palicourea rigida*: parede do colênquima e da epiderme. **C.** *Miconia albicans*: parede do floema e do xilema. **D.** *Miconia albicans*: parênquima lacunoso. **E-G.** *Salvertia convallariodora*: parênquima paliçádico (**E**) e parênquima fundamental (**F-G**). **H.** *Qualea grandiflora*: região abaxial da nervura mediana. **A-D.** Pirocatecol violeta. **E-F.** Chrome azurol S. **G.** Azurine. **H.** Hematoxilina. Abreviaturas: Cl (cloroplasto); Ct (cutícula); Co (colênquima); Dr (drusa); Ep (epiderme); Ev (elemento de vaso); Tr (tricoma); Pl (parênquima lacunoso); Ga (grão de amido); Mu (mucilagem); Es (esclerênquima); Fb (fibra). Setas pretas e brancas indicam reação positiva e negativa para alumínio, respectivamente.

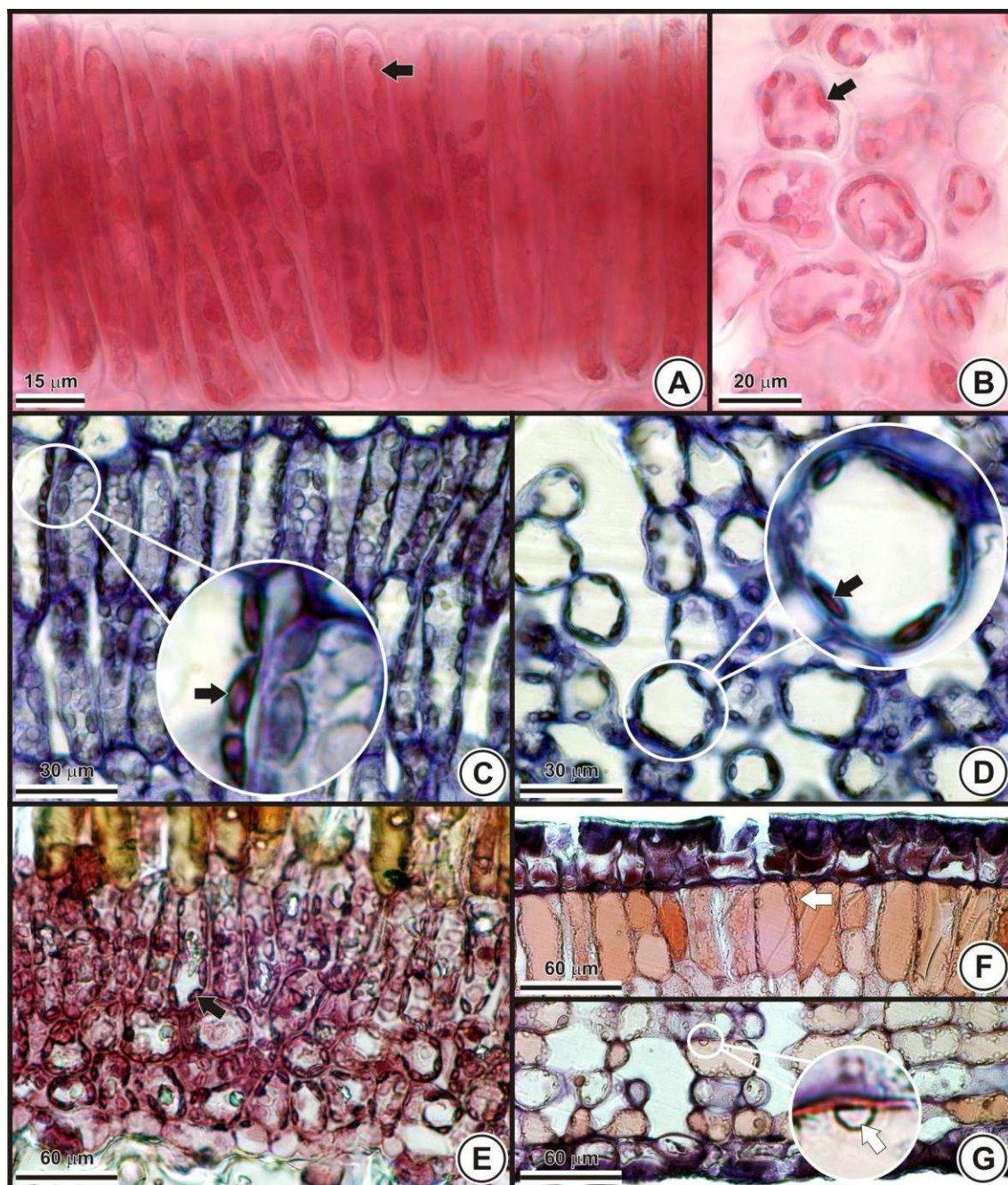


FIGURA 5. Detecção de alumínio em cloroplastos de espécies de Cerrado. **A-B.** *Palicourea rigida*: parênquima paliçádico (**A**) e lacunoso (**B**). **C-D.** *Salvertia convallariodora*: parênquima paliçádico (**C**) e lacunoso (**D**). **E.** *Miconia albicans*: parênquima lacunoso. **F-G.** *Symplocos nitens*: parênquima paliçádico (**F**) e lacunoso (**G**). **A-B.** Aluminon. **C-D.** Azurine. **E-G.** Hematoxilina. Setas pretas e brancas indicam reação positiva e negativa para alumínio, respectivamente.

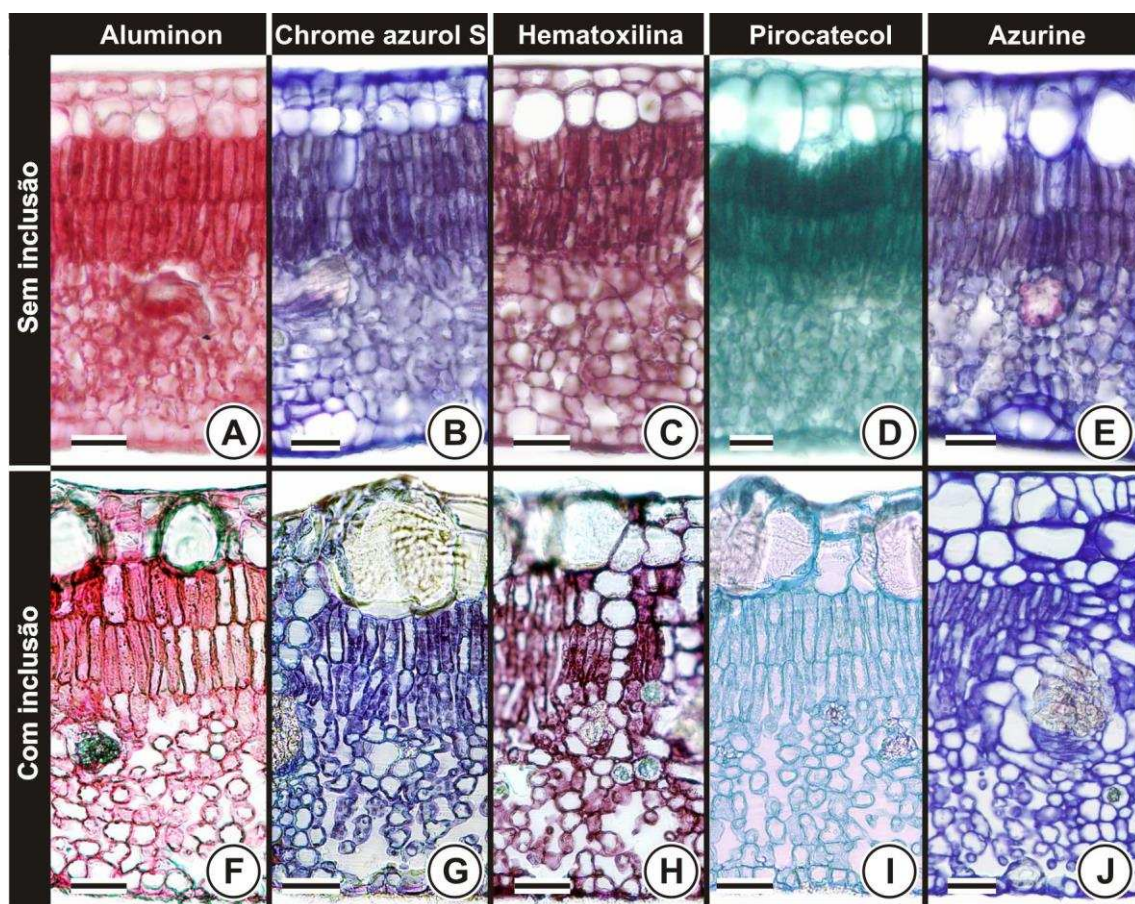


FIGURA 6. Detecção de alumínio em *Salvertia convallariodora*, mediante utilização de diferentes reagentes e técnicas de processamento das amostras foliares (secções transversais). Barras = 50 μm .

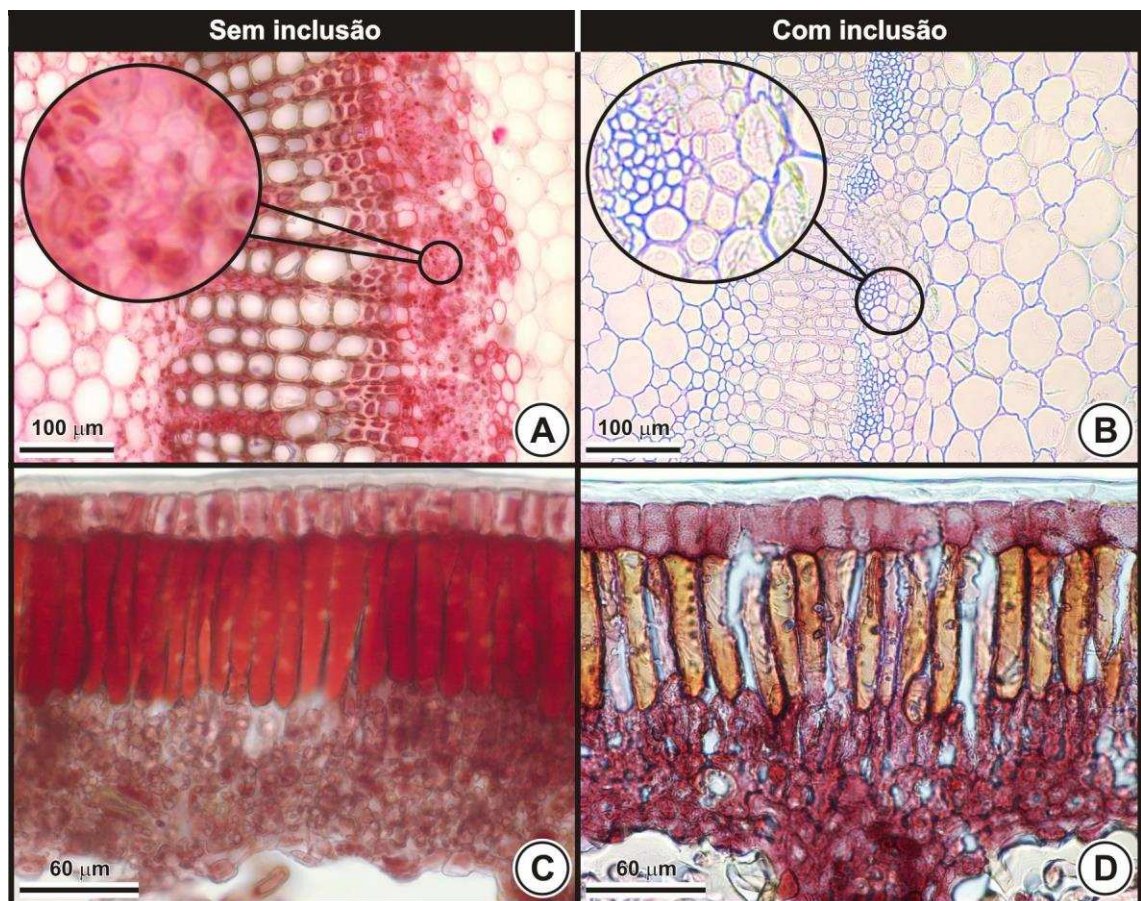


FIGURA 7. Utilização de reagentes na detecção de alumínio mediante emprego de diferentes técnicas de processamento das amostras foliares (secções transversais). **A-B.** Reação com aluminon na região do feixe vascular de *Palicourea rigida*. **A.** Reação positiva para o floema. **B.** Reação negativa para o floema. **C-D.** Reação com hematoxilina na lâmina foliar de *Miconia albicans*.

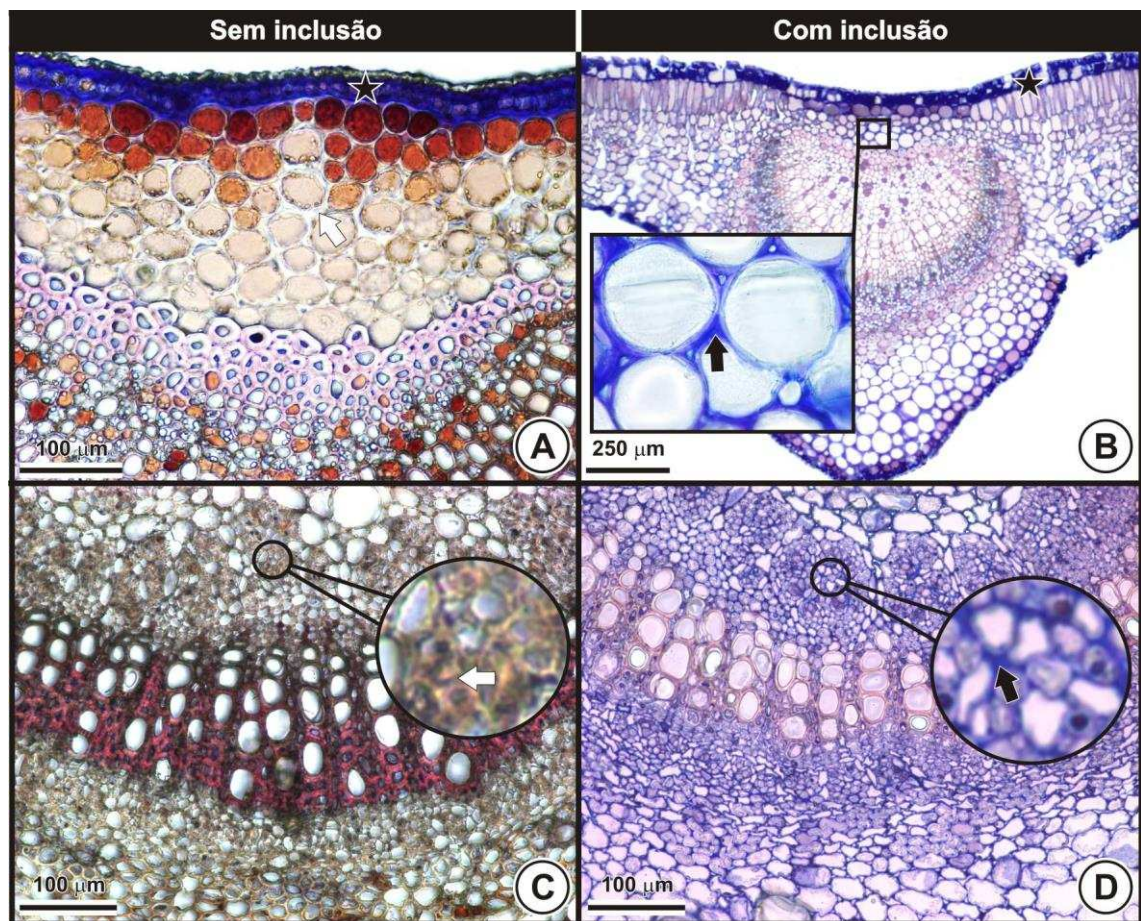


FIGURA 8. Utilização do reagente azurine na detecção de alumínio, mediante emprego de diferentes técnicas de processamento das amostras foliares (secções transversais). **A-B.** *Symplocos nitens*: nervura mediana, com detalhe para células do colênquima. **C-D.** *Qualea grandiflora*: nervura mediana, com detalhe para porção do floema incluído. Estrela indica epiderme. Setas pretas e brancas indicam reação positiva e negativa para alumínio, respectivamente.

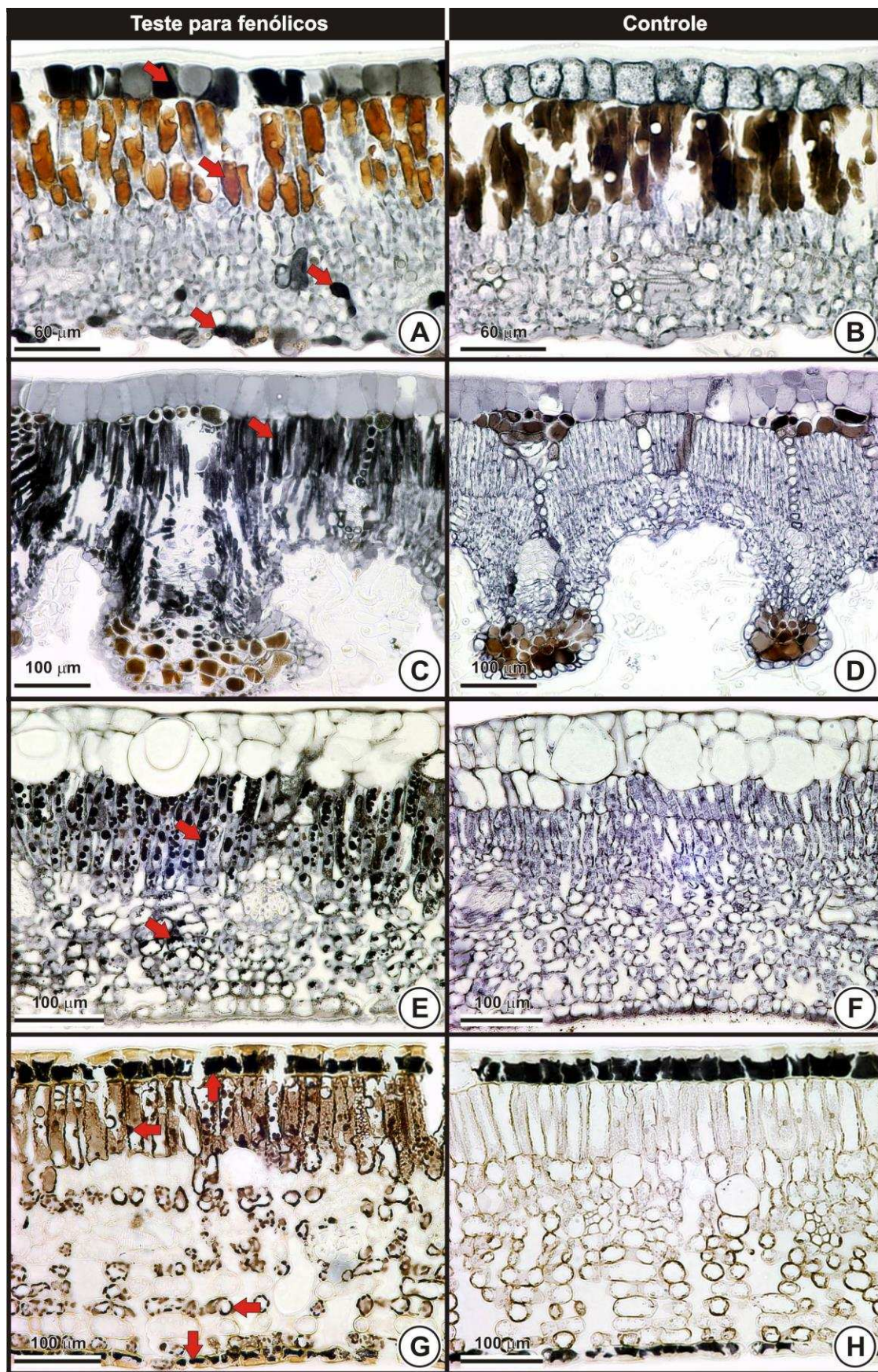


FIGURA 9. Detecção de compostos fenólicos nas folhas de espécies de Cerrado (secções transversais). **A-B.** *Miconia albicans*. **C-D.** *Qualea grandiflora*. **E-F.** *Salvertia convallariodora*. **G-H.** *Symplocos nitens*. Setas vermelhas incidam os compostos fenólicos.

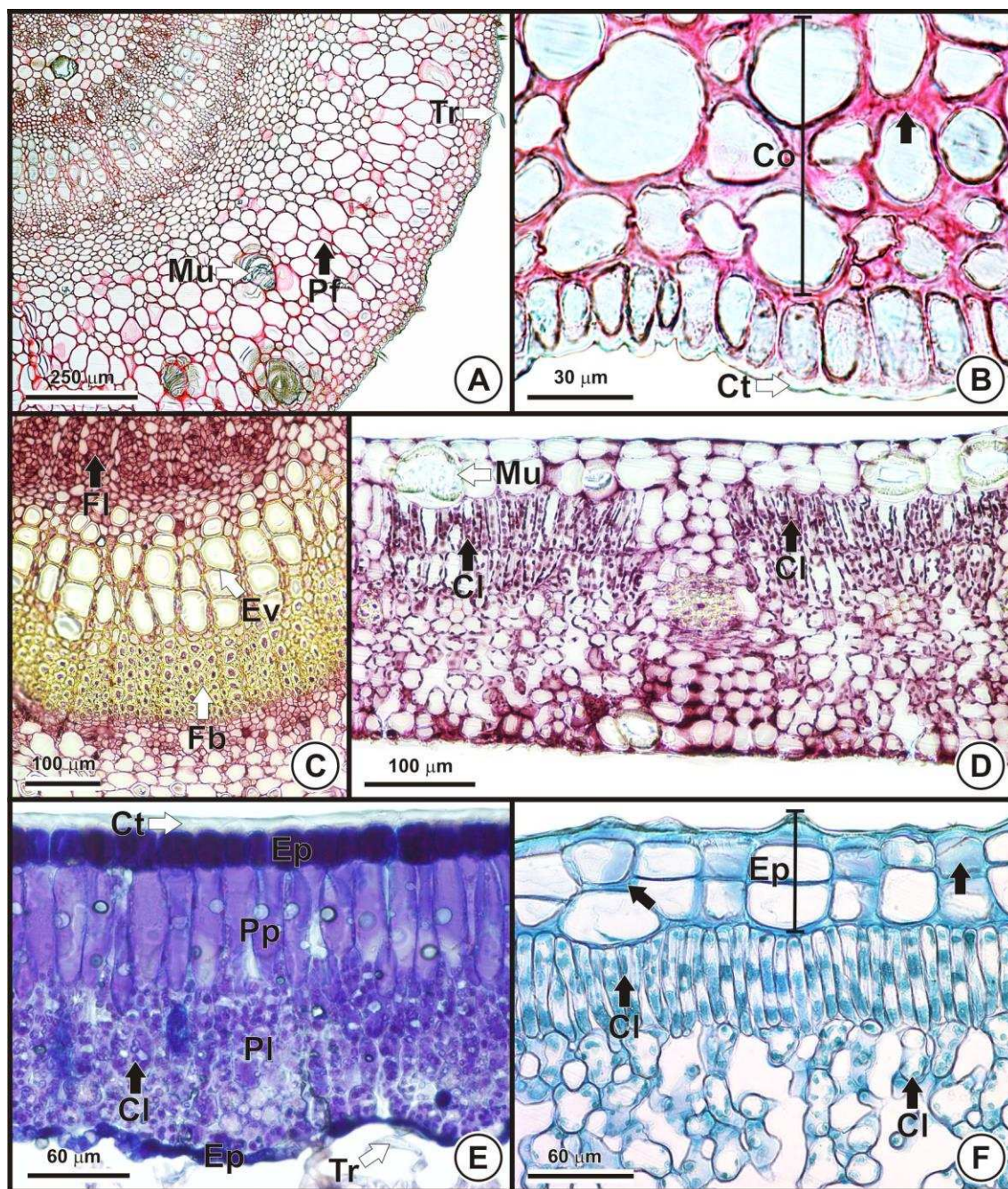


FIGURA 10. Detecção de alumínio em folhas de espécies acumuladoras após extração de compostos fenólicos com metanol (secções transversais). **A-B.** *Qualea grandiflora*, após reação com aluminon. **A.** Região da nervura mediana. **B.** Detalhe da região abaxial da nervura mediana, evidenciando colênquima. **C-D.** *Salvertia convallariodora*, após reação com hematoxilina. **C.** Região da nervura mediana. **D.** Lâmina foliar. **E.** Lâmina foliar de *Miconia albicans*, após reação com azurine. **F.** Lâmina foliar de *Palicourea rigida*, após reação com pirocatecol violeta. Abreviaturas: Cl (cloroplasto); Ct (cutícula); Co (colênquima); Ep (epiderme); Ev (elemento de vaso); Tr (tricoma); Pf (parênquima fundamental); Pl (parênquima lacunoso); Pp (parênquima paliçádico); Mu (mucilagem); Fb (fibra). Setas pretas e brancas indicam reação positiva e negativa para alumínio, respectivamente.

TABELA 2. Eficiência de reagentes e de técnicas de processamento na identificação de sítios de acúmulo de alumínio em folhas de espécies de Cerrado.

Reagente	Técnica	Número de sítios identificados por espécie e intensidade da reação ¹														
		<i>Salvertia convallariodora</i>			<i>Palicourea rigida</i>			<i>Miconia albicans</i>			<i>Symplocos nitens</i>			<i>Qualea grandiflora</i>		
		+	++	Total	+	++	Total	+	++	Total	+	++	Total	+	++	Total
Aluminon	Com inclusão	6	5	11	5	0	5	0	11	11	8	1	9	0	9	9
	Sem Inclusão	0	11	11	9	2	11	2	9	11	0	9	9	0	9	9
Azurine	Com inclusão	1	10	11	8	2	10	2	9	11	5	4	9	0	9	9
	Sem Inclusão	0	11	11	6	4	10	4	1	5	0	1	1	3	0	3
Chrome azurol S	Com inclusão	1	10	11	7	2	9	2	9	11	5	4	9	8	0	8
	Sem Inclusão	0	11	11	5	4	9	4	1	5	0	1	1	3	5	8
Hematoxilina	Com inclusão	1	10	11	8	2	10	2	9	11	5	4	9	0	9	9
	Sem Inclusão	0	11	11	5	5	10	2	9	11	0	1	1	0	9	9
Pirocatecol violeta	Com inclusão	0	11	11	10	0	10	2	9	11	5	4	9	7	1	8
	Sem Inclusão	0	11	11	7	3	10	2	3	5	1	1	2	5	3	8

¹ ++ Reação positiva forte
+ Reação positiva fraca

TABELA 3. Histolocalização de alumínio em amostras foliares de *Salvertia convallariodora* A. St.-Hill. (Vochysiaceae).

Espécie	Tecido	Estrutura/Tipo celular	Reagente ¹									
			Aluminon		Azurine		Chrome azurol S		Hematoxilina		Pirocatecol violeta	
			Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão
Salvertia convallariodora A. St.-Hill.	Epiderme	Parede celular	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Cutícula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tricomas	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
	Parênquima paliçádico	Parede celular	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Cloroplastos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Parênquima lacunoso	Parede celular	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Cloroplastos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Floema	Elemento de tubo c.	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cél. Companheira	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Parênquima	+	++	+	++	+	++	+	++	++	++
	Xilema	Elemento de vaso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Parênquima	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Esclerênquima	Parede celular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Colênquima	Parede celular	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Parênquima fundamental	Parede celular	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Substâncias ergásticas	Cristais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucilagem		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- 1 ++ Reação positiva forte
+ Reação positiva fraca
- Reação negativa
aus Estrutura ausente

TABELA 4. Histolocalização de alumínio em amostras foliares de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae).

Espécie	Tecido	Estrutura/Tipo celular	Reagente ¹									
			Aluminon		Azurine		Chrome azurol S		Hematoxilina		Pírocatecol violeta	
			Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão
Palicourea rigida Kunth.	Epiderme	Parede celular	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++
		Cutícula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tricomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Parênquima paliçádico	Parede celular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Cloroplastos	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	Parênquima lacunoso	Parede celular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Cloroplastos	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	Floema	Elemento de tubo c.	-	+	+	+	+	++	+	++	+	+
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cél. Companheira	-	+	+	+	+	++	+	++	+	+
		Parênquima	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Xilema	Elemento de vaso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Parênquima	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Esclerênquima	Parede celular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Colênquima	Parede celular	-	+	+	++	+	+	+	++	+	+
	Parênquima fundamental	Parede celular	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	Substâncias ergásticas	Cristais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- 1 ++ Reação positiva forte
 + Reação positiva fraca
 - Reação negativa

TABELA 5. Histolocalização de alumínio em amostras foliares de *Miconia albicans* (Sw.) Steud. (Melastomataceae).

Espécie	Tecido	Estrutura/Tipo celular	Reagente ¹										
			Aluminon		Azurine		Chrome azurol S		Hematoxilina		Pírocatecol violeta		
			Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	
Miconia albicans (Sw.) Steud.	Epiderme	Parede celular	+	++	++	+	++	+	++	++	++	++	++
		Cutícula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tricomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Parênquima paliçádico	Parede celular	+	++	++	+	++	+	++	++	++	++	++
		Cloroplastos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Parênquima lacunoso	Parede celular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Cloroplastos	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Floema	Elemento de tubo c.	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cél. Companheira	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-
		Parênquima	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-
	Xilema	Elemento de vaso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Parênquima	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-
	Esclerênquima	Parede celular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Colênquima	Parede celular	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-
	Parênquima fundamental	Parede celular	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-
	Substâncias ergásticas	Cristais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- 1 ++ Reação positiva forte
+ Reação positiva fraca
- Reação negativa

TABELA 6. Histolocalização de alumínio em amostras foliares de *Symplocos nitens* (Pohl) Benth. (Symplocaceae).

Espécie	Tecido	Estrutura/Tipo celular	Reagente ¹									
			Aluminon		Azurine		Chrome azurol S		Hematoxilina		Pírocatecol violeta	
			Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão
Symlocos nitens (Pohl) Benth.	Epiderme	Parede celular	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Cutícula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tricomas	aus	aus	aus	aus	aus	Aus	aus	aus	aus	aus
	Parênquima paliçádico	Parede celular	+	++	++	-	++	-	++	-	++	-
		Cloroplastos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Parênquima lacunoso	Parede celular	+	++	++	-	++	-	++	-	++	-
		Cloroplastos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Floema	Elemento de tubo c.	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cél. Companheira	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-
		Parênquima	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-
	Xilema	Elemento de vaso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Parênquima	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-
	Esclerênquima	Parede celular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Colênquima	Parede celular	+	++	++	-	++	-	++	-	++	+
	Parênquima fundamental	Parede celular	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-
	Substâncias ergásticas	Cristais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- 1 ++ Reação positiva forte
 + Reação positiva fraca
 - Reação negativa
 aus Estrutura ausente

TABELA 7. Histolocalização de alumínio em amostras foliares de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae).

Espécie	Tecido	Estrutura/Tipo celular	Reagente ¹									
			Aluminon		Azurine		Chrome azurol S		Hematoxilina		Pirocatecol violeta	
			Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão	Com inclusão	Sem inclusão
<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	Epiderme	Parede celular	++	++	++	+	+	+	++	++	+	+
		Cutícula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tricomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Parênquima paliçádico	Parede celular	++	++	++	+	+	++	++	++	+	++
		Cloroplastos	++	++	++	+	-	+	++	++	-	-
	Parênquima lacunoso	Parede celular	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
		Cloroplastos	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
	Floema	Elemento de tubo c.	++	++	++	-	+	++	++	++	+	+
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cél. Companheira	++	++	++	-	+	++	++	++	+	+
		Parênquima	++	++	++	-	+	++	++	++	+	++
	Xilema	Elemento de vaso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Parênquima	++	++	++	-	+	-	++	++	+	+
	Esclerênquima	Parede celular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Colênquima	Parede celular	++	++	++	-	+	++	++	++	++	++
	Parênquima fundamental	Parede celular	++	++	++	-	+	+	++	++	+	+
	Substâncias ergásticas	Cristais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mucilagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 1 ++ Reação positiva forte
 + Reação positiva fraca
 - Reação negativa
 aus Tecido ausente

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L.R.M.; BARROS, L.M.G.; ECHEVARRIA, G.F.; AMARAL, L.I.V.; COTTA, M.G.; ROSSATTO, D.R.; HARIDASAN, M.; FRANCO A.C. 2010. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. **Environmental and Experimental Botany**, v.70, p.37-42.
- BEDETTI, C.S., AGUIAR, D.B., JANNUZZI, M.C., MOURA, M.Z.D., SILVEIRA, F.A.O. 2011. Abiotic factors modulate phenotypic plasticity in an apomictic shrub [*Miconia albicans* (Sw.) Triana] along a soil fertility gradient in a Neotropical savanna. **Australian Journal of Botany**, v.59, p.274-282.
- BIERAS, A.C.; SAJO M.G. 2009. Leaf structure of the Cerrado (Brazilian savanna) woody plants. **Trees**, v.23, p.451-471.
- BRITEZ, R.M.; WATANABE, T.; JANSEN, S.; REISSMANN, C.B.; OSAKI, M. 2002. The relationship between aluminium and silicon accumulation in leaves of *Faramea marginata* (Rubiaceae). **New Phytologist**, v.156, p.437-444.
- CARR, H.P.; LOMBI, E.; KUPPER, H.; MCGRATH, S.P.; WONG, M.H. 2003. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Agronomie**, v.23, p.705-710.
- CHANG, Y.C., YAMAMOTO, Y., MATSUMOTO, H. 1999. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. **Plant, Cell and Environment**, v.12, p.1009-1017.
- CHENERY, E.M. 1948. Aluminum in the plant world. Part I. General survey in dicotyledons. **Kew Bulletin**, v.2, p.173-183.
- CUENCA, G., HERRERA, R., MÉRIDA, T. 1991. Distribution of aluminium in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. **Plant, Cell and Environment**, v.14, p.437-441.

DENTON, J.; FREEMONT, A.J.; BALL, J. 1984. Detection and distribution of aluminium in bone. **Journal of Clinical Pathology**, v.37, p.136-142.

DENTON, J.; OUGHTON, D.H. 1993. The use of an acid solochrome azurine stain to detect and assess the distribution of aluminum in Sphagnum moss. **Ambio**, v.22, p.19-21.

FERNÁNDEZ-MARTÍN, J.L.; MENÉNDEZ, P. ACUÑA, G.; CANTEROS, A.; GÓMEZ, C.; CANNATA, J.B. 1996. Staining of bone aluminium: comparison between aluminon and solochrome azurine and their correlation with bone aluminium content. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.11, supl.3, p.80-85.

FURLEY, P.A.; RATTER, J.A. 1998. Soil resources and plant communities of the central Brazilian Cerrado and their development. **Journal Biogeography**, v.15, p.97-108.

HARIDASAN, M. 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil**, v. 65, p.265-273.

HARIDASAN, M. 1988. Performance of *Miconia albicans* (Sw.) Triana, an aluminum-accumulating species, in acidic and calcareous soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.1091-1103.

HARIDASAN, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, n.3, p.183-195.

HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G.M. 1988. Aluminium accumulating species in two forest communities in the cerrado region of the central Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.24, p.15-26.

HARIDASAN, M.; PAVIANI, T.I.; SCHIAVINI, I. 1986. Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. **Plant and Soil**, v.94, p.435-437.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C.H.; SILVEIRA, G.G.; VASCONCELOS, P.C.P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. 2006. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.207-214.

IAWA COMMITTEE. 1989. International Association of Wood Anatomists. List of microscopic features for hardwood identification. **IAWA Bulletin**. v.10, p.220-332.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw Hill Book, 523p.

KOCHIAN, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260.

KÖEPPEN, W. 1948. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. México, Fondo de Cultura Económica, 479p.

KUKACHKA, B.F.; MILLER, R.B. 1980. A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Bulletin**, v.1, n.3, p.104-109.

LILLIE, R.D. (ed). 1977. **Conn's Biological Stains, A Handbook on the Nature and Uses of the Dyes Employed in the Biological Laboratory**. 9 ed., St. Louis, Williams & Wilkins Company, 692p.

MARQUIS, R.J.; MORAIS, H.C.; DINIZ, I.R. 2002. Interactions among cerrado plants and their herbivores: unique or typical? *In*: OLIVEIRAS, P.S.; MARQUIS, R.J. (eds). **The Cerrados of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York, Columbia University Press, 367p.

MEDEIROS, R.A.; HARIDASAN, M. 1985. Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminium accumulating and non-accumulating species of the cerrado region of central Brazil. **Plant and Soil**, v. 88, p.433-436.

MOREL, L.J.F., BARATTO, D.M., PEREIRA, P.S., CONTINI, S.H.T., MOMM, H.G., BERTONI, B.W., FRANÇA, S.C., PEREIRA, A.M.S. 2011. Loganin production in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) from populations native to Brazilian Cerrado. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.12, p.2559-2565.

NAGATA, T.; HAYATSU, M.; KOSUGE, N. 2002. Identification of aluminum forms in tea leaves by ²⁷Al NMR. **Phytochemistry**, v.31, p.1215-1218.

NERI, A.V., SCHAEFER, C.E.G.R., SILVA, A.F., SOUZA, A.L., FERREIRA-JUNIOR, W. G., MEIRA-NETO, J.A.A. 2012. The influence of soils on the floristic composition and community structure of an area of Brazilian Cerrado vegetation. **Edinburgh Journal of Botany**, v.69, p.1-27.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.369-389.

OLIVARES, E., COLONNELLO, G., PEÑA, E., RODRIGUEZ, L. 2010. Aluminum accumulation in nineteen Melastomataceae species from three contrasting plant formations in acid soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.173, p.453-460.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; RATTER, J.A. 2002. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. *In*: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. (eds). **The Cerrados of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York, Columbia University Press, 367p.

PIERONI, L.G., REZENDE, F.M., XIMENES, V.F., DOKKEDAL, A.L. 2011. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v.16, p.9439-9450.

RATTER, J.A., BRIDGEWATER, S., RIBEIRO, J.F. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: Comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v.60, n.1, p.57-109.

RIBEIRO, S.P., BRAGA, A.O., SILVA, C.H., FERNANDES, G.W. 1999. Leaf polyphenols in Brazilian Melastomataceae: Sclerophylly, habitats and insects herbivores. **Ecotropica**, v.5, p.137-146.

SHEN, R.; MA, J.F.; KYO, M.; IWASHITA, T. 2002. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Planta**, v.215, p.394-398.

SILVA, D.M.; BATALHA, M.A. 2011. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecology**, v.212, p.181-193.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. 1995. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 174p.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. 2005. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.1, p.129-143.

WATANABE, T.; OKADA, K. 2005. Interactive effects of Al, Ca and other cations on root elongation of Rice cultivar under low pH. **Annals of Botany**, v.95, p.379-385.

WATANABE, T.; OSAKI, M.; YOSHIHARA, T.; TADANO, T. 1998. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. **Plant and Soil**, v.201, p.165-173.

WEHR, J.B., MENZIES, N.W., BLAMEY, F.P.C. 2003. Model studies on the role of citrate, malate and pectin esterification on the enzymatic degradation of Al- and Ca-pectate gels: possible implications for Al-tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1007-1010.

WEHR, J.B.; BLAMEY, F.P.C.; HANNA, J.V.; KOPITKE, P.M.; KERVEN, G.L.; MENZIES, N.W. 2010. Hydrolysis and speciation of Al bound to pectin and plant cell wall material and its reaction with the dye chrome azurol S. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.5553-5560.

WILLIAMS, R.J.P. 1999. What is wrong with aluminium? **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.76, p.81-88.

YANG, J.L., LI, Y.Y., ZHANG, Y.J., ZHANG, S.S., WU, Y.R., WU, P., ZHENG, S.J. 2008. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, v.146, p.602-611.

YANG, J.L.; ZHU, X.F.; PENG, Y.X.; ZHENG, C.; LI, G.X.; LIU, Y.; SHI, Y.Z.; ZHENG, S.J. 2011. Cell wall hemicelluloses contributes significantly to Al adsorption and root growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.155, n.4, p.1885-1892.