

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**Caracterização das sementes de seis espécies de
Theobroma em relação ao *Theobroma cacao* L.**

Maria Helena Martini

**Pesquisadora Científica III
Instituto Adolfo Lutz
Lab. I de Campinas**

Orientadora: Prof^a. Débora de Queiroz Tavares

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.**

Campinas, 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA- UNICAMP

M364c Martini, Maria Helena
Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma*
em relação ao *Theobroma cacao* L. / Maria Helena Martini. –
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Débora de Queiroz Tavares
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Sementes. 2.*Theobroma*. 3.Citoquímica. 4.*Compostos de
reserva da semente. 5.*Análises ultraestruturais. I.Tavares,
Débora de Queiroz. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Carmello Guerreiro
Dept^o. de Botânica / IB / UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Cristiana de Noronha Begnami

Dr^a. Marlene Correia
Seção de Microscopia de Alimentos / IAL-São Paulo

Dr^a. Márcia Bittar Atui
Seção de Microscopia de Alimentos / IAL-São Paulo

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka
Dept^o. de Alimentos e Nutrição / FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo
Dept^o. de Biologia Celular / IB / UNICAMP

“ Tudo o que é natureza é arte que desconheces;
Tudo que é acaso é direcionamento que não podes ver;
Tudo que é discordância é harmonia não compreendida;
Tudo que é mal parcial é bem universal.”

Alexandre Pope

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha querida Família.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Débora pela dedicada orientação para o enriquecimento deste trabalho, através de um relacionamento amigo, com o qual muito aprendi sobre o mundo da microscopia e das sementes de *Theobroma*.

Aos Professores / Pesquisadores, Sandra, Cristiana, Marlene, Márcia, Célio e Ângelo, membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Antonio Figueira pela atenção e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

À CEPLAC de Marituba-PA e Itabuna-BA, pelo fornecimento dos frutos de *Theobroma*.

Ao Instituto Adolfo Lutz e em especial à Regina Gomes de Almeida – Diretora da Divisão de Laboratórios Regionais e à Christina Leopoldo e Silva – Diretora do Laboratório I de Campinas, pela possibilidade de cursar o doutorado, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos amigos sempre presentes da Seção de Bromatologia e Química do IAL-Campinas: Beatriz, Berenice, Elaine, Maria Ângela, Maria Irene, Marise, Paulo Flávio e Valéria.

À amiga Camila pela troca de idéias e companheirismo em todos os trabalhos.

Às amigas do Laboratório de Microestrutura de Alimentos, Yara e Suzana, pela colaboração e amizade.

Aos amigos da Pós-graduação e em especial Maria Cristina, Denise, Lilia, Fernanda, Sônia, Vera e Patrícia pelos momentos: alegres, de desafios, algumas dificuldades, conquistas e vitórias.

Aos colegas Professores e Funcionários do DEPAN pelo apoio e colaboração.

À Unicamp pelo curso de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIGLAS	xi
RESUMO GERAL	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
CAPÍTULO 2: LOCALIZAÇÃO DAS RESERVAS COTILEDONARES DE <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng) Schum., <i>Theobroma subincanum</i> Mart., <i>Theobroma bicolor</i> H. & B. E ANALOGIAS COM <i>Theobroma cacao</i> L.....	36
CAPÍTULO 3: AS CÉLULAS POLIFENÓLICAS E AS SUAS INTER-RELAÇÕES COM AS CÉLULAS COTILEDONARES EM ESPÉCIES DE <i>Theobroma</i>	61
CAPÍTULO 4: MUCILAGE POCKETS IN COTILEDON TISSUE OF <i>Theobroma speciosum</i>	79
CONCLUSÃO GERAL	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Teor de lipídeos de sementes do gênero <i>Theobroma</i> demonstradas entre 1981 a 2002	15
Tabela 2: Composição dos principais triglicérides (g/100g) de gorduras de sementes de <i>Theobroma</i> obtidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	16
Tabela 3: Composição dos principais ácidos graxos de sementes de <i>Theobroma</i> expressa em porcentagem molar	16
Tabela 4: Ponto de Fusão (5% de sólidos) calculado por Calorimetria Diferencial de Varredura (CDC) de gorduras de quatro espécies de <i>Theobroma</i>	17

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Tamanho e peso médio das sementes de <i>T. grandiflorum</i> , <i>T. bicolor</i> , <i>T. subincanum</i> e <i>T. cacao</i>	44
Tabela 2: Concentração das principais reservas das sementes de <i>Theobroma</i> , em base seca (%)	46

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Quantidade de polifenóis em base seca e desengordurada dos cotilédones de sete espécies de <i>Theobroma</i> (9 amostras)	71
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Formação dos glóbulos lipídicos por vesiculação do RE nas sementes.	18
Figura 2: Mecanismo de formação da reserva lipídica (Lea & Leegood, 1999).....	19
Figura 3: Ontogênese dos corpos protéicos e vacúolos de reserva de proteínas em sementes (Herman & Larkins, 1999)	22

CAPÍTULO 2

Figura 1: Frutos e suas sementes	49
Figura 2: MO dos cotilédones	50
Figura 3: MO dos cotilédones: lípidos e amido.....	51
Figura 4: MEV: proteínas	52
Figura 5: MEV: proteínas	53
Figura 6: MET: mesofilo imaturo de <i>T. cacao</i>	54
Figura 7: MET: reservas lipídicas e protéicas em <i>T. cacao</i> , <i>T. subincanum</i> e <i>T. bicolor</i>	55

CAPÍTULO 3

Figura 1: Cortes frescos de mesofilos e radículas tratados com soluções aquosas de corantes vitalis ou observados sob luz polarizada	68
Figura 2: <i>T. grandiflorum</i>	69
Figura 3: Células polifenólicas de sete spp de <i>Theobroma</i> (Azul de Toluidina pH 4 e pH 8).....	70
Figura 4: MEV: Célula polifenólica e sua inter-relação com mucilagem	73
Figura 5: Corpos polifenólicos no mesofilo cotiledonar	74

CAPÍTULO 4

Figura 1: <i>Theobroma speciosum</i> . Light microscopy. Toluidine Blue pH 8.0 staining.	80
Figure 2: <i>Theobroma speciosum</i> . Light microscopy. Staining with Naphthol Blue Black to demonstrate proteins	80
Figure 3: <i>Theobroma speciosum</i> . Light microscopy. Mucilage stained with Ruthenium Red.	81
Figure 4. <i>Theobroma speciosum</i> . Light microscopy. Spaces filled with mucilage	81
Figure 5. <i>Theobroma speciosum</i> . Light microscopy. PAS positive neutral polysaccharides: starch and cellulose.....	81
Figure 6. <i>Theobroma speciosum</i> . Transmission electron microscopy. Oil bodies near the cell surface.....	81
Figure 7. <i>Theobroma speciosum</i> . Transmission electron microscopy. The protein bodies display heterogeneous electron density and shapes.....	82
Figure 8. <i>Theobroma speciosum</i> . Scanning electron microscopy of the cotyledon of <i>T. speciosum</i> showing two empty mucilaginous spaces.	82
Figure 9. <i>Theobroma speciosum</i> . Scanning electron microscopy. Mucilage pocket between cotyledon parenchyma cells.....	82

LISTA DE SIGLAS

AG – Ácidos Graxos

AT – Azul de Toluidina

Brilh – Brilhante

CDV – Calorimetria Diferencial de Varredura

Cel – Células

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira

CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura

CIRAD – Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPATU – Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental

DAP – Dias após polinização

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

I/KI – Iodo/ Iodeto de Potássio

MO – Microscopia óptica

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NBB – Naphthol Blue Black

Parenq – Parênquima

PAS – Periodic Acid Schiff

POP – Palmítico, Oleico, Palmítico

POS – Palmítico, Oleico, Esteárico

Polifenol. – Polifenólicos

RE – Retículo endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

SOA – Esteárico, Oleico, Araquídico

Sol – Soluções

SOO – Esteárico, Oleico, Oleico

SOS – Esteárico, Oleico, Esteárico

TAG – Triacilglicerol

Verm. – Vermelha

RESUMO GERAL

Nos estudos sobre as reservas do mesofilo cotiledonar do gênero *Theobroma* destacam-se os trabalhos sobre sementes de *T. cacao*, fonte única da matéria prima do chocolate. Estas pesquisas preferenciam as mudanças ocorridas na estrutura celular durante a fermentação, secagem, torração; etapas do processo de produção do chocolate. Mais recentes são os trabalhos com sementes de *T. grandiflorum* utilizadas na elaboração do cupulate, produto com características semelhantes ao chocolate.

O presente trabalho analisa as células de reserva lípide-proteicas e idioblastos de polifenóis de *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor* e *T. speciosum*. Em *T. obovatum* e *T. microcarpum* o estudo apresentou apenas as células polifenólicas. A distribuição dos glóbulos lipídicos nas células são análogas nestas espécies, isto é, localização periférica e extrema susceptibilidade ao calor, coalescendo sob condições térmicas acima de 30°C. A proteína de reserva apresenta-se entremeada com os glóbulos lipídicos e alguns grãos de amido. As células polifenólicas, em *T. bicolor* e *T. speciosum*, localizam-se na região do feixe vascular e parênquima da radícula e nas outras espécies estudadas estão dispersas pelo mesofilo e próximas ao feixe vascular.

A mucilagem é uma secreção celular constante em cinco espécies estudadas, não se acumulando dentro das células, porém com raras exceções ocorrem células com mucilagem na epiderme do mesofilo (*T. subincanum*). *T. speciosum* caracteriza-se por efetivamente apresentar células de mucilagem. Estas células são abundantes no mesofilo e cerca de 10% alcançam grandes dimensões sem rompimento do tecido. As células polifenólicas apresentam características histoquímicas semelhantes a mucilagem, porém sua estreita relação com os feixes vasculares direciona seu desenvolvimento para a síntese de polifenóis.

O tecido do mesofilo cotiledonar é semelhante em todas as espécies aqui estudadas devido a predominância de reserva lípide-proteica. Células imaturas de sementes verdes demonstram capacidade para sintetizar todas as reservas; na maturidade celular demonstram predominância de reservas lípide-proteicas ou de mucilagem ou de polifenóis. A distribuição das reservas no mesofilo aproximam *T. grandiflorum* à *T. subincanum*. A maior quantidade de proteínas está em *T. bicolor*. Esta espécie apresenta menor quantidade de lipídeos e de células polifenólicas.

SUMMARY

Many investigations on the cellular reserves within the cotyledon mesophyll of the genus *Theobroma* have been carried out on *Theobroma cacao* seeds, the source of raw material for the production of chocolate. These studies demonstrated structural cellular changes due to fermentation, drying, and roasting processes during chocolate production. Recently the seeds of the *T. grandiflorum* have been analyzed due to their importance in the production of “cupulate”, a new product similar to chocolate.

In the present work, we analyze the lipid-protein reserve cells and polyphenolic idioblasts derived from *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor*, *T. speciosum* and *T. obovatum*. Only phenolic cells were studied in *T. obovatum* and *T. microcarpum*. The distribution of lipid bodies was similar in all the species studied; that is, they were located at the periphery of the cell wall and demonstrated extremely susceptibility to heat, coalescing at temperatures above 30°C. The reserve protein was interspersed with lipid bodies and some starch granules. The polyphenolic cells were dispersed throughout the mesophyll and around the vascular bundles in all the species studied. In *T. bicolor* and *T. speciosum* the polyphenolic cells were only observed around the vascular bundle and radicle parenchyma.

Mucilage is a cellular secretion in the five species studied. Mucilage does not accumulate intracellularly; however, rarely we did observe mucilage in the cells of the mesophyll epidermis of *T. subincanum*. In *T. speciosum*, mucilage cells were abundant in the mesophyll and about 10% reached large dimensions without tissue disruption. The polyphenolic cells presented characteristic mucilage histochemistry, however their strict association with vascular bundles should direct their development towards polyphenol synthesis.

Cotyledon mesophyll tissue is similar in all the species studied with respect to lipid-protein reserve. Immature cells demonstrated the capacity to synthesize all the reserves, but this capacity is not retained in the mature cell. The distribution of reserves in the mesophyll are most similar in *T. grandiflorum* and *T. subincanum*. *T. bicolor* showed a high protein content, lower lipid levels and low levels of polyphenolic cells.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

As reservas das sementes de espécies do gênero *Theobroma* despertam continuado interesse. Na atualidade recrudescer o estudo sobre as gorduras, fonte de novos produtos para as indústrias de alimentos e farmacêutica. A semente de *T. cacao* permanece como matéria prima e única do chocolate; *T. grandiflorum* (cupuaçu) está atingindo o mercado com o cupulate, um produto assemelhado ao chocolate quanto a cor e plasticidade conferida pela sua gordura. *T. speciosum*, *T. sylvestre* e *T. bicolor* estão sendo indicados como fontes alternativas à gordura de cacau ou como parte de misturas de gorduras alimentícias (Gilabert-Escrivá, 2002). A presença de polifenóis em *T. cacao*, *T. bicolor*, *T. subincanum* (Martini et al., 2004) e sua capacidade antioxidante tem atraído a indústria de chocolate pela quantidade de polifenóis que agrega valor nutricional ao produto e o identifica¹.

Estudos sobre a estrutura de sementes de cacau e cupuaçu referem-se sobretudo às transformações ocorridas durante a fermentação, secagem, torração e etapas do processo de produção de chocolate e cupulate respectivamente (Roelofsen, 1958; Biehl et al., 1977; 1982a, c; 1993; Brito, 2000; Mattietto, 2001).

¹ Por exemplo, o chocolate escuro precisa conter no mínimo 3600µg de polifenóis/g e no máximo 8000µg/g de chocolate. Para o chocolate branco o padrão esperado é conter polifenóis entre o mínimo de 1000µg/g e o máximo de 5000µg/g de chocolate branco (Wollgast & Anklam, 2000).

O objetivo da presente revisão é atualizar informações sobre as reservas cotiledonares de *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor*, *T. speciosum*, *T. obovatum* e *T. microcarpum*. Serão abordados as relações morfológicas com os cotilédones de *T. cacao*. A presença de oleosinas de glóbulos lipídicos, a diversificação da presença de polifenóis ou da mucilagem também serão abordados.

1. O GÊNERO *THEOBROMA* E COMPORTAMENTO RECALCITRANTE DE SUAS SEMENTES

Na maioria das espécies de clima temperado o período de viabilidade das sementes aumenta à medida que a temperatura e umidade do armazenamento decrescem; este comportamento é denominado *ortodoxo* (Neves, 1994). Existem sementes sensíveis ao dessecação que são denominadas *recalcitrantes* porque apresentam curto período de viabilidade. São liberadas da planta-matriz com alto teor de umidade o que estimula a germinação imediata. Não ocorre secagem natural dentro do fruto durante a maturação e, por ausência de dormência, entram em germinação imediata sob condições favoráveis (Neves, 1994; Pammenter & Berjak, 2000).

O comportamento recalcitrante é característico de sementes originárias de climas tropicais. Em *Theobroma cacao* suas sementes são suscetíveis ao dessecação e à temperaturas abaixo da temperatura média de seus ambientes (Mumford & Brett, 1982; Pammenter & Berjak, 2000). Estudos sobre tempo de viabilidade de sementes recalcitrantes em função de perda de água e mudanças de temperatura durante a germinação mostraram que a gradativa diminuição de água resulta em perda de viabilidade devido a alterações da estrutura das membranas celulares do hipocótilo (Neves, 1994).

1.1. SEÇÕES DO GÊNERO

O gênero *Theobroma* pertence à família Sterculiaceae e a ordem Malvales; sob o gênero ocorrem vinte e duas espécies na América Tropical (Aragão, 1992; Beckett, 1997). Cuatrecasas (1964) classificou-as em seis seções: **Andropetalum** (*T. mammosum*); **Glossopetalum** (*T. angustifolium*, *T. canumanense*, *T. chocoense*, *T. cirmolinae*, *T. grandiflorum*, *T. hylaeum*, *T. nemorale*, *T. obovatum*, *T. simiarum*, *T. sinuosum*, *T. stipulatum*, *T. subincanum*); **Oreanthes** (*T. bernouillii*, *T. glaucum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. velutinum*); **Rhytidocarpus** (*T. bicolor*) **Telmatocarpus** (*T. gileri*, *T. microcarpum*) e **Theobroma** (*T. cacao*). Ocorrem no Brasil: *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. obovatum*, *T. bicolor*, *T. sylvestre*, *T. speciosum*, *T. microcarpum*, todas com frutos comestíveis.

Chaiseri et al.(1989) chamam a atenção para o estudo das 22 espécies do gênero *Theobroma*, porque além do *T. cacao*, somente *T. grandiflorum* e *T. bicolor* foram estudadas. No Brasil, o cultivo do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é incentivado e existe industrialização da polpa, a qual é destinada à produção de sucos, sorvetes e geléias. Suas sementes, submetidas ao mesmo processo de produção do chocolate, produzem o cupulate com características e sabor originais.

A gordura de cupuaçu tem um perfil de ácidos graxos semelhante à gordura de cacau o que incentiva seu uso em indústria de alimentos, não como substituto da gordura de cacau mas compondo novos produtos (chocolates, margarinas, massas) (Berbert, 1981; Jee,1984; Nazaré et al., 1990; Gilabert-Escrivá, 2002).

1.2 CACAU - *Theobroma cacao* L.; CUPUAÇU – *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) Schum. e CACAU TIGRE – *Theobroma bicolor* H.&B.

1.2.1 CACAU - *Theobroma cacao* L.

O cacaueiro é uma espécie nativa da floresta tropical úmida americana, provavelmente originária das bacias do Amazonas e Orinoco. Seu cultivo estende-se da Colômbia, para a Venezuela, América Central e México. Ao dispersar-se ao longo do rio Amazonas, alcança também as Guianas. Saindo das Américas, a cultura foi introduzida na África nos países de Gana, Nigéria, Costa do Marfim, Camarões e Malásia. A África é responsável por cerca de 60% da produção mundial de cacau e Costa do Marfim produz 41% deste total (CEPLAC, 2003). O Brasil tem a quinta maior produção, responsável por 4% do total mundial. Hoje o cultivo do cacau ocorre em nove estados brasileiros, sendo 81% da produção nacional proveniente da Bahia (Gramacho citado por Melo, 1996).

O cacau é classificado sob três variedades: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitario*, a maioria do cacau comercializado mundialmente é tipo *Forastero*; o tipo *Trinitario* resulta da hibridização entre *Forastero* e *Criollo*. As variedades *Trinitario* e *Criollo* produzem um chocolate considerado de qualidade excelente e suave aroma e sabor (Beckett, 1997).

Criollo

Seus cotilédones são brancos e sem pigmentação. O chocolate de suas amêndoas tem qualidade superior devido à coloração marrom brilhante, aroma e sabor peculiares. A cultura de *Criollo* abrange países da América Central, Venezuela, Colômbia, Equador e Peru (Gramacho citado por Melo, 1996).

Forastero

A variedade Forastero representa 95% de toda produção mundial de cacau devido a maior produtividade e resistência às pragas e doenças. As sementes são achatadas e tem coloração violeta intensa, produzem um chocolate com sabor mais ácido e adstringente. O *forastero* ocorre na Bahia, Amazônia e países produtores da África (Beckett, 1997).

Trinitario

Este híbrido das variedades *Criollo* e *Forastero* produz sementes que variam de amarelo a roxo. O chocolate originado desta variedade é considerado de qualidade intermediária sendo cultivado na Malásia e Indonésia (Beckett, 1997).

Fruto e semente

O fruto de cacau com cerca de 20cm x 7,5cm (Figura 1- D e D₁ pág. 49), é alongado e apresenta sulcos longitudinais no pericarpo; que é duro e com coloração variando do amarelo ao vermelho (Silva, 2000). Contém 30 à 50 sementes representando cerca de 13,5 a 29% do peso do fruto (Mattietto, 2001). As sementes medem 2 a 3cm de comprimento e apresentam polpa, testa e cotilédones. A polpa é constituída por um parênquima de células esponjosas mucilaginosas contendo água, frutose, glucose, sacarose, pentosanas, ácido cítrico, proteínas e vários sais inorgânicos. A testa secreta a mucilagem e atua como via de transporte entre os cotilédones e a polpa mucilaginosa. O cotilédone apresenta células contendo reservas protéicas, lípidos, amido e células polifenólicas. No tecido fresco predominam células contendo numerosos e regulares glóbulos lipídicos que revestem ordenadamente a face interna da membrana celular. As células polifenólicas apresentam um grande e único vacúolo preenchido por polifenóis sendo responsáveis pela cor dos cotilédones. Este vacúolo é lisado durante a fermentação (Urbanski, 1992).

1.2.2 CUPUAÇU – *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.

O cupuaçuzeiro nativo da floresta amazônica é encontrado ao sul e sudeste do Pará, parte do Maranhão e Tocantins. Atualmente está disseminado em quase toda Amazônia sendo uma das principais frutas amazônicas cultivadas. Encontram-se espécimes isoladas nos estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro. Seu cultivo ocorre também na Venezuela, Equador, Costa Rica, Colômbia, Trinidad Tobago, Gana, Martinica, São Tomé, Flórida e Austrália (Cavalcante, 1991; Vasconcelos, 1999; Venturieri, 1999). A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), o Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU) e Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica (CIRAD), França, estão incentivando o cultivo do cupuaçu em cooperativas (Sautier & Silvestri, 1995).

Existem algumas variedades de cupuaçu que podem ser agrupadas em função do formato e peso do fruto, espessura da casca e presença ou ausência de sementes. As mais conhecidas são: *Cupuaçu- redondo*, *cupuaçu mamorana*, *cupuaçu mamau* (Müller, 1995).

Fruto e semente

Fruto elipsoideo à subgloboso medindo 16cm x 11cm (Figura 1- A e A₁, pág. 49) é o maior do gênero *Theobroma*, polpa ácida com odor intenso, agradável e distinto do odor do cacau (Silva, 2000; Martini et al., 2004) é utilizada na indústria alimentícia para produção de sucos, sorvetes e geléias.

Cada fruto contém 20 a 50 sementes (média 36). Os cotilédones, redondos e achatados, medem 2 a 4cm de largura. Cunha et al. (1997) iniciaram a descrição das alterações das estruturas celulares do cupuaçu durante a fermentação. A testa apresenta material fenólico, entremeado com células do parenquima. Comparação entre estrutura celular antes e pós-fermentação foram esboçadas.

1.2.3 CACAU TIGRE – *Theobroma bicolor* H.& B.

Tem origens incertas, parecendo ser natural da América Central onde é encontrado sob cultivo não extensivo desde o México até a Amazônia (região do Rio Negro). Existe na forma silvestre na Guatemala. As sementes são utilizadas pela população rural em substituição ao cacau e sua polpa mucilaginosa para a produção de bebidas (sucos) (Furlán & Bressani, 1999). No Brasil a polpa é empregada como suco e as sementes são consumidas assadas (Berbert, 1981; Monteiro, 1996; Silva, 2000; Gilabert-Escrivá, 2002; Torres et al., 2002).

Fruto e semente

Fruto elipsóide à globoso medindo cerca de 17cm x 13cm (Figura 1- C e C₁ pág. 49). O pericarpo é desenhado por grossas veias reticuladas. O tecido cotiledonar consiste de células de reserva e poucas células polifenólicas que predominam ao redor dos feixes vasculares (Müller et al., 2000; Martini et al., 2004).

1.3 ESPÉCIES DE *THEOBROMA* MENOS ESTUDADAS

CUPUI - *Theobroma subincanum* Mart.: a espécie é considerada a mais primitiva do gênero e sua distribuição natural ocorre por toda a bacia Amazônica, Venezuela e Guiana Francesa. Sua polpa também é utilizada no preparo de sucos. O fruto é elipsóide medindo 15cm x 8cm (Figura 1- B e B₁, pág. 49). Sementes entre 2 – 2,5cm, apresentam polpa branco amarelada e sem cheiro (Cuatrecasas, 1964).

CACAUI - *Theobroma speciosum* Mart.: a espécie ocorre ao longo do rio Amazonas e seus afluentes. Não apresenta ainda valor comercial (Monteiro, 1996). Fruto globoso-elipsóide,

medindo cerca de 10cm de comprimento, apresentando até 20 sementes. Polpa esbranquiçada e sem odor (Cavalcante, 1976).

CABEÇA DE URUBU - *Theobroma obovatum* Bern.: distribui-se pela região do Alto Amazonas, Acre, Mato-Grosso, Peru, Colômbia e Bolívia. Tanto os frutos quanto as sementes são muito pequenos. Segundo Carpenter et al. (1994) as sementes são ricas em gordura, possuindo 64% de gordura amarelada. A polpa é ácida e apreciada (Monteiro, 1996).

CACAU JACARÉ - *Theobroma microcarpum* Mart. é considerada uma espécie rara e tida como exemplo de especiação causada pelo isolamento geográfico. Ocorre na parte ocidental da região amazônica (Monteiro, 1996). Os frutos são pequenos, possuindo em média de 10 a 12 sementes apresentando um dos mais baixos teores de gordura, ou seja, entre 5% e 6% (Carpenter et al., 1994; Lenci et al., enviado para publicação). Sua polpa é adocicada (Monteiro, 1996) devido ao maior volume de amido em relação às suas outras reservas (Lenci et al., para publicação).

2. COMPOSTOS DE RESERVA DAS SEMENTES DE *THEOBROMA* (VÁRIAS ESPÉCIES)

As reservas das sementes de *Theobroma* maduras são lipídeos, proteínas e carboidratos. As proteínas em microscopia óptica aparecem como áreas vacuolares. Os lípides, das sete espécies estudadas neste trabalho, quando observados em secções úmidas e sob frio ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) apresentam forma globular. São numerosos glóbulos com diâmetros iguais. Os grânulos de amido são facilmente detectáveis embora sejam escassos, à exceção de *T. microcarpum*.

O mesofilo dos cotilédones de cacau apresenta dois tipos de células de reserva: lípide-protéicas e polifenólicas. As primeiras caracterizam-se pela grande quantidade de glóbulos lipídicos e corpos protéicos que permeiam-se entre as outras reservas. As células polifenólicas apresentam um grande vacúolo de polifenóis (Biehl et al.1977; Calen,1996. Lenci, 2002).

2.1. LIPÍDEOS E SÍNTESE

Os lipídeos são a principal fonte de reserva das sementes da maioria das espécies do gênero *Theobroma* com valores acima de 60% em *T. grandiflorum* e *T. obovatum*, (Tabela 1). Os triacilgliceróis (TAGs) e suas cadeias de carbono tem comprimentos e funcionalidades distintos. A caracterização das gorduras das espécies estudadas neste trabalho foram analisadas por Gilabert-Escrivá (2002). Sementes do mesmo material também foram analisadas citologicamente por Martini et al.(2004). Gilabert-Escrivá (2002) analisou os lipídeos de: *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. microcarpum* e *T. bicolor*. As Tabelas 2, 3 e 4, extraídas de Gilabert-Escrivá (2002) contêm uma síntese da composição de TAG, AG e ponto de fusão das sementes de quatro espécies.

Há relativa homogeneidade nas quatro espécies em relação à predominância dos ácidos graxos (Tabela 3). Ácido oléico seguido de esteárico e uma queda substancial de palmítico em *T. bicolor*, *T. subincanum* e *T. grandiflorum*. Ao analisar a composição TAG (Tabela 2), *T. bicolor* se aproxima de *T. cacao*. Por sua vez, o *T. subincanum* e *T. grandiflorum* estabelecem melhor correlação quanto à composição de seus respectivos TAGs.

Os pontos de fusão da Tabela 4, todos abaixo da temperatura bucal humana, parecem indicar que todas as três gorduras seriam substitutas da manteiga de cacau, nome comercial dos lípidos de *T. cacao*.

Gilabert-Escrivá (2002) entretanto, quando analisou as curvas de cristalização por Calorimetria Diferencial de Varredura (CDV) das gorduras, obteve um comportamento semelhante para *T. bicolor* e *T. grandiflorum* os quais se distanciaram de *T. subincanum*. A autora atribue a fusão característica da gordura de *T. cacao* à sua composição em TAG, e ao comprimento de cadeia de seus ácidos graxos, os quais são mais uniformes em relação às outras 3 espécies. Entretanto, a mesma autora, quando analisou as formas cristalográficas destas quatro espécies, encontrou grande polimorfismo, inclusive em *T. cacao*.

Tabela 1: Teor de lipídeos de sementes do gênero *Theobroma* demonstradas entre 1981 a 2002

SEÇÃO/ESPÉCIE	ORIGEM	% de LIPÍDEO
Glossopetalum		
<i>T. grandiflorum</i>	Brasil	60,5 ¹
	<i>desconhecida</i>	36,7 ²
	Brasil	56,7 ³
<i>T. obovatum</i>	Brasil	64,0 ³
<i>T. subincanum</i>	Brasil	48,8 ³
Oreanthes		
<i>T. speciosum</i>	Costa Rica	25,8 ³
Rhytidocarpus		
<i>T. bicolor</i>	Brasil	36,1 ¹
	Brasil	34,1 ²
	Costa Rica	27,0 ²
	México	17,0 ⁴
	Costa Rica	29,6 ³
	Guatemala	25,5 ⁵
	Peru	30,8 ⁶
Telmatocarpus		
<i>T. microcarpum</i>	Brasil	5,3 ³
Theobroma		
<i>T. cacao</i>	Brasil	56,0 ¹
	<i>desconhecida</i>	52,0 ²
	México variedade Criollo	23,9 ⁴
	Costa Rica	19,5 ⁴
	Brasil	54,5 ³
	Guatemala	42,8 ⁵

¹Bebert (1981); ²Chaiseri et al. (1989); ³Carpenter et al. (1994); ⁴Sotelo & Alvarez (1991), ⁵Furlán & Bressani (1999); ⁶Torres et al. (2002).

A caracterização das gorduras ressalta-lhes o potencial como alternativas à gordura de cacau ou como fonte de ácidos graxos específicos (behênico C 22:0 ou araquídico C 20:0 (Gilabert-Escrivá, 2002). As gorduras de cupuaçu e bicolor apresentam maior maciez em relação à gordura de cacau e são indicadas para a indústria de margarinas e cosméticos (Berbert, 1981; Sotelo & Alvarez., 1991). Silva (1988) mostrou que o padrão de fusão da gordura de cacau foi preservado quando adicionou 10% de gordura de cupuaçu ou de sua estearina .

Tabela 2. Composição dos principais triglicérides (g/100g) de gorduras de sementes de *Theobroma* obtidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Espécies	TAG				
	POS	SOS	POP	SOO	SOA
<i>T. grandiflorum</i>	12,0	31,4	1,1	16,1	18,1
<i>T. subincanum</i>	–	27,4	1,1	21,0	14,5
<i>bicolor</i>	16,5	52,2	1,4	17,9	4,4
<i>T. cacao</i>	42,3	26,4	20,8	0,9	2,0

S = esteárico; P = palmítico; O = oléico; A = araquídico Fonte: Gilabert-Escrivá (2000)

Tabela 3. Composição dos principais ácidos graxos de sementes de *Theobroma* expressa em porcentagem molar.

Espécies	AG			
	C 16:0 Palmítico	C 18:0 Esteárico	C 18:1 Oléico	C 20:0 Araquídico
<i>T. grandiflorum</i>	8,5	34,6	42,0	9,9
<i>T. subincanum</i>	6,8	31,8	45,6	-
<i>T. bicolor</i>	8,1	47,8	41,0	-
<i>T. cacao</i>	30,6	33,9	31,4	-

Fonte: Gilabert-Escrivá (2000)

Tabela 4. Ponto de Fusão (5% de sólidos) calculado por Calorimetria Diferencial de Varredura (CDV) de gorduras de quatro espécies de *Theobroma*.

Espécies	CDV (°C)
<i>T. grandiflorum</i>	32,56
<i>T. subincanum</i>	32,00
<i>T. bicolor</i>	35,76
<i>T. cacao</i>	30,57

Fonte: Gilabert-Escrivá (2000)

Sementes de *Theobroma*, estocam TAGs com cadeias de ácidos graxos sob distintas dimensões e funcionalidades (Murphy, 2001). A dimensão dos glóbulos lipídicos nas células depende da espécie; em geral são numerosos e atingem dezenas por célula com cerca de 0,5 a 10µm de diâmetro. Quanto à biogênese, Murphy (2001), demonstrou que atribuí-la ao retículo endoplasmático é inespecífico, porque esta organela é muito heterogênea nas plantas e apresenta várias funções nos seus distintos domínios onde estão presentes o conjunto das enzimas que participam da biossíntese dos TAGs.

Durante o desenvolvimento das sementes de *T. cacao*, a síntese de TAGs é marcada por três estágios e ocorrem em um período de dois meses. O primeiro estágio caracteriza-se por uma rápida divisão celular e pouco acúmulo de reservas. O segundo estágio ocorre rápida síntese de TAGs entre o 120^o e 160^o DAP²; quando se estabelece o padrão de ácidos graxos. O último estágio, ao redor do 170^o DAP, dá início a fase de relativo dessecação da semente (Griffiths & Harwood, 1991).

² DAP: dias após polinização

O glóbulo lipídico, na maioria das sementes, apresenta-se circundado por uma camada de fosfolípides originada da membrana do RE por vesiculação ou brotamento (Figura 1) (Huang et al., 1993; Murphy & Vance, 1999). Na semente tolerante ao dessecação, a maioria de clima temperado, os TAGs dos glóbulos lipídicos são sintetizados juntamente com uma classe de proteínas especializadas, as *oleosinas*, cujo peso molecular situa-se entre 15 a 24KDa e direciona os terminais de suas moléculas voltados para o citoplasma (Figura 1). Estas proteínas conferem estabilidade aos glóbulos lipídicos, inibindo sua coalescência durante os períodos de desidratação e reidratação da semente (Huang et al., 1993; Huang, 1996; Leprince et al., 1998, Murphy & Vance, 1999, Murphy, 2001).

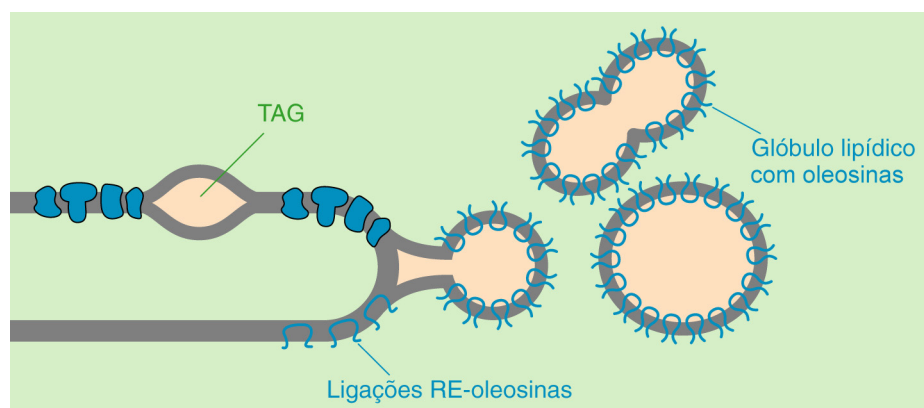


Figura 1. Formação dos glóbulos lipídicos por vesiculação do RE nas sementes. O envoltório possui uma camada de fosfolípides associados à outra camada contínua de proteínas anfipáticas, as oleosinas (Murphy & Vance, 1999).

Existem glóbulos lipídicos que ao se desligarem do RE são parcialmente cobertos pelas oleosinas formando glóbulos lipídicos maiores. O diâmetro dos glóbulos lipídicos depende da taxa de oleosina durante sua formação. Nas sementes tolerantes ao dessecação o tamanho varia entre 0,5- 2,0 μm (Murphy, 2001). Em sementes sensíveis ao dessecação, geralmente de origem tropical e subtropical, como cacau, e frutas ricas em óleo como azeitona e abacate, não se

registram teores significativos de oleosinas (Murphy, 2001). Durante a formação dos glóbulos ocorrem fusões até alcançarem diâmetros que variam entre 5 a 30 μ m, Figura 2 (Huang et al., 1993; Lea & Leegood, 1999; Murphy & Vance, 1999;)

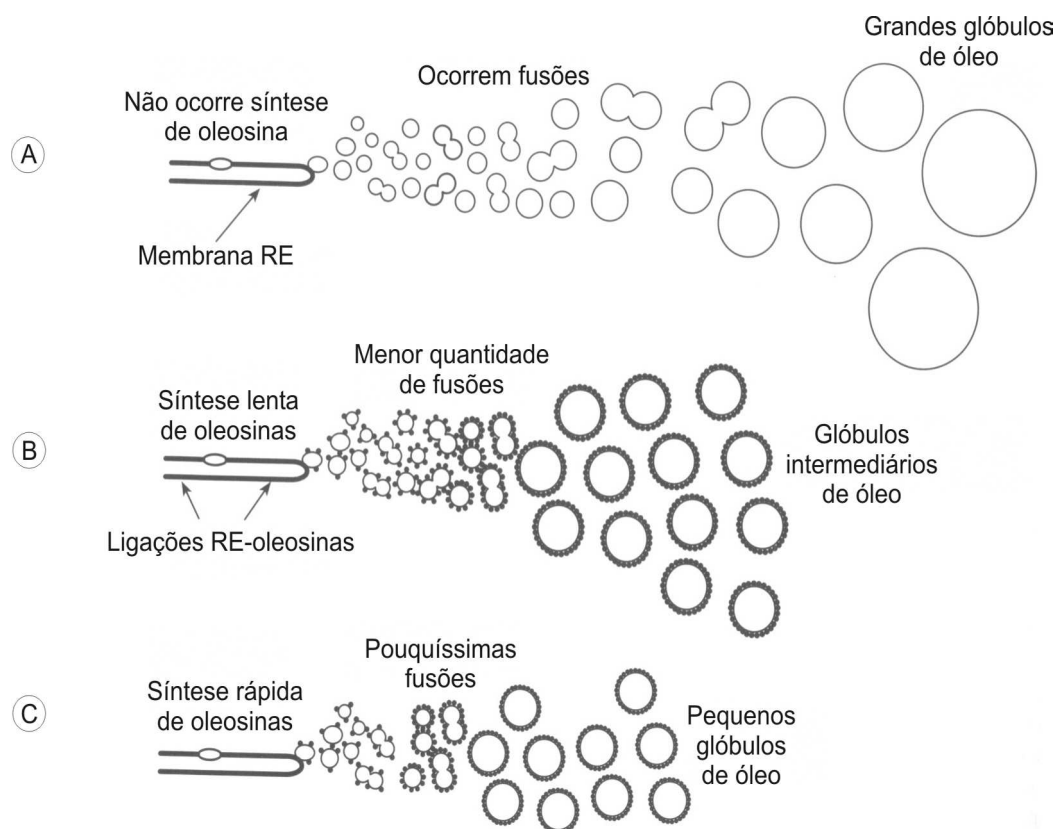


Figura 2. Mecanismo de formação da reserva lipídica (Lea & Leegood, 1999). Os glóbulos lipídicos acumulam-se inicialmente na bicamada da membrana do RE. Desligam-se eventualmente como pequenas gotas de TAG com diâmetro entre 60 a 100nm delimitados por monocamada fosfolipídica e possivelmente outra de oleosinas. A) Em ausência de oleosinas, as pequenas gotas coalescem até um tamanho entre 10 a 25 μ m determinado pela composição e viscosidade do meio citoplasmático. Ocorrem em tecidos de frutos ricos em óleos e sementes oleaginosas de clima tropical. B) Em teores moderados de oleosinas, estas são inseridas co- ou pos-translacionalmente sobre a membrana do RE, difundindo-se sobre a superfície dos glóbulos lipídicos em formação; ocorrerá uma pequena fusão entre eles e chegarão ao final com 1 a 5 μ m de diâmetro. C) Sob intensa síntese de oleosinas há muito pouca fusão entre os glóbulos lipídicos formados que possuirão diâmetros entre 0,1 a 1,0 μ m.

2.2 MOBILIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS PARA A GERMINAÇÃO

Nas sementes que armazenam lípidos, a mobilização dos glóbulos lipídicos ocorre na primeira semana de germinação que se inicia pela mobilização das lipases responsáveis pela hidrólise das moléculas de TAGs. No processo há indicações de que as oleosinas sendo superficiais agiriam como receptoras das lipases. A hidrólise das lipases é também eficiente nas sementes desprovidas de oleosinas porque as plantas não transportam lipídeos neutros ou membranas lipídicas, mas convertem-nas à sacarose ou outro intermediário solúvel para o transporte intercelular e/ou vascular (Lea & Leegood, 1999; Murphy, 2001). Após a mobilização dos glóbulos lipídicos, ocorre a liberação de grande quantidade de ácidos graxos, os quais são disponibilizados para ceder energia via β -oxidação nos glioxissomas.

Em geral, as sementes de plantas tropicais e subtropicais como *T. cacao*, são recalcitrantes, apresentando alto teor de umidade e estando aptas a germinar após sua liberação e dispersão sem períodos de dormência e reidratação. Os glóbulos lipídicos de cotilédones maduros tendem a ser maiores (7 μ m) quando comparados aos de sementes tolerantes ao dessecamento (0,5-2,0 μ m). Leprince et al.(1998) não detectaram oleosinas nos glóbulos lipídicos das sementes de cacau, mas observaram que os glóbulos lipídicos das sementes tropicais e subtropicais permanecem estáveis, apesar da ausência de oleosinas, durante desidratação artificial, porém fundem-se imediatamente após reidratação. Posteriormente Guilloteau et al. (2003) demonstraram a existência de oleosinas quando isolaram das sementes de *T. cacao* cinco polipeptídeos com pesos moleculares (16,1 a 26,5 kDa) iguais aos das oleosinas. Estes autores atribuem a natureza recalcitrante das sementes de cacau a alta concentração da proteinase aspártica sendo esta enzima responsável pela degradação das proteínas de sementes maduras do *T. cacao* em condição ácida que ocorre durante a fermentação.

2.3. PROTEÍNAS E SÍNTESE

As proteínas das sementes podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade em água (albuminas), em soluções salinas (globulinas), em álcoois (prolaminas) e em soluções ácidas ou alcalinas (glutelinas) (Bewley & Black, 1994).

As proteínas podem ser analisadas sob três categorias funcionais: proteínas de reserva, proteínas estruturais e proteínas biologicamente ativas (Fukushima (1991) citado por Marcone, 1999). As proteínas de reserva constituem a maior fração protéica e sua proteólise marca o estágio de germinação da semente (Biehl & Passern, 1982b; Marcone, 1999). São sintetizadas em tecidos específicos, por exemplo, no endosperma e no mesofilo cotiledonar, durante o desenvolvimento da semente (Muntz, 1996).

A síntese das proteínas ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER) e são transportadas sequencialmente ou para os corpos protéicos, como organelas isoladas no citoplasma (Bewley & Black, 1994; Werker, 1997) ou são seqüestradas por autofagia para dentro de grandes vacúolos de reserva de proteínas (Figura 3) (Herman & Larkins, 1999). As reservas protéicas são depositadas durante o desenvolvimento da semente nas células do endosperma ou do mesofilo cotiledonar (Müntz, 1996).

O período de síntese das proteínas é precoce. Por exemplo, em *Pisum sativum* ocorre ao final da divisão celular e início do crescimento das células cotiledonares no período entre o 10º ao 20º DAP (Bewley & Black, 1994). As proteínas de reserva do mesofilo cotiledonar ou do endosperma são codificadas por genes reguladores do desenvolvimento e expressos durante períodos específicos do ciclo de vida da planta sendo espécie dependente (Fosket, 1994; Müntz, 1996).

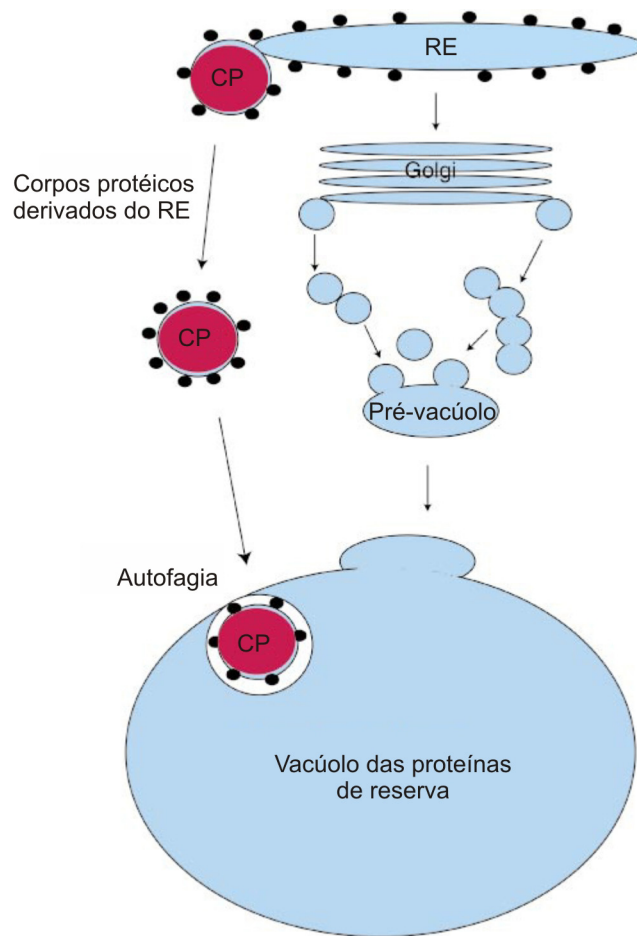


Figura 3. Ontogênese dos corpos protéicos e vacúolos de reserva de proteínas em sementes (Herman & Larkins, 1999). Os corpos protéicos são formados pela agregação de proteínas no RE. Após a formação, estes permanecem ligados ao RE ou separam-se em corpúsculos. Os corpúsculos acumulam-se no citoplasma, por autofagia poderão ser transportados para dentro de vacúolos de reserva de proteínas. Estes vacúolos são formados por proteínas sintetizadas no RE e transportadas pelo sistema de endomembranas (complexo de Golgi) originando um grande vacúolo com os agregados protéicos.

As proteínas das sementes de *T. cacao* seguem o padrão das dicotiledôneas, isto é, tem 52% de albuminas como polipeptídeo predominante cujo peso molecular é 19kD, as globulinas do tipo vicilinas representam 43% e suas frações de polipeptídeos tem pesos moleculares entre 47 kDa, 31 kDa e 14,5 kDa (Biehl et al., 1982c; Voigt et al., 1993). Uma fração importante na formação do sabor e aroma do cacau é atribuída aos peptídeos originados da digestão proteolítica das

vicilinas durante a etapa de fermentação do cacau, no processo de chocolatzização. É importante lembrar que todas as sementes contem vicilinas e leguminas ou apenas leguminas (α leguminas). O *T. cacao* é uma exceção, suas globulinas contêm apenas vicilinas (Murphy, 2001).

Mueller et al.(2000) estudando as três espécies de *T. cacao*, *T. grandiflorum* e *T. bicolor* encontraram um tipo de albumina e dois tipos de vicilinas ($46,5 \pm 1$ kDa e $30,3 \pm 2$ kDa). As vicilinas com 30 kDa representaram 15% do total de proteínas nas três espécies.

O estudo do perfil de proteínas totais das sementes de *Theobroma: cacao, grandiflorum, bicolor, microcarpum, subincanum, obovatum* e *sylvestre* (Silva et al., 2001) mostrou a presença de frações peptídicas de peso molecular 21kDa e sugeriu tratar-se do inibidor de tripsina, com limitado polimorfismo; com respeito às vicilinas (31 kDa e 47 kDa) os autores encontraram grande polimorfismo (Silva, 2000; Silva et al., 2001).

2.4. CORPOS PROTÉICOS

Em sementes maduras, os corpos protéicos e os glóbulos lipídicos ocupam grande parte do citoplasma da célula. Os corpos protéicos variam entre 0,5 -20 μ m de diâmetro, aparecem como matriz amorfa ao MO, geralmente homogênea e apresentam inclusões cristalinas (Werker, 1997) freqüentes demonstrados por Lenci (2002) e Martini et al.(2004).

2.5. CARBOIDRATOS

Os carboidratos como material de reserva estão presentes no embrião, no endosperma e nos cotilédones, junto com outras substâncias de reserva.

Os polissacarídeos estão integrados à parede celular, compondo a mucilagem e na forma de grãos de amido. Os grãos de amido são estratificados em camadas de amilose e amilopectina durante a deposição periódica. Os grãos possuem distinta morfologia, tamanho, forma e estrutura

das camadas (Bewley & Black, 1994; Werker, 1997) e por consequência propriedades funcionais específicas e bem conhecidas na indústria de alimentos. O conteúdo de amilose no amido de reserva em sementes não modificadas varia entre 25-30% (Denyer et al., 2001)

A porcentagem de amido encontrado em sementes de *T.cacao* provenientes de 7 diferentes regiões, inclusive do Brasil (Bahia), variou entre 4,5 a 7,0% e o conteúdo de amilose representou 36% dos amidos (Schmieder & Keeney, 1980).

A composição dos carboidratos depositados na parede celular pertencem a três grupos: mananos, galactomananos e xiloglicanos. Redgwell & Hansen (2000) isolaram o material da parede celular de cotilédones de *T. cacao* e verificaram a presença de polissacarídeos pécticos (60%), celulose (28%) xiloglicanos (8%) e galactoglicomananos (3%).

2.6. ESTRUTURAS SECRETORAS EM SEMENTES

2.6.1.Compostos Fenólicos

Os polifenóis dos vegetais estão localizados no interior de idioblastos da epiderme e subepiderme de folhas, raízes e sementes (Biehl et al., 1977; Hutzler et al., 1998; Castro & Machado, 2003), normalmente em vacúolos (Zobel et al., 1989). Os polifenóis são derivados do metabolismo da glicose, vias acetato e shikimato (Bravo, 1998).

Zaprometov (1992), revisando o desempenho funcional dos compostos fenólicos, reafirma a participação destes na agregação de polissacarídeos complexos na parede celular primária e na formação da suberina e cutina, conferindo ainda proteção ao aparato fotossintético e genético contra radiação de ondas curtas UV. A intrínseca reatividade facilita-lhes a atuação no metabolismo intracelular e finalmente como substâncias redutoras ou sinalizadoras na inter-relação planta-microorganismo.

Bravo (1998) considera que existem acima de 8000 estruturas fenólicas nas plantas; este fato explica porque continuam em estudo. Em 2000, Wollgast & Anklam focalizaram o interesse sobre os polifenóis dos alimentos sobretudo no chocolate. A revisão aponta que os polifenóis apresentam acima de 20 propriedades protetoras à saúde humana, das quais muitas envolvem a ação anti-oxidante.

Os polifenóis, localizados no mesofilo cotiledonar de *T. cacao* (Biehl et al., 1977) estão associados com os eventos de sabor e cor do chocolate, representam cerca de 12 a 20% da massa das sementes de cacau secas e desengorduradas (Kim & Keeney, 1984; Wollgast & Aklam, 2000). Além de sementes de *T. cacao*, polifenóis estão presentes em *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. microcarpum* (Griffiths, 1960; Cunha et al., 1997; Müller et al., 2000; Mattietto, 2001 e Lenci, 2002).

2.6.2. Mucilagem

Mucilagens são polímeros complexos de polissacarídeos ácidos ou neutros, de alto peso molecular contendo mais de 30.000 açúcares diferentes, solúveis em água, comumente encontrados em plantas superiores (MacGarvie & Parolis, 1981 citado por Medina-Torres et al., 2000; Castro & Machado, 2003). Sua função fisiológica na maioria dos casos é incerta, podem servir como substâncias de reserva ou contribuir para o balanço hídrico e/ou resistência ao dessecação (Distelbarth & Kull, 1985). A pectina, polissacarídeo ácido, é o principal componente da mucilagem (Western et al., 2000). À microscopia óptica, a mucilagem desidratada, caracteriza-se por distribuição em camadas (Baas & Gregory, 1985).

A ordem Malvales é conhecida entre as dicotiledôneas por conter células ou cavidades secretoras exclusivamente de mucilagem (Gregory & Baas, 1989; Metcalfe & Chalk, 1989 citado

por Bakker & Gerritsen, 1992). Estudos demonstraram estruturas como idioblastos, cavidades, ductos, superfícies epidérmicas, parênquima envolvidas na secreção de mucilagem em muitas espécies, entre elas às da família Sterculiaceae (Castro & Machado, 2003). Em *T. cacao*, cavidades lisígenas preenchidas com substância mucilaginosa ocorrem em raiz, caule, flores e folhas (Brooks & Gard, 1952; Figueira et al., 1994).

2.6.3. Alcalóides

Os alcalóides são derivados do metabolismo secundário dos aminoácidos lisina, ornitina, fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina, sendo fonte de nitrogênio para a maioria dos alcalóides (Lea & Leegood, 1999).

Hammerstone et al.(1994) estudando onze espécies de *Theobroma* encontraram alcalóides do grupo das purinas, cafeína e teobromina, porém em níveis detectáveis somente para o *T. cacao*. Em todas as espécies encontraram o tetrametilurato, com exceção de *T. obovatum* que não apresentou alcalóides. Buchelli et al.(2001) determinaram em *T. cacao* a variação de concentração destes alcalóides durante a maturação da semente e observaram aumento da concentração de teobromina a partir do 125º DAP estendendo-se até o final da maturação (175º DAP). Em relação à cafeína os mesmos autores, evidenciaram o início da deposição a partir do 146º DAP até a maturidade.

3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO

Finalizando, há evidências na literatura que os frutos de *Theobroma* e respectivas sementes apresentam constante polimorfismo. Em *T. cacao*, espécie onde as sementes são mais estudadas o polimorfismo ainda ocorre quanto à dimensão do fruto, características morfológicas, tipo e quantidade de elementos de reserva. O fato não impede que o chocolate ainda seja exclusivo de *T. cacao*, mas assim mesmo chocolates são diversificados devido a origem dos varietais.

Os trabalhos realizados sobre a semente de *T. cacao* estão, em sua maioria, direcionados para as fases do processamento das amêndoas para a obtenção de chocolate. As pesquisas que caracterizaram a morfologia das sementes são escassas e apenas referem-se ao *T. cacao*.

A revisão bibliográfica mostrou que há lacunas de conhecimento sobre as outras espécies de *Theobroma*, porque algumas destas, como *T. grandiflorum* e *T. bicolor* estão sendo cultivadas, o que aumenta a necessidade de conhecimento destas espécies.

As pesquisas nacionais recentes analisam:

1. As características das gorduras do gênero *Theobroma* para aplicações tecnológicas (Gilabert-Escrivá, 2002).
2. A filogenia do gênero *Theobroma* (Silva et al, 2001).
3. Propostas de tratamento na fase de fermentação, secagem e torração de *T. cacao* visando melhoramento do sabor (Brito, 2000).

Existe após os trabalhos de Biehl, especialmente depois de 1982 (Biehl et al., 1982c) um vácuo de informações morfológicas sobre *T. cacao*. Com relação às outras espécies não encontramos referências bibliográficas.

A presente revisão bibliográfica resumiu as principais e mais recentes informações referentes à síntese de lípidos e corpos lipídicos, porque as gorduras do gênero *Theobroma* têm especial importância devido às características inerentes às sementes recalcitrantes.

A síntese das proteínas foram especialmente estudadas em Voigt et al. (1993) e Müller et al. (2000) porque foram efetuadas em *T. cacao*, *T. grandiflorum* e *T. bicolor*.

As células fenólicas e a mucilagem, elementos freqüentes em Sterculiaceae foram consideradas nesta revisão devido à importância da mucilagem na morfologia dos tecidos de *T. speciosum* e a participação dos fenóis nos fenômenos de fermentação, torração e chocolateização das amendoas de *T. cacao*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo.** Manaus, 1992, 115 p.(Dissertação de Mestrado). Universidade do Amazonas.

BAAS, P.; GREGORY, M. A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. **Israel Journal of Botany**. Jerusalem, 34:167- 186, 1985

BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, St. Paul, 2.ed. Suffolk: St. Edmundsbury Press Ltda., 1997. 408p.

BERBERT, P. R. F. Determinação do teor, ácidos graxos e características físicas das gorduras das sementes do *Theobroma grandiflora* L. e do *Theobroma bicolor* L. e comparação com a gordura do *Theobroma cacao* L. **Revista Theobroma**, Ihéus, v. 11, n. 2, p.91-98, 1981.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BIEHL, B.; PASSERN, U.; PASSERN, D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation., **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, p.41-52, 1977.

BIEHL, B.; PASSERN, D.; SAGEMANN, W. Effect of Acetic Acid on Subcellular Structures of Cocoa Bean Cotyledons **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33, p.1101-1109, 1982 a.

BIEHL, B., PASSERN, D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33, p.1280-1290, 1982 b.

BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33, p.1291-1304, 1982 (c).

BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; BERGHAUSEN, H. Z.; SRIVASTAVA, S.; XIONG, Q.; PASSERN, D., SENYUK, V.I.; HAMMOOR, M. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. **Angewandte Botnik**, Berlim v. 67, p.59-65, 1993.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, p.317-333, 1998.

BRITO, E.S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.); e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor**. Campinas, 2000. 134p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BROOKS, E. R.; GUARD, A. T. Vegetative anatomy of *Theobroma cacao*. **Botanical Gazette**, Chicago,v. 113, June, p.444- 454, 1952.

BUCHELI, P.; ROUSSEAU,G.; ALVAREZ, M.; LALOI, M.; MCCARTHY, J. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds.**Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v.49, n.10, p.5046-5051, 2001.

CALEN, E. **Elaboration d'une methode d'observation microscopique et d' analyse de structure appliquee a la feve de cacao**. Soutenue, 1996.34p. Diplome d'etude approfondies de mecanique des materiaux, structures et genie des procedes. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc.

CARPENTER, D.R.; HAMMERSTONE, J.F.; ROMANCZYK, L.J and AITKEN, W.M. Lipid composition of *Herrania* and *Theobroma* seeds. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 71, n.8, August, 1994.

CASTRO, M. M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**, Viçosa, UFV, 2003. 438 p.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 2. ed. Belém: 1976. 154 p.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: Ed. CEJUP. 1991.279p.

CHASERI, S.; ARRUDA, D.H.; DIMICK, P.S.; ENRIQUEZ, G.A. Thermal characteristics and composition of fats from *Theobroma* Species. **Turrialba**, San Jose, v. 39, n. 4, p.468- 472, 1989.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira: **Cacau informações de mercado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil Disponível em <http://www.ceplac.gov.br/>. Acesso em 28 março 2003.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United State National Herbarium**, Washington, v. 35, p.379-614, 1964.

CUNHA, C.R.; JACKIX, M. N. H; CORTELAZZO, A.; VASCONCELOS, M.A.M. Alterações na microestrutura das amendôas durante a fermentação de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), In: **II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 14 de novembro de 1997. Campinas -SP.

DENYER, K.; JOHNSON, P.; ZEEMAN, S.; SMITH, A.M. The control of amylose synthesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart,v.158, p.479-487, 2001.

DISTELBARTH, H.; KULL, U. Physiological investigations of leaf mucilages II. The mucilage of *Taxus baccata* L. and of *Thuja occidentalis* L. **Israel Journal of Botany**. Jerusalem, v.34, p.113- 128, 1985.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BeMILLER, J.N. Partial characterization of cacao pod and stem gums. **Carbohydrate Polymers**. Great Britain, 24:133- 138, 1994.

FURLÁN, A. L.; BRESSANI, R. Recursos vegetales com potencial de explotación agrindustrial de Guatemala. Caracterización química de la pulpa y la semilla de *Theobroma bicolor*. **Archivos Latinamericanos de Nutricion**, v. 49, p.373- 378, 1999.

GREGORY, M.; BAAS, P. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v. 38, p.125- 174, 1989

GILABERT- ESCRIVÁ, M.V. **Caracterização e seleção de gorduras do gênero *Theobroma* para aplicação tecnológica**. Campinas, 2002. 178p.Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GRIFFITHS, L. A. A comparative study of the seed polyphenols of the genus *Theobroma*. **Biochemistry Journal**,v. 74, p.362-365, 1960.

GRIFFITHS, G; HARWOOD, J. L. The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cacao*)L. **Planta**, Berlim, v. 184, p.279- 284, 1991.

GUILLOTEAU, M.; LALOI, M.; BLAIS, D.; CROUZILLAT, D.; Mc CARTHY, J. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15,8 and 16,9 kDa oleosins. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p.597-606, 2003. ISSN 0168-9452.

HAMMERSTONE, J. F. JR.; ROMANCZYK, L. J. JR; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*, **Phytochemistry**, New York, v. 35, p.1237- 1240, 1994.

HERMAN, E. M.; LARKINS, B. A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p.601- 613, 1999.

HUANG, A. H. C.; TZEN, J. T. C., LEE; K., BIH, F. Y.; TING, J. T. L.; RATNAYAKE, C. STRUCTURE AND ONTOGENY OF SEED OIL BODIES IN MAIZE AND OTHERS SPECIES. In: Shewry, P. R.; STOBART, K. (Ed). **Seed storage compounds: biosynthesis, interactions, and manipulation**. Oxford: Clarendon Press, 1993. cap.7, p.115- 127.

HUANG, A. H. C.; Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 110, p.1055- 1061, 1996.

HUTZLER, P.; FISCHBACH, R.; HELLER, W.; JUNGBLUT, T. P.; REUBER, S.; SCHMITZ, R.; VEIT, M.; WEISSENBOCK, G.; SCHNITZLER, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p.953-965, 1998.

JEE, M.H. Composition of the fat extracted from the seeds of *Theobroma bicolor*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 61, p.751- 753, 1984.

KIM, H.; KEENEY, P.G. (-) – Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p.1090-1092, 1984.

LEA, P. J.; LEEGOOD, R.C. **Plant biochemistry and molecular biology**. 2.ed. Chichester: Wiley, 1999.364p.

LENCI, C. G. **Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *Theobroma cacao*, *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum***. Campinas, 2002. 101 p. Tese (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

LENCI, C. G.; MARTINI, M. H.; TAVARES, D. Q. Estrutura e localização das reservas cotiledonares de *T. obovatum* e *T. microcarpum*; análogos com *T. cacao*. (para publicação)

LEPRINCE, O.; Van AELST, A.C.; PRITCHARD, H.W.; MURPHY, D.J. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and sensitive oilseeds. **Planta**, Berlim, v. 204, p.109-119, 1998.

MARCONI, M. F. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. **Food Research International**, Essex, v. 32, p.79-92, 1999.

MARTINI, M. H.; LENCI, C.G.; TAVARES, D. Q. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *theobroma speciosum*. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.65- 69, 2003. Disponível em: < <http://www.sbm.org.br/actar/html/trabalhos/12.pdf> >. Acesso em 23 jan. 2004.

MARTINI, M. H.; LENCI, C. G.; FIGUEIRA, A.; TAVARES, D. Q. Estrutura e localização das reservas cotiledonares de *Theobroma grandiflorum* Schum., *Theobroma subincanum* Mart. e *Theobroma bicolor* H.&B. e analogias com *Theobroma cacao* L. (enviado para publicação)

MARTINI, M. H.; LENCI, C. G.; TAVARES, D. Q. As células polifenólicas e interrelações com as células cotiledonares de *Theobroma cacao* L., *T. grandiflorum* (Spreng) Schum, *Theobroma obovatum* Klotzsch ex Bernoulli., *T. subincanum* Mart., *T. speciosum* Willd. Ex Spreng, *T. bicolor* H & B, *T. microcarpum* Mart. (enviado para publicação)

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**, Campinas, 2001. 163p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MONTEIRO, W.R. O gênero *Theobroma*: Distribuição e importância econômica. In: 1º WORKSHOP SOBRE AS CULTURAS DO CUPUAÇU E DA PUPUNHA, 1., 1996, Manaus. **Anais**.1996. p.96-109.

MEDINA-TORRES, L.; BRITO-DE LA FUENTE, E.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; KATTAHAIN, R. Rheological properties of the mucilage gum *Opuntia ficus indica*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, p.417- 424, 2000.

MELO, G.R.P. **Características qualitativas de importância na gordura da amêndoa em nove híbridos de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.)**. Lavras, 1996, 41p. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. V. I, Malvaceae, p.223- 234, Clarendon Press, Oxford.1989 citado por BAKKER, M. E.; GERRITSEN, A.F. The development of mucilage cells in *Hibiscus schizopetalus*. **Acta Bot. Neerl.**, v. 41, p.31-42, 1992.

MÜLLER, C. H. EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- Centro de pesquisa agroflorestal da Amazônia oriental – CPATU **A cultura do cupuaçu** Coleção Plantar, 24 Editor Carlos M. Andreotti. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 61p.

MÜLLER, S.; ROHSIUS C.; REISDORFF, C.; GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R. Anatomical and physiological characteristics of *Theobroma spec.* seeds and their relevance to processing. **Proceedings of the 13 th International cocoa research conference**, Kota Kinabalu (Malaysia), 2000.

MUMFORD, P. M.; BRETT, A. C. Conservation of cacao seed. **Tropical Agric.**, Trinidad, v. 59, n.4, p.306-310, 1982.

MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 298, p.605-622, 1996.

MURPHY, D.J.; VANCE, J. Mechanisms of lipid-body formation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n.3, p.109-115, 1999.

MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plant and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 40, p.325-438, 2001.

NAZARÉ, R. F. R.; BARBOSA, W. C.; VIÉGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1990. 37 p.

NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes- Revisão de Literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 29, p.1459-1467, 1994.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, p.301-306, 2000.

REDGWELL, R. J.; HANSEN, C.E. Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **Planta**, Berlim, v. 210, p.823- 830, 2000.

ROELOFSEN, P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Adv. Food. Res.**, v. 8, p.225-296, 1958.

SAUTIER, D.; SILVESTRE, A. **Recherche-developpement-formation pour la valorisation economique et technologique des produits agricoles amazoniens dans l'état du Para (Bresil)**. Montpellier: CIRAD-SAR/EMBRAPA-CPATU, Rapport d'activites 1995. 46 p.

SCHMIEDER, R.L.; KEENEY, P.G. Characterization and quantification of starch in cocoa beans and chocolate products. **Journal of Food Science**. Chicago, v. 45, p.555-563, 1980.

SILVA, C.R.S. **Filogenia do gênero *Theobroma* utilizando marcadores moleculares e bioquímicos**. Piracicaba, 2000. 139 p.Dissertação (Mestre em Ciências, Energia Nuclear na Agricultura) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

SILVA, C. R. S; FIGUEIRA, A.V.O.; SOUZA, E.C.A.S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In. DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacaueiro**. Goiás: FUNAPE- UPG, 2001. p. 49-80.

SILVA, W. G. **Gordura de cupuaçu - sucedâneo de manteiga de cacau**. São Paulo, USP, 1988, 124p. (Dissertação de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SOTELO, A.; ALVAREZ, R.G. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 39, p.1940- 1943, 1991.

TORRES, D. E. G.; MANCINI, D. A. P; TORRES, R.P; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, p.278-281, 2002.

URBANSKI, J. J. Chocolate flavor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. **The Manufacturing Confectioner**, v. 72, p.69-82, 1992.

VASCONCELOS, M., A., M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amendôas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Campinas, UNICAMP, 1999, 114 p. (Dissertação de Mestrado).

VENTURIERI, G.A. Base de dados do cupuaçu. Disponível na Internet: <http://www.ufpa.br/centros/ccb/citogenetica/cupu/>, junho.1999.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; KAMARUDDIN, S.; WAZIR, S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, Oxford, v. 47, p.145-151, 1993.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Stuttgart: Bomtraeger, 1997. 424p.

WESTERN, T. L.; SKINNER, D. J.; HAUGHN, G. W. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 122, p.345-355, 2000.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, v.33, p.423- 447, 2000.

ZAPROMETOV, M. N. On the functional role of phenolic compounds in plants. **Soviet Plant Physiology**, New York, v. 39, p.802-809, 1992.

ZOBEL, A. M.; KURAS, M.; TYKARSKA, T. Cytoplasmatic and apoplastic location of phenolic compounds in the covering tissue of the *Brassica napus* radicle between embryogenesis and germination. **Annals of Botany**, London, v. 64, p.149-147, 1989.

CAPÍTULO 2

LOCALIZAÇÃO DAS RESERVAS COTILEDONARES DE *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., *Theobroma subincanum* Mart., *Theobroma bicolor* H.&B. E ANALOGIAS COM *Theobroma cacao* L.

Martini, M. H.¹; Lenci, C. G.²; Figueira, A.³; Tavares, D. Q.²

ABSTRACT

This study analyzed the cell reserves of the cotyledon mesophyll of *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor* and investigated the organelles related to the synthesis of the cotyledon reserves as compared to *T. cacao*. The three species showed cotyledons typical of the Sterculiaceae family, that is foliar cotyledons densely folded around the hypocotyl radicle axis. The seeds of *T. grandiflorum* and *T. bicolor* measured about 30 mm and those of *T. subincanum* 17 mm, weighing 11.6g, 9.4g and 2.1g respectively. The cotyledon mesophyll contained the lipid-protein reserve cells and idioblasts of polyphenols. *T. grandiflorum* and *T. subincanum* contained more than 50% lipid and presented fluorescence with Nile Red. As with *T. cacao*, the lipid bodies of the three species were located at the periphery of the cell wall and measured from

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Campinas

² DEPAN-FEA, UNICAMP CP 6121, 13083-862, Campinas –SP, e-mail: debora@fea.unicamp. br

³ CENA –USP, Piracicaba –SP

Artigo pronto para ser enviado para a Revista Brasileira de Botânica.

1 to 4 μm . Cryofracture in SEM demonstrated the involvement of the lipid bodies with the protein reserves. TEM showed low density protein precipitation in the central vacuole of young mesophyll cells of *T. cacao* while in the mature cells of *T. cacao* and of *T. grandiflorum*, *T. subincanum* and *T. bicolor* the reserve protein was interspersed with the lipid bodies and some starch granules. *T. bicolor* showed a high protein content (19,07%). The polyphenolic cells were dispersed throughout the mesophyll cells of the cotyledon and around the vascular bundles in *T. cacao*, *T. grandiflorum* and *T. subincanum*. So far *T. bicolor* showed a lower level of polyphenols and the polyphenolic cells were only observed around the vascular bundles. The mesophyll tissue was similar in all the species studied here due to the prominence of the lipid-protein reserve. The immature cells demonstrated the capacity to synthesize all the reserves but these were not retained in the mature cell.

RESUMO

O presente trabalho analisa as reservas celulares do mesofilo cotiledonar de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. bicolor*, investigando as organelas que estão relacionadas com as sínteses de reservas cotiledonares e estabelece comparação com *T. cacao*. As três espécies apresentam os cotilédones foliáceos densamente redobrados em torno do eixo hipocótilo-radícula, característico da família Sterculiaceae. As sementes de *T. grandiflorum* e *T. bicolor* medem cerca de 30 mm e de *T. subincanum* 17 mm, e pesam em média 11,6, 9,4 e 2,1g, respectivamente. No mesofilo cotiledonar estão as células de reserva lípide-proteicas e idioblastos de polifenóis. A quantidade de lípideos está acima de 50% em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* e apresentam fluorescência sob Nile Red. Nas três espécies, como em *T. cacao*, a localização dos glóbulos lipídicos é periférica, medem de 1 a 4 μm e ao MEV demonstra-se o envolvimento dos glóbulos

lipídicos com as reservas protéicas. Nas células do mesofilo de *T. cacao* observa-se, ao MET, a precipitação pouco densa das proteínas no vacúolo central da célula jovem, enquanto em células maduras das três espécies e em *T. cacao* a proteína de reserva está entremeada por glóbulos lipídicos e alguns grãos de amido. *T. bicolor* apresenta o maior teor proteico (19,07%). As células polifenólicas estão dispersas entre as células do mesofilo cotiledonar e circundam os feixes vasculares em *T. cacao*, *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Em *T. bicolor*, que possui a menor quantidade de polifenóis, as células polifenólicas ocorrem apenas ao redor do feixe vascular. O tecido do mesofilo é semelhante em todas as espécies aqui estudadas devido a predominância de reserva lípide-proteica. As células imaturas demonstram capacidade para sintetizar todas as reservas, o que não permanece na maturidade celular.

INTRODUÇÃO

Na família Sterculiaceae o gênero *Theobroma* é conhecido pela importância econômica de *Theobroma cacao* devido a utilização de suas sementes nos processos de chocolateização. Outras espécies do gênero *Theobroma* são potenciais reservatórios de genes e também são fontes de novos produtos para a indústria de alimentos, como o cupulate, produto originado do *T. grandiflorum* (cupuaçu) (Venturieri & Aguiar, 1988; Silva et al., 2001). Gilabert-Escrivá (2002) caracterizou os ácidos graxos e triglicerídeos de *T. bicolor* e *T. sylvestre*, e sugeriu seus lipídios como substitutos potenciais da gordura de cacau. Quanto às gorduras do *T. grandiflorum*, *T. obovatum* e *T. subincanum*, devido à maciez e pontos de fusão diferentes da gordura de cacau, o autor acima propôs outras aplicações: sorveteria e cosméticos. O processo de fermentação ao qual são submetidos o *T. cacao* e *T. grandiflorum* mereceram várias pesquisas sobre as características das reservas lipídicas e protéicas de sementes íntegras e pós-fermentação (Brooks & Guard,

1952; Biehl et al., 1977; Biehl et al., 1982; Ruhl et al., 1989a; Ruhl et al., 1989b; Brito, 2000; Mattietto, 2001). No mesofilo cotiledonar destas quatro espécies são mais evidentes dois tipos de células de reserva: lípide–protéicas e polifenólicas.

O estudo de filogenia de Cuatrecasas (1964) classificou *T. grandiflorum* e *T. subincanum* na seção Glossopetalum considerada a mais primitiva. *T. bicolor* foi incluído em seção mais recente, a Rhytidocarpus e *T. cacao*, na seção Theobroma, que é considerada pelo autor como a mais evoluída.

O presente trabalho analisa as reservas celulares do mesofilo cotiledonar das quatro espécies acima e investiga elementos citológicos que possam sustentar a hipótese de teobromas menos evoluídos em relação à *T. cacao*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Sementes⁴ de *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor* e *T. cacao* foram obtidas de frutos maduros provenientes das coleções da Comissão Executiva do Plano Cacaueiro (CEPLAC) de Marituba- PA e Itabuna- BA. Os frutos foram divididos em dois grupos de acordo com a origem:

Grupo 1 (G1). *T. cacao* (frutos maduros recebidos do CEPLAC- Marituba, PA; em março de 2001);

⁴ As sementes são oriundas de dois lotes subdivididos entre três grupos de pesquisadores sob a liderança de A. Figueira (CENA/Piracicaba), o qual aborda a filogenia das espécies através de marcadores bioquímicos e moleculares. L. A. G. Gonçalves procedeu a caracterização das gorduras para aplicação tecnológica e a equipe de D. Q. Tavares procedeu a caracterização estrutural das sementes.

Grupo 2 (G2). *T. cacao*, *T. grandiflorum* *T. subincanum* e *T. bicolor* (frutos maduros recebidos do CEPLAC- Itabuna, BA; em novembro de 2001).

Métodos

Os cotilédones foram preparados para o estudo ao microscópio óptico (MO) de luz transmitida ou microscópio óptico de epifluorescência (MO Fluorescência), microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET).

1. MO

Cotilédones frescos foram seccionados manualmente e, ainda hidratados, foram conservados à 15°C para estudo ao MO. Cubos (2mm³) do tecido cotiledonar vicinais às amostras anteriores foram fixados em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído (v/v) acrescido de 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3 (120h à 5°C). O tecido foi desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol e incluído em historesina GMA (glicolmetacrilato). Cortes de 1 a 3µm foram submetidos às colorações seguintes:

a) Azul de Toluidina (AT) 0,5% em Bórax 5%, pH 8,0 para auxiliar a localização de estruturas contendo pectinas e polifenóis (O'Brien & Mc Cully, 1981; Gahan, 1984);

b) Naphthol Blue Black (NBB)1% em ácido acético 7% para identificação total de proteínas (Ling-Lee et al., 1977);

c) PAS/Reativo de Schiff para amido e polissacarídeos da parede celular. Os cortes histológicos foram previamente tratados com glicina 0,15mM em tampão fosfato 0,05M a pH 7,0 por 2 horas, para bloquear grupamentos aldeídos do fixador. A seguir o material foi submetido à oxidação com o ácido periódico 0,5% (Silva, 1995).

2. MO - Fluorescência

Seções congeladas obtidas em criostato, foram usadas para demonstrar lipídeos. Os cortes foram tratados com solução de Nile Red dissolvido em acetona 100µg/ml (Greenspan et al., 1985).

3. Microscopia Eletrônica

Outras porções dos mesmos cotilédones foram divididas para estudos sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

3.1 MEV

Os blocos de tecidos com volume entre 1 a 5mm³ foram fixados em solução 5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,3 (120h a 6°C) e pós-fixados em solução a 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) e tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,3 por 18h (Bechtel, 1983). A seguir foram lavados e desidratados em soluções crescentes de etanol (50, 70, 80, 90 e etanol absoluto) e imersos em nitrogênio líquido para proceder a criofratura. Estas amostras foram colocadas em acetona (2h) para extração do óleo e seguindo-se a secagem em aparelho de ponto crítico de CO₂. As amostras foram colocadas sobre suportes metálicos, metalizadas com ouro/paládio e observadas em microscópio JEOL JSM-5800LV sob aceleração de 10KV ou 15KV.

3.2 MET

Os blocos de cotilédones com cerca de 2mm³ de volume foram fixados em solução 2,5% de glutaraldeído, 4% paraformaldeído (v/v) com adição de sacarose 3% em tampão cacodilato de

sódio 0,1M, pH 7,3 por 90 horas à 5°C. Foram pós- fixados em solução a 1% de OsO₄ em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,3 (18h). Após lavar o material este foi contrastado por 16h em solução de acetato de uranila 0,5% acrescida de sacarose 13,3% (Haddad et al., 1998). O tecido foi desidratado em soluções crescentes de etanol (70, 80, 90, 95 e etanol absoluto) e procedeu-se inclusão com resina epoxi (EPON). Cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (Harris, 1991; Haddad et al., 1998) e examinados ao MET LEO 906, sob 60 KV.

4. Determinações Químicas

Lipídeos totais foram determinados pelo Método Soxhlet (963.15 AOAC, 1997) a partir de amostras liofilizadas e moídas. Utilizou-se éter de petróleo para a extração da gordura. Proteínas foram determinadas pelo Método de Kjeldahl (970.22 AOAC, 1997) utilizando-se o fator de conversão 5,4 (Silva, 2000). Os carboidratos totais foram calculados por diferenças de pesos⁵. A determinação de polifenóis foi realizada por espectrofotometria (Marigo, 1973) com estas modificações: 50mg da amostra liofilizada e desengordurada foi adicionada a solução de acetona 70% e centrifugada (3200xg/20min a 4°C). Para uma alíquota de 0,5ml do sobrenadante acrescentou-se 60 ml água destilada, 15ml de carbonato de sódio anidro a 20% e 5ml de Folin Ciocalteu e mantidas a 20°C por 2 horas. A curva padrão foi de ácido gálico nas concentrações 5, 10, 25, 50, 100, 150, 250, 500 e as leituras feitas à 760 nm no espectrofotômetro Beckman DU-70.

⁵ obtida por subtração do peso de proteínas, lípides e cinzas das respectivas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde 1911 sabe-se que a espécie *T. cacao* “cobre inumeráveis variedades que diferem quanto a forma do fruto, tamanho e produtividade das árvores” (Hart, 1911 citado por Cuatrecasas, 1964). Portanto, entre as 22 espécies do gênero, o polimorfismo é marcante e gera muitas hipóteses de filogenia. Neste trabalho compararam-se as reservas dos cotilédones de *T. grandiflorum*, *T. bicolor* e *T. subincanum*. As sementes de *T. grandiflorum* e *T. bicolor*, são elipsóides e medem cerca de 30 mm (Tabela 1) em seu maior eixo; *T. subincanum* tem forma trapezoidal com 17 mm de altura. Abrindo-se as sementes (Figura 1) observam-se os cotilédones característicos de Sterculiaceae, isto é, foliáceos, densamente redobrados em torno do eixo hipocótilo-radícula e geralmente esbranquiçados (Corner, 1976; Barroso et al., 1999). Dois aspectos reforçam a morfologia foliar: a) na superfície externa, os cotilédones apresentam rede vascular permeando toda a sua extensão; b) a espessura destes cotilédones, em média de 0,7mm em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* e atingiu 1,4mm em *T. bicolor*. A denominação *T. bicolor* é apropriada porque os cotilédones mais jovens abrigam entre seus redobramentos um tecido translúcido, destacável e retorcido como um suspensor (Figura 2A) sendo constituído por parênquima homogêneo e não contendo substâncias de reserva (Figura 2A₁) como observado nas células cotiledonares (Figura 2A₂). *T. cacao* por sua vez tem coloração muito variável: é roxo no varietal forastero (Figura 1D₁) e atinge o esbranquiçado em outros varietais (Barroso et al., 1999; Silva et al., 2001). Em termos de massa, *T. grandiflorum* e *T. bicolor* destacam-se (Tabela 1) em relação às outras espécies.

Tabela 1. Tamanho e peso médio das sementes de *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. subincanum* e *T. cacao*.

Espécie	Tamanho *(mm)	Peso** (g)
<i>T. grandiflorum</i> (G2)	31 x 24	11,6 ± 2,8
<i>T. subincanum</i> (G2)	17 x 11	2,1 ± 0,2
<i>T. bicolor</i> (G2)	30 x 24	9,4 ± 1,1
<i>T. cacao</i> (G1)	23 x 13	3,2 ± 0,2
<i>T. cacao</i> (G2)	29 x 12	2,8 ± 0,2

* eixos longitudinal e transversal

** valores: média ± desvio padrão

G1 e G2 referem-se à procedência, vide Material e Métodos.

Mesofilo cotiledonar

O mesofilo cotiledonar assim como o embrião contém células de reserva, idioblastos de polifenóis e feixes vasculares. O endosperma de *Theobroma* desaparece precocemente. Em *T. cacao* o endosperma está presente entre o 83^o DAP ao 104^o DAP, período no qual as reservas serão utilizadas para o desenvolvimento do embrião; entre 160^o - 170^o DAP a semente estará madura (Bucheli et al., 2001; Dangou et al., 2002). Todas as três espécies e também *T. cacao* demonstraram sementes e células em estágios diferenciados de maturação. Em sementes jovens as células do mesofilo, contendo poucas reservas, apresentam o característico vacúolo central melhor evidenciado ao MET (Figura 6A,B). Este vacúolo desaparece à medida que as reservas se acumulam.

Apenas as células da epiderme mantêm até a maturidade o grande vacúolo central, o qual é fracamente positivo ao AT pH 8,0 (Figura 2B). Nas três espécies as células da epiderme contêm pequenos (< 0,3µm) glóbulos metacromáticos ao AT indicando a presença de polifenólicos, poucos glóbulos lipídicos e raros grãos de amido (Figura 2B₁).

Os idioblastos acompanham os feixes vasculares e são identificáveis assim que a lâmina cotiledonar inicia seu crescimento na semente. Brooks & Guard (1952) apresentaram características da morfologia celular das porções vegetativas que ocorrem também nos cotilédones destas espécies, como por exemplo os espaços intercelulares que ocorrem em graus variados e são bem aparentes em *T. subincanum*. Em cortes do mesofilo fresco, pode-se dissociar células íntegras de reserva exercendo-se uma pressão entre a lâmina e lamínula histológicas. Esta labilidade entre as células promove espaços lisígenos armazenadores de mucilagem, fenômeno extensivo em *T. speciosum* (Martini et al., 2003).

As células dos mesofilos de *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor* e *T. cacao* sintetizam mucilagem (Figura 2B). Os cortes histológicos de tecido fresco demonstram-na sob coloração com vermelho de rutênio (Martini et al, 2003) ou por metacromasia ao AT em tecido fixado (Figura 2B₁). Na testa das sementes, por metacromasia ao AT, foram observadas células repletas de mucilagem. Nos mesofilos não se identificaram células específicas para esta secreção, entretanto, a secreção é abundante nas seções à fresco.

Os resultados obtidos nas determinações das reservas dos cotilédones estão apresentados na Tabela 2. As concentrações de lipídeos são análogas às encontradas por Silva (2000) visto que as amostras são oriundas do mesmo lote da CEPLAC/PA e CEPLAC/ BA 2001; as proteínas totais apresentadas por Silva (2000) foram obtidas com sementes desengorduradas. Observa-se que três espécies, assim como *T. cacao*, caracterizam-se como sementes de reserva lípide-proteica. *T. bicolor* entretanto destaca-se pela maior quantidade de reserva protéica e muito baixa produção de polifenóis em relação as demais espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração das principais reservas das sementes de *Theobroma*, em base seca (%)

Amostra	Proteína	Lipídeo	Carboidrato	Polifenóis
<i>T. grandiflorum</i> (G2)	12,95	54,22	25,37	4,27
<i>T. subincanum</i> (G2)	9,48	59,88	nd	5,52
<i>T. bicolor</i> (G2)	19,07	30,86	45,75	0,50
<i>T. cacao</i> (G1)	14,20	47,26	34,20	8,27
<i>T. cacao</i> (G2)	14,50	51,22	28,92	7,72

nd = não determinado. Os valores são médias de três determinações.

G1 e G2 referem-se à procedência, vide Material e Métodos

Lipídeos

A localização dos glóbulos de lipídeos (Figura 2 B, B₁, B₂) é semelhante à de *T. cacao*: localização periférica e glóbulos entre 1µm a 4µm. No tecido seccionado a fresco os glóbulos coalescem nas células ainda íntegras quando a temperatura atinge acima de 30°C (exame ao MO por iluminação transmitida através da lâmina).

Sob criosecção em CO₂ os cotilédones preservaram parcialmente os glóbulos lipídicos e estão evidenciados por fluorescência ao Nile Red (Figura 3 A, B, C).

O envolvimento dos glóbulos de gordura pelas reservas protéicas é uma constante e demonstrável ao MEV (Figura 5A,B). A proximidade com a reserva protéica obscurece a presença da oleosina (membrana lípide-protéica que envolve o glóbulo de gordura de sementes ortodoxas). De fato, na Figura 7, em *T. cacao*, *T. subincanum* e *T. bicolor* ocorre tênue membrana entre os glóbulos lipídicos. Leprince et al. (1998) incluiu *T. cacao* como exemplo de semente recalcitrante e desprovida de oleosinas. Guilloteau et al. (2003) afirmam a existência de oleosina e apresentam a sequência de peptídeos que compõe as duas classes de oleosinas de *T. cacao*.

Quanto a composição dos ácidos graxos e triacilglicerois, o estudo de Gilabert- Escrivá (2002) é abrangente; é descrito que há relativa homogeneidade em relação a predominância de ácido oléico, seguido de esteárico em *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor* e *T. cacao*. Entretanto, ocorre 70% de redução do ácido palmítico do *T. cacao* nas outras três espécies em estudo.

A composição dos TAGs demonstram predominância do TAG SOS nas três espécies e do TAG POS em *T. cacao*. Segundo Gilabert-Escrivá (2002) esta diferença demonstra que os lípides das três espécies não seriam substitutos naturais da manteiga de cacau.

Proteínas

Na semente madura de *T. cacao* as proteínas estão presentes na seguinte proporção: 52% de albumina, 43% de globulinas e 5% de glutelinas. Sabe-se que as proteínas estão vinculadas ao aroma e sabor do chocolate (Voigt et al., 1993) devido à acentuada proteólise das vicilinas (globulinas tipo vicilinas) durante a fermentação das sementes. Em 1995, Voigt et al. demonstraram que os precursores específicos do aroma estão ligados a vicilina 7S. Um fato relevante é que a totalidade das globulinas das sementes possuem apenas legumina ou leguminas e vicilinas. *T. cacao* apresenta apenas vicilinas. Ao MO, a proteína ocupa a porção central da célula (Figura 2 B, B₁, B₂). Durante o processo de síntese, o vacúolo central por autofagia foi internalizando a proteína de reserva. Demonstra-se ao MET a presença das proteínas no vacúolo central das células de sementes jovens (Figura 6 A, B, C). As Figuras 7A e B apresentam as proteínas de reserva entremeadas com os glóbulos de lipídeos e alguns grãos de amido; esta associação é constante para as quatro espécies estudadas.

Ao MEV (Figuras 4 e 5) as criofraturas mostram a rede protéica exibindo os numerosos orifícios que indicam a retirada dos lipídeos.

Carboidratos

As quantidades de carboidratos expressos na Tabela 2 referem-se sobretudo à constituição da parede celular porque amido não é reserva importante nestas espécies. As Figuras 3D e E demonstram que 6 a 8 pequenos grãos de amido ocupam uma pequena área dentro das células. Lenci (2002) obteve 12 grandes grãos de amido, em média, preenchendo 80% da superfície celular de *T. microcarpum*, fato que não ocorre em *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. bicolor*.

Existe uma relação entre síntese de amido e a presença de plastoglóbulos dentro dos leucoplastos com grãos de amido (Smith et al., 2000). As Figuras 7B e C mostram vários leucoplastos contendo corpos densos. Estes corpos são plastoglóbulos cujo conteúdo demonstrou-se análogo aos depósitos iniciais de polifenóis nas células.

Polifenóis

As células polifenólicas estão dispersas entre as células do mesófilo cotiledonar e também circundam feixes vasculares em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* como ocorre em *T. cacao* (Martini et al., 2004). Em *T. bicolor*, que possui a menor quantidade de polifenólicos, as células polifenólicas localizam-se apenas ao redor do feixe vascular.

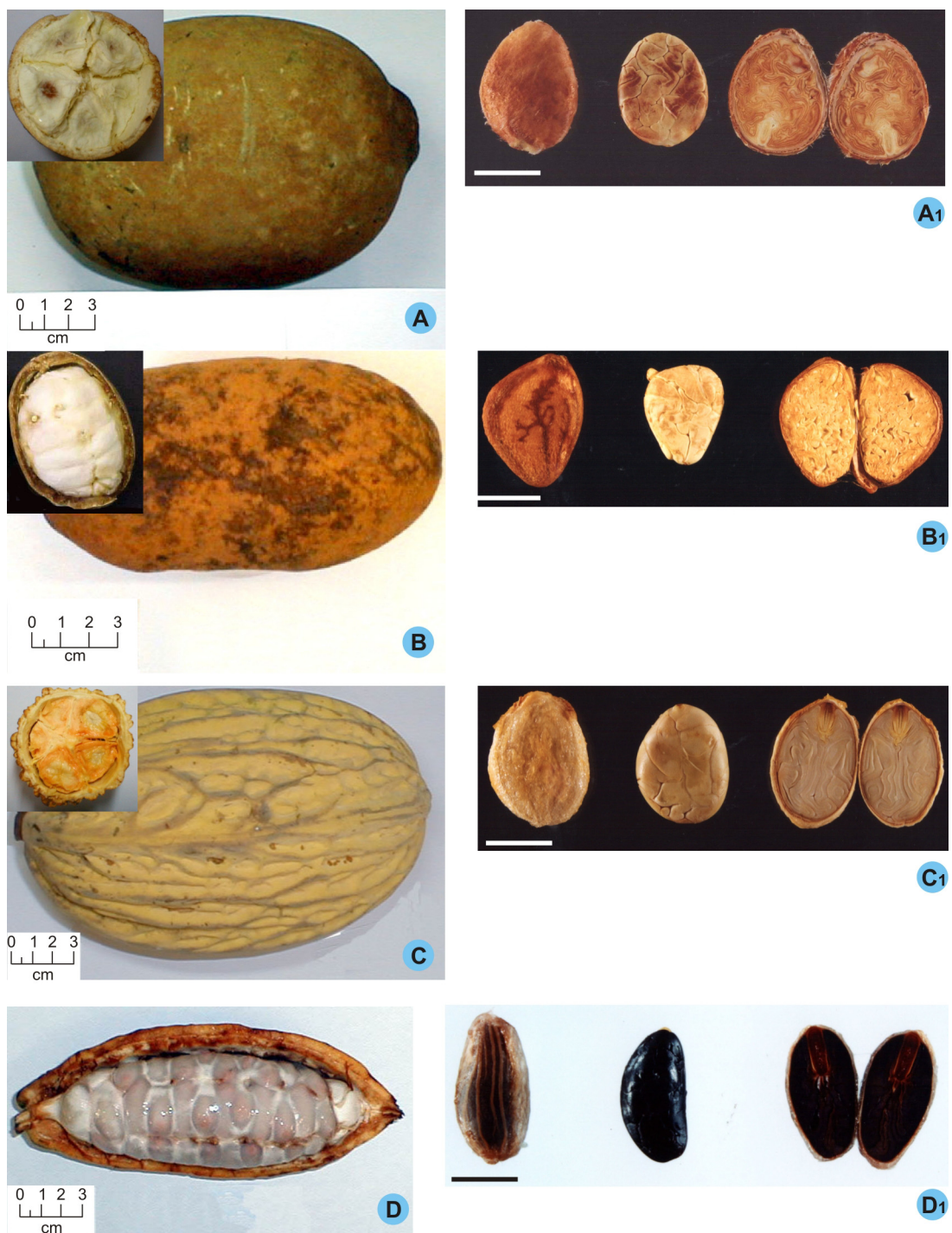


Figura 1 Frutos e suas sementes. Os cotilédones redobrados e compactados são características do gênero. A diversidade de forma do fruto é freqüente dentro do *Theobroma*: **A – A₁** *T. grandiflorum*. **B – B₁** *T. subincanum*. **C – C₁** *T. bicolor*. **D – D₁** *T. cacao*. (A₁, B₁, C₁, D₁: Barra = 10mm).

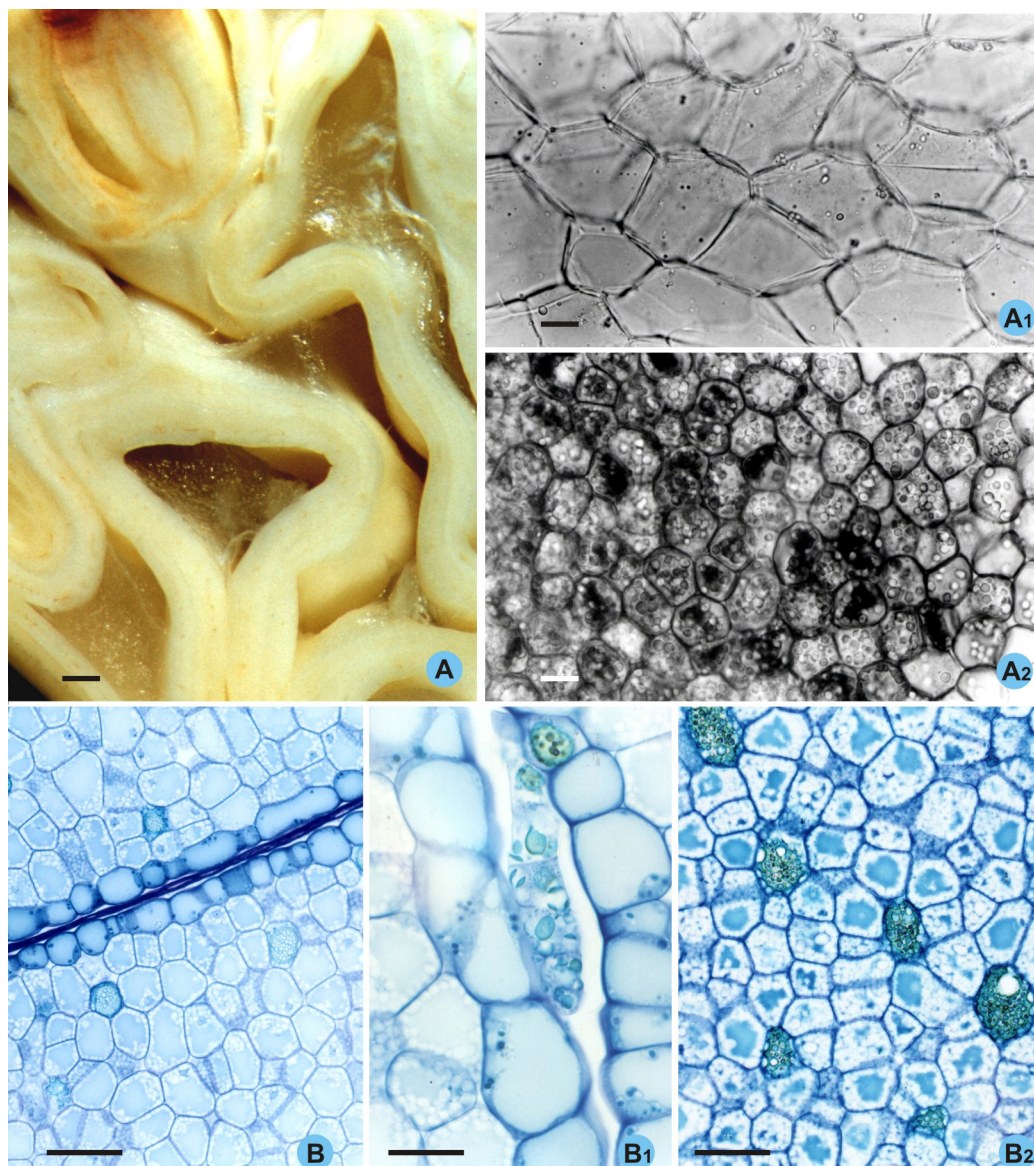


Figura 2 MO dos cotilédones. *T. bicolor*: A, A₁, A₂, à fresco sem coloração. A (Barra = 10mm) o cotilédone dobrado está entremeado por um tecido translúcido. A₁ (barra = 10µm) este tecido translúcido é indiferenciado e atua como eixo suspensor da semente. A₂ (barra = 10µm) o cotilédone apresenta substâncias de reserva. *T. grandiflorum*: B, B₁, B₂, reação ao A T, pH8 B (barra = 50µm) o mesofilo tem células com síntese proteica circundada por glóbulos de lípidos; entre as duas epidermes escorre a mucilagem. B₁ (barra = 10µm) as células da epiderme e o tricoma sintetizam um pouco de todas as reservas: lípidos, proteínas, polifenóis e mucilagem. B₂ (barra = 10µm) mesofilo de semente madura; as células polifenólicas são metacromáticas (verde).

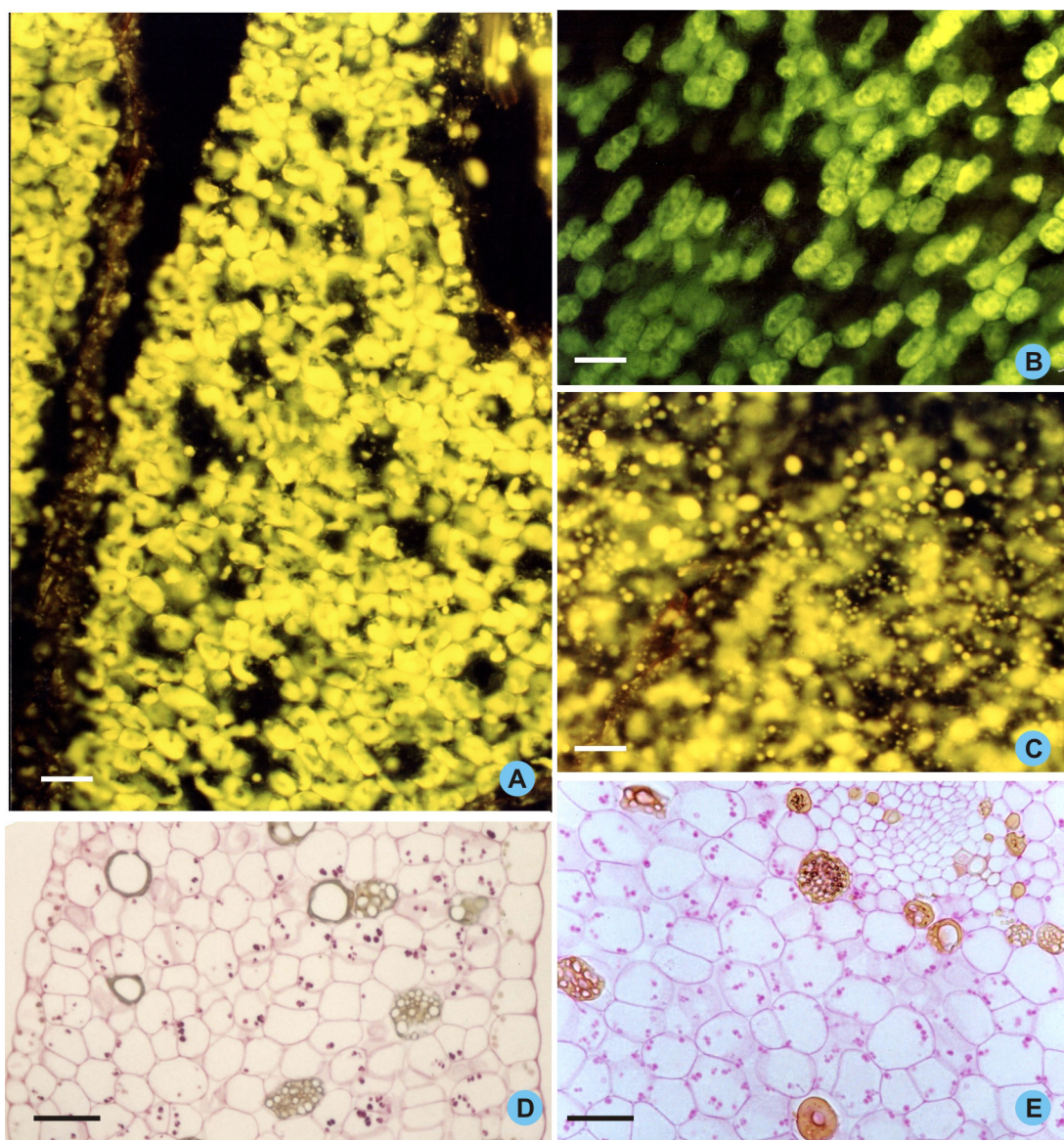


Figura 3 MO dos cotilédones: lípides e amido. **A** *T. grandiflorum* à fresco com Nile red sob fluorescência: os lípides, fluorescentes (amarelo) coalesceram em corpos maiores. **B** *T. bicolor*, idem técnica acima: as células estão individualizadas e os lípides embora coalescidos estão dentro das células. **C** *T. subincanum*, idem técnica acima: os glóbulos de lípides apresentaram rápida coalescência. **D** *T. subincanum*, pós fixação e coloração pelo PAS o tamanho e a quantidade do amido são pequenos. **E** *T. grandiflorum*, técnica idem; o amido está também em pequena quantidade. (Barras = 50μm).

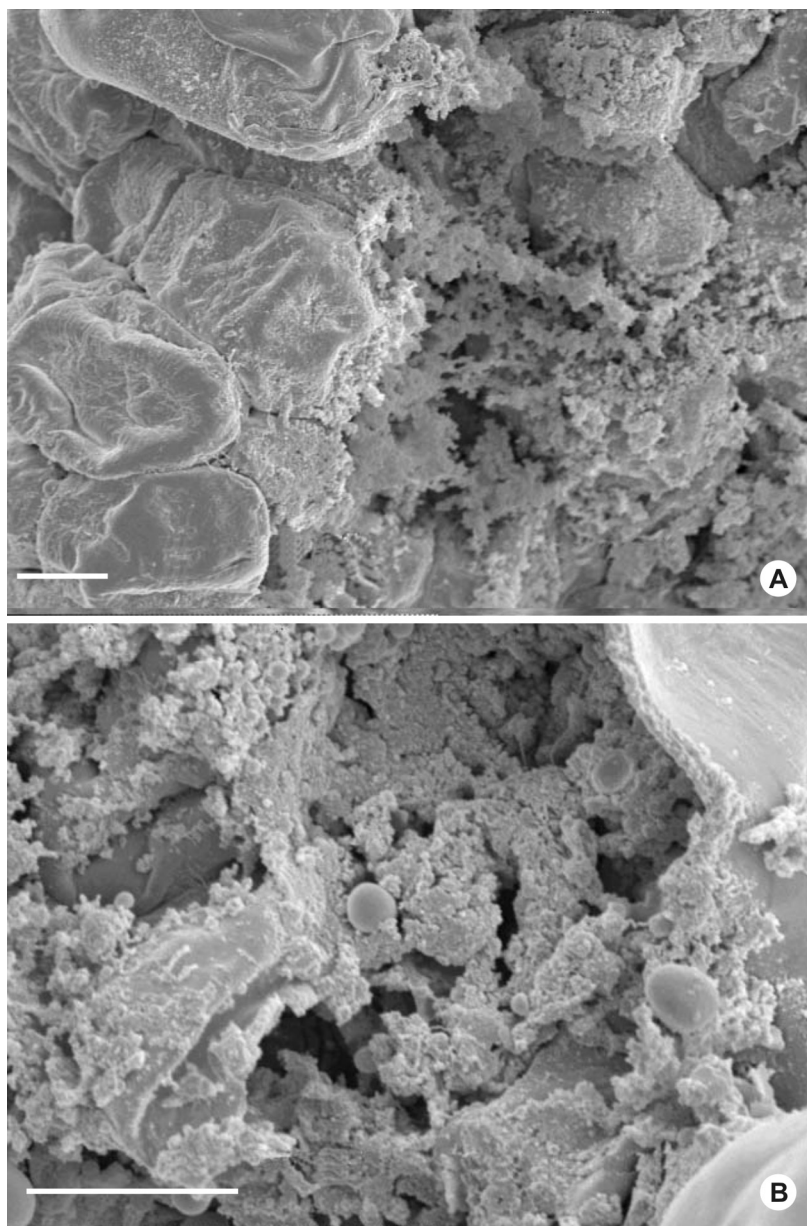


Figura 4. MEV: proteínas. As proteínas destes teobromas estão em rede tridimensional constituída por filamentos rendilhados. **A** *T. grandiflorum*, à esquerda cel. fechadas e à direita a proteína está exposta pela criofratura. **B** *T. subincanum*, exposição também parcial do conteúdo proteico das células.(Barras = 10µm)

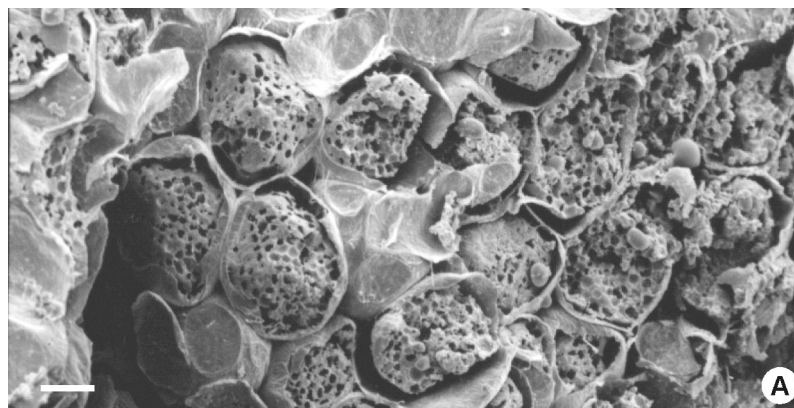


Figura 5. MEV: proteínas. **A** *T. bicolor* (Barra = 20 μ m), a criofratura demonstra a rede proteica na sua face adjacente à parede celular; os orifícios abrigaram glóbulos lipídicos extraídos com acetona durante a preparação. **B** *T. cacao* (Barra = 10 μ m), a distribuição é também ampla dentro das células sendo similar nas quatro espécies.

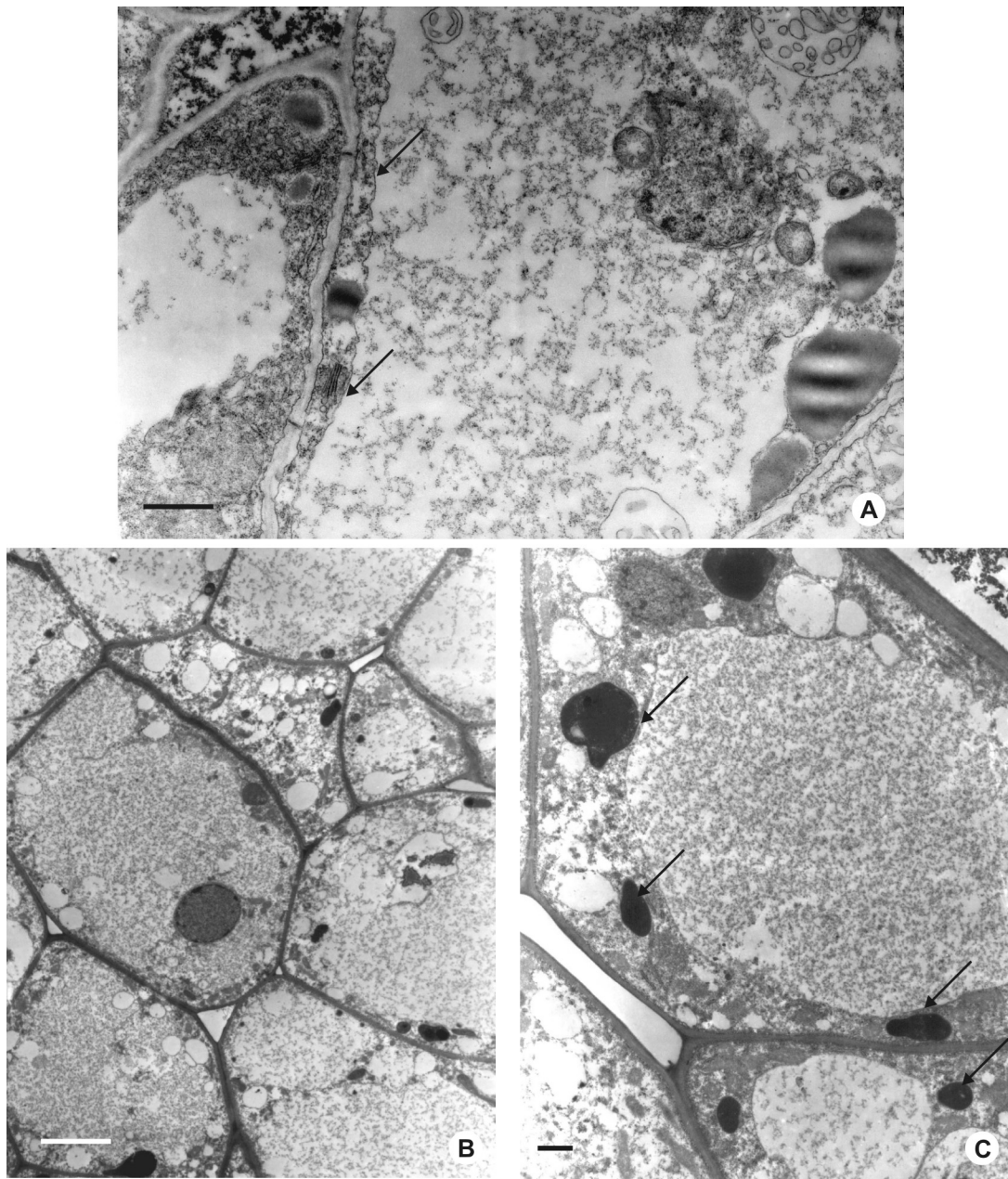


Figura 6. MET: mesofilo imaturo de *T. cacao*. O mesófilo demonstra a evolução concomitante das reservas. **A** (barra = 10µm), na cel. imatura já estão presentes três glóbulos de polifenóis. O citoplasma periférico está demarcado. A seta indica o complexo de Golgi. **B** (barra = 4µm), todas as reservas presentes estão em estado incipiente. **C** (barra = 1µm), o citoplasma abriga vários glóbulos lipídicos e seis plastídeos contendo plastoglóbulos (↙).

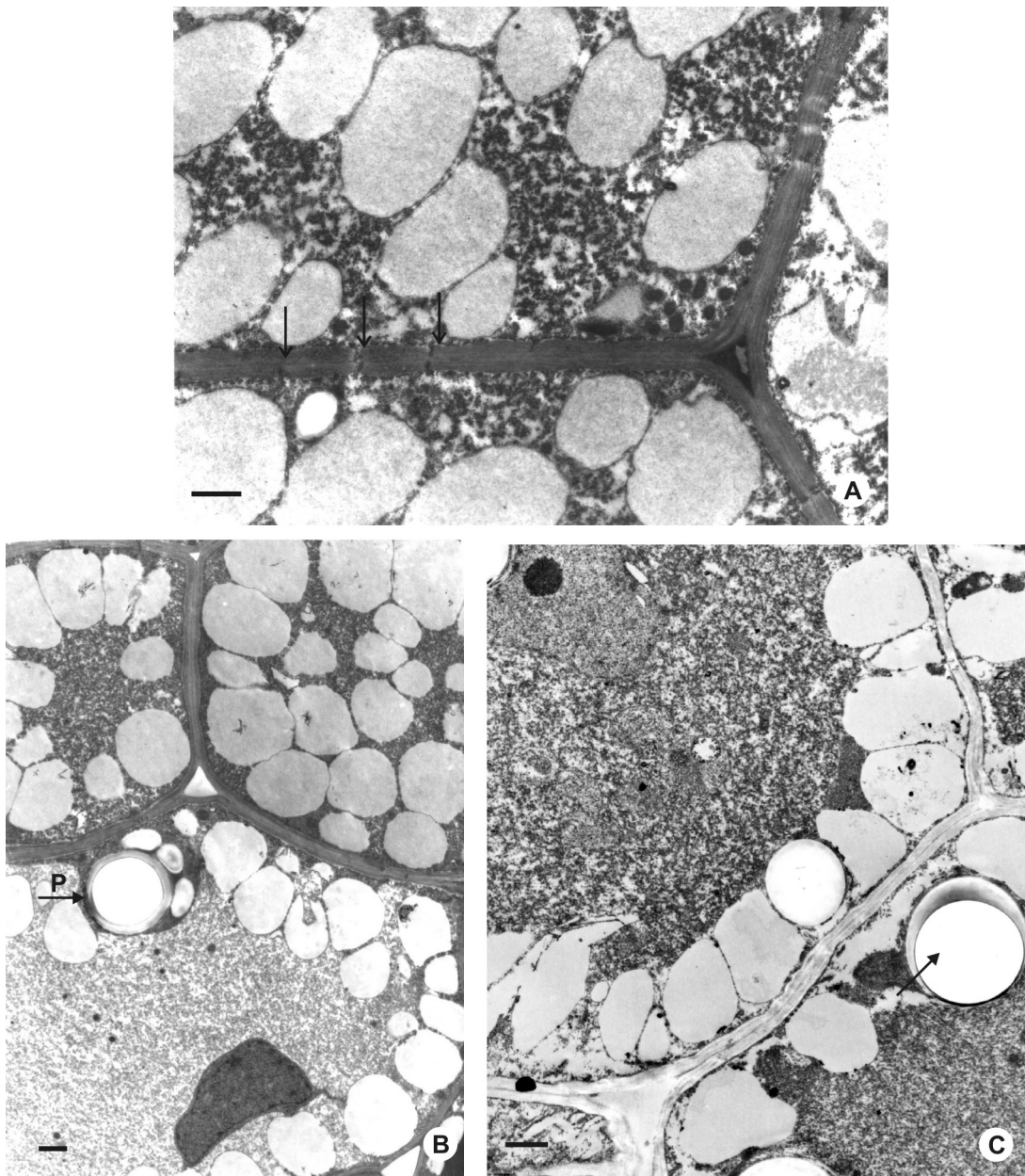


Figura 7. MET: reservas lipídicas e protéicas em *T. cacao*, *T. subincanum* e *T. bicolor* (↙). Estas sínteses são concomitantes; é constante a interrelação dos lípides com a rede proteica. **A** *T. cacao* (barra = 1µm), a reserva protéica destas células maduras é densa. Plasmodesmos estão configurados (↓). **B** *T. subincanum* (barra = 1µm), um plastídeo (→) abriga três grânulos íntegros e um grânulo que perdeu a parte central; **C** *T. bicolor* (barra = 2µm), célula madura de reservas lípide-protéicas; dois espaços que continham (→) grânulo de amido.

CONCLUSÕES

A distribuição das reservas no mesofilo aproximam *T. grandiflorum* à *T. subincanum*. A maior quantidade de proteínas está em *T. bicolor*. Há porém menor quantidade de lipídeos e as células polifenólicas são escassas em *T. bicolor*; não obstante seu mesofilo é semelhante à *T. cacao*.

A quantidade de polifenóis é um elemento distintivo na aparência macroscópica das sementes.

As células do mesofilo cotiledonar de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. bicolor* apresentam semelhanças morfológicas entre si e com *T. cacao*, o representante do gênero.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte técnico de YARA FAGNANI HONÓRIO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Edited by Patricia Cunniff. 16.ed. 3. rev. Gaithersburg:AOAC, 1997. v.1-2.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F. **Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 443 p.

BECHTEL, D.B. **New Frontiers in Food Microstructure**. St. Paul: AACC, 1983. 392p.

BIEHL, B.; PASSERN, U.; PASSERN, D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation., **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, p.41- 52, 1977.

BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p.1101- 1109, 1982.

BRITO, E.S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.); e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor**. Campinas, 2000. 134p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BROOKS, E. R.; GUARD, A. T. Vegetative anatomy of *Theobroma cacao*. **Botanical Gazette**, Chicago,v. 113, June, p.444- 454, 1952.

BUCHELI, P.; ROUSSEAU,G.; ALVAREZ, M.; LALOI, M.; MCCARTHY, J. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds.**Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v.49, n.10, p.5046- 5051, 2001.

CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. London: Cambridge University Press, 1976. v. 1. 311p.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United Statate National Herbarium**, Washington, v. 35, p.379-614, 1964.

DANGO, J.S.; HOCHER, V.; FERRIÈRE, N.; FULCHERI, C.; MORARD, P.; ALEMANN, L. Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. **Seed Science Research**, New York, v. 12, n. 2, 91- 100, june, 2002.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**.London: Academic Press, 1984. 301p.

GILBERT- ESCRIVÁ, M.V. **Caracterização e seleção de gorduras do gênero *Theobroma* para aplicação tecnológica**. Campinas, 2002. 178p.Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GREENSPAN, P.; MAYER, E.P.; FOWLER, S.D. Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of Cell Biology**. New York, v. 100, p.965-973, Mar., 1985.

GUILLOTEAU, M.; LALOI, M.; BLAIS, D.; CROUZILLAT, D.; Mc CARTHY, J. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15,8 and 16,9 kDa oleosins. **Plant Science**. Limerick, v. 164, p.597-606, 2003.

HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTIAS, M.; MEIRELLES, M. N.; SILVEIRA, M. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, 179p.

HARRIS, J.R. **Electron microscopy in Biology**: a practical approach. New York: Oxford University Press, 1991.308p.

LENCI, C. G. **Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *Theobroma cacao*, *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum***. Campinas, 2002. 101 p. Tese (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

LEPRINCE, O.; Van AELST, A.C.; PRITCHARD, H.W.; MURPHY, D.J. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and sensitive oilseeds. **Planta**, Berlim, v. 204, p.109-119, 1998.

LING-LEE, M.; CHILVERS, G.A.; ASHFORD, A.E. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fatigata* deane and maiden. **New Phytologist**, Cambridge, v. 78, p.313-328, 1977.

MARIGO, G. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. **Analusis**, Paris, v. 2, p. 106-110, 1973.

MARTINI, M. H.; LENCI, C.G.; TAVARES, D. Q. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *theobroma speciosum*. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.65- 69, Dezembro, 2003. Disponível em: < <http://www.sbm.org.br/actar/html/trabalhos/12.pdf> >. Acesso em 23 jan. 2004.

MARTINI, M. H.; LENCI, C. G.; FIGUEIRA, A.; TAVARES, D. Q. Estrutura e localização das reservas cotiledonares de *Theobroma grandiflorum* Schum., *Theobroma subincanum* Mart. e *Theobroma bicolor* H.&B. e analogias com *Theobroma cacao* L. (enviado para publicação)

MARTINI, M. H; LENCI, C. G.; TAVARES, D. Q. As células polifenólicas e interrelações com as células cotiledonares de *Theobroma cacao* L., *T. grandiflorum* (Spreng) Schum, *Theobroma obovatum* Klotzsch ex Bernoulli., *T. subincanum* Mart., *T. speciosum* Willd. Ex Spreng, *T. bicolor* H & B, *T. microcarpum* Mart. (enviado para publicação)

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**, Campinas, 2001. 163p.Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M. E.**The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne:Bradford House Pty. Ltd., 1981.352 p. ISBN 0-9594174-0-0

RUHL, G.; BIEHL, B.; DAMBROTH, M. Stability of isolated lipid bodies from cotyledons. **Landbauforschung Volkenrode**, Braunschweig, v.4, p.193-201, 1989a.

RUHL, G. & DAMBROTH, M. Ultrastructure of the cotyledonary storage parenchyma cells of desiccating cacao seeds. **Landbauforschung Volkenrode**, Braunschweig, v.1, p.15-27, 1989b.

SILVA, C.R.S. **Filogenia do gênero *Theobroma* utilizando marcadores moleculares e bioquímicos**. Piracicaba, 2000. 139 p.Dissertação (Mestre em Ciências, Energia Nuclear na Agricultura)- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

SILVA, C.R.S; FIGUEIRA, A.V.O.; SOUZA, E.C.A.S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In. DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacaueiro**. Goiás: FUNAPE- UPG, 2001. p. 49-80.

SILVA, T.R.G. **Compostos de reserva em sementes de *Dalbergia miscolobium* Benth.**: caracterização histo e bioquímica e variação durante a germinação. Campinas, 1995. 134p.Tese (Doutora em Ciências na área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

SMITH, M. D.; LICATOLOSI, D. D.; THOMPSON, J. E. Co-association of cytochrome *f* catabolites and plastid-lipid-associated protein with chloroplast lipid particles. **Plant Physiology**, Rockville,v. 124, p.211-221, 2000.

VENTURIERI, G.A; AGUIAR, J.P.L. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Schum. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, p.3-8, 1988.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; KAMARUDDIN, S., WAZIR, S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, Oxford, v. 47, p.145-151, 1993.

VOIGT, J.; KAMARUDDIN, S.; HEINRICHS, H; WRANN, D.; SENYUK, V.; BIEHL, B. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L seeds. **J. Plant Physiol.**, v. 145, p.199-307, 1995.

CAPÍTULO 3

AS CÉLULAS POLIFENÓLICAS E AS SUAS INTER-RELAÇÕES COM AS CÉLULAS COTILEDONARES EM ESPÉCIES DE *Theobroma*

Martini, M. H.¹; Lenci, C. G.²; Tavares, D. Q.²

ABSTRACT

This study determined the polyphenolic content and showed the polyphenolic cells in the mesophyll of the cotyledon of *T. cacao* L., *T. obovatum* Klotzsch ex Bernoulli., *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., *T. subincanum* Mart., *T. microcarpum* Mart., *T. bicolor* H & B and *T. speciosum* Willd. ex Spreng, analyzing the development of the idioblasts. The total polyphenolic content was determined by spectrophotometry. The following mean results were obtained in mg/g polyphenols: 97.5 for *T. cacao*, 55.2 for *T. subincanum*, 51.0 for *T. obovatum*, 42.7 for *T. grandiflorum*, 26.8 for *T. microcarpum*, 5.0 for *T. bicolor* and 3.2 for *T. speciosum*. As observed in MO, the polyphenolic cells were arranged perpendicular to the edge of the mesophyll near the epidermis in *T. cacao* and *T. grandiflorum* and in all the species studied were associated with the vascular bundles. In *T. bicolor* and *T. speciosum* the phenolic cells were only located around the vascular bundles. Using SEM the polyphenols appeared as 40 µm long bags (*T. cacao*) or as vesicles with diameters from 3 to 20 µm (*T. cacao*). Leakage from the phenolic

¹ Instituto Adolfo Lutz- Laboratório I de Campinas

² DEPAN-FEA, UNICAMP CP 6121, 13083-862, Campinas – SP, e-mail: debora@fea.unicamp. Br

Artigo pronto para ser enviado à Revista Brasileira de Botânica.

bodies was frequently observed, the contents being found adhered to the cell wall, as could be seen under SEM. Using TEM, intraplastid bodies with density and aspects similar to the polyphenols were seen.

RESUMO

Este estudo determina a quantidade de polifenóis totais, apresenta as células polifenólicas do mesofilo cotiledonar de *T.cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. speciosum* e analisa o desenvolvimento destes idioblastos. A quantidade de polifenóis totais foi determinada por espectrofotometria. Os resultados mostram as seguintes médias em mg/g de polifenóis: 97,5 em *T. cacao*, 55,2 em *T. subincanum*, 51,0 em *T. obovatum*, 42,7 em *T. grandiflorum*, 26,8 em *T. microcarpum*, 5,0 em *T. bicolor* e 3,2 em *T. speciosum*. As células polifenólicas observadas ao MO dispõem-se perpendicularmente à borda do mesofilo próximo a epiderme em *T. cacao* e *T. grandiflorum* e em todas as espécies associam-se com o feixe vascular. Em *T. bicolor* e *T. speciosum* as células polifenólicas localizam-se somente na região do feixe vascular. Ao MEV os polifenóis estão delimitados como sacos de 40µm de comprimento (*T. cacao*) ou como vesículas de 3 a 20µm de diâmetro (*T. cacao*). Ocorre com frequência o extravasamento do corpo fenólico e o conteúdo aparece aderido à parede celular, característica demonstrada através da MEV. Em *T. subincanum* corpos intraplastídios com densidade e aspecto semelhante aos polifenóis foram observados ao MET.

INTRODUÇÃO

Os polifenóis de vegetais são derivados do metabolismo da glicose através das vias acetato e shikimato. No mesofilo cotiledonar do gênero *Theobroma* as células polifenólicas, ou seja, idioblastos, caracterizam-se pelo grande vacúolo translúcido, e em algumas espécies, como *T. cacao* e *T. grandiflorum* por colorações rubras (Zobel, 1986; Kuras et al., 1999; Lenci, 2002). São conhecidos mais de 8000 compostos fenólicos (Bravo, 1998). A diversidade está aliada à diversidade funcional que se inicia com a formação da parede da célula indo até a proteção ao estresse biótico e abiótico dos vegetais (Zaprometov, 1992; Hutzler et al., 1998).

Os polifenóis estão na epiderme e subepiderme de folhas, raízes e tecido cotiledonar de reserva das sementes de *T. cacao* (Biehl et al., 1977; Jalal & Collin, 1977).

Os polifenóis das sementes de *T. cacao* conferem, junto aos elementos de reserva, sabor e cor ao chocolate (Porter et al., 1991) e representam 12 a 20% da massa de sementes secas e desengorduradas (Kim & Keeney, 1984; Wollgast & Anklam, 2000). A descrição morfológica das células polifenólicas apresentadas neste artigo só foram possíveis pela reunião de técnicas histoquímicas ao MO e à evidência das organelas reveladas especialmente ao MEV e confirmadas ao MET. Quanto à constituição química dos polifenóis sobretudo de *T. cacao* foram bem estudadas por Jalal & Collin (1977), Kim & Keeney (1984), Porter et al. (1991) e Wollgast & Anklam (2000).

O presente trabalho apresenta células polifenólicas do mesofilo cotiledonar de sete espécies do gênero *Theobroma* e analisa o desenvolvimento destes idioblastos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Sementes de *T.cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. speciosum* foram obtidas de frutos provenientes das coleções da Comissão Executiva do Plano Cacaueiro (CEPLAC- Marituba- PA e CEPLAC- Itabuna- BA).

Os frutos foram divididos em dois grupos de acordo com a origem:

Grupo 1 (G1). *T. cacao*, *T. obovatum*, *T. speciosum* e *T. microcarpum* (frutos maduros recebidos da CEPLAC- Marituba, PA; em março de 2001);

Grupo 2 (G2). *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. bicolor* (frutos maduros recebidos da CEPLAC- Itabuna, BA; em novembro de 2001);

Métodos

Determinação de polifenóis

Utilizou-se 50mg de amostra liofilizada e desengordurada; adicionou-se 15ml de solução aquosa de acetona a 70% e centrifugou-se à 3200 xg/20min à 4°C. Às alíquotas de 0,5ml acrescentaram-se 60ml de água destilada, 15ml de carbonato de sódio anidro a 20% e 5ml de Folin Ciocalteu e mantidas à 20°C por 2 horas. A determinação colorimétrica foi efetuada em espectrofotômetro em 760nm de comprimento de onda e expressos a partir de uma curva padrão de ácido gálico variando entre 5 a 750mg/l (Marigo, 1973).

Microscopia Óptica (MO)

Os cotilédones foram seccionados a fresco para análise prévia do tecido e utilizou-se Rodamina B e Azul cresil brilhante. Ao mesmo tempo outras seções de 2mm^3 foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído (v/v) acrescido de 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,3 (120h à 5°C). O tecido foi desidratado a seguir em soluções crescentes de etanol e incluídas em historesina GMA (glicolmetacrilato). Cortes de 1 a 3μ foram corados com:

- a) Azul de toluidina 0,025% pH 4,0 em tampão McIlvaine (15 minutos) e lavados em água destilada (Vidal, 1977) e Azul de Toluidina 0,5% em bórax 5%, pH 8,0 (O'Brien & McCully, 1981).
- b) Azul de toluidina 0,05% em água destilada durante 5 minutos e pós tratados com iodeto de potássio (Lugol) diluído em água destilada 1:3 (v/v) durante 30 segundos, a seguir foram lavados com água destilada (Gutmann, 1995).

Amostras do grupo 1 foram fixadas em FAA (Johansen, 1940) solução de etanol 50%: ácido acético: formaldeído 40%; 90:5:5 (v:v). Tempo de fixação, desidratação e inclusão em GMA seguiram os mesmos procedimentos descritos acima.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Seções entre 1 a 5mm^3 foram fixados em solução de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,3 (120h a 6°C), pós-fixadas em solução à 1% de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,3 durante 18h (Bechtel, 1983). A seguir foram desidratadas em soluções crescentes de etanol, levadas ao nitrogênio líquido e procedida a criofratura. A seguir foram imersas em acetona (2h) para extração do óleo e levadas à secagem

em aparelho de ponto crítico de CO₂. Colocadas sobre suportes metálicos, as amostras foram recobertas de ouro/paládio (Haddad et al., 1998) e micrografadas ao MEV marca JEOL JSM-5800LV sob aceleração de 10KV e 15KV.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Seções de 2mm³ de tecido cotiledonar foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% (v/v) com adição de sacarose a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 90 horas à 5°C. O material foi então pós fixado durante 18h em solução 1% tetróxido de ósmio e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3. A seguir o material foi colocado em acetato de uranila 0,5% (16h) e desidratado em concentrações crescentes de etanol. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 (Haddad et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cortes manuais do tecido fresco revelaram os locais das células polifenólicas no mesofilo e suas associações com o sistema vascular, especialmente os da radícula.

As células polifenólicas de *T. cacao* apresentam coloração própria (Figura 1A). Em cortes a fresco destacam-se por apresentar grande volume celular e aspecto hialino (Figuras 1B,C). Em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* ocorrem cristais refringentes agrupados na epiderme, mesofilo e radícula (Figuras 1D,I). Nota-se a ausência de antocianinas em *T. obovatum* e as células polifenólicas foram realçadas pela utilização de filtro amarelo (Figura 1E). Os idioblastos da radícula, acompanham o sistema vascular e o parênquima adjacente aos cordões procambiais (Figura 1F). O conjunto de células polifenólicas próximas da epiderme dispõem-se

perpendicularmente à borda do mesofilo em *T. cacao* e *T. grandiflorum* (Figura 1A,G). Pequenos vacúolos de polifenóis são observados em pêlos epidérmicos de *T. subincanum* (Figura 1H) sendo uma característica da epiderme apresentar algumas reservas lipídicas, protéicas e amido.

A metacromasia das células polifenólicas ao azul de toluidina é evidenciada quando as seções foram pós-tratadas com Iodeto de Potássio (Figura 2). A fixação com FAA preservou os polissacarídeos acídicos (mucilagem) que participam da parede celular primária, do vacúolo central, do mesofilo e da epiderme. A mucilagem está evidente (Figura 2) entre as dobras dos cotilédones de *T. grandiflorum*. Ocorre a metacromasia do azul esverdeado ao amarelo, com azul de toluidina (pH 8,0 e pH 4,0) em *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. microcarpum* e *T. cacao* (Figura 3).

Ocorre também em *T. bicolor* e *T. speciosum* a constante associação das células polifenólicas apenas com o feixe vascular do mesofilo em detrimento de células polifenólicas espalhadas pelo mesofilo, como ocorre nas outras cinco espécies. Em várias espécies do gênero o mesofilo expande-se, redobra-se, porém tem espessura abaixo de 1mm (exemplo: *T. cacao* e *T. grandiflorum*). O sistema vascular é relativamente pequeno e na semente madura o mesofilo tem caracteristicamente poucas e isoladas células polifenólicas em *T. microcarpum* ou estão ausentes em *T. bicolor* e *T. speciosum* (Figura 3 F, D, E). De fato, pela Tabela 1 observa-se que *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. speciosum* apresentam pequena quantidade de polifenóis em relação às demais espécies estudadas. Em *T. speciosum* (Figura 3E), observa-se no mesofilo grandes cavidades lisígenas, preenchidas por mucilagem. A formação das cavidades ocorre pela permeação das paredes celulares à mucilagem. Martini et al.(2003) demonstram que a cavidade de mucilagem contém porções polifenólicas em *T. speciosum*.

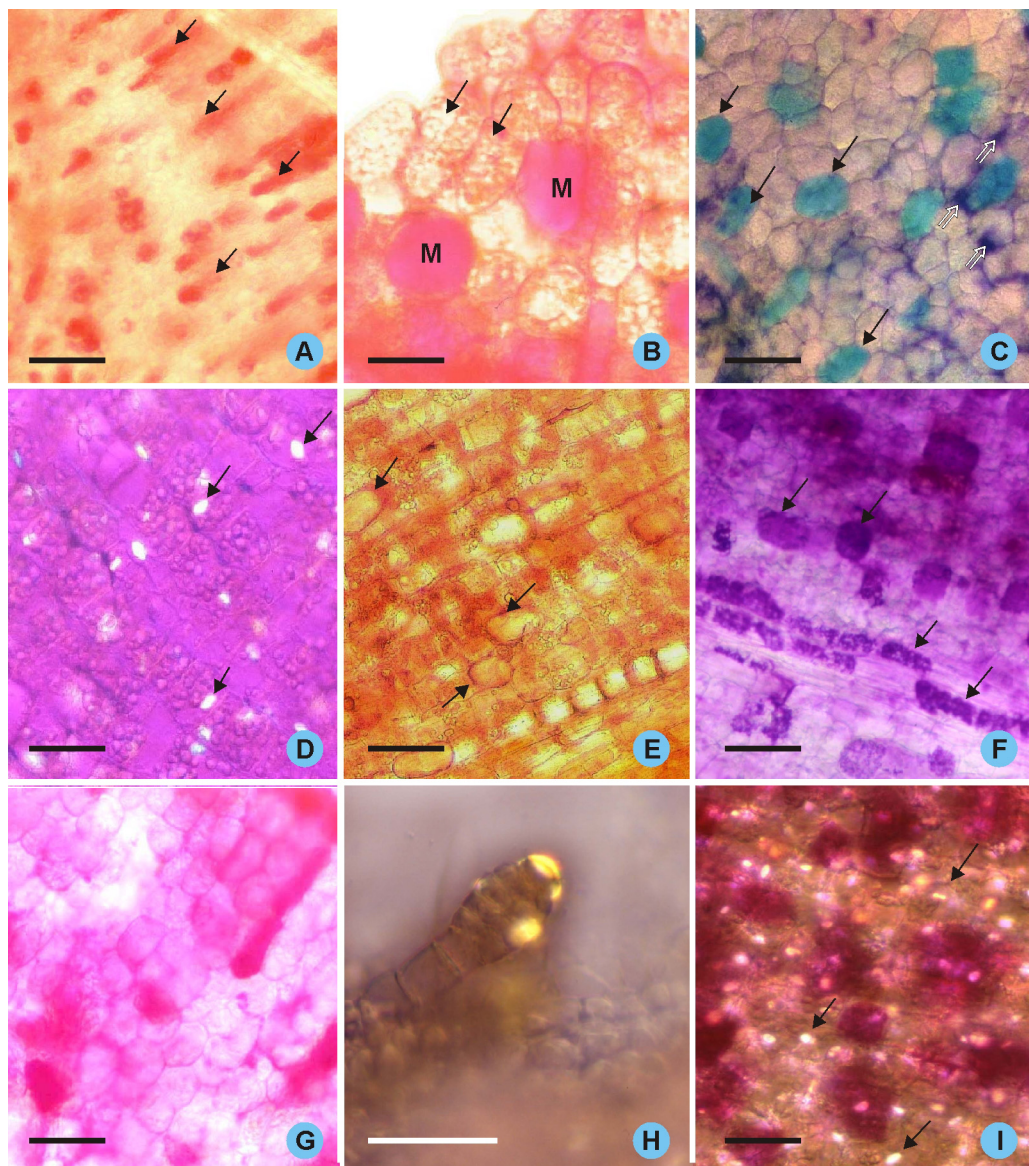


Figura 1 Cortes frescos de mesofilos e radículas tratados com sol. aquosas de corantes vitais ou observados sob luz polarizada: **A** *T. cacao* (Barra = 100µm): numerosas cel. polifenol. associadas mostram sua própria coloração verm. (✓). **B** *T. obovatum* (rodamina B, Barra = 50µm): cel. polifenol. (M) retém a rodamina devido à presença de pectinas. O halo rosa da parede das cel. demonstram também pectina; os glóbulos de gordura (✓) não se coram. **C** *T. subincanum* (azul cresil brilh., Barra = 50µm): com o cresil as cel. polifenol. íntegras tornam-se verdes (✓). O polifenol extravasado e oxidado é metacromático (↗). **D** *T. grandiflorum* (luz polarizada, Barra = 50µm): cristais refringentes na epiderme e radícula. **E** *T. obovatum* (filtro amarelo, Barra 50µm): as cel. polifenol. são descoloridas por ausência de antocianinas. **F** *T. subincanum* (Rodamina B, Barra = 100µm): a radícula e o parenq. adjacente têm muitas cel. polifenol. **G** *T. grandiflorum* (Rodamina B, Barra = 50µm): as cel. polifenol. do mesofilo tem orientação semelhante às de *T. cacao*. **H** *T. subincanum* (luz polarizada, Barra = 5µm): a epiderme possui tricomas que produzem pequenas quantidades de óleo, amido e polifenóis; o óleo está refringente. **I** *T. subincanum* (luz polarizada, Barra = 2,5µm): os cristais refringentes ocorrem nas radículas, mesofilo e epiderme; alguns cristais são grânulos de amido, as manchas púrpuras são cel. polifenol. subjacentes.



Figura 2. *T. grandiflorum* (Azul de Toluidina e I/KI, Barra = 50µm). As cel. polifenólicas (F) são metacromáticas (verde/amarela) e estão acompanhando o feixe vascular ou espalhadas pelo mesofilo. A fixação com FAA conservou os polissacárides (mucilagem) da parede celular primária, e de seus vacúolos centrais. Toda coloração castanha demonstra os polissacárides acídicos da mucilagem, a qual aparece exudada após a epiderme. Os grânulos (O→) de amido são escassos e as gotículas de óleo revestem a superfície interna das células.

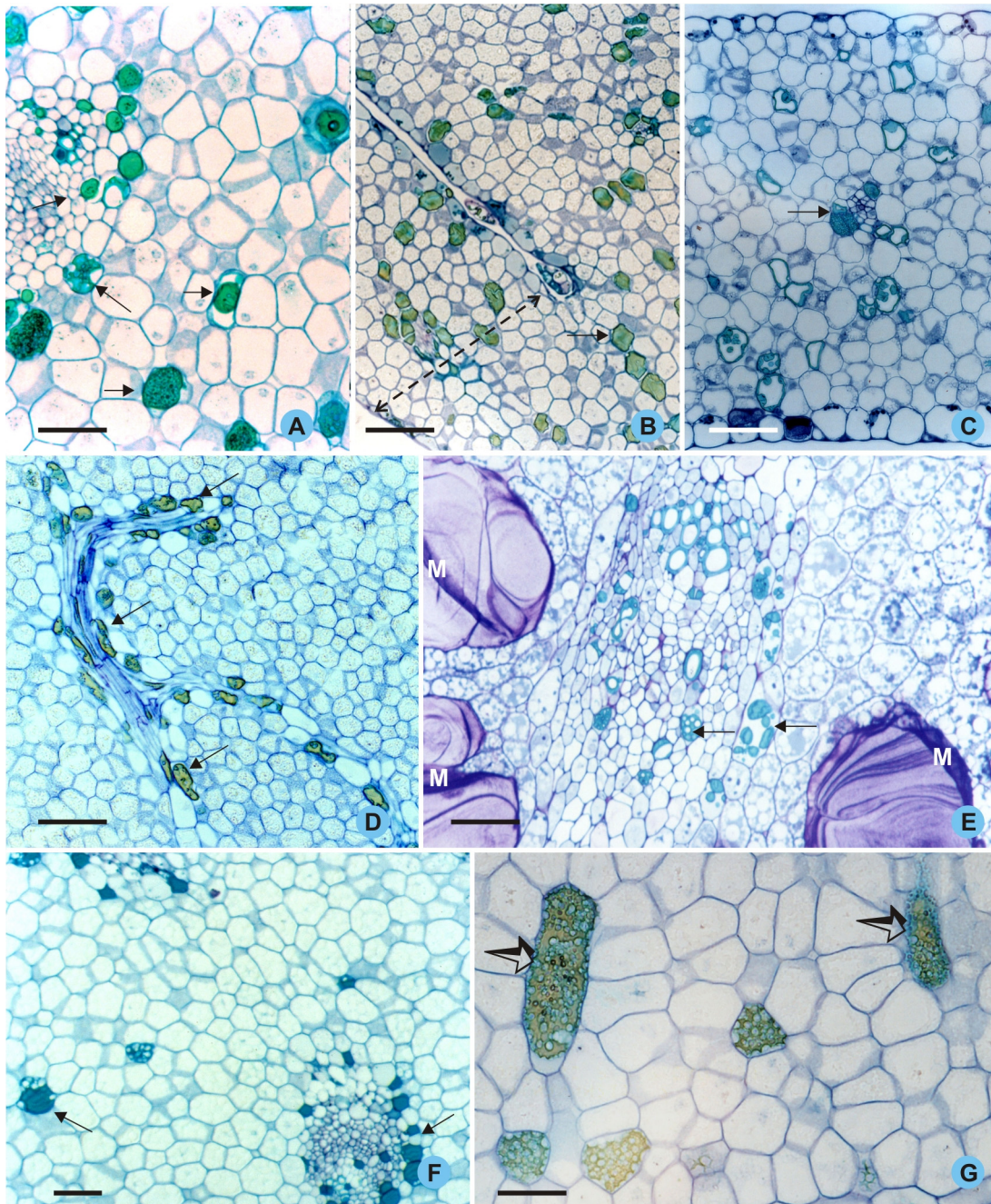


Figura 3 Células polifenólicas das sete spp de *Theobroma* (Azul de Toluidina pH4 e pH8). Ocorre metacromasia destas células as quais coram-se do azul-esverdeado ao amarelo. É freqüente que a preparação para a MO resulte em perda de polissacarídeos solúveis o que fragmenta o conteúdo polifenólico: **A** *T. grandiflorum* (Barra = 50µm). **B** *T. obovatum* (Barra = 100µm). **C** *T. subincanum* (Barra = 50µm). Nestas três espécies os cotilédones são muito delgados, por ex., obovatum (B) e subincanum (C) possuem de 12 a 18 camadas de células entre as duas barras de epiderme (↔). **D** *T. bicolor* (Barra = 100µm): suas cel. polifenol. estão sempre vicinais aos feixes vasculares (↙). **E** *T. speciosum* (Barra 50µm): as cel. polifenol. tem a mesma distribuição encontrada em *T. bicolor*. Uma diferença marcante de *T. speciosum* são suas cavidades de mucilagem (M) no mesofilo. **F** *T. microcarpum* (Barra = 50µm): setas indicam células polifenólicas. **G** *T. cacao* (Barra = 50µm): seta indica provável fusão de 3 a 4 células polifenólicas.

Tabela 1. Quantidade de polifenóis em base seca e desengordurada dos cotilédones de sete espécies de *Theobroma* (9 amostras)

Amostras	Polifenóis ^a (mg/g)
<i>T. subincanum</i> (G2)	55,2 ± 2,8
<i>T. obovatum</i> (G1)	51,0 ± 5,0
<i>T. grandiflorum</i> (G2)	42,7 ± 2,3
<i>T. microcarpum</i> (G2)	26,8 ± 1,1
<i>T. bicolor</i> (G2)	5,0 ± 1,2
<i>T. speciosum</i> (G1)	3,2 ± 0,5
<i>T. cacao</i> (G1)	82,7 ± 6,2
<i>T. cacao</i> (G2)	77,2 ± 6,0
<i>T. cacao</i> (G2)	132,7 ± 7,5

^a Valores: média ± desvio padrão. Os índices G1 e G2 referem-se a procedência, vide Material e Métodos.

Quando analisadas ao MEV as células polifenólicas demonstram melhor a citoarquitetura e suas relações vicinais com o citosol. Ocorre com frequência, que o conteúdo polifenólico apareça como um saco de 40µm em média de comprimento, ou como vesículas de 3 a 20 µm de diâmetro (medidas em *T. cacao*). Em ambos os casos, a estrutura polifenólica é revestida por evidente membrana (Figura 4) a qual se pode atribuir constituição pectínica semelhante à membrana que reveste as cavidades de mucilagem que ocorrem na testa de sementes de *Theobroma* ou no mesofilo de *T. speciosum* (Martini et al., 2003).

A tendência das células polifenólicas no mesofilo é constituírem fileiras ao formarem-se em direção à borda ou ao feixe vascular. Em *T. cacao*, dependendo do varietal e do grau de maturação, as células polifenólicas estão individualizadas (Figura 4C) mas é freqüente que associem-se em um só conteúdo. As correlações dos tecidos à fresco e ao MEV mostram que no tecido fresco as células ainda íntegras dissociam-se sob pequena pressão em *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. subincanum* e *T. obovatum*. Os tecidos cotiledonares apresentaram-se

coesos e continham muito amido em *T. microcarpum* e *T. speciosum*. As criofraturas dos cotilédones das cinco espécies acima demonstraram a mesma ligação frouxa entre as células (Figuras 4E e F).

Células polifenólicas, assim como outras do mesofilo, sintetizam mucilagem, embora com menor intensidade depois que se definiram como idioblastos. É aparente a evasão da mucilagem para o espaço intercelular. A Figura 4(E e F), demonstra que, em E, a mucilagem localizada na periferia da célula deixa os espaços entre a massa de reservas e a parede celular.

Células cotiledonares possuem poros de ligação intercelulares e tão freqüentes que confere aparência de peneira de aberturas circulares (leguminosas). Em *Theobroma*, nas cinco espécies com células de baixa coesão os septos indicam pela aparente plasticidade mucilagem extracelular (Figura 4 F).

No presente trabalho, sob MET, foi possível observar o desenvolvimento da célula polifenólica: a célula jovem, isto é, quando a área ocupada pelo vacúolo central é grande e as sínteses proteicas estão incipientes, aparecem diminutos corpos, aparentemente intraplastídeos contendo depósitos fenólicos (Figuras 5A e B).

A Figura 5C apresenta uma célula polifenólica de semente madura. Neste estágio, o depósito polifenólico ocupa todo o volume celular, como se demonstrou ao MO. Durante a preparação do tecido para estudo ao MEV e MET ocorre vesiculação e perda parcial do material polifenólico. As vesículas remanescentes permanecem junto à parede celular (Figuras 4B e 5C).

Quanto à organela que sintetiza o corpo fenólico, a tendência atual é considerá-lo oriundo do retículo endoplasmático. Entretanto Rühl & Biehl (1989) e Rühl & Dambroth (1989) mostram vários “corpos intraplastídios” com densidade e aspecto homogêneo idêntico ao que se apresenta na Figura 5B. Ocorre também um par de vesículas fenólicas rodeadas por evidente dupla membrana, sugerindo serem plastídios.

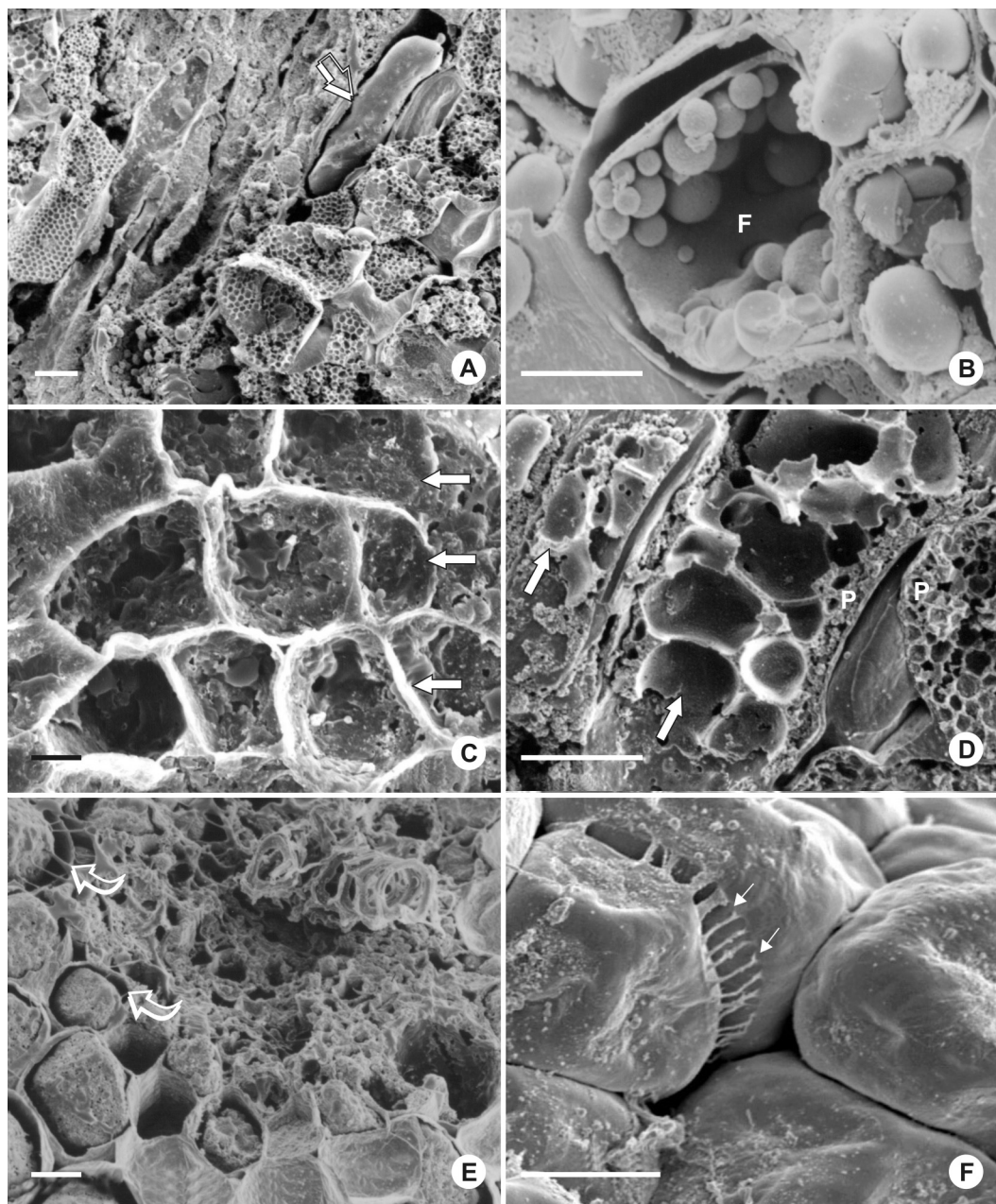


Figura 4. MEV: Célula polifenólica e sua inter-relação com mucilagem: **A** *T. cacao* (Barra = 10µm); seta aponta cel. polifenol, conteúdo unilocular. **B** *T. microcarpum* (Barra =10µm), a célula (F) apresenta conteúdo polifenol multivesicular. **C** *T. cacao* (Barra = 10µm) três fileiras de células polifenol. (↔) onde o conteúdo foi retirado; o interior da célula mostra camada protéica. **D** *T. cacao* (Barra = 10µm): duas cél. polifenol. vicinais exibem fragmentos vesiculosos de polifenóis (P). A proteína (P) tem aspecto rendado porque envolve glóbulos (ausentes) de gordura. **E** *T. bicolor* (Barra = 10µm) evidências de mucilagem que atravessam a parede celular. **F** *T. obovatum* (Barra = 10µm) septos elásticos (V) de ligação entre as células, os plasmodesmos estão evidenciados por setas. FotoD cortesia Lenci (2002)

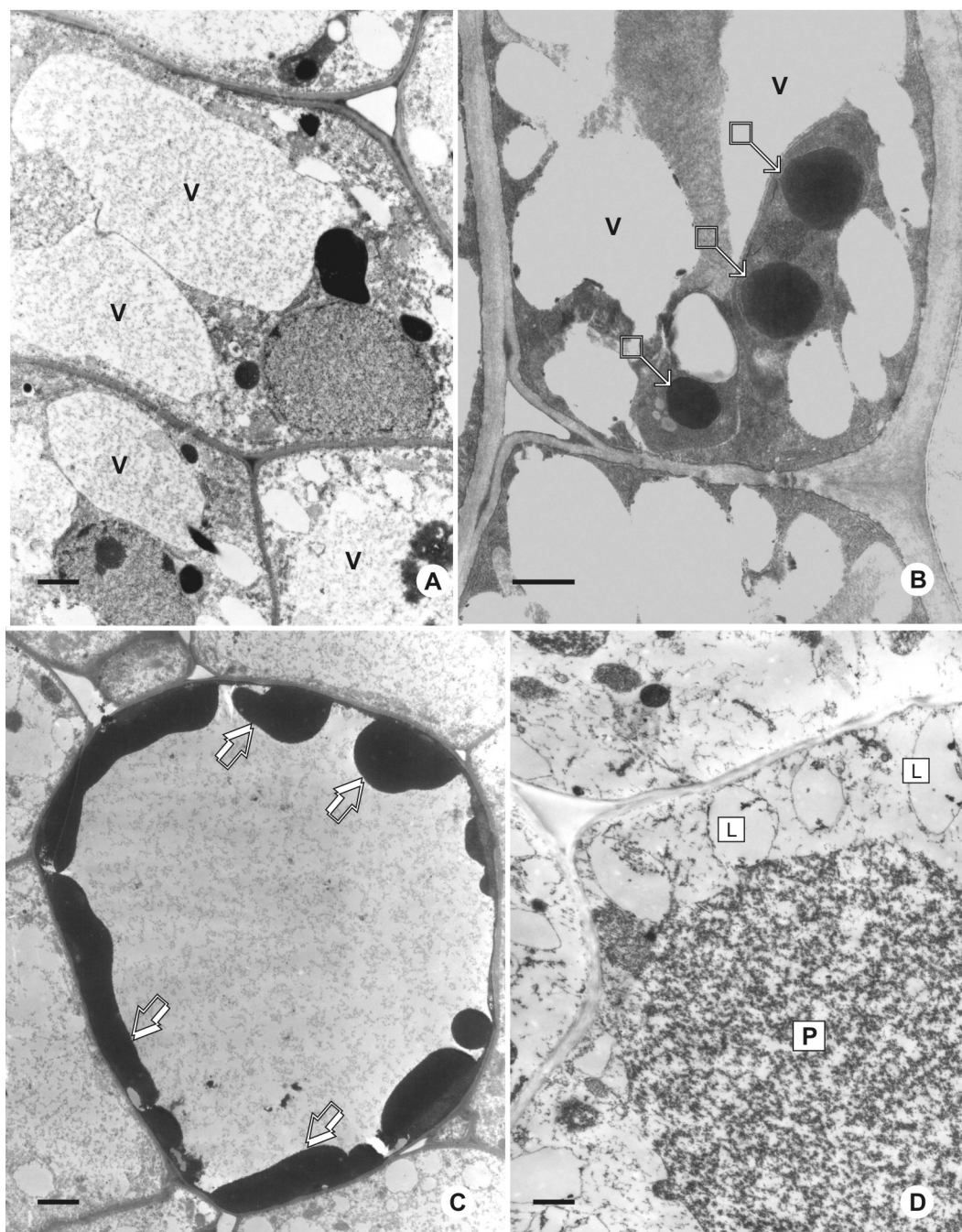


Figura 5. Corpos polifenólicos no mesofilo cotiledonar **A** *T. cacao* (Barra = 1 μ m) início de polifenólicos nos idioblastos do mesofilo e o característico vacúolo central (V) de célula jovem. **B** *T. subincanum* (Barra = 1 μ m): três “corpos intraplastídios” (□) com densidade e aspecto homogêneo. **C** *T. cacao* (Barra = 2 μ m) apresenta vesículas de polifenóis aderidas ao interior da parede celular (↗). **D** *T. speciosum* (Barra = 1 μ m): reservas características de mesofilo onde proteínas (P) predominam sobre as outras reservas; glóbulos lipídicos (L) estão na borda interna das células; prováveis oleosinas circundam estes glóbulos.

Na região do citosol encontra-se ainda o aparelho de Golgi, empenhado na produção de polissacarídeos acídicos com resíduos de galactose e rhamnose, ou mesmos glicosídeos da pectina e de polifenóis. A Figura 5D mostra uma célula onde não ocorrem polifenóis, o vacúolo central apresenta extensa reserva protéica à qual agregam-se os glóbulos lipídicos em suas bordas.

CONCLUSÃO

A quantidade de polifenóis (mg/g de sementes desengorduradas) variou dentro da mesma espécie, mas foi evidente que *T. cacao*, *T. obovatum*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum* destacaram-se pela quantidade de polifenóis em relação à *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. speciosum*.

Os idioblastos são detectáveis a fresco devido ao conteúdo hialino (*T. obovatum* e *T. subincanum*) ou por sua própria coloração (*T. cacao*). Ao MO foram demonstráveis as relações com os feixes vasculares. Ao MEV observou-se a existência de uma membrana envoltória que isola a secreção polifenólica na célula madura. Ao MET, em *T. cacao* demonstrou-se o desenvolvimento dos corpos polifenólicos. O aparecimento de corpos contendo polifenóis ocorre na célula ainda em desenvolvimento, ou seja quando os primeiros glóbulos lipídicos estão em formação. Sugere-se que a origem destes corpos fenólicos é intra-plastídeo. As células polifenólicas maduras revelaram, ao MEV, que seu citoplasma permanece organizado e portanto ativo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte técnico de YARA FAGNANI HONÓRIO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECHTEL, D.B. **New Frontiers in Food Microstructure**. St. Paul: AACC, 1983. 392p.

BIEHL, B.; PASSERN, U.; PASSERN, D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation., **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, p.41-52, 1977.

BRAVO, L. Poliphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, p.317-333, 1998.

GUTMANN, M. Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 179, p.277-281, 1995.

HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTIAS, M.; MEIRELLES, M. N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; SOARES, M. J.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, 179p.

HUTZLER, P.; FISCHBACH, R.; HELLER, W.; JUNGBLUT, T. P.; REUBER, S.; SCHMITZ, R.; VEIT, M.; WEISSENBOCK, G.; SCHNITZLER, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p.953-965, 1998.

JALAL, M. A. F.; COLLIN, H.A. Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. **Phytochemistry**, New York, v.116, p.1377-1380, 1977.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 523p. 1940.

KIM, H.; KEENEY, P.G. (-) – Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p.1090-1092, 1984.

KURAS, M.; WRONKA, M.; LYNCH, J. M.; ZOBEL, A. M. Cytochemical localization of phenolic compounds in columella cells of the root cap in seeds of *Brassica napus* – changes in the localization of phenolic compounds during germination. **Annals of Botany**, London, v. 84, p.135-143, 1999.

LENCI, C. G. **Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *Theobroma cacao*, *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum***. Campinas, 2002. 101 p.Tese (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MARIGO, G. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. **Analusis**, Paris, v. 2, p. 106-110, 1973.

MARTINI, M. H.; LENCI, C.G.; TAVARES, D. Q. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *theobroma speciosum*. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.65- 69, 2003. Disponível em: < <http://www.sbm.org.br/actar/html/trabalhos/12.pdf> >. Acesso em 23 jan. 2004.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M. E.**The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne Bradford House Pty. Ltd., 1981.352 p.

PORTER, L. J.; MA, Z.; CHAN, B.G. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, New York, v. 30, p.1657-1663, 1991

RÜHL, G.; BIEHL, B. Investigations in the causes of sensitivity to cold and water stress of tropical seeds, represented by cacao seeds. IV. Ultrastructure of the cotyledonary storage parenchyma cells of desiccating cacao seeds. **Landbauforschung Völkenrode**, Braunschweig, v. 39, p.15- 27, 1989.

RÜHL, G.; DAMBROTH, M. Investigations in the causes of sensitivity to cold and water stress of tropical seeds, represented by cacao seeds. III. Ultrastructure of the parenchyma cells in radicles of desiccating cacao seeds. **Landbauforschung Völkenrode**, Braunschweig, v. 39, p.1- 15, 1989.

SILVA, C. R.; FIGUEIRA, A.; VENTURIERI, G. A.; GILABERT-ESCRIVÁ, M. V.; GONÇALVES, L. A. G.; CARVALHO, M. T. V. Genetic relationships and phylogeny of *Theobroma*.(enviada para publicação)

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular & Molecular Biology**, Noisy Le Grand, v. 22, p.45-67, 1977.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, v.33, p.423- 447, 2000.

ZAPROMETOV, M. N. On the functional role of phenolic compounds in plants. **Soviet Plant Physiology**, New York, v. 39, p.802-809, 1992.

ZOBEL, M. A. Localization of phenolic compounds in tannin-secreting cells from *Sambucus racemosa* L. shoots. **Annals of Botany**, London, v. 57, p.801-810, 1986.

Mucilage Pockets in Cotyledon Tissue of *Theobroma Speciosum*

M. Helena Martini; Camila G. Lenci and Débora Q. Tavares

Laboratório de Microestrutura de Alimentos

Fac. Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Rua Monteiro Lobato, CxP 6121 Cep 13083-970 Campinas, SP, Brasil

Fone: (19) 3788-4082 Fax: (19) 3788-4060 - email: debora@fea.unicamp.br

Abstract

Theobroma speciosum belongs to the Oreanthes section. The main characteristic of the cotyledonary tissue of *T. speciosum* is the large number of dispersed mucilage pockets. The histochemistry and morphology of its cotyledon and mucilage pockets were studied. The intrinsic metabolism of acid polysaccharides of a pectic nature and protein is described already [17] to control mucilage synthesis in the cells, a common feature in the first steps of phenol synthesis. The morphology of the cells around the mucilage pockets was not disturbed. The sections of fresh cotyledonary tissue demonstrated loosely arranged cells and the gradual expansion of the mucilage took advantage of the spaces among the cells. There was no evidence of lysigenous activity.

Keywords: Theobroma, ultrastructure, mucilage, seed, morphology.

Few studies exist on the structural characterisation of seeds of the genus *Theobroma*, with the exception of cocoa, for which the morphological characteristics of the mature, germinated and fermented seeds have been described [2, 3; 14].

An analysis of the total proteins of the seeds, as well as of the fatty acid and triacylglycerol profiles, was effected for wild *Theobroma* species, including *T. speciosum*, which presented a fatty acid composition closest to that of cocoa [15].

T. speciosum, like other *Theobroma*, belongs to the order Malvales, and stands out amongst the dicotyledons for possessing mucilage cells or cavities, which are secretory elements [1]. Studies of the Malvaceae family have demonstrated the presence of mucilage cells, cavities or ducts in various structures of many species of these trees [13].

In *Theobroma cacao*, lysigenous cavities filled with mucilaginous substances occur in the roots, stem, flowers and leaves [5] but have not been described in the seeds.

Mucilage, a high molecular weight, water-soluble polysaccharide, containing more than 30,000 different sugars, is common in higher plants [12]. In most cases its physiological function is uncertain; it may serve as reserve substances or contribute to the moisture balance and/or resistance to drying out [8]. Pectin, an acidic polysaccharide, is the main component of mucilage [17].

The present study characterized the cotyledonary cells histochemically and studied the distribution of mucilage pockets within the cotyledonary tissue. An attempt was made to ascertain the origin of the pockets as either lysigenous activity or some other arrangement of the cells.

Introduction

Theobroma speciosum (cacaui) is one of the 22 species of the genus *Theobroma* and belongs to the section Oreanthes [7]. Its geographical distribution extends throughout regions of Brazil, Bolivia and Peru.

Studies of the phylogenetic relations between the sections of the genus *Theobroma* have shown great affinity between the species of the sections *Theobroma* (*T. cacao*) and Oreanthes (*T. speciosum* and *T. sylvestre*) [15].

Materials and Methods

The seeds of *T. speciosum* were obtained from fruits donated by CPATU-EMBRAPA, Belém/ Pará, Brazil, and CEPLAC-Marituba/Pará, Brazil.

Light microscopy

Approximately 2mm³ sections of cotyledon were fixed in 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde (V/V) with the addition of 3% sucrose in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 according to Souza [16]. The tissue was dehydrated in a series of graded ethanol solutions of increasing concentration and mounted in the historesin GMA (glycol-methacrylate). 2µm thick sections, were stained with Toluidine Blue at pH 8.0 and pH 4.0, Ruthenium Red (0.02%) and Periodic Acid-Schiff [9]. Naphthol Blue Black showed the proteinaceous nature of the cytosol [11]. The stained sections were examined under a JENVAL-ZEISS optical microscope.

Electron microscopy

Two types of preparation were performed. In the first preparation, for scanning electron microscopy (SEM), the cotyledon sections were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.3 (24h), post-fixed in 1% osmium tetroxide (24h) and dehydrated in ethyl alcohol solutions of increasing concentration, then submitted to an oil extraction step with acetone (2h) before drying in a CO₂ critical point apparatus. Coating with gold was effected in a sputter coater [16]. The microscopic observation was carried out with an acceleration of 10kV in a JEOL JSM – 5800 LV scanning electron microscope.

In the second preparation, for transmission electron microscopy (TEM), sections about 1mm³ of cotyledon were prepared as described by Souza [16]. The sections were fixed in 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde (V/V) with the addition of 3% sucrose in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2, post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in epoxy resin (EPON). Ultra-thin sections were cut and stained with 5% uranyl acetate and lead citrate, and examined with a LEO 906 transmission electron microscope.

Results and Discussion

Theobroma genus has compactly folded cotyledons where the leaf structure remains preserved. There are two kinds of secretory cells in the genus, the phenolic cell and the mucilage cell. *T. speciosum* displays phenolic cells along the vascular system as far as the terminal portion of its xylem and phloem (Figure 1).

The mucilage cells are ubiquitous throughout the cotyledon, but are not easily recognizable. When the

cotyledonary cells are mature, the starch has already been synthesized as has the oil reserve. Myriad lipid droplets cover the internal surface of the cotyledonary cells (Figure 1) and every one has starch granules (Figure 5). The remaining space is filled with cytosol, which shows a proteinaceous composition, being Naphthol Blue Black positive (Figure 2), as well as carbohydrate components that are faintly metachromatic under Toluidine Blue staining at pH 8.0.

The present authors agree with Bouchet *et al.* [4] about the metabolic evolution of cotyledonary cells. These cells have a first metabolic stage producing their reserves, starch and oil in this case. Secondly, some indistinct cells start to secrete mucilage inside the cytosol.

This secretion accumulates initially as vesicles, which are gradually pushed to the outside of the plasmatic membrane by exocytosis [17].



Figure 1. *Theobroma speciosum*, light microscopy. Toluidine Blue pH 8.0 staining. The phenolic cells (arrows) are surrounding a vascular system (V). M, mucilage pocket. (mag. X340).

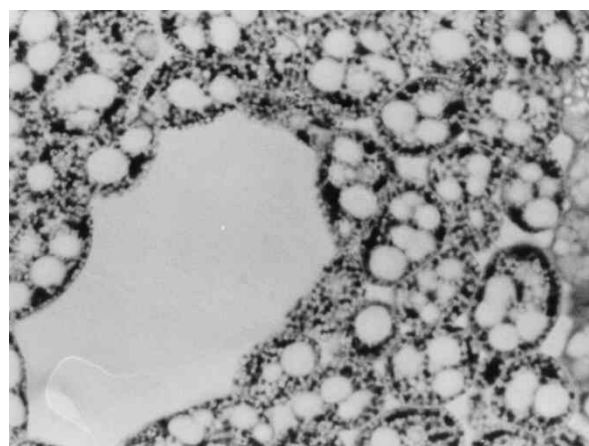


Figure 2. *Theobroma speciosum*. Light microscopy. Staining with Naphthol Blue Black to demonstrate proteins (mag. X540).

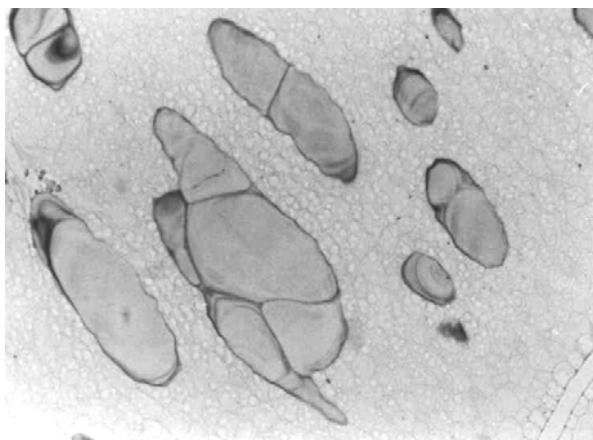


Figure 3 *Theobroma speciosum*. Light microscopy. Mucilage stained with Ruthenium Red (mag. X210).

Below the pectic-cellulosic wall, that is, still inside the cell, the mucilage continues absorbing more water and enlarges enormously, compressing the internal organelles of the cell until inhibiting their own cellular function. One peculiarity must be described: the cotyledonary cells are merely adjoining (Figure 4), leaving spaces between themselves. This becomes evident when the fresh tissue is cut and observed under the optical microscopy - the cells are easily detached under finger pressure and the mucilage escapes from the pockets and flows around the vicinal cells.

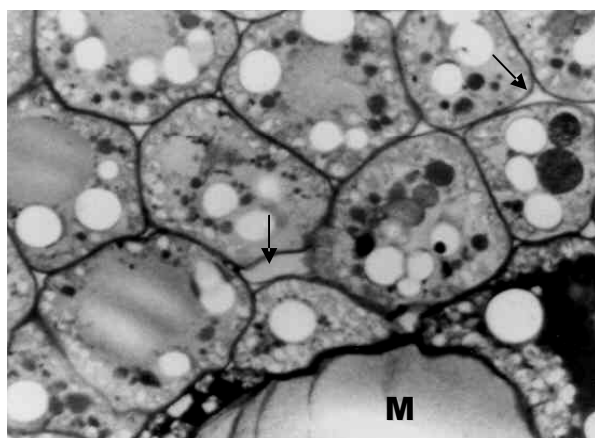


Figure 4. *Theobroma speciosum*. Light microscopy. These spaces (→) will be filled with mucilage. Stained with Toluidine Blue pH 8.0 . M, mucilage pocket (mag. X1500).

Fixation and staining conferred an aspect of undulating mass on the mucilage. Metachromasy was evident with Toluidine Blue, staining violet at pH 8.0 and pink at pH 4.0.

The mucilage showed affinity for the Ruthenium Red dye (Figure 3), confirming the presence of pectic substances [6; 9].

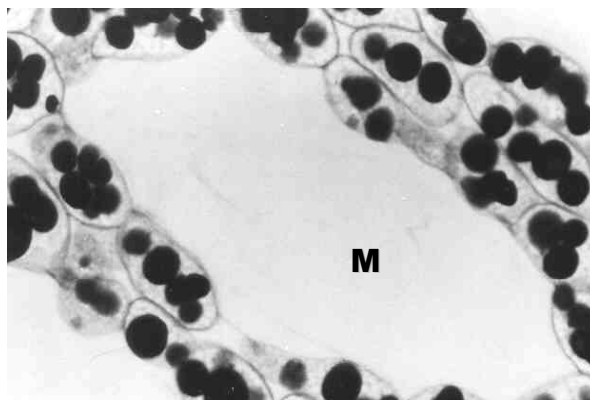


Figure 5. *Theobroma speciosum*. Light microscopy; PAS positive neutral polysaccharides: starch and cellulose. M, PAS-negative mucilage (mag. X540).

The mucilage showed no reaction under PAS (Figure 5); the positive reaction was evident for the starch grains after PAS treatment. The Figure 5 also demonstrates that the vicinal cells to mucilage pocket are not compressed.

Transmission electron microscopy (TEM) showed empty oil vesicles (Figure 6). The present authors could not confirm the existence of membrane vesicles, and record that the lack of oleosins in oil bodies of *T. cocoa* is well accepted [10]. With respect to the cytosol, its proteins are dispersed due to mucilage synthesis. Figure 7 shows more than five dense protein bodies displaying heterogeneous electron density.

Figure 8 under scanning electron microscopy, shows two empty pockets of mucilage. This figure also reveals the spaces between the tissue cells. The cotyledon cells are exposed by the partial absence of the epidermis layer and demonstrate that they are only pushed together, without the characteristic continuity of a tissue. This arrangement of the cotyledon cells probably allows for the expansion of the mucilage pockets.

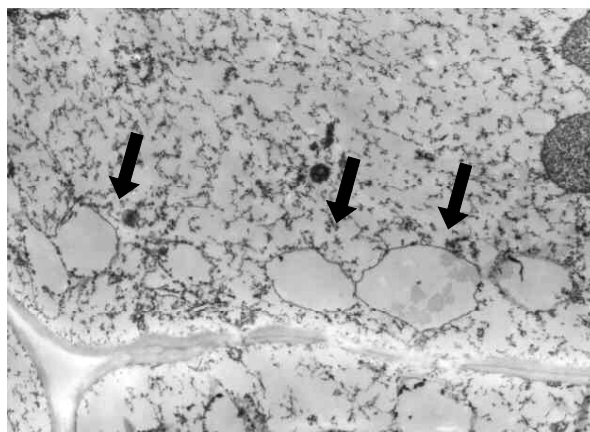


Figure 6. *Theobroma speciosum*. Transmission electron microscopy. Oil bodies (arrows) near the cell surface (mag. X9600).

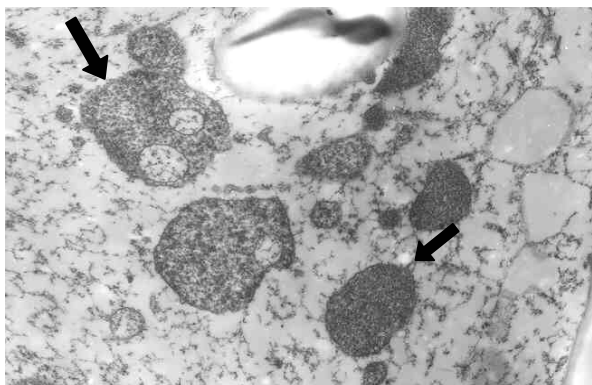


Figure 7. *Theobroma speciosum*. Transmission electron microscopy. The protein bodies (arrows) display heterogeneous electron density and shapes. (mag. X11600).

Figure 9 shows a large, almost intact mucilage pocket; the fibrils around the pocket are mucilaginous fibrils released during the preparation of the sample. The fibrillar nature of the mucilage was already apparent inside its pocket and after being released under light microscopy. Actually, in this figure a viscous and perhaps resilient external membrane was formed.

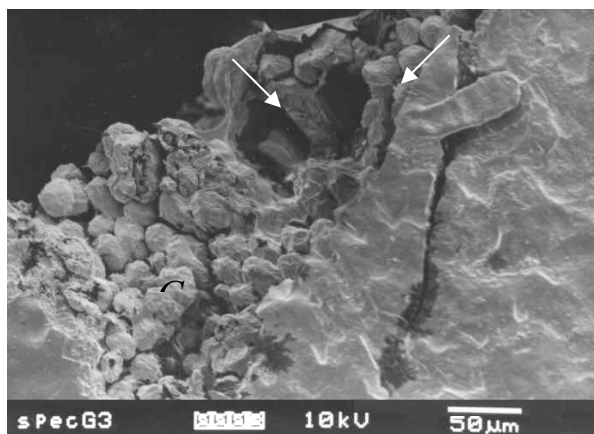


Figure 8. *Theobroma speciosum*. Scanning electron microscopy of the cotyledon of *T. speciosum* showing two empty mucilaginous spaces (arrows). 10kV. C, cotyledonary cells.

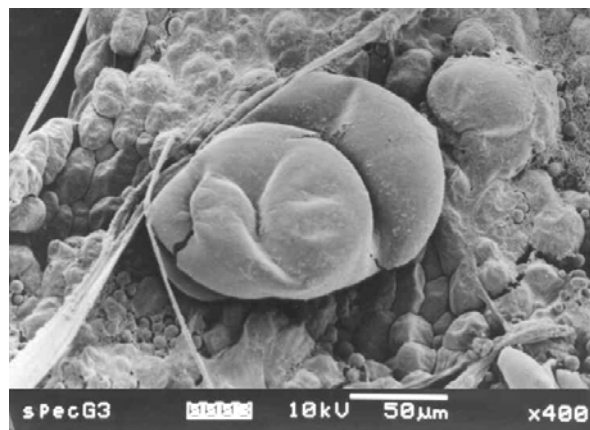


Figure 9. *Theobroma speciosum*. Scanning electron microscopy. Mucilage pocket between cotyledon parenchyma cells. 10kV.

Conclusions

Mucilage cells of *Theobroma speciosum* are very abundant within the mass of cotyledon tissue. After a period of oil and starch production, the cells increase the secretion of acidic polysaccharides, which are metachromatic to Toluidine Blue. Furthermore, the pectic constitution was proven by Ruthenium Red staining. About 10% of the cotyledon will be occupied by mucilage pockets reaching dimensions, greater than 200 x 100 μm, without disruption of the tissue. The phenolic cells, which are secretory cells, are in closed association with the vascular system.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. A. Figueira, who stimulated this project, and for the technical collaboration of Mrs. Yara Honório Fagnani.

References

1. BAAS, P. & GREGORY, M. (1985) A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. *Israel Journal of Botany*. 34:167- 186.
2. BIEHL, B., PASSERN, U., PASSERN, D. (1977) Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *J. Sci. Fd. Agric.* 28:41- 52.
3. BIEHL, B., PASSERN, D. (1982) Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *J. Sci. Fd. Agric.* 33:1291-1304.

4. BOUCHET, P. & DEYSSON, G. (1976) La sécrétion du mucilage chez les végétaux supérieurs: aspects morphologiques et ultrastructuraux. Soc. Bot. Fr., Coll. Sécrét. Végét. 133-145.
5. BROOKS, E.R. & GUARD, A.T. (1952) *apud* FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BeMILLER, J.N. (1994) Partial characterization of cacao pod and stem gums. Carbohydrate Polymers. 24:133- 138.
6. CONN'S, H. J. (1990) Biological Stains. Sigma Chemical Company, St. Louis, 692p.
7. CUATRECASAS, J. (1964) Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus Theobroma. Contribution from the United States National Herbarium. 35:379-614.
8. DISTELBARTH, H.; KULL, U. (1985) Physiological investigations of leaf mucilages II. The mucilage of *Taxus baccata* L. and of *Thuja occidentalis* L. Israel Journal of Botany. 34:113- 128.
9. GAHAN, P.B. (1984) Plant Histochemistry and Cytochemistry - An Introduction. Academic Press, London, 301p.
10. LEPRINCE, O., VAN AELST, A. C., PRITCHARD, H. W., MURPHY, D. J. (1998) Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds. Planta. 204:109-119.
11. LING-LEE, M.; CHILVERS, G. A.; ASHFORD, A. E. (1977) A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* deane and maiden. New Phytol. 78:313- 328.
12. MacGARVIE & PAROLIS (1981) *apud* MEDINA-TORRES, L.; BRITO- DE LA FUENTE, E.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; KATTHAIN, R. (2000) Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). Food Hydrocolloids. 14:417-424.
13. METCALFE, C. R. & CHALK, L. (1965) *apud* BAKKER, M. E. & GERRITSEN, A. F. (1992) The development of mucilage cells in *Hibiscus schizopetalus*. Acta Bot. Neerl. 41:31 – 42.
14. RUHL, G.; BIEHL, B. (1989) Untersuchungen zu den Ursachen der - und trocknungsempfindlichkeit tropischer samen am beispiel des kakao. IV. Ultrastruktur des speicherparenchyms der kotyledonen trocknender kakaosamen. Landbauforschung Volkenrode. 39:15- 27.
15. SILVA, C.R.S. (1999) Relações Genéticas e Filogenia em *Theobroma*. Monografia, Mestrado em Ciências. Piracicaba, USP, 17p.
16. SOUZA, W. (1998) Manual Sobre Técnicas Básicas Em Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, 179p.(Cap.I, V).
17. WESTERN, T.L.; SKINNER, D.J.; HAUGHN, G.W. (2000) Differentiation of mucilage secretory cells of the Arabidopsis seed coat. Plant Physiology. 122:345-355.

CONCLUSÃO GERAL

As células do mesofilo cotiledonar de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. bicolor* apresentam semelhanças morfológicas entre si assim como *T. cacao*, o representante do gênero. A distribuição das reservas no mesofilo aproximam *T. grandiflorum* à *T. subincanum*.

A maior quantidade de proteínas está em *T. bicolor*, entretanto esta espécie exibe menor quantidade de lipídeos e de células polifenólicas, as quais estão presentes apenas associadas ao sistema vascular. Não obstante tais diferenças em relação às reservas, o seu mesofilo é semelhante à *T. cacao*.

A quantidade de polifenóis é um elemento distintivo na aparência macroscópica das sementes. Não há indícios no mesofilo cotiledonar que possam indicar linha evolutiva entre as quatro espécies estudadas.

A quantidade de polifenóis (mg/g de sementes) variou dentro de uma mesma espécie; é evidente porém que *T. cacao*, *T. obovatum*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum* destacam-se pela maior quantidade de polifenóis em relação à *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. speciosum*.

Os idioblastos são detectáveis a fresco devido ao conteúdo hialino (*T. obovatum* e *T. subincanum*) ou pela coloração (*T. cacao*). Ao MO são demonstráveis as relações com o sistema vascular e ao MEV demonstrou-se a existência de uma membrana envoltória que isola a secreção polifenólica na célula madura. Ao MET, em *T. cacao* demonstrou-se o desenvolvimento dos

corpos polifenólicos. As células polifenólicas maduras revelaram ao MEV que seu citoplasma permanece organizado, e portanto ativo.

As células de mucilagem de *Theobroma speciosum* são abundantes no tecido cotiledonar. Após a fase inicial de síntese de lipídeos e amido prevalecerão as sínteses de polissacarídeos acídicos metacromáticos ao Azul de Toluidina, cuja constituição péctica é atestada pelo Ruthenium Red. Cerca de 10% destas células alcançam grandes dimensões (200 x 100µm), sem rompimento do tecido. As células polifenólicas apresentam as mesmas características histoquímicas mas sua estreita associação com a rede vascular direciona seu desenvolvimento para a síntese de fenóis.