



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**Caracterização Estrutural e Química do Tecido de
Reserva das Sementes de *Theobroma cacao*,
Theobroma obovatum e *Theobroma microcarpum***

Candidata: Camila Gonçalves Lenci

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

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Camila Gonçalves Lenci**, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de outubro de 2002.

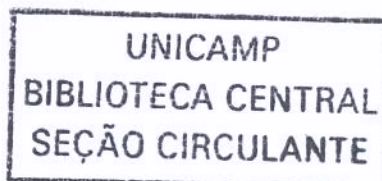
Campinas, 22 de Outubro de 2002.


Prof. Dra. Débora de Queiroz Tavares
Presidente da Banca

Campinas, 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Tese apresentada ao Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP L542c
V	EX
TOMBO BC/	51913
PROC.	16-837-02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00176268-9

BIBID.-275744

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

L545c Lenci, Camila Gonçalves
Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *Theobroma cacao*, *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum* / Camila Gonçalves Lenci. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

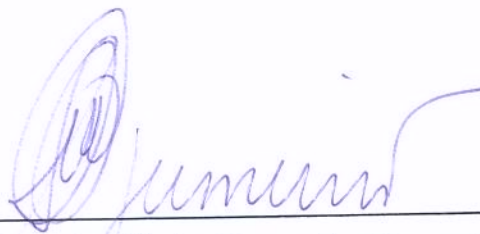
Orientador: Débora de Queiroz Tavares
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

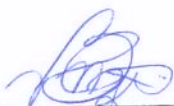
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Débora de Queiroz Tavares
Orientadora



Profª Drª. Sandra Maria Carmello Guerreiro
Deptº. Botânica / IB / UNICAMP



Drª. Cristiana de Noronha Begnami

Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia
DTA / FEA / UNICAMP

110258650

“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”

Cora Coralina

“Errei porque não basta mostrar as belezas do mar.
É preciso também agir e lutar para que essas belezas
não sejam destruídas”

Jacques Yves Cousteau

AGRADECIMENTOS

São tantos...e muitas pessoas que quero agradecer eu não saberia enquadrar em um único adjetivo, portanto tentem vocês mesmos:

Aos familiares..... sempre ouvi dizer que parente a gente não pode escolher, pensando nisso me considero uma pessoa de sorte. É sério!

Aos amigos..... acho que não é preciso agradecer o que vocês me fizeram de coração, em todo caso, obrigada por proporcionarem tantos bons momentos!

Aos mestres..... sei que não estão aqui por acaso, ensinar não é uma técnica, mas sim uma arte!

Aos colegas..... quem são? Ora, todos aqueles que de alguma maneira colaboraram com a realização deste trabalho. Não saberia listar todos os nomes.

Agradeço especialmente...

A Deus, por ter me concedido viver tudo isso. Pai e mãe pelo suporte que nunca faltou. Fábio Luiz por me fazer acreditar e pelos passeios de fim de semana, essenciais à minha saúde física e mental. Aos meus irmãos pelos bons exemplos, em especial à Dani que me ajudou no pontapé inicial e acessória em estatística (espero ter sido uma boa aluna). À Débora por ter aceitado o desafio de me orientar e pelos almoços seguidos de bolo de chocolate. À Maria Helena pela paciência inesgotável, incentivo,, amizade e companhia em todos os trabalhos. À Lília por todas as vezes que me cedeu o micro mesmo sem uma boa razão, pelas risadas, pelas opiniões, sugestões e dúvidas de onde almoçar (e também por não ter seguido à risca as recomendações da Nutrição). A Fernanda pelas viagens virtuais que proporcionou e pelas decisões rápidas quanto aos restaurantes. A Yara por me agüentar falando o tempo todo (não só ela), pela organização do laboratório e suporte técnico. A Suzana pelos momentos de descontração e pela eficiente acessória em assuntos extra-oficiais. A Cristiana e Sandra pela colaboração e atenção, sempre que precisei. À Ceplac por ter fornecido os frutos e ao A.Figueira por ter apresentado-nos ao mundo dos teobromas. Ao CNPq por ter concedido a bolsa de mestrado e a FAEP por ter financiado a compra do micro, ferramentas indispensáveis. À UNICAMP pela oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O Gênero <i>Theobroma</i>	3
2.2. <i>Theobroma cacao</i>	4
2.3. Distribuição Geográfica das Espécies	5
2.4. Comportamento Recalcitrante	6
2.5. Compostos de Reserva	7
2.5.1. Carboidratos.....	7
2.5.2. Proteínas	8
2.5.3. Lipídeos	11
2.5.4. Polifenóis	14
2.5.5. Alcalóides	15
2.6. Relação entre Compostos de Reserva e Chocolateiração	16
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Material Vegetal.....	21
4.2. Métodos	22
4.2.1. Microscopia Óptica	22
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão	24

4.2.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura	24
4.2.4.	Composição Química das Sementes	25
4.2.5.	Análise de Imagem	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1.	Características macroscópicas das sementes	29
5.2.	Análises da Composição Química das Sementes	32
5.3.	Citoquímica	34
5.3.1.	Azul de Toluidina em pH8,0 e pH4,0.....	34
5.3.2.	Polissacarídeos.....	36
5.3.3.	Lipídeos	36
5.3.4.	Proteínas	37
5.4.	Histologia do Cotilédone	39
5.4.1.	Epiderme	39
5.4.2.	Mesofilo	40
5.5.	Microscopia eletrônica	41
5.6.	Resultados da Análise de Imagem.....	84
6.	CONCLUSÕES	87
6.1.	<i>Theobroma cacao</i> L.	87
6.2.	<i>Theobroma obovatum</i>	88
6.3.	<i>Theobroma microcarpum</i>	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO 1		99
ANEXO 2		101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos das sementes de teobromas.	14
Tabela 2: Tamanho e peso médio de sementes íntegras das três espécies.	32
Tabela 3: Dados da composição química das sementes maduras.	33
Tabela 4: Percentual de fenóis totais em base seca e desengordurada.....	33
Tabela 5: Resultados da análise de imagem.	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representando os diferentes tipos de corpos protéicos presentes em tecidos de estoque.....	11
Figura 2. Frutos de teobromas maduros.....	30
Figura 3. Sementes maduras inteiras, sem testa e em corte longitudinal.....	31
Figura 4. Constituição estrutural dos cotilédones de <i>T. obovatum</i>	44
Figura 5. Cotilédone de <i>Theobroma cacao</i> corado pelo Naphthol Blue Black (NBB).	46
Figura 6. Cotilédone de <i>Theobroma obovatum</i> corado pelo NBB.	48
Figura 7. Cotilédone de <i>Theobroma microcarpum</i> , corado pelo NBB.	50
Figura 8. Reação do tecido cotiledonar ao Azul de Toluidina pH4,0.....	52
Figura 9. Ocorrência do amido nas três espécies, evidenciado pelo PAS.	54
Figura 10. <i>T. microcarpum</i> e <i>T. cacao</i> corado pelo Azul de Toluidina.	56
Figura 11. Fluorescência do lipídeo (Nile Red).	58
Figura 12. Presença de inclusões não protéicas.	60
Figura 13. Distribuição típica do amido em <i>T. microcarpum</i>	62
Figura 14. Cotilédones de <i>T. cacao</i> sob luz polarizada mostrando a birrefringência do amido e inclusões.....	64
Figura 15. Cotilédones de <i>T. obovatum</i> sob luz polarizada mostrando a birrefringência do amido e inclusões.	66
Figura 16. <i>T. cacao</i> , MEV (2700x).	68
Figura 17. <i>T. cacao</i> , MEV (2000x).....	68
Figura 18. <i>T. cacao</i> , MEV (7000x).....	68
Figura 19. <i>T. obovatum</i> , MEV (2700x).....	70
Figura 20. <i>T. obovatum</i> , MEV (3300x).....	70
Figura 21. <i>T. microcarpum</i> , MEV (1200x).....	72
Figura 22. <i>T. microcarpum</i> , MEV (3500x).....	72
Figura 23. <i>T. microcarpum</i> , MEV (1900x).....	74
Figura 24. <i>T. microcarpum</i> , MEV (8000x).....	74

Figura 25. <i>T. cacao</i> em estágio de maturação incompleta, MET (3500x).....	76
Figura 26. <i>T. obovatum</i> , MET (3500x).....	78
Figura 27. <i>T. obovatum</i> , MET (4500x).....	78
Figura 28. <i>T. obovatum</i> , MET (9600x).....	80
Figura 29. <i>T. obovatum</i> , MET (12400x).....	80
Figura 30. <i>T. obovatum</i> . (26700x).....	82
Figura 31. <i>T. microcarpum</i> , MET (9000x).	82

LISTA DE SIGLAS

A	amido
AT	Azul de Toluidina
DAP	dias após a polinização
E	epiderme
F	polifenóis
Fn	célula fenólica
FV	feixes vasculares
L	glóbulos lipídicos
MET	microscopia de transmissão
MEV	microscopia de varredura
MO	microscopia óptica
Mp	matriz protéica
NBB	Naphthol Blue Black
p	vacúolos protéicos
PAS	Periodic Acid Schiff
PB	corpo protéico
Pc	parênquima cotiledonar
PSV	vacúolo de estoque de proteína
RE	retículo endoplasmático
REL	retículo endoplasmático liso
RER	retículo endoplasmático rugoso
TAG	triacilglicerol
V	vacúolo

Recentemente, as espécies selvagens de *Theobroma* despertaram o interesse de pesquisadores da área da biotecnologia, como possíveis bancos de recursos genéticos úteis ao melhoramento do cacau (*Theobroma cacao*) como planta e como matéria prima do chocolate. Atributos como composição lipídica, perfil protéico, teor de polifenóis e resposta a chocolatzização, vêm sendo avaliados para as sementes das espécies selvagens. O objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento das espécies de *Theobroma* selvagens através da avaliação da morfologia e ultraestrutura do tecido cotiledonar e da composição química das sementes maduras de *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum* comparativamente ao *Theobroma cacao*. O material fixado foi incluído em resina GMA para os métodos de análise histoquímica, e incluído em resina Epóxi para a observação da ultraestrutura em microscópio eletrônico de transmissão. As sementes maduras foram submetidas ainda às técnicas de microscopia eletrônica de varredura e aos métodos bioquímicos para a determinação da composição química. Demonstrou-se a semelhança entre *T. obovatum* e *T. cacao* bem como a diversidade existente no gênero ao compará-los ao *T. microcarpum*. Em *T. obovatum*, pode-se notar o mesmo padrão de acúmulo de componentes de reserva e morfologia do tecido cotiledonar observado em *T. cacao*, os vacúolos de proteína ocupam a porção central da célula de reserva ou estão comprimidos entre os glóbulos lipídicos. Em *T. microcarpum* os vacúolos protéicos ocupam os espaços remanescentes em meio aos grandes grãos de amido. Entre as três espécies de *Theobroma* estudadas *T. cacao* é a espécie que tem a maior expressão de células fenólicas, seguida por *T. obovatum*; essas células geralmente acompanham os vasos condutores ou estão dispersas pelo parênquima cotiledonar, agrupadas ou não. A composição química das sementes de *T. obovatum* ($\cong 60\%$ de lipídeos, 25% de proteínas, 10% de carboidratos e 5% de fenóis totais) aproxima-se dos valores encontrados em *T. cacao* ($\cong 49\%$ de lipídeos, 27% de proteínas, 18% de carboidratos e 8% de fenóis totais) e ambos são bastante diferentes dos valores encontrados em sementes de *T. microcarpum* ($\cong 6\%$ de lipídeos, 13% de proteínas, 75% de carboidratos e $2,7\%$ de fenóis totais) nas quais o amido é o principal componente de reserva.

Lately, the wild *Theobroma* species have called attention of the biotechnology field researchers, as a possible bank of useful genetic resources to the improvement of cocoa (*Theobroma cacao*) as a plant and raw material for chocolate. Attributes such as lipid composition, protein profile, polyphenol content and response to the chocolate process have been searched in seeds of the wild species. The aim of this study was to contribute to the knowledge of the wild *Theobroma* species. The cotyledonary tissue's morphology and ultrastructure and the chemical composition of *Theobroma obovatum*'s and *Theobroma microcarpum*'s mature seeds were investigated and compared to *T. cacao*. The fixed material was included in resin GMA for the histochemistry methods and included in Epoxi resin for transmission electron microscopy (TEM). The mature seeds were also submitted to the scanning electron microscopy (SEM) techniques and chemical composition analysis. We could observe a clear similarity between *T. obovatum* and *T. cacao* as well as the diversity in the genus when compared to *T. microcarpum*. It can be noticed in *T. obovatum* the same pattern of storage compounds' accumulation and cotyledonary tissue's morphology observed in *T. cacao*, the protein storage vacuoles (PSVs) occupy the central portion of the cell or they are squeezed between the lipid bodies. In *T. microcarpum* the PSVs occupy the spaces among the large starch grains. Concerning these species, *T. cacao* has the major phenolic cell expression, followed by *T. obovatum*. The phenolic cells usually come along with the vascular bundle or can be dispersed through the parenchyma, as gathered or isolated cells. The chemical composition of *T. obovatum* seeds ($\cong$ 60% of lipids, 25% of proteins, 10% of carbohydrates and 5% of total phenols) approaches to the values found in *T. cacao* seeds ($\cong$ 49% of lipids, 27% of proteins, 18% of carbohydrates and 8% of total phenols) and both of them are different from the values found in *T. microcarpum* seeds ($\cong$ 6% of lipids, 13% of proteins, 75% of carbohydrates and 2.7% of total phenols) which accumulate starch as the main storage compound.

1. INTRODUÇÃO

A semente do cacau (*Theobroma cacao*) é amplamente conhecida quanto as suas características como matéria-prima do chocolate. Nos últimos anos, vários estudos contribuíram para esclarecer as vias bioquímicas de formação do sabor (Biehl et al., 1993; Voigt et al., 1994; Bytof et al., 1995; Voigt & Biehl, 1995; Amin & Jamilah, 1997), bem como as características físico-químicas da gordura que conferem à manteiga de cacau propriedades únicas de solidificação e fusão (Berbert, 1981; Chaiseri et al., 1989; Hernandez et al., 1991; Carpenter et al., 1994). Com o avanço da biotecnologia cresceu o interesse por espécies geneticamente próximas do cacau, que possam oferecer caracteres desejáveis ao melhoramento do cacaueiro, tanto em produtividade (p.ex: abscisão natural de frutos, resistência a pragas), quanto a melhorias relativas ao perfil protéico e lipídico e quaisquer outros traços da amêndoa que favoreçam sua chocolateização. Alguns trabalhos de hibridação realizados no passado por Addison e Tavares (1951) confirmaram a possibilidade de cruzamento entre as espécies de *Theobroma* e descreveram algumas relações de afinidade. Vale ressaltar que grande parte das espécies selvagens está restrita a campos de estudo e constituem poucas unidades; representam, portanto, amostras de populações sob possível risco de perda. São mais freqüentes os estudos da estrutura e ultraestrutura de *T. cacao* sobre o tecido cotiledonar de sementes fermentadas (Biehl et al., 1977, 1982a). À exceção de *T. grandiflorum*, não foram encontrados trabalhos desse caráter relacionado às espécies nativas e não comerciais (por nós consideradas selvagens).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Gênero *Theobroma*

O gênero *Theobroma* pertencente à família Sterculiaceae (Ordem Malvales) tem relevância econômica devido à importância do cacaueiro (*T. cacao*). Este gênero compreende 22 espécies de origem neotropical divididas em 6 seções. Todas as espécies produzem frutos comestíveis, porém, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. angustifolium* e *T. cacao* são as únicas espécies cultivadas, sendo o *T. cacao* cultivado em larga escala (Silva, 2000).

Cuatrecasas (1964) definiu as relações filogenéticas do gênero *Theobroma* pelo método clássico da morfologia comparada, baseando-se em caracteres vegetativos relevantes e estrutura do fruto. As seções *Rhytidocarpus* (*T. bicolor*), *Oreanthes* (*T. speciosum*, *T. sylvestre*, entre outras) e *Theobroma* (*T. cacao*) são consideradas as mais evoluídas. Por outro lado, as espécies da seção *Glossopetalum* (entre elas: *T. obovatum* e *T. grandiflorum*) são morfologicamente consideradas as mais antigas do gênero. As seções *Theobroma* e *Telmatocarpus* (*T. microcarpum*, *T. gileri*) evoluíram paralelamente, como inferido a partir da morfologia das folhas. A seção *Telmatocarpus* pode ser considerada mais avançada em outra direção, considerando o sistema vascular do pericarpo (Cuatrecasas, 1964 apud Silva et al., 2001).

As sementes de *Theobroma* são classificadas como dicotiledônea, formadas por dois cotilédones foliáceos, dobrados em torno do eixo hipocótilo-radicular e envoltos por testa e tégmen (Barroso et al., 1999; Corner, 1976). Todas as espécies do gênero apresentam cotilédones claros à exceção de *T. cacao* que pode apresentar cotilédones de coloração castanha à violeta, de acordo com o varietal (Silva et al., 2001). Corner (1976) apresenta a descrição das sementes de dicotiledôneas por

famílias, as informações quanto ao gênero *Theobroma* limitam-se na descrição da espécie *Theobroma cacao* e são apresentadas a seguir:

Sementes com 15 a 30 mm de comprimento, cor variando de marrom avermelhada a marrom escuro; o envoltório da semente é formado por testa espessa e tégmen muito mais fino que a testa. O endosperma está reduzido a uma única camada de células ao redor do embrião. A coloração do embrião varia entre os tons chocolate e violeta. Os cotilédones são espessos, dobrados e com superfície pilosa.

Segundo o autor, a descrição das sementes de *Theobroma* ainda é insatisfatória e a família tem muito a ensinar a respeito da evolução de frutos e sementes; há muita variação genética a ser investigada.

2.2. *Theobroma cacao*

O cacaueiro começa a florir a partir do 3º ano e atinge pleno desenvolvimento por volta do 10º ano de vida (Vasconcelos, 1999). Apenas cerca de 1% de suas flores são polinizadas por pequenos insetos (moscas) e evoluem para frutos (Beckett, 1994).

O fruto do *Theobroma cacao* é classificado como bacóide e origina-se do desenvolvimento de um gineceu formado por 5 carpelos, com 5 lóculos dispostos radialmente; cada lóculo comporta vários óvulos distribuídos em duas séries, em placentas auxiliares (Barroso et al., 1999).

O processo de maturação dos frutos estende-se por 5 a 6 meses; o ponto ideal de maturação pode ser avaliado pela coloração da casca, que muda durante o desenvolvimento e é dependente da variedade. O fruto do cacaueiro tem casca grossa correspondendo à aproximadamente 80% do seu peso. No interior de um fruto maduro encontram-se entre 30 e 50 sementes imersas em polpa mucilaginosa (Vasconcelos, 1999).

O *cacau* é classificado em 3 tipos ou variedades: Criolo, Forasteiro e Trinitário. O cacau Criolo tem cotilédones brancos (sem pigmentação), é o tipo originalmente cultivado e costuma ser considerado de qualidade superior, por possuir um sabor menos adstringente. Entretanto, sua árvore é menos vigorosa que a do tipo Forasteiro, sendo, portanto, mais vulnerável a algumas doenças (Beckett, 1994). O tipo Forasteiro, por ser uma variedade mais produtiva e mais resistente a pragas e enfermidades, representa a maioria do cacau de consumo no mundo atual. Seus cotilédones caracterizam-se por uma coloração violeta, e seu produto possui sabor mais amargo e adstringente que as outras variedades (Vasconcelos, 1999).

A origem da variedade Trinitário é atribuída ao resultado da hibridização entre os outros dois tipos. Porém, evidências bioquímicas recentes, sugerem que o cacau Trinitário seja mais próximo do cacau Criolo (Vasconcelos, 1999).

2.3. Distribuição Geográfica das Espécies

Segundo Silva et al. (2001), o conhecimento da origem e dispersão das espécies de *Theobroma* é baseado em levantamentos de herbário e relatos de expedições. O *T. cacao* estende-se das florestas tropicais da Bacia Amazônica até o sul do México. O *T. obovatum* pode ser encontrado por toda a parte ocidental da bacia do rio Amazonas, em terras elevadas e úmidas. No Brasil o *T. obovatum* encontra-se na metade ocidental da Amazônia, a partir da região de Tefé no Amazonas e do Rio Jaú. No Peru, a espécie pode ser encontrada até as partes mais baixas dos rios Huallaga, Ucayali, Itaya e Putamayo. O *T. microcarpum* ocorre na região meridional e ocidental brasileira do alto Amazonas, nos rios Solimões, Yapurá, Purus, Madeira, Tapajós e no rio Caquetá na Colômbia Ocidental.

2.4. Comportamento Recalcitrante

Grande parte das espécies de clima temperado apresenta o comportamento denominado ortodoxo, isto é, refere-se às sementes cuja viabilidade aumenta à medida que a temperatura e umidade de armazenamento decrescem (Neves, 1994). Espécies que produzem sementes sensíveis ao dessecação são chamadas recalcitrantes; o grau de sensibilidade varia com a maturidade fisiológica da semente (Chandel et al., 1995).

A viabilidade da semente recalcitrante é assegurada enquanto for alto o teor de umidade. A semente ortodoxa é liberada da planta-mãe quando a redução de umidade atinge 20%. As sementes recalcitrantes, ao contrário, não sofrem secagem natural na planta-matriz e são liberadas com conteúdo de água elevado. Ocorre, portanto, que na semente recalcitrante a fase de dormência está anulada e sua germinação será muito rápida (Neves, 1994). Espécies altamente recalcitrantes, como *T. cacao*, são ademais, muito sensíveis ao frio e são danificadas com temperaturas logo abaixo da temperatura ambiente (King & Roberts, 1982; Mumford & Brett, 1982).

Alguns autores consideram que o comportamento recalcitrante não é um fenômeno absoluto. Existiria um gradiente contínuo do comportamento das sementes em relação à perda de água, abrangendo desde a forte tolerância à dessecação até a extrema sensibilidade a perda de umidade (Normah et al., 1997; Farrant et al., 1997).

Em resumo, as sementes de *T. cacao* não passam por desidratação e tampouco exibem dormência ao atingirem a maturidade; germinarão imediatamente se as condições ambientais forem favoráveis. Quando a germinação não ocorre, a viabilidade da semente é muito curta. Ao estudar a relação entre o conteúdo de umidade (base fresca) e a viabilidade das sementes de *T. cacao*, Mumford e Brett (1982) encontraram um nível crítico de dessecação entre 17 e 20% de umidade, ocorrendo então a redução na viabilidade.

2.5. Compostos de Reserva

Carboidratos, proteínas e lipídeos são as principais substâncias de reserva e na ausência de endosperma, serão depositados nas células do parênquima cotiledonar (Esau, 1977).

Biehl et al.(1977) descreveram dois tipos celulares compondo o mesofilo cotiledonar das sementes de *T. cacao*: células de estoque de proteína e lipídeo em maior número, e células de polifenóis dispersas entre as anteriores.

Cortes transversais do tecido cotiledonar maduro de *T. cacao* revelaram em MET um conteúdo médio de 59% de lipídeos, 21% de proteína vacuolar e 8% de amido, compondo as células do primeiro tipo (Biehl et al., 1982c). Sotelo e Alvarez (1991) confirmaram que os lipídeos são os principais componentes de reserva das sementes de *T. cacao*.

2.5.1. Carboidratos

Nas sementes maduras, é comum a presença de amido como material de reserva, armazenado como grânulos cristalinos no citoplasma. Os grãos de amido são formados nos amiloplastos, por deposição periódica das camadas ao redor do hilo. A morfologia dos grãos varia entre as espécies em tamanho, forma, relação amilose/amilopectina e localização e forma do hilo. Portanto, podem ser encontrados grãos isolados ou compostos por grânulos de várias formas e tamanhos (Werker, 1997).

Em algumas sementes, a principal forma de reserva de carboidratos são outros polissacarídeos que não amido, pertencentes a três grandes grupos: os mananos, os galactomananos e os xiloglicanos. Esses compostos estão depositados na parede das

células do endosperma (Palmae, Lilioflorae, *Coffea*, Ebenaceae, Loganiaceae), do perisperma e dos cotilédones (*Ceratonia*, *Lupinus*, *Impatiens*) (Werker, 1997).

Schmieder e Keeney (1980), encontraram um conteúdo médio de 5,3% de amido, variando entre 4,5 e 7,0%, para 12 lotes de *T. cacao* que representavam diferentes regiões de produção¹. No mesmo trabalho, os autores observaram que o conteúdo de amido da semente aumentava com o crescimento e maturação dos frutos.

Redgwell e Hansen (2000) ao isolarem os principais polissacarídeos da parede celular em sementes de *T. cacao* encontraram cerca de 60% de polissacarídeos pécicos, 28% de celulose, 8% de xiloglicanos e 3% de galactoglicomananos. Diante destes resultados, os autores concluíram que os principais tipos e características estruturais dos polissacarídeos da parede celular de *T. cacao* assemelhavam-se mais aos polissacarídeos de células do parênquima de frutas e vegetais do que aos polissacarídeos de reserva das sementes.

2.5.2. Proteínas

Proteína de reserva de semente pode ser definida como aquela proteína acumulada na semente em desenvolvimento e que durante a germinação é rapidamente hidrolisada, provendo nitrogênio para os primeiros estágios de desenvolvimento da plântula (Higgins, 1984). As proteínas de reserva também exibem outras características estruturais e de solubilidade que auxiliam seu reconhecimento. Quanto à solubilidade as proteínas são divididas em 4 classes principais: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas que são solúveis em água, soluções salinas, alcoólicas e soluções ácidas ou alcalinas, respectivamente (Bewley & Black, 1994). As características estruturais serão consideradas a seguir.

¹ Ghana, Brasil (Bahia), Samoa, Equador, Venezuela, Jamaica, Trinidad.

Biossíntese das Proteínas de Reserva

As proteínas de reserva são uma classe peculiar de proteínas codificadas por genes regulados pelo desenvolvimento; a expressão desses genes ocorre durante um período limitado do ciclo de vida da planta e somente nos cotilédones ou no endosperma, dependendo da espécie. A expressão desses genes exclusivamente nos cotilédones (no caso de espécies de *Theobroma*) é regulada através da ligação dos fatores de transcrição (possivelmente proteínas dos cotilédones), às seqüências específicas de seu DNA (Fosket, 1994). Os produtos da tradução do RNAm são os polipeptídeos precursores das subunidades que serão formadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) (Müntz, 1996).

Nas dicotiledôneas, o período de intensa síntese de proteínas de reserva é concomitante ao de expansão celular e sucede a fase de divisão durante o desenvolvimento da semente (Conn & Stumpf, 1981).

Nas sementes de dicotiledôneas, as proteínas de reserva estão dentro de corpos protéicos (PBs) (Pernollet, 1978) e vão acumular-se no citoplasma como corpos isolados, ou serão recolhidos para dentro de vacúolos, por autofagia, dando origem aos vacúolos de estoque de proteínas (PSVs) (Herman & Larkins, 1999).

Membros de várias famílias de proteínas de reserva incluindo as 7S (globulina tipo vicilina) são co-traducionalmente glicosiladas dentro do retículo endoplasmático (RE). Oligômeros das globulinas 7S e 11S são transportadas aos vacúolos por progressão através do sistema de endomembranas, onde vão dar origem aos PSVs. Antigamente, os termos PB e PSV eram usados como sinônimos; segundo Herman e Larkins (1999) o termo PSV é usado para diferenciar vacúolos contendo proteínas dos corpos protéicos oriundos RE. A síntese de proteínas de estoque e a formação de vacúolos especializados se dá após o término da divisão celular, quando o crescimento subsequente ocorrerá através da expansão celular e acúmulo de

substâncias de reserva. Assim sendo, as sementes maduras irão conter densos depósitos de proteínas preenchendo o PSV (Hermant & Larkins, 1999).

Segundo Biehl et al. (1982c) as proteínas de estoque constituem a principal parte da fração protéica total da semente. Voigt et al. (1993), em estudo sobre as classes de proteínas do cacau, encontraram 52% de albuminas, 43% de globulinas, do tipo vicilina e 5% de glutelinas em sementes de *T. cacao* não fermentadas. As globulinas da semente de *T. cacao* são extremamente importantes durante seu processamento para chocolatzização, pois os peptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres hidrofóbicos, considerados precursores do sabor de chocolate, são formados através da proteólise destas globulinas durante a etapa de fermentação (Voigt et al., 1995).

Corpos Protéicos

Do ponto de vista morfológico, os corpos protéicos apresentam acentuado polimorfismo e recebem descrições ultraestruturais distintas, de acordo com sua composição. Alguns corpos protéicos têm padrão granular concêntrico sem inclusões, enquanto outros exibem inclusões cristalóides insolúveis e/ou globóides embebidas em matriz protéica homogênea, como mostra a

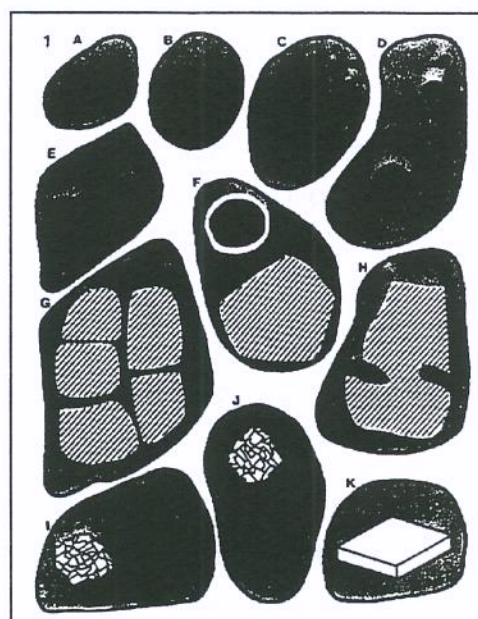
Figura 1.

A presença de inclusões cristalóides pode estar relacionada com proteínas da classe das globulinas. Corpos protéicos sem inclusões sugerem presença de albuminas. Algumas inclusões globóides possuem natureza não exclusivamente protéica, podendo conter depósitos de ácido fítico (60 – 80%) e sais de cálcio, potássio e magnésio. Envolvendo a inclusão globóide estão os depósitos de fitase que criam a interface enzimática entre a fitina e a matriz protéica (Pernollet, 1978; Bewley & Black, 1994). Em estudos com 70 espécies da família Proteaceae, Pate et al. (1986)

classificaram 7 tipos distintos de inclusões de natureza não protéica de acordo com tamanho, forma e resposta aos corantes Azul de Toluidina e Naphthol Blue Black.

Figura 1. Diagrama representando os diferentes tipos de corpos protéicos presentes em tecidos de estoque.

(A) matriz protéica. (B) – (E) globóides (preto) de diferentes tamanhos embebidos na matriz. (F) – (H) globóide envolvido por halo de fitase (halo branco) e inclusão protéica cristalóide insolúvel (listrado). (I) – (K) cristais (drusas) de oxalato de cálcio com ou sem globóides. (Adaptado de Bewley & Black, 1994).



2.5.3. Lipídeos

A quantidade de lipídeo estocado nos cotilédones de teobromas pode exceder 50% da reserva das sementes (Carpenter et al., 1994); são triacilgliceróis (TAGs) empacotados em vesículas numerosas denominadas glóbulos lipídicos, presentes no citoplasma das células de reserva (Esau, 1977).

Em muitas espécies vegetais, os glóbulos lipídicos são estáveis e não coalescem após estocagem prolongada da semente. A estabilidade é atribuída à

membrana constituída por hemicamada fosfolipídica contendo entre 0,5 a 4% de proteínas, com pesos moleculares entre 15 e 26kDa, denominadas oleosinas (Huang et al., 1993).

Comparando sementes de oleaginosas, Leprince et al.(1998) demonstraram que os glóbulos lipídicos de *T. cacao* são desprovidos de oleosinas. Os autores utilizaram o microscópio eletrônico de varredura, com emissão de campo em temperatura baixa, para investigar a estabilidade estrutural dos glóbulos lipídicos das sementes após secagem, estocagem em baixa temperatura e reidratação. Os glóbulos lipídicos do cacau permaneceram relativamente estáveis sob secagem lenta (23°C e 26%UR²) ou rápida (temperatura ambiente e 3%UR); durante a reidratação, os glóbulos lipídicos de *T. cacao* fundiram-se, alterando a integridade celular.

Síntese de Glóbulos Lipídicos

Os ácidos graxos sintetizados nos plastídeos são transportados ao RER onde ocorrerá a montagem dos TAGs (Browse & Somerville, 1991).

Várias sementes oleaginosas em fase de maturação (Schwarzenbach, 1971; Wanner et al.1981 apud Huang et al., 1993) mostraram ao microscópio eletrônico que os glóbulos lipídicos são originados no retículo endoplasmático liso (REL) por um processo de vesiculação ou brotamento, levando consigo a monocamada de fosfolipídeos, oriunda da cisterna do REL.

A enzima envolvida especificamente na síntese dos TAGs, a diacilglicerol aciltransferase, está localizada no RER onde possivelmente tenha início a síntese dos TAGs (Huang et al., 1993). A diacilglicerol aciltransferase exerce um papel chave na regulação da composição final de ácidos graxos dos lipídeos de reserva das

² UR – umidade relativa.

sementes (Lea & Leegood, 1993). Portanto, os TAGs, os fosfolipídeos e as oleosinas (quando ocorrem) são sintetizados no RER (Huang et al., 1993).

Em *T. cacao*, a síntese de óleo nas sementes estende-se por cerca de 2 meses e a deposição dos TAGs ocorre em duas fases principais. Na primeira, a divisão celular do tecido cotiledonar acontece com rapidez e ocorre pequena deposição de reservas. Na segunda, a síntese de TAGs ocorre rapidamente entre o 120° e 160° DAP³ (Griffiths & Harwood, 1991). Patel et al. (1994), em estudo com sementes de *T. cacao* em desenvolvimento, observaram que o período maior de síntese de lipídeos totais e ácidos graxos ocorreu entre 125° e 135° DAP e foi a seguir declinando até a maturidade, isto é, cerca de 170° DAP.

Griffiths e Harwood (1991), observaram o acúmulo de óleos polinsaturados ricos em oleato e linoleato durante fase inicial de biossíntese dos TAGs e aumento dos níveis de estearato durante a maturação em *T. cacao*. A composição das sementes de *Theobroma* foi analisada para o perfil de ácidos graxos e composição de esteróis, tocoferóis e tocotrienóis (Carpenter et al., 1994). A Tabela 1 apresenta os dados da composição de ácidos graxos das sementes de três espécies de teobromas.

Degradação dos Glóbulos Lipídicos

Os glóbulos lipídicos serão degradados na fase de germinação da semente e os TAGs, hidrolizados à glicerol e ácidos graxos, serão convertidos à açúcares para suportar o crescimento da plântula (Huang et al., 1993). Para os cereais, a lipase liga-se especificamente aos glóbulos lipídicos em um ponto de reconhecimento possivelmente situado nas oleosinas. No cacau, a ausência de oleosinas (Leprince et al., 1998) não confirma esta ligação. Finalmente, após a lipólise, os glóbulos lipídicos

³ Dias após a polinização.

vão gradualmente fundindo-se à membrana de vacúolos os quais poderão fundir-se em um amplo vacúolo central (Huang, 1996).

Tabela 1: Composição de ácidos graxos das sementes de teobromas.

	Composição (%)							
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0
<i>T. cacao</i>								
¹	30,6	0,6	33,9	31,4	2,5		0,9	
²	27,4	0,2	34,2	33,6	3,1	0,1	1,0	0,2
¹ <i>T. obovatum</i>	8,6		31,7	42,0	6,1		9,7	1,4
¹ <i>T. microcarpum</i>	14,4	0,8	6,4	31,4	27,1	3,6	6,6	9,8

¹ Gilabert-Escrivá, 2002.

² Carpenter et al., 1994.

2.5.4. Polifenóis

Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de substâncias no reino vegetal. Polifenóis são produtos do metabolismo secundário das plantas resultantes de duas diferentes vias (acetato e *shikimato*⁴), ambas derivadas do metabolismo da glicose e estão presentes em altos níveis na maioria das sementes. Os compostos fenólicos podem ser divididos em 10 classes distintas de acordo com sua estrutura básica, sendo os flavonóides o grupo mais importante. Alguns flavonóides são os constituintes

⁴ Os produtos da via primária do *shikimato* são os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), sua degradação leva à via do *phenylpropanoid*, no metabolismo secundário.

monoméricos dos taninos condensados, os quais são apontados como moléculas altamente hidroxiladas que podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. Outros flavonóides fazem parte das antocianinas, o grupo mais importante de pigmentos vegetais hidrossolúveis (Shirley, 1998; Wollgast & Anklam, 2000). O *T. cacao* possui grande quantidade de polifenóis, entre eles: ácidos fenólicos, antocianinas, catequinas, proantocianidinas e glicosídeos flavonóis. Os principais constituintes da fração fenólica do cacau são as catequinas (37%), as proantocianidinas (58%) e as antocianinas (4%) (Wollgast & Anklam, 2000).

Em 1977, Biehl et al., descreveram que nos cotilédones de *T. cacao* os polifenóis são armazenados em células dispersas pelo parênquima, ocupando principalmente regiões próximas aos vasos. O padrão de distribuição das células fenólicas no tecido cotiledonar em três espécies do gênero *Theobroma* será discutido no item 5.4.2 do presente trabalho.

2.5.5. Alcalóides

Os alcalóides, compostos nitrogenados de baixo peso molecular, são na maioria das vezes, derivados dos aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano, lisina e ornitina. Os alcalóides teobromina, teofilina e cafeína pertencem ao grupo das purinas e, embora estejam amplamente distribuídos na planta, sua presença dentro de reino vegetal é limitada (cerca de 20% das espécies vegetais). Estudos sobre os alcalóides presentes em *Camellia sinensis* (chá) e *Coffea arabica* (café) demonstraram que a cafeína é formada a partir da teobromina, e a teofilina é um intermediário do catabolismo da cafeína (Suzuki et al., 1992 apud Ito et al., 1997).

Existem duas hipóteses sobre a função de altas concentrações de alcalóides em algumas espécies vegetais: a hipótese da defesa química propõe o papel protetor contra a predação, outra hipótese sugere que os alcalóides das sementes são

liberados no solo inibindo a germinação de outras sementes (Ashihara & Crozier, 2001).

O levantamento da presença de alcalóides em 10 espécies de *Theobroma* indicou que apenas *T. cacao* possui cafeína e teobromina em níveis detectáveis nas sementes maduras, enquanto que o tetrametil urato (teocrina) foi encontrado em todas as outras espécies de *Theobroma* analisados com exceção de *T. obovatum* para o qual não foi detectado nenhum alcalóide (Hammerstone et al., 1994). Os alcalóides presentes nas sementes de *T. cacao* estão localizados nas mesmas células que armazenam os compostos fenólicos (Roelofsen, 1958 apud Brito, 2000). Jaenicke (1973) sugeriu um modelo para explicar o processo de difusão dos alcalóides (teobromina e cafeína) para dentro dos vacúolos de polifenóis. Segundo o autor os alcalóides de *T. cacao* localizam-se dentro de vacúolos específicos que fundem-se à membrana dos vacúolos de polifenóis, permitindo que os alcalóides alcancem o interior do vacúolo como inclusões desprovidas de membrana.

2.6. Relação entre Compostos de Reserva e Choclatização

O processo de choclatização das amêndoas engloba diversas reações bioquímicas e enzimáticas decorrentes das etapas de fermentação, secagem e torração.

Durante a fermentação ocorre a difusão dos ácidos produzidos para dentro do cotilédone que somada à elevação da temperatura provocam a morte do embrião; a semente, então, passa a ser denominada amêndoa, uma vez que perde seu potencial de germinação (Vasconcelos, 1999). A morte do embrião provoca mudanças nas membranas celulares facilitando a migração de enzimas e substratos (Beckett, 1994); nessa etapa as proteínas de reserva tornam-se suscetíveis à ação das proteases.

Estudos demonstraram que a formação dos precursores do aroma específico é devida a proteólise, ácido induzida, da principal proteína de reserva (globulina, tipo vicilina), por ação conjunta da endoprotease aspártica e uma carboxipeptidase dando origem aos oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres hidrofóbicos (Voigt et al., 1994; Voigt & Biehl, 1995). O aroma específico do cacau é obtido quando os precursores são aquecidos na presença de açúcares redutores, através da reação de escurecimento não enzimático ou reação de Maillard (Cros, 1999).

Durante o processo de secagem algumas modificações bioquímicas continuam a ocorrer no cotilédone, como a redução de ácidos através da evaporação (Cros, 1999). Anteriormente à torração, a amêndoa pode ser adstringente, amarga e ácida. Contudo, a torração reduz a acidez, através da diminuição significativa nas concentrações de ácidos voláteis, especialmente ácido acético (Beckett, 1994).

Os polifenóis contribuem para a adstringência e inibem o desenvolvimento do aroma durante a torração ao complexarem com proteínas. Os teores de alcalóides purinas (teobromina e cafeína) decrescem 20 a 30% durante a fermentação em consequência de sua difusão, contribuindo para a redução do sabor amargo na amêndoa (Cros, 1999).

Com a morte da semente, a fusão dos glóbulos de lipídeo se completa estabelecendo uma fase contínua de óleo envolvendo as inclusões citoplasmáticas, ou seja, a compartimentação celular é perdida e as reações dependentes de meio aquoso são prejudicadas (Biehl et al., 1977). O papel principal do lipídeo no processo de chocolateização será como constituinte da gordura da amêndoa que recebe grande importância econômica devida às suas características físico-químicas específicas. A composição lipídica das sementes de *T. cacao* poderá variar de acordo com as variedades e condições de crescimento; variações do perfil de ácidos graxos influenciarão diretamente as propriedades físicas da manteiga de cacau, assim como a textura, sabor e ponto de fusão do produto final (Liendo et al., 1997).

3. OBJETIVOS

- Descrever a morfologia das sementes das três espécies do gênero: *Theobroma cacao* L., *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum*;
- Caracterizar, empregando métodos citoquímicos, os componentes de reserva e os principais tipos celulares que compõe o tecido cotiledonar das três espécies;
- Avaliar através da ultraestrutura a localização subcelular dos elementos de reserva de *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum*;
- Caracterizar, através de métodos bioquímicos, a composição química das sementes maduras;
- Estimar tamanho das células de reserva e proporção das células fenólicas no tecido cotiledonar através da análise, por software, das imagens obtidas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de *T. cacao*, *T. obovatum* e *T. microcarpum*, obtidas de frutos provenientes das coleções da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC-Marituba⁵, PA; CEPLAC-Itabuna⁶, BA).

Os frutos foram recebidos em 2 ocasiões e classificados em grupos (1 e 2) para facilitar a referência à origem.

Grupo 1 - *T. obovatum*, *T. microcarpum* e *T. cacao* (frutos maduros recebidos do CEPLAC-Marituba, PA; em Março de 2001);

Grupo 2 - *T. cacao* (frutos maduros provenientes do CEPLAC-Itabuna, BA recebidos em Abril de 2001).

⁵ Marituba: Município que integra a região metropolitana de Belém, Pará; localizado à 19Km da capital.

⁶ Itabuna: Município do Estado da Bahia, localizado 36Km à oeste de Ilhéus.

4.2. Métodos

4.2.1. Microscopia Óptica

Fixação, Inclusão e Microtomia

Seções dos cotilédones de aproximadamente 2mm³ foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído (V/V) e 3% de sacarose em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,3, durante 120 horas à 5°C; a seguir foram desidratadas em série etílica (etanol 70, 80, 90 e 95% e etanol absoluto) e incluídas em historesina Glicolmetacrilato (GMA Leica) para obtenção de cortes em micrótomo com 1 a 3µm de espessura.

Colorações

A partir dos cortes obtidos foram realizadas reações citoquímicas para demonstrar a presença de polissacarídeos, proteínas, lipídeos e polifenóis.

Azul de Toluidina

Para a localização dos grupos aniônicos⁷ os cortes foram corados com Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0 (15 minutos) e lavados em água destilada (Vidal, 1977). Na coloração de rotina foi utilizada solução de Azul de Toluidina 0,5% em Borax 5% (pH8,0).

⁷ referentes aos radicais fosfatos presentes em ácidos nucleicos e radicais sulfatos e carboxilas presentes em polissacarídeos ácidos.

Método do PAS

O método do PAS (Periodic Acid Schiff) foi utilizado para evidenciar amido e polissacarídeos da parede celular. Os cortes foram previamente tratados em solução de glicina 0,15mM em tampão fosfato 0,05M a pH 7,0 por 2 horas, para bloquear grupamentos aldeídos do fixador. O material foi então submetido à oxidação com o ácido periódico 0,5% durante 10 minutos, lavado em água destilada, seco ao ar e tratados com reagente de Schiff por 8 minutos, na ausência de luz. Após a coloração foram submetidos a 3 banhos de 3 minutos em água sulfurosa (18 partes de água destilada, 1 parte de HCl 1N e 1 parte de Metabissulfito de Sódio 10%) (Silva, 1995).

Naphthol Blue Black (NBB)

Para a localização do material protéico, os cortes em historesina foram corados com solução de Naphthol Blue Black 1% em ácido acético 7%, por 10 minutos (temperatura ambiente), em seguida, lavados com ácido acético 7% e água destilada para a retirada do excesso de corante (Ling-Lee et al., 1977).

Nile Red (Nile Blue A oxazone)

Cortes congelados, obtidos em criostato, foram usados para a detecção das reservas lipídicas evitando o uso de solventes empregados nos métodos de inclusão em resinas. Os cortes foram tratados com solução de Nile Red em acetona (100µg/ml), montados em solução aquosa de Nile Red 1µg/ml e observados em microscópio de fluorescência sob excitação em 510nm (Greenspan et al., 1985)

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fixação, Inclusão e Ultramicrotomia

Seções dos cotilédones, com cerca de 2mm³, foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído (V/V) e 3% de sacarose em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,3, durante 90 horas, à 5°C. Após a fixação em aldeído, foram pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio 1% (18h) e em Acetato de Uranila 0,5% em sacarose 13,3% por 16h (Haddad et al., 1998). Após desidratação as seções foram incluídas em Epon e seccionadas em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos que foram colhidos sobre telas de níquel.

Contrastação

Para intensificar o contraste dos cortes ultrafinos as telas contendo os cortes foram tratadas em Acetato de Uranila 5% durante 20 minutos e Citrato de Chumbo por 5 minutos (preparado à partir de Nitrato de Chumbo e Citrato de Sódio) (Harris, 1991; Haddad et al., 1998). O material foi observado ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 ZEISS (Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP) e as imagens fotografadas.

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Fixação e Criofratura

Porções dos cotilédones das sementes foram fixadas em solução de glutaraldeído 5% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,3, durante 120 horas à 6°C e pós fixadas em Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,3 por 18 horas (Bechtel, 1993). As amostras foram desidratadas em Etanol 50,

70, 80, 90 e 95% e Etanol absoluto, e levadas ao Nitrogênio líquido para proceder a criofratura. Após a criofratura, as amostras foram imersas em Acetona PA (2 horas), para a remoção do óleo que normalmente provoca obscurecimento estrutural (Arnott & Webb, 1983 in Bechtel, 1983).

Secagem e Cobertura

Para a secagem do material utilizou-se um secador de ponto crítico de CO₂ "CPD-030 Balzers". a cobertura com ouro realizada em metalizador "Sputter Coater SCD-050". A observação microscópica e o registro de imagens foram procedidos à 10kV de aceleração no microscópio de varredura JEOL JSM - 5800 LV. (Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP).

4.2.4. Composição Química das Sementes

As amostras destinadas à análise da composição química foram previamente pesadas, liofilizadas e novamente pesadas obtendo-se a porcentagem de umidade bruta.

A determinação de lipídeos totais foi feita segundo Método de Soxhlet (963.15 AOAC, 1997). A extração da gordura foi feita com éter de petróleo a partir da amostra liofilizada e moída.

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Kjeldahl (970.22 AOAC, 1997), utilizando-se o fator de conversão 5,4; o mesmo utilizado por Silva (2000).

A porcentagem de sólidos totais e umidade foi determinada através da secagem em estufa à 105°C, até peso constante (931.04 AOAC, 1997). A amostra seca em estufa foi carbonizada e incinerada em mufla à 550°C para a obtenção do

percentual de cinzas (972.15 AOAC, 1997). A porcentagem de carboidratos totais foi calculada por diferença.

A extração dos fenóis totais foi realizada segundo metodologia de Price & Butler (1977) adaptada por Fernández Barbery (1999) a partir da amostra liofilizada e desengordurada. A determinação da concentração de fenóis totais foi realizada pelo método colorimétrico do Folin-Ciocalteu (Amerine & Ough, sd) e as leituras realizadas em espectrofotômetro à absorvância de 760nm. Para a curva de calibração foram utilizadas soluções de ácido gálico nas concentrações 5, 10, 25, 50, 100, 150, 250, 500mg/L e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico.

4.2.5. Análise de Imagem

As estimativas de tamanho de células, tamanho dos grãos de amido e proporção de células fenólicas no tecido cotiledonar foram feitas através da análise das imagens geradas ao microscópio óptico e capturadas por câmera; utilizando-se o software de domínio público *Scion Image* (www.scioncorp.com) e o *Global Lab Image*.

O *Global Lab Image* foi utilizado para análise de partículas. Uma partícula é definida como um número de pixels conectados dentro de uma faixa de cinza especificada. Os grãos de amido corados pelo método do PAS (p.ex.) possuem uma faixa de cinza correspondente na imagem em “branco e preto”, dessa forma eles serão considerados partículas pertencentes a uma mesma classe (Anexo 2).

O *Scion Image* foi utilizado para medir individualmente os grãos de amido ou células quando não foi possível separá-los por gradiente de cinza e definí-los como partículas isoladas. O *Scion Image* também foi útil para o processamento da imagem através da ferramenta *density slice*. Esta ferramenta permite segmentar os objetos, com base no valor de cinza. Os objetos são então realçados em vermelho e ao tornar a imagem binária os pixels marcados em vermelho serão convertidos a preto e o restante será convertido a branco (Anexo 1).

Calibração

A calibração em unidade conhecida (micrômetros) foi feita através da imagem capturada da escala milimétrica calibrada Zeiss na qual a menor divisão corresponde a 100 micrômetros. A equivalência encontrada entre pixel (pxl) e micrômetros (μ) para cada objetiva utilizada foi:

Objetiva	25x	40x	100x
100 μ	145pxl	230pxl	584pxl

A partir da análise exploratória do tecido avaliou-se o tamanho da amostra (p. ex.: número de grãos de amido) necessária para estimar a área média (μ_A) através da seguinte equação (Barnett, 1974; Cochran, 1977):

$$n \geq \frac{(1 + 2/n_1) \times (z_\alpha)^2 \times s^2}{d^2}$$

Onde:

n = tamanho da amostra

n_1 = amostra inicial ≥ 30

s^2 = variância populacional estimada

Z_α = valor crítico da distribuição normal para o nível de significância de 0,01

$Z_\alpha = 2,33$

d = erro máximo (5% de μ_1)

μ_1 = média da amostra inicial

O tamanho da amostra para cada tipo de análise foi:

	Célula fenólica	Célula de reserva	Grão de amido
<i>T. cacao</i>	297	137	133
<i>T. obovatum</i>	125	198	150
<i>T. microcarpum</i>	62	134	92

Para a determinação da proporção de células fenólicas no tecido cotiledonar foram avaliados cinco campos aleatórios com área total conhecida, variando entre 5×10^5 e $6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$. A análise considerou a área ocupada pelas células fenólicas dentro de cada campo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características macroscópicas das sementes

As sementes das três espécies estudadas (*T. microcarpum*, *T. obovatum* e *T. cacao*) apresentam as características descritas por Barroso et al. (1999) e Corner (1976) para o gênero *Theobroma*: dois tegumentos (testa e tégmen), embrião axial, elipsóide, cotilédones densos muito dobrados em torno do eixo hipocótilo-radicular.

Os frutos de cacau provenientes de Marituba/PA eram diferentes dos frutos oriundos de Itabuna/BA, tanto em formato, tamanho e coloração do fruto quanto ao número e tamanho das sementes (Figura 2).

Quanto às características das sementes observadas, independente da origem dos frutos, o cacau possui cotilédones muito dobrados, cor violeta devido à presença de antocianinas. Quando abertas, as sementes por oxidação tornam-se marrons. As sementes de *T. obovatum* têm o envoltório mais fino que o das outras duas espécies estudadas; seus cotilédones são claros, delgados, muito imbricados e são menores em relação ao *T. cacao* e *T. microcarpum* (Figura 3).

Os cotilédones de *T. microcarpum* são espessos e menos imbricados se comparados ao *T. cacao* e *T. obovatum*; assim como as outras duas espécies oxidam-se rapidamente quando a semente é aberta, assumindo aparência ferruginosa. O tamanho e peso médio das sementes das três espécies são apresentados na tabela 2.

Figura 2(a). Frutos de teobromas maduros.

A – C: *T. obovatum*; D e E: *T. microcarpum*; F – I: *T. cacao*.

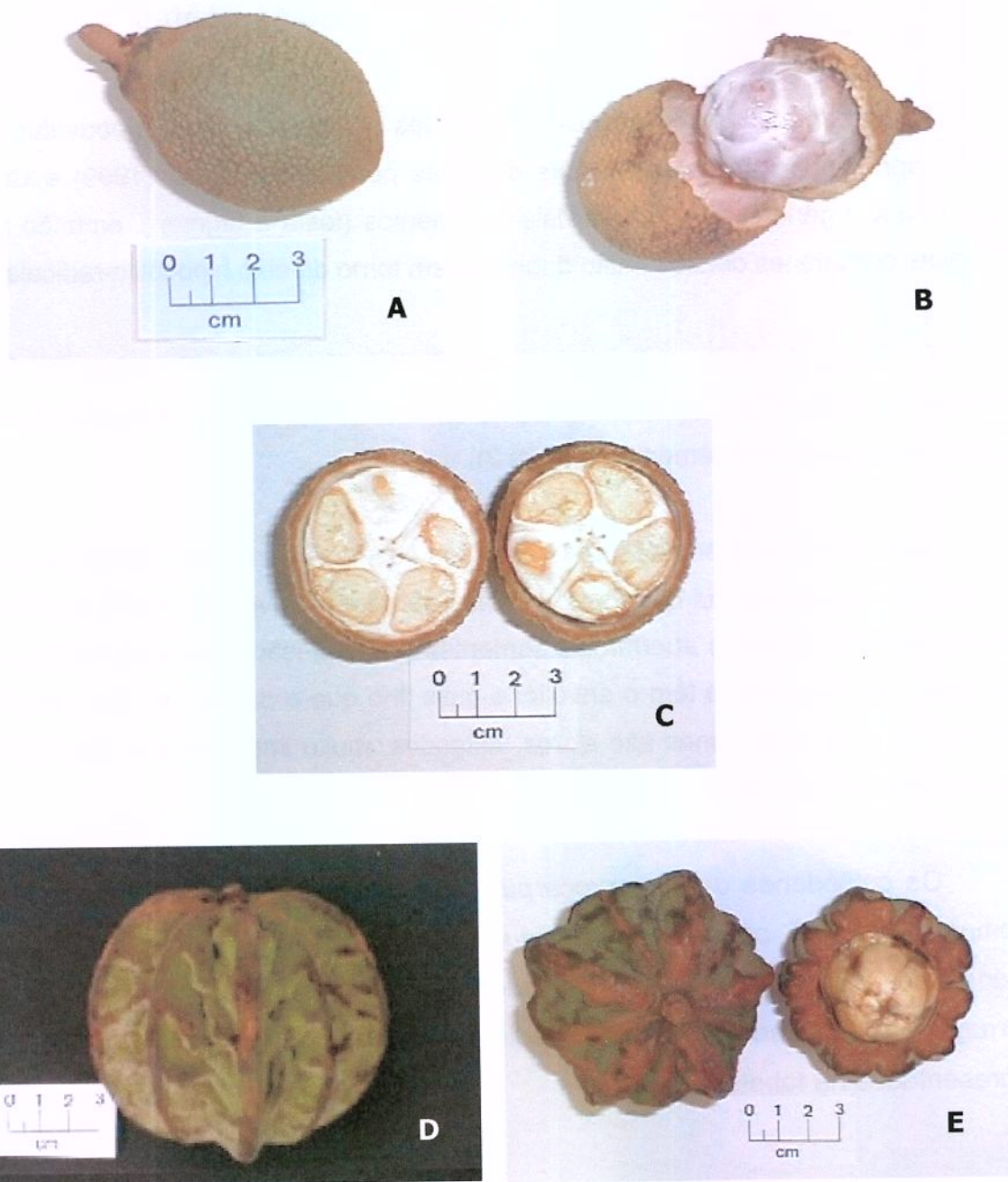


Figura 2(b). Frutos de teobromas maduros. F e G: grupo 2; H e I: grupo 1.

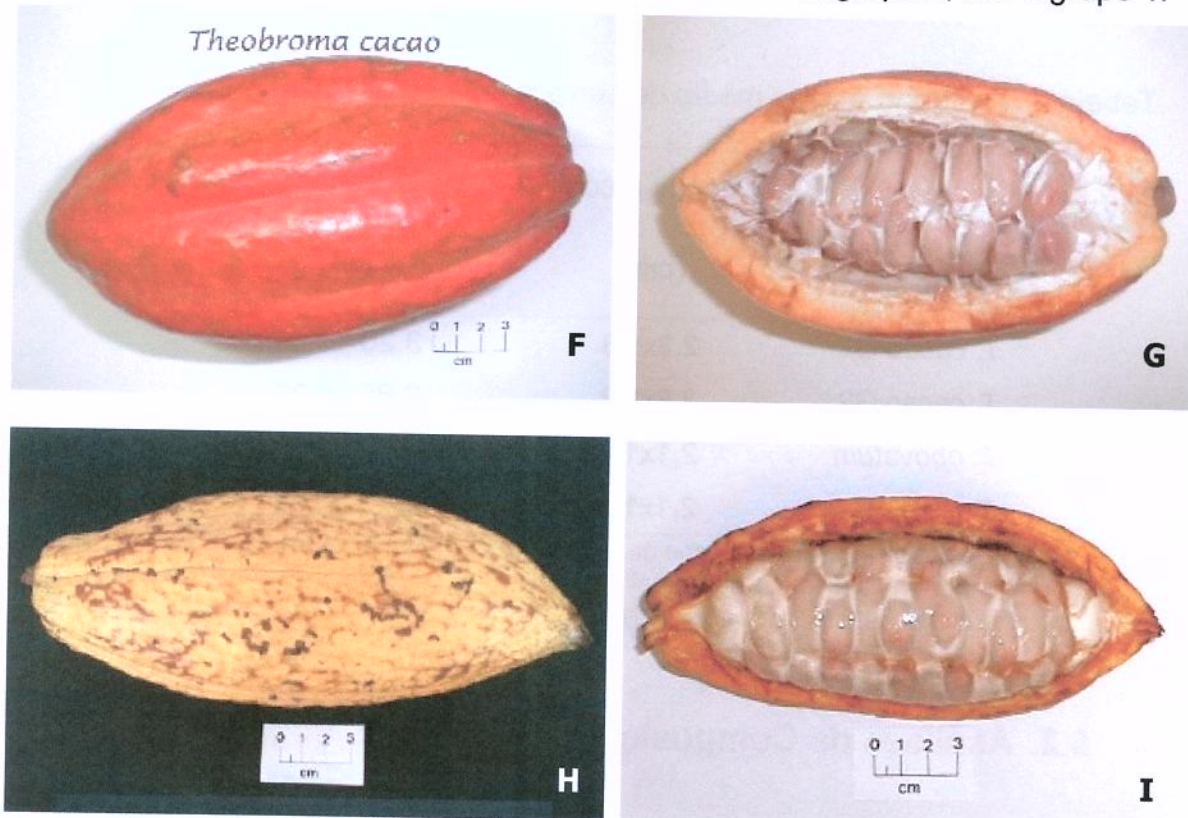


Figura 3. Sementes maduras inteiras, sem testa e em corte longitudinal. A – *T. cacao*, B – *T. microcarpum*, C – *T. obovatum*.

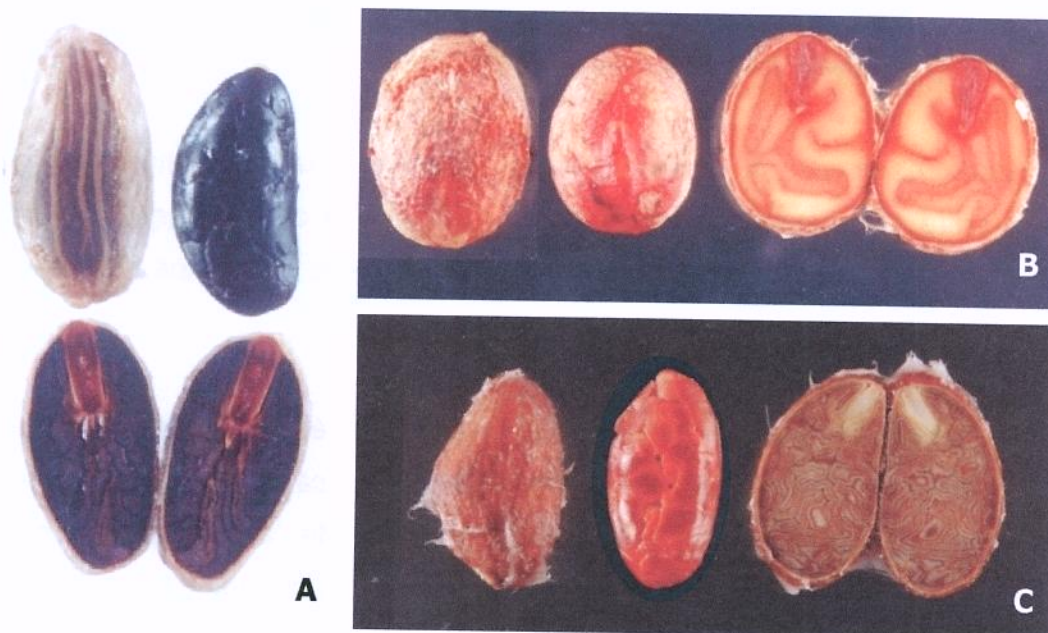


Tabela 2: Tamanho e peso médio de sementes íntegras das três espécies.

	Tamanho médio*	Peso**
	(cm)	(g)
<i>T. cacao</i> G1	2,3x1,3	3,20 ±0,18
<i>T. cacao</i> G2	2,9x1,2	2,80 ±0,22
<i>T. obovatum</i>	2,1x1,5	2,18 ±0,17
<i>T. microcarpum</i>	2,1x1,6	2,73 ±0,82

G1 e G2 referem-se ao grupo de amostras 1 e 2, respectivamente.

* eixos longitudinal e transversal

** valores: média ± desvio padrão

5.2. Análises da Composição Química das Sementes

Os resultados da composição química das amostras analisadas (Tabela 3) revelam diferenças entre as espécies quanto ao principal composto de reserva encontrado: *T. microcarpum* apresenta alto teor de carboidrato enquanto em *T. cacao* e *T. obovatum* os lípides são a principal reserva.

Como esperado, *T. cacao* mostrou uma composição química um pouco diferente entre as amostras do grupo 1 e 2; vale lembrar que a origem geográfica é um dos fatores que podem influenciar na proporção dos elementos de reserva na semente.

Os teores de proteína encontrados nas três espécies são semelhantes aos valores obtidos por Silva (2000), como esperado *T. microcarpum* apresentou a menor porcentagem de proteínas na semente desengordurada; os valores de proteína obtidos nas sementes de *T. obovatum* e *T. cacao* (grupo 1) foram próximos (Tabela 3). Quanto aos fenóis totais (Tabela 4), confirma-se que *T. cacao* está entre os teobromas mais ricos em fenóis; os valores de fenóis totais em *T. cacao* são

comparáveis aos encontrados por Müller, et al. (2000). As células contendo os polifenóis são claramente visíveis e os resultados da Tabela 4 confirmam as observações feitas ao microscópio óptico.

Tabela 3: Dados da composição química das sementes maduras.

Composição química das sementes maduras base seca (%)					
	Proteína ^a	Lipídeo	Cinzas	Umidade	Carboidrato ^b
<i>T. cacao</i> G1	25,44 (24,1)*	47,25	3,01	1,34	22,95
<i>T. cacao</i> G2	28,68	51,22	3,20	2,16	14,74
<i>T. obovatum</i>	24,88 (27,1)	60,77	3,14	0,89	10,32
<i>T. microcarpum</i>	13,27 (14,4)	6,54	2,75	2,86	74,57

^a proteína total das amostras desengorduradas.

^b obtido por diferença.

* entre parênteses: valores obtidos por Silva, 2000.

Tabela 4: Percentual de fenóis totais em base seca e desengordurada

Concentração de fenóis totais ^a (%)	
<i>T. cacao</i> G1	8,3 ± 0,6
<i>T. cacao</i> G2	7,7 ± 0,6
<i>T. obovatum</i>	5,1 ± 0,5
<i>T. microcarpum</i>	2,7 ± 0,1

^a valores: média ± desvio padrão

5.3. Citoquímica

Não foram notadas diferenças em relação ao conteúdo celular e morfologia cotiledonar entre as sementes de *T. cacao* dos grupos 1 e 2. Os resultados da citoquímica e estrutura desconsideram, portanto, a origem geográfica das sementes analisadas.

5.3.1. Azul de Toluidina em pH8,0 e pH4,0

Os cortes destinados à coloração pelo Azul de Toluidina (AT) originaram-se do material incluído em historesina GMA (Glicol metacrilato) e foram submetidos à soluções de AT em pH8,0 e pH4,0.

O Azul de Toluidina é definido como um corante básico, portador do radical NH_3^+ , utilizado para evidenciar substratos aniônicos totais por reações de basofilia (Vidal & Mello, 1987). A habilidade de ligação do AT aos grupos aniônicos diminui com o pH. Um fato conhecido é que os compostos sulfatados e polifosfatos ainda se coram metacromaticamente em pH baixo (Gahan, 1984). Em pH 4,0, o AT, em geral, não cora proteínas, já que poucos radicais carboxilas presentes encontram-se negativados. Por outro lado, os radicais fosfatos presentes em ácidos nucleicos e radicais sulfatos e carboxilas presentes em açúcares ácidos são corados (Vidal & Mello, 1987; Cortelazzo, 1989).

A ligação das moléculas do corante aos grupos acídicos próximos de uma molécula resulta no deslocamento do pico de absorção do azul (AT) para o vermelho, tal fenômeno é conhecido como metacromasia (Gahan, 1984). Em células e tecidos animais e vegetais, as estruturas metacromáticas apresentam-se róseo-avermelhadas; em casos contrários permanecem azuis, mas podem progredir ao azul esverdeado indicando a ortocromasia (Vidal & Mello, 1987).

O AT é também interessante para identificar pectinas, porque estas apresentam reação metacromática produzindo coloração violeta (O'Brien *et al.*, 1981), enquanto os polifenóis mostram coloração azul esverdeada brilhante quando corados pelo AT (Gahan, 1984).

Os compostos pécticos das paredes de células cotiledonares das três espécies apresentaram metacromasia ao AT (cor arroxeada). Entre as dobras retorcidas dos cotilédones de *T. cacao*, é possível notar a presença de mucilagem que na presença de AT (pH4,0) adquiriu aspecto filamentoso e metacromático corando em rosa avermelhado (Figura 8A).

As paredes do xilema foram destacadas pelo AT, coradas em verde. As células da epiderme dos cotilédones apresentaram reação acentuada de radicais aniônicos que preenchem o citoplasma. Na periferia destas células, detectou-se a presença de glóbulos mais corados pelo Azul de Toluidina (Figura 8).

As células da epiderme dos cotilédones apresentaram reação acentuada definindo a posição parietal do citoplasma e corando o grande vacúolo central (Figuras 4 e 8). O citoplasma contém vários elementos estruturais de difícil identificação ao M.O. Com efeito, as células epidérmicas não representam células de reserva e a característica comum para as três espécies estudadas é o grande vacúolo central e o alinhamento celular formado por uma única camada. Em *T. microcarpum* as granulações (de natureza indefinida nas outras duas espécies), têm características colorimétricas de fenóis.

Os núcleos e nucléolos quando presentes no corte histológico apresentam predominância de cromatina frouxa e grande nucléolo (Figuras 6B e 10A).

5.3.2. Polissacarídeos

Para o PAS evidenciar polissacarídeos neutros (amido e celulose) é necessária a prévia oxidação de grupos hidroxilas de carbonos vicinais da amostra pelo ácido periódico, resultando na formação de grupos aldeído livres que serão demonstrados com o reativo de Schiff, produzindo coloração rosa (Gahan, 1984).

Os cortes submetidos ao PAS revelaram a presença notória de amido nos cotilédones de *T. microcarpum*, como a principal reserva de carbono do embrião. Os grânulos de amido são imbricados em forma de tetraedros e grandes no tamanho em relação às outras duas espécies (item 5.6), preenchendo quase toda a célula da semente madura (Figura 9C); as proteínas de reserva, por sua vez, ocupam os espaços remanescentes.

Em *T. cacao* e *T. obovatum* o teor lipídico é predominante (Tabela 3); os plastídeos privilegiaram a formação dos lipídeos e, como consequência, os grânulos de amido são relativamente poucos e pequenos, ocupando pequena porção da célula (Figura 9, A e B). Os polissacarídeos das paredes das células cotiledonares também foram evidenciados pelo PAS, caracterizando seu material celulósico.

A presença de grãos de amido pode ser confirmada por seu padrão de birrefringência característico de “cruz de malta”, quando vistos sob luz polarizada (Figuras 13, 14 e 15) (Gahan, 1984). Para a microscopia de polarização foram utilizados os cortes corados com Naphthol Blue Black ou Azul de Toluidina.

5.3.3. Lipídeos

Segundo Greenspan *et al.* (1985) o Nile Red é indicado para a detecção de glóbulos lipídicos intracelulares, através da microscopia de fluorescência. A

fluorescência do corante ocorre em comprimento de onda de excitação entre 450 e 560nm.

A análise microscópica sob fluorescência dos cortes de cotilédones, obtidos ao criomicrotomo e corados pelo Nile Red, confirmou a presença acentuada de glóbulos de lipídeos em *T. cacao* e *T. obovatum*. Alguns minutos após a exposição, os glóbulos lipídicos coalesceram formando grandes gotas sobre o corte (Figura 11).

Entre as espécies brasileiras do gênero *Theobroma*, *T. microcarpum* é a espécie que exhibe o menor percentual de lipídeo na semente; provavelmente em consequência de apresentar o amido como principal fonte de carbono. Nos cortes de *T. microcarpum*, os glóbulos lipídicos são vicinais à membrana plasmática; neste caso serão melhor observados em MET (Figura 31). É necessário comparar os diferentes cortes com a mesma espessura, porque cortes espessos corados pelo Nile Red podem transmitir falsa impressão sobre a proporção de lipídeos presentes no tecido.

5.3.4. Proteínas

Nos cotilédones maduros de *T. cacao* o material protéico ocupa em geral um grande vacúolo central circundado por pequenos círculos negativos ao Naphthol Blue Black (NBB) (Figura 5; A e B). Inclusões negativas ao NBB e birrefringentes sob luz polarizada estão presentes nos vacúolos protéicos das células do parênquima (Figuras 12A e 14).

Em *T. obovatum*, o material protéico das células do parênquima mostra o mesmo padrão de distribuição observado no cacau, o vacúolo central rodeado por glóbulos não corados. No entanto, algumas vezes a proteína não é identificada ocupando a porção central das células do parênquima de reserva em *T. cacao* e *T. obovatum* (Figura 5B e Figura 6B). Nesses casos, o aumento da síntese dos glóbulos lipídicos parece dividir gradativamente o vacúolo protéico, forçando a proteína a

ocupar os espaços remanescentes dentro da célula. O núcleo deslocado do centro e o nucléolo foram evidenciados pelo corante (Figura 6B).

Em *T. microcarpum* o material protéico, fortemente corado pelo NBB, localiza-se entre os grãos de amido formando, portanto, vacúolos distintos. Assim como no cacau, observam-se inclusões birrefringentes sob luz polarizada dentro dos vacúolos protéicos de *T. microcarpum* (Figura 12B), e em células da epiderme de *T. obovatum* (Figura 15; A e B).

Pate et al.(1986) identificaram, dentro do vacúolo protéico, 7 tipos de inclusões não protéicas⁸ em 70 espécies (30 gêneros) da família Proteaceae, algumas positivas ao Azul de Toluidina (AT⁺), outras não (inclusões esféricas AT⁻); nenhuma delas reagiu ao NBB. As inclusões foram classificadas segundo forma e tamanho; inclusões do tipo A, drusa (AT⁻) ocorrem singularmente no corpo protéico e exibem birrefringência sob luz polarizada. Entre os 30 gêneros observados, apenas um não apresentou inclusões e outros sete possuíam apenas um dos tipos (AT⁺ ou AT⁻). Inclusões dos tipos A (AT⁻) e D, esferoidal (AT⁺) foram comumente encontradas. Segundo os autores, todos os gêneros e algumas espécies podem ser distinguidos com base: na distribuição e frequência dos tipos de inclusões existentes, e no padrão de coloração dos corpos protéicos do cotilédone pelo NBB.

⁸ Principalmente cristais de oxalato ou carbonato de cálcio, fitato e sais (P, K, Mg, Ca).

5.4. Histologia do Cotilédone

A figura 4 apresenta a constituição estrutural dos cotilédones de *T. obovatum* para ilustrar os tecidos que formam os cotilédones das sementes em *Theobroma*, são eles: epiderme e mesofilo onde são encontrados as células parenquimáticas de reserva, idioblastos com polifenóis e os feixes vasculares.

5.4.1. Epiderme

As células que formam a epiderme dos cotilédones de *T. cacao* apresentam um grande vacúolo suavemente positivo ao NBB e ao AT pH4,0. Nas mesmas células ocorrem também glóbulos ortocromáticos ao AT pH4,0 e glóbulos fortemente corados pelo NBB (Figuras 5B e 8A).

Em *T. microcarpum*, é comum a presença de glóbulos ortocromáticos ao AT pH4,0 (glóbulos de polifenóis) e o grande vacúolo está preenchido por material fracamente corado(Figura 8C). Os núcleos geralmente são bem visualizados nessas células (Figura 10A).

As células da epiderme de *T. obovatum*, são preenchidas por material positivo ao AT e grânulos ortocromáticos fortemente corados (Figura 8B), além de inclusões birrefringentes sob luz polarizada (Figura15, A e B).

As respostas das células epidérmicas à aos métodos citoquímicos de detecção de proteínas e carboidratos sugerem que estas células, embora alinhadas como um tecido de revestimento, apresentam capacidade de sintetizar os compostos de reserva porém em menor quantidade se comparadas às células do parênquima de reserva.

5.4.2. Mesofilo

Parênquima de reserva

Nas três espécies, a maior parte do parênquima cotiledonar é efetivamente constituída por células de reserva; o tipo de reserva predominante será lipídeo para *T. cacao* e *T. obovatum* e amido para *T. microcarpum* (Tabela 3).

As células do parênquima cotiledonar de *T. cacao* e *T. obovatum* não apresentam um formato predominante e na última, são menores em relação às outras 2 espécies (item 5.6), porém apresentam um aspecto semelhante à *T. cacao*, com diversos glóbulos lipídicos circundando o vacúolo protéico. Em alguns casos, o núcleo pode ser observado e os espaços intercelulares estão aparentes.

Em *T. microcarpum*, as células de reserva têm formato poliédrico e os espaços intercelulares não são comuns no tecido maduro (Figura 21). Os grãos de amido e os vacúolos contendo a proteína de reserva preenchem a célula; o núcleo algumas vezes não é facilmente distinguido e o escasso material lipídico só é observado através da análise ao microscópio eletrônico de transmissão.

Idioblastos de Polifenóis

Segundo Zobel (1986), os compostos fenólicos ou polifenóis estão presentes na maioria dos tecidos vegetais podendo ser encontrados em grandes quantidades. Usualmente, os fenóis já ocupam um amplo vacúolo central nas células idioblásticas⁹.

⁹ Idioblasto - Célula vegetal especializada contendo uma composição química distinta comparada às células adjacentes.

Nas três espécies estudadas, a presença de idioblastos de polifenóis no mesofilo é comum, sendo mais acentuada em *T. cacao*. Tais células ocupam principalmente regiões próximas aos vasos condutores ou estão dispersas pelo parênquima sendo identificadas pela cor magenta translúcida (em cortes a fresco) ou pela ortocromasia ao AT, pH4,0, quando então se coram em verde brilhante.

Em *T. cacao* ocorrem ainda grupos com cerca de 3 à 10 células perpendiculares à epiderme; estas células parecem acompanhar os vasos e seus conteúdos vacuolares assumem aspecto vesiculado em algumas preparações. (Figura 10B) Ainda nessas células, distinguem-se pequenos grãos de amido birrefringentes sob luz polarizada (Figura 12A).

Em *T. microcarpum* as células fenólicas também têm grãos de amido dispostos lateralmente ao vacúolo; esses grãos são menores do que os grãos das células de reserva (Figura 13B). O vacúolo contendo o material fenólico é homogêneo em *T. microcarpum*, porém, em *T. obovatum* têm aspecto ora homogêneo, ora vesiculado.

Uma possível explicação para o aspecto vesiculado dos vacúolos de polifenol seria a presença de inclusões de alcalóides nesses vacúolos (Jaenicke, 1973). No entanto, segundo Hammerstone et al. (1994) não foi detectada a presença de alcalóides em *T. obovatum*.

5.5. Microscopia eletrônica

A análise dos cotilédones ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) revelou a espessura das paredes celulares e a organização da rede protéica e dos glóbulos lipídicos e/ou grãos de amido dentro das células do parênquima de reserva das três espécies (Figuras 16 a 24).

Ao MEV, as células do parênquima de *T. cacao* mostram a rede protéica e os espaços dos glóbulos lipídicos (extraídos pela acetona). A extração dos lipídeos com acetona (Bechtel, 1983) permitiu melhor visualização do material impedindo a formação do filme de óleo sobre o tecido. Os grãos de amido aparecem em proporção menor em relação às reservas de proteína e lipídeo (Figuras 16, 17 e 18).

Em *T. microcarpum* grande parte do tecido analisado é constituído por células hexagonais, de parede celular espessa; contendo grãos de amido conjugados, mergulhados em densa rede protéica (Figuras 21, 22 e 24). Entre as células de reserva de amido e proteína ocorrem células maiores contendo glóbulos de vários tamanhos e pouco amido; as mesmas células são ortocromáticas ao AT pH4,0. Pelo tamanho e conteúdo distinto das demais, estas células poderiam ser as mesmas células fenólicas observadas na microscopia óptica (Figura 23).

Nas imagens obtidas de *T. obovatum*, o material protéico aparece circundado pelos espaços dos glóbulos lipídicos (Figura 20). Os grãos de amido estão em quantidade menor em relação ao *T. microcarpum*, conforme se poderia esperar pelo resultado obtido ao microscópio óptico e quanto à quantidade total de carboidratos encontrada na semente (Tabela 3).

Ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) os cortes de *T. obovatum* e *T. microcarpum* foram avaliados quanto à localização dos componentes de reserva dentro da célula.

Em *T. microcarpum*, discretos glóbulos lipídicos estão localizados próximos à membrana plasmática. A Figura 31 demonstra ainda um grande vacúolo com inclusão, preenchido com material elétron denso. Como descrito para *T. cacao* (Rühl & Biehl, 1989) *T. obovatum* também apresenta glóbulos lipídicos ocupando grande parte da célula; entre eles estão os depósitos de proteína e algumas inclusões (Figuras 26, 27 e 29).

Segundo Haddad et al. (1998), as inclusões lipídicas, ao MET, aparecem como estruturas circulares geralmente elétron-lucentes e são limitadas por uma meia unidade de membrana, uma linha que corresponde às cabeças polares das moléculas de triglicerídeos periféricas, alinhadas na interface inclusão lipídica-citoplasma celular. O Tetróxido de Ósmio utilizado na etapa de pós fixação, liga-se preferencialmente às duplas ligações dos ácido graxos insaturados, conseqüentemente, boa parte da porção saturada que constitui os lipídeos de reserva é extraída nas etapas seguintes. Portanto, maior ou menor eletrondensidade (função da quantidade de ósmio ligado) pode ser devida ao grau de insaturação dos lipídeos ou à proporção de lipídeos insaturados presentes.

Os glóbulos lipídicos de *T. obovatum* mostram um padrão distinto das outras duas espécies, com duas regiões de diferente eletrondensidade (Figuras 27 e 29). Tal padrão pode ser devido à deposição diferenciada de moléculas de triglicerídeos saturados e insaturados, permitindo assim, a formação de zonas de eletrondensidade diferentes no mesmo glóbulo.

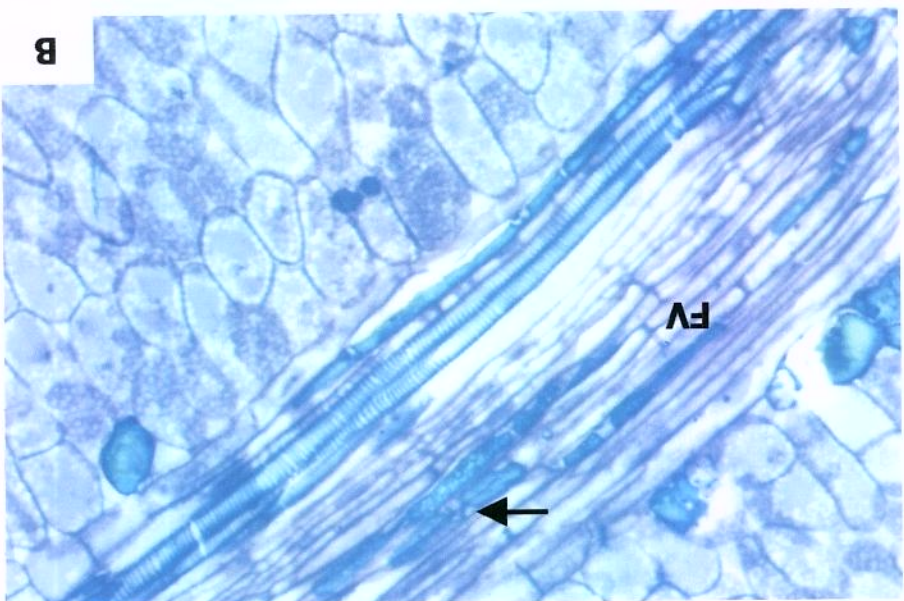


Figura 4. Constituição estrutural dos cotilédones de *Theobroma*.

Foto A – *T. obovatum* (AT pH8,0). Corte transversal mostrando as células da epiderme (E) em pleno desenvolvimento. Devido ao pequeno acúmulo de reservas e o grande vacúolo (V) nas células da epiderme, o citosol está periférico. As porções protéicas [→] estão presentes entre os espaços dos glóbulos de lipídeo (imagem negativa). (640x)

Foto B – *T. obovatum* (AT pH8,0). Corte longitudinal mostrando os feixes vasculares (FV) acompanhados por sucessivas células muito alongadas, contendo vacúolos de polifenóis [→]. (500x)

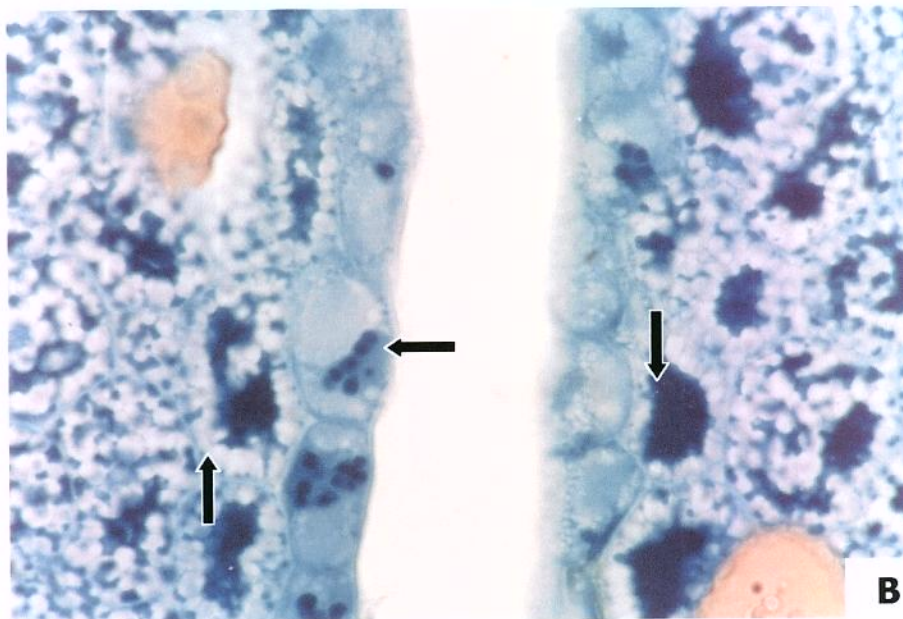
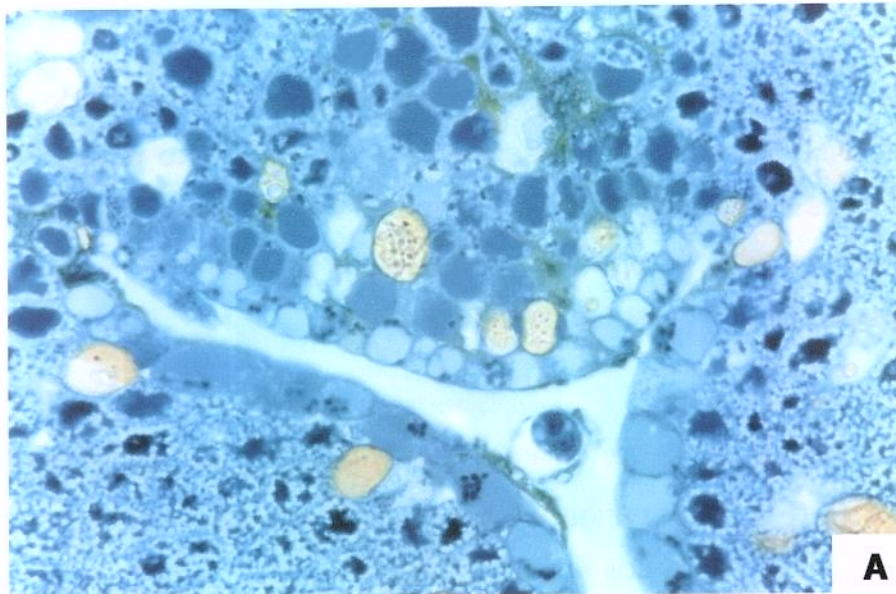


Figura 5. Cotilédone de *Theobroma cacao* corado pelo Naphthol Blue Black (NBB).

Foto A – Corte transversal mostrando o parênquima cotiledonar revestido por epiderme e a distribuição das células que produziram lipídeos e proteínas de reserva. As grandes células NBB⁻ estão amarelas e em distribuição aleatória aparente [→]. (400x)

Foto B – [↑] local dos glóbulos de lipídes. [↓] vacúolos protéicos NBB⁺ no parênquima de reserva. Nas células da epiderme nota-se a presença de glóbulos fortemente positivos ao NBB [←]. (1000x)

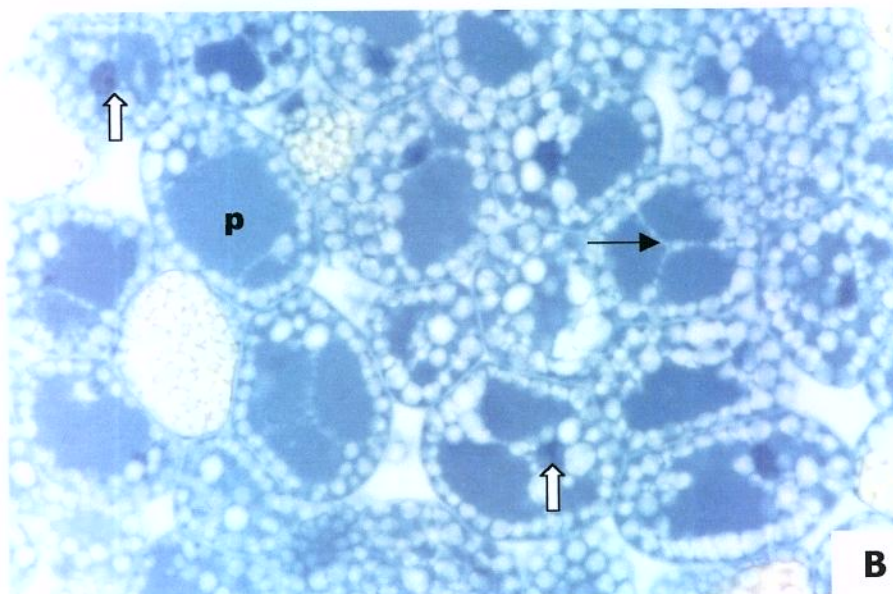
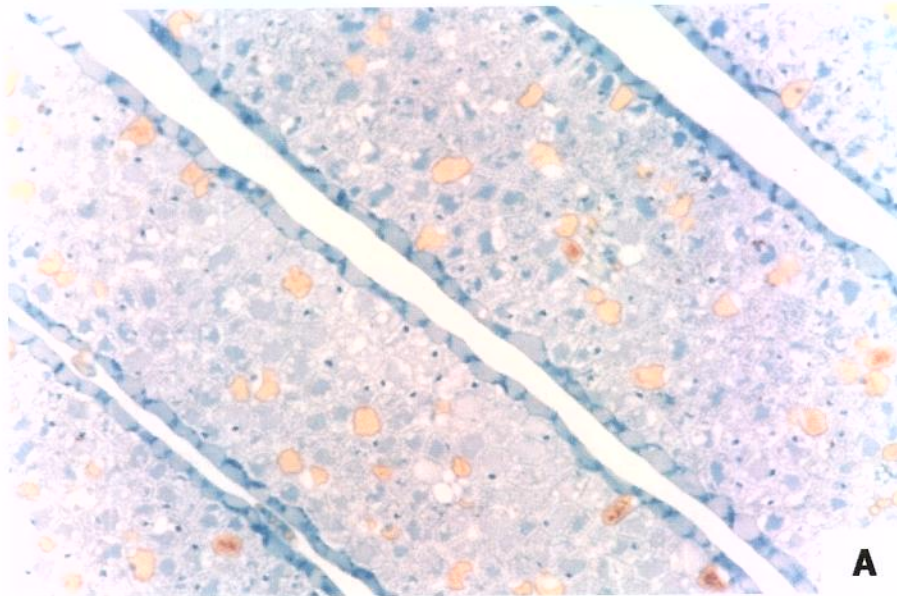


Figura 6. Cotilédone de *Theobroma obovatum* corado pelo NBB.

Foto A – *T. obovatum*. Nota-se a pequena espessura das folhas cotiledonares. (200x)

Foto B – As células cotiledonares mostram, por vezes, um formato poliédrico. Todavia são comuns os espaços intercelulares. É possível notar a secção dos vacúolos protéicos (p) pelos glóbulos de lipídeo [→], e os núcleos em algumas células [↑]. (1000x)

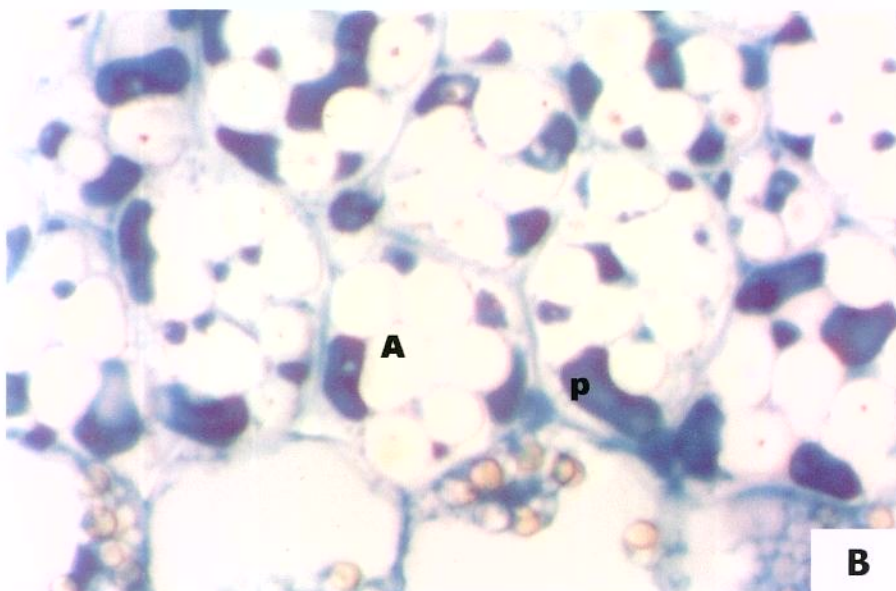
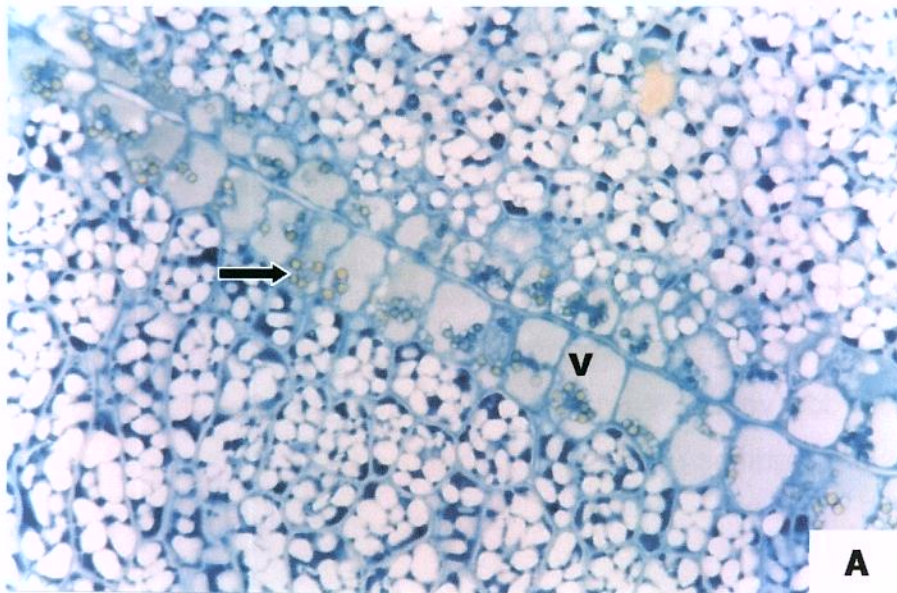


Figura 7. Cotilédone de *Theobroma microcarpum*, corado pelo NBB.

Foto A – Nas células da epiderme é possível notar a presença de glóbulos amarelos NBB^- [➡] e a predominância de um grande vacúolo (V). (400x)

Foto B – O parênquima cotiledonar possui células relativamente grandes ($\cong 575\mu\text{m}^2$) onde grãos de amido (A) com grande tamanho ($\cong 80\mu\text{m}^2$) estão distribuídos entre o material protéico (p), fortemente positivo ao NBB. (1200x)

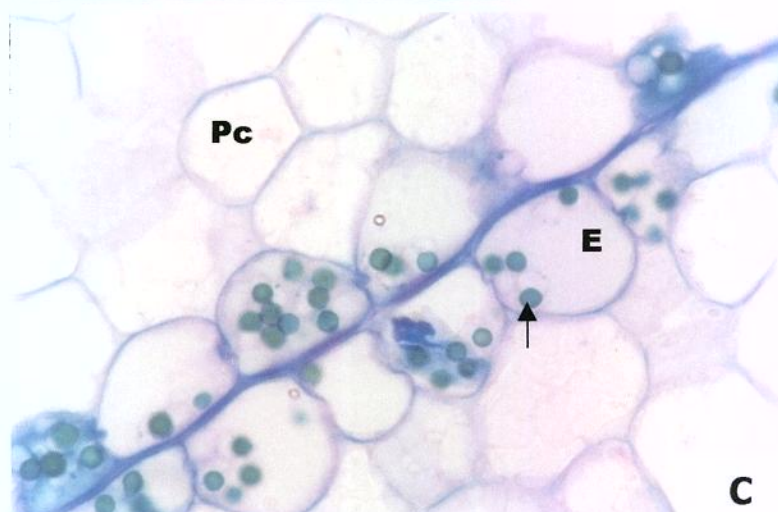
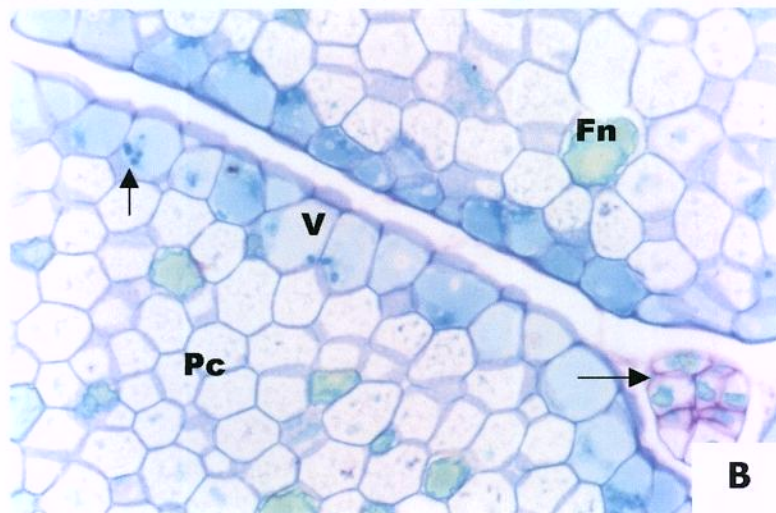
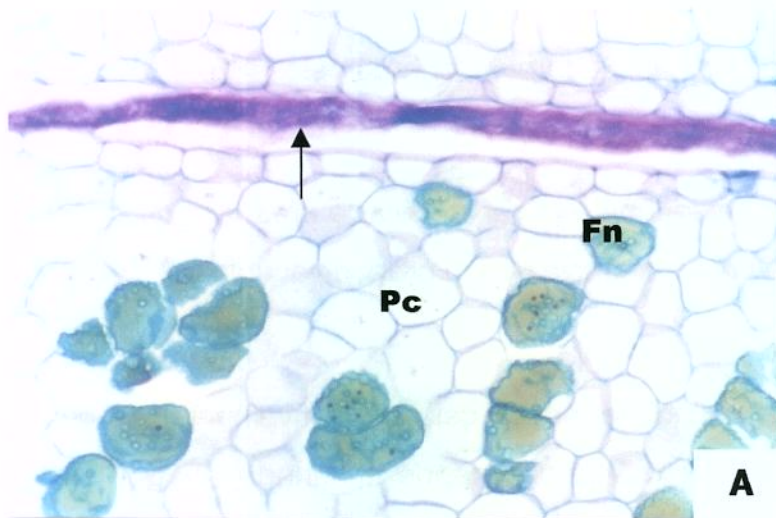


Figura 8. Reação do tecido cotiledonar ao Azul de Toluidina pH4,0.

Foto A – *T. cacao*. A mucilagem metacromática ao AT [↑] atravessa o espaço entre os cotilédones. A coloração natural dos polifenóis está mascarada pelo azul do corante. (400x)

Foto B – *T. obovatum*. Com exceção do pêlo [→], o AT delinea em azul as paredes celulares e o grande vacúolo (V) das células da epiderme. Nota-se também a presença de grânulos azuis [↑] no citoplasma destas células. (400x)

Foto C – *T. microcarpum*. Glóbulos de polifenóis nas células da epiderme [↑]. (1000x)

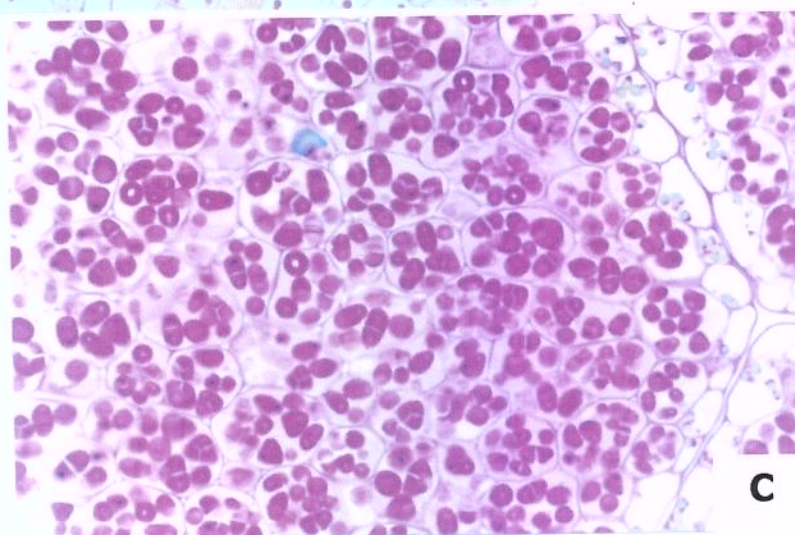
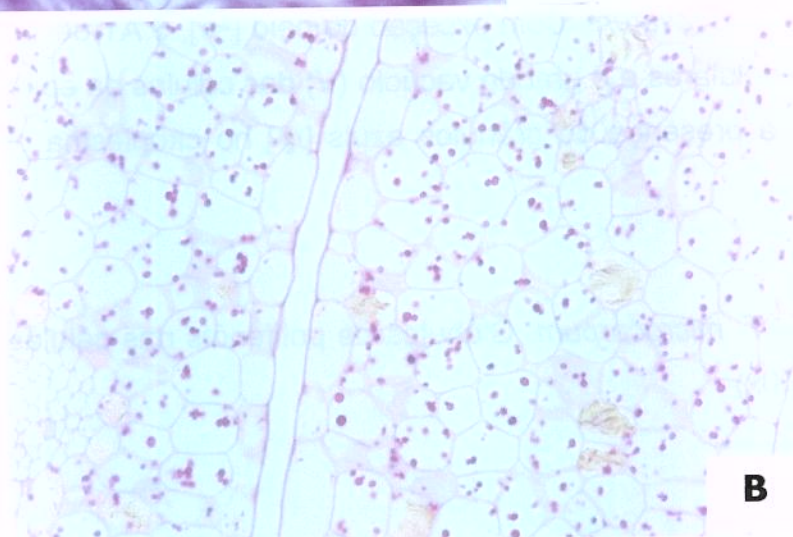
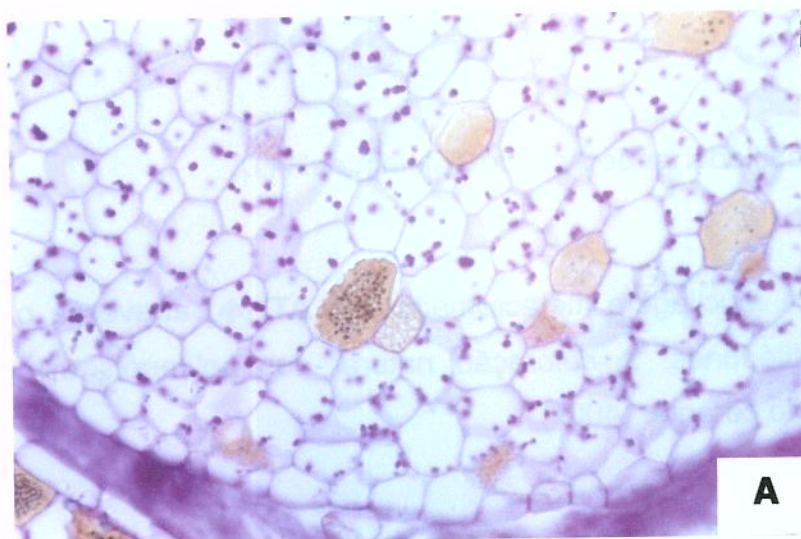


Figura 9. Ocorrência do amido nas três espécies, evidenciado pelo PAS.

Foto A – *T. cacao* (440x). B – *T. obovatum* (400x). C - *T. microcarpum* (450x). O PAS⁺ marca a prevalência dos grãos de amido em *T. microcarpum*, nota-se em *T. cacao* e *T. obovatum* que os grânulos de amido são relativamente poucos e menores quando comparados ao *T. microcarpum*.

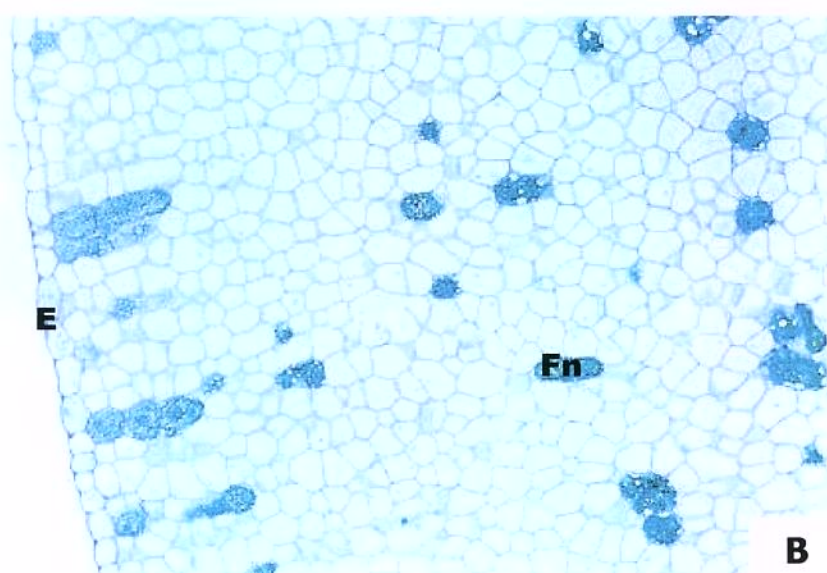
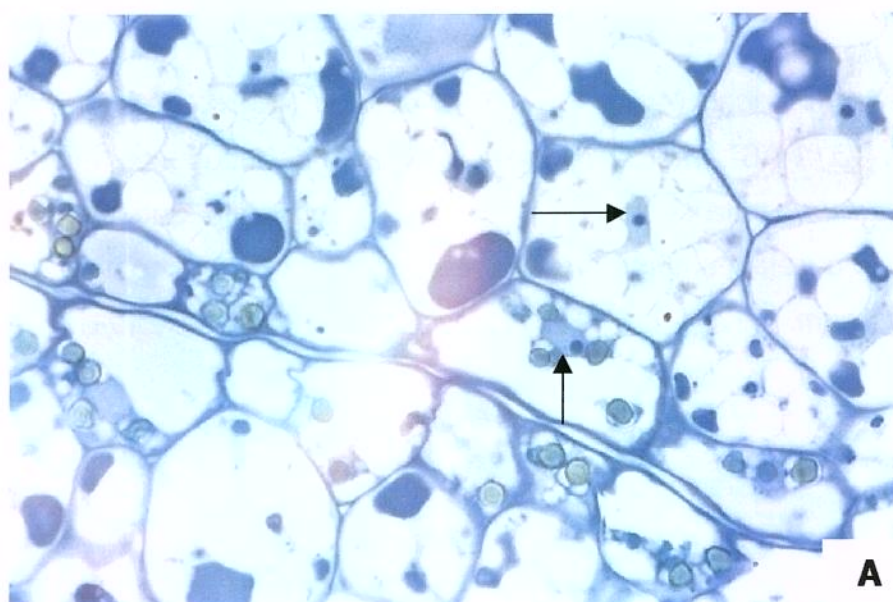


Figura 10. *T. microcarpum* e *T. cacao* corado pelo Azul de Toluidina.

Foto A – *T. microcarpum* corado pelo AT pH8,0. Nota-se a presença do núcleo nas células cotiledonares [→]. (1100x)

Foto B – *T. cacao* corado pelo AT pH4,0. Mostrando o aspecto e a disposição das células fenólicas (Fn) em relação à epiderme (E). (220x)

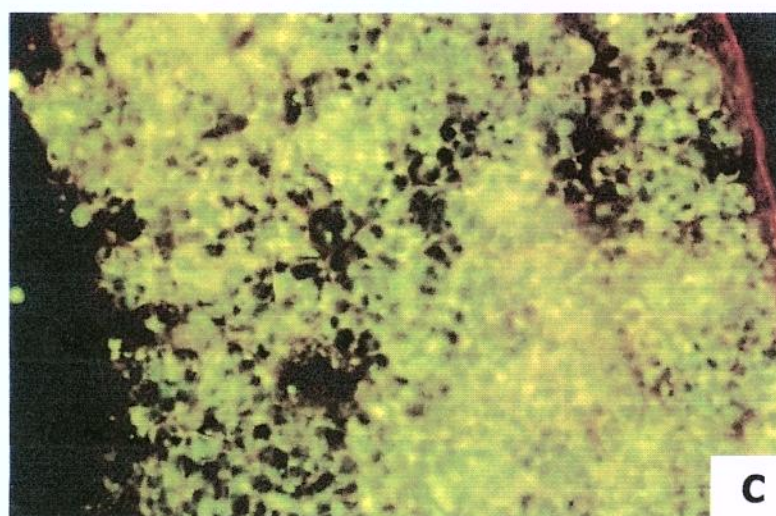
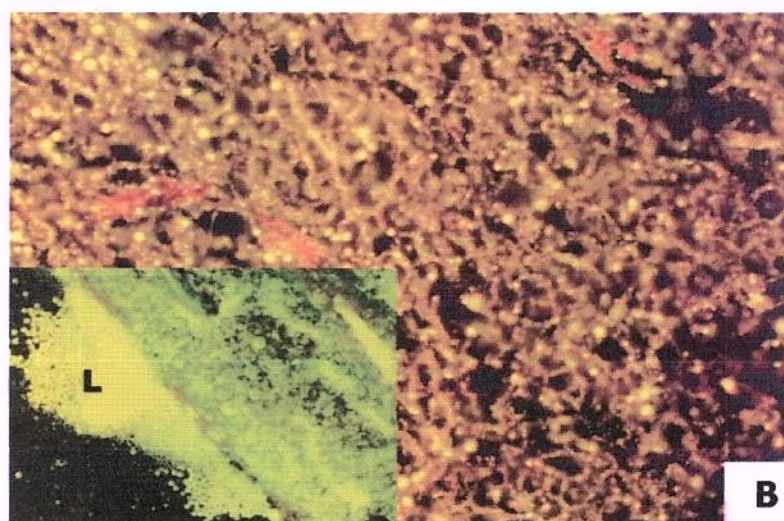
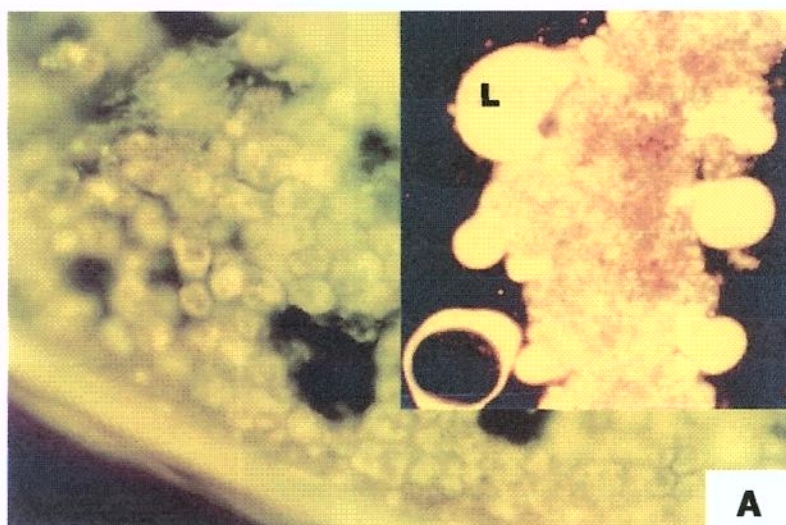


Figura 11. Fluorescência do lipídeo (Nile Red).

Foto A – *T. cacao* (500x; 320x) B – *T. obovatum* (320x) e C – *T. microcarpum* (500x). O lipídeo (fluorescência amarela) em cortes de congelação extravasa e as gotículas fundem-se rapidamente (L).

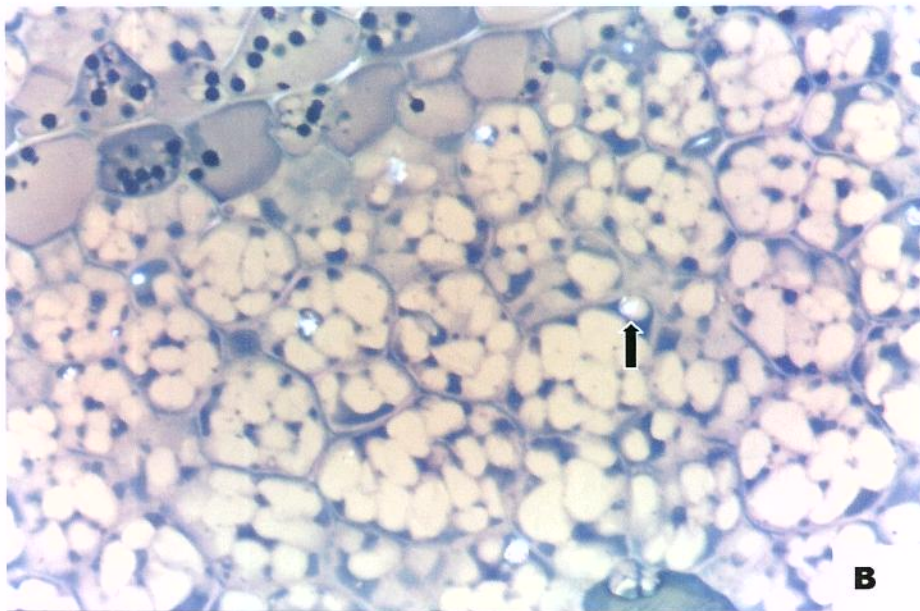
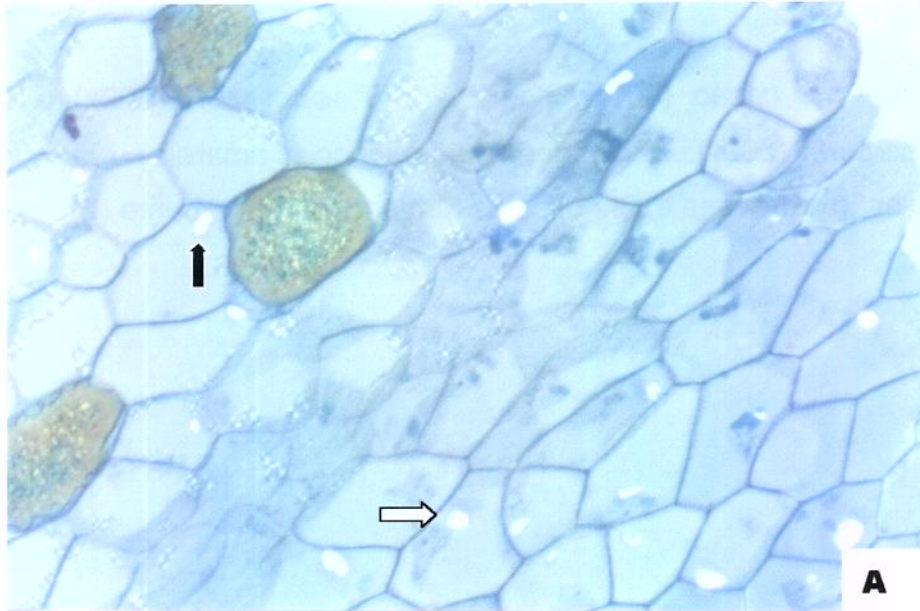


Figura 12. Presença de inclusões não protéicas.

Foto A – *T. cacao*, coloração com AT pH4,0 e polarização (650x). Foto B – *T. microcarpum*, coloração com NBB e polarização (510x) Observam-se cristais de oxalato de cálcio (inclusões do tipo drusa; NBB⁻ e AT⁻) birrefringentes sob luz polarizada [↑], dentro dos vacúolos protéicos das células de reserva das duas espécies. Em *T. cacao* também é possível notar a presença de cristais birrefringentes nas células da epiderme [⇒].

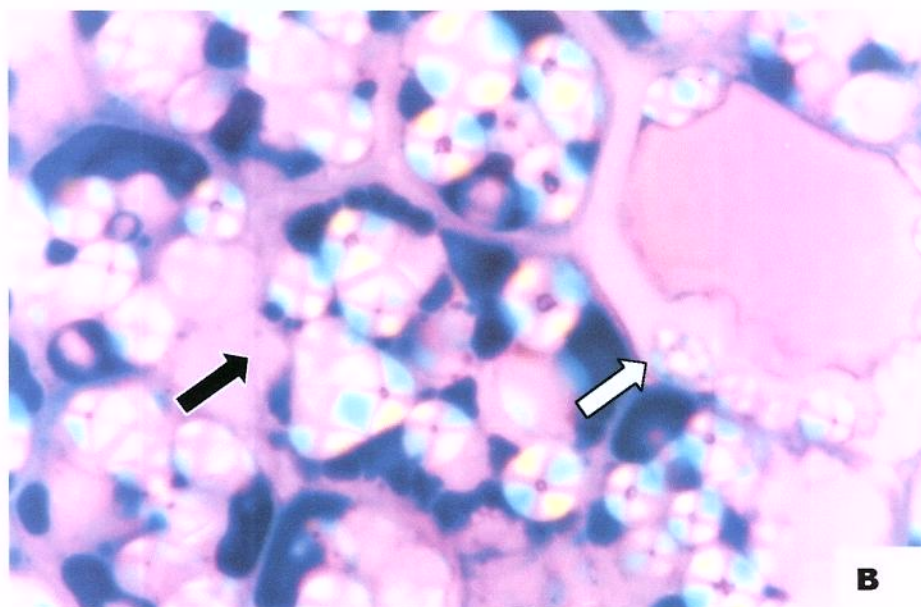
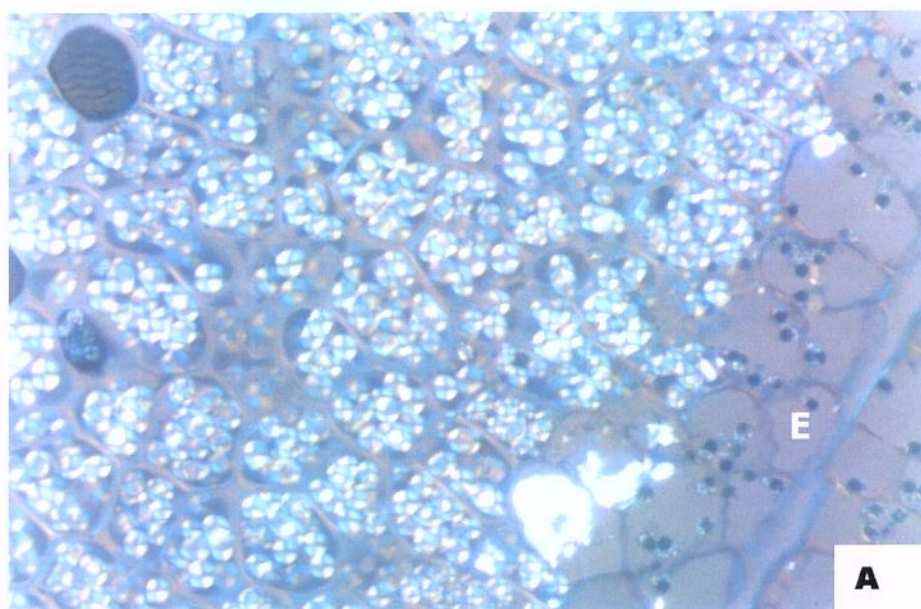


Figura 13. Cotilédones de *T. cacao* sob luz polarizada mostrando a birrefringência do amido e inclusões.

Fotos A e B –. Nota-se a distribuição do amido (→) nas células de reserva e a presença de inclusões birrefringentes (⇒). (A – 440x; B – 700x)

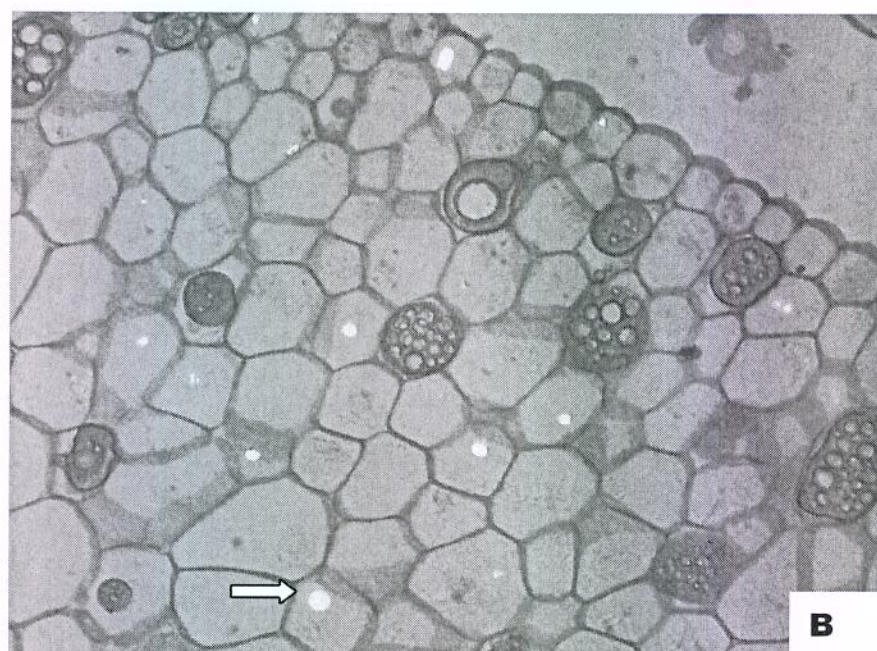
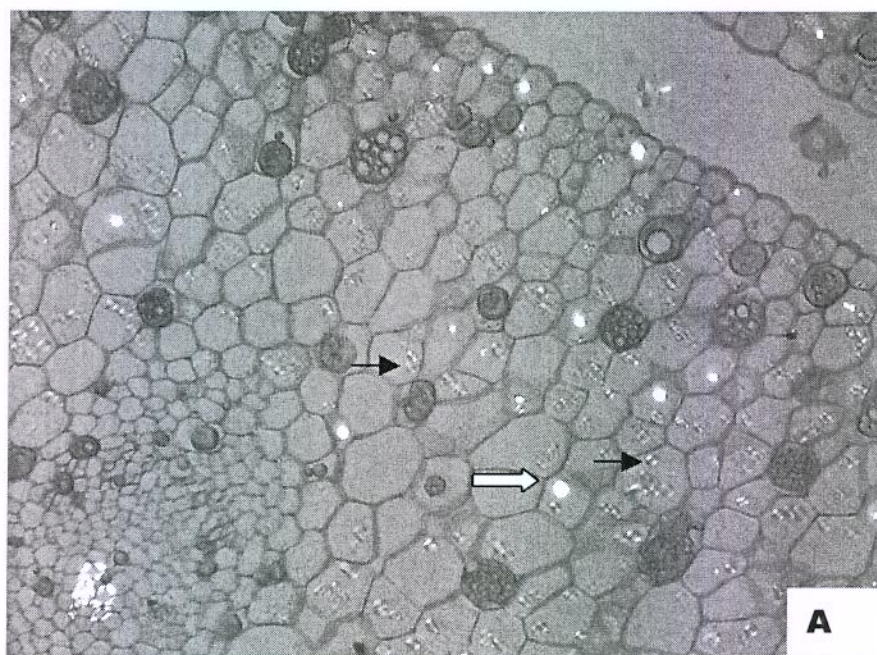


Figura 14. Cotilédones de *T. cacao* sob luz polarizada mostrando a birrefringência do amido e inclusões.

Fotos A e B –. Nota-se a distribuição do amido (→) nas células de reserva e a presença de inclusões birrefringentes (⇒). (A – 440x; B – 700x)

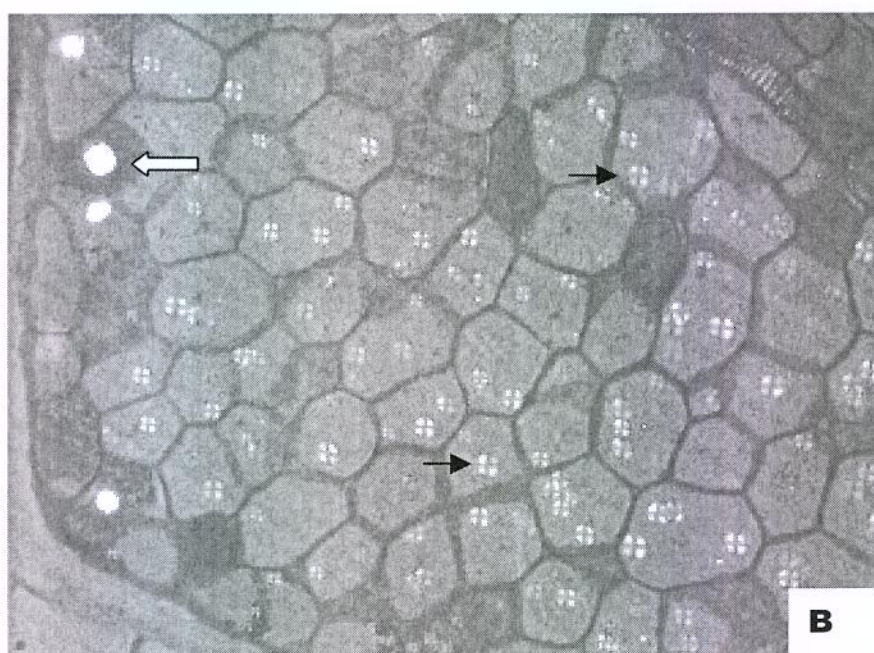
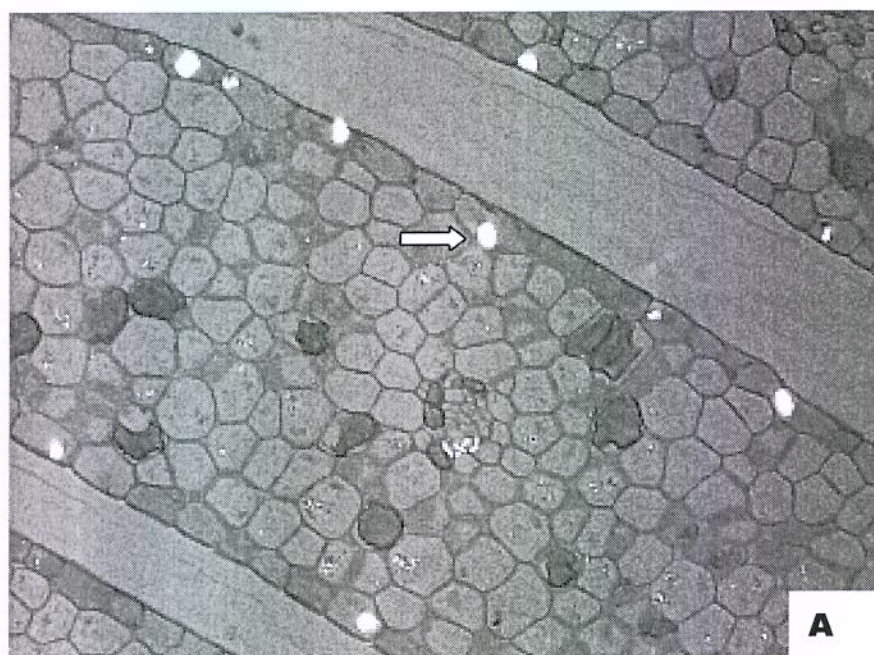
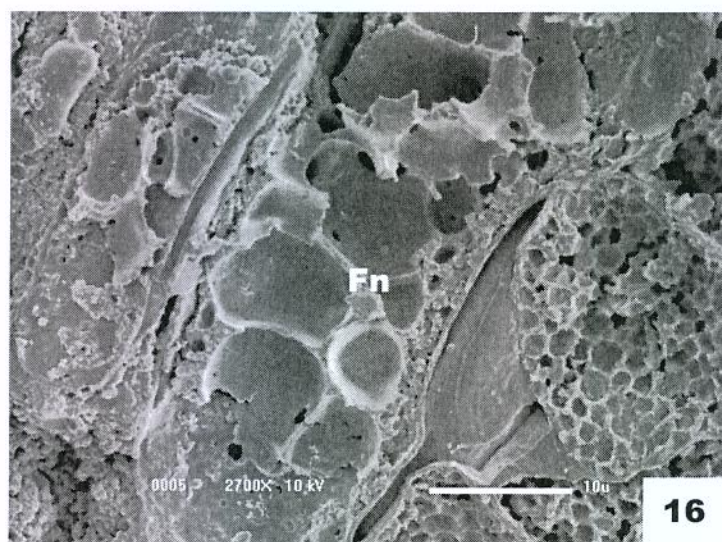
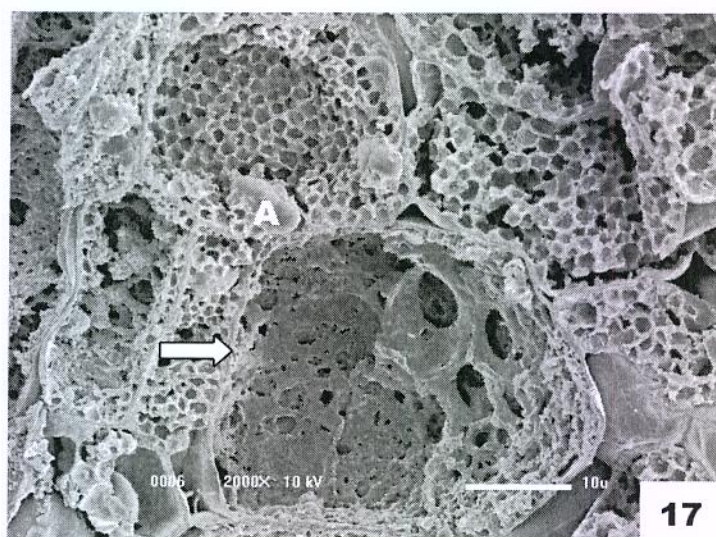


Figura 15. Cotilédones de *T. obovatum* sob luz polarizada mostrando a birrefringência do amido e inclusões.

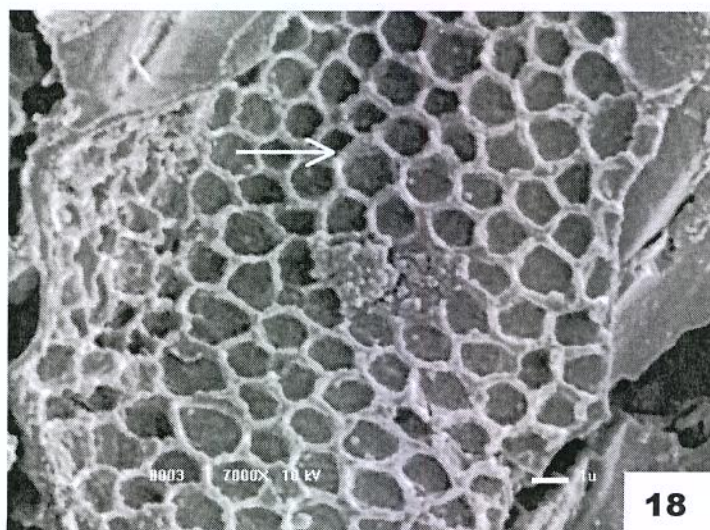
Fotos A e B –. Notam-se os grãos de amido (→) nas células de reserva e a presença de inclusões birrefringentes (⇒) nas células da epiderme. (A – 440x; B – 700x)



16



17



18

Figura 16. *T. cacao*, MEV (2700x).

Nota-se a célula de reserva do parênquima cotiledonar e a célula fenólica (Fn) adjacente exibindo, neste caso, o conteúdo formado por glóbulos grandes, possivelmente revestidos por membrana lipoprotéica.

Figura 17. *T. cacao*, MEV (2000x).

Os grânulos de amido são escassos (A) e estão, neste exemplo, em células onde predominam os lipídeos. Logo abaixo se observa a grande célula [⇒], possivelmente de polifenol, que nesta espécie é geralmente maior que as células de reserva.

Figura 18. *T. cacao*, MEV (7000x).

Detalhe da rede protéica [→] com espaços regulares anteriormente ocupados pelos glóbulos lipídicos, extraídos pela acetona após a fixação da amostra.

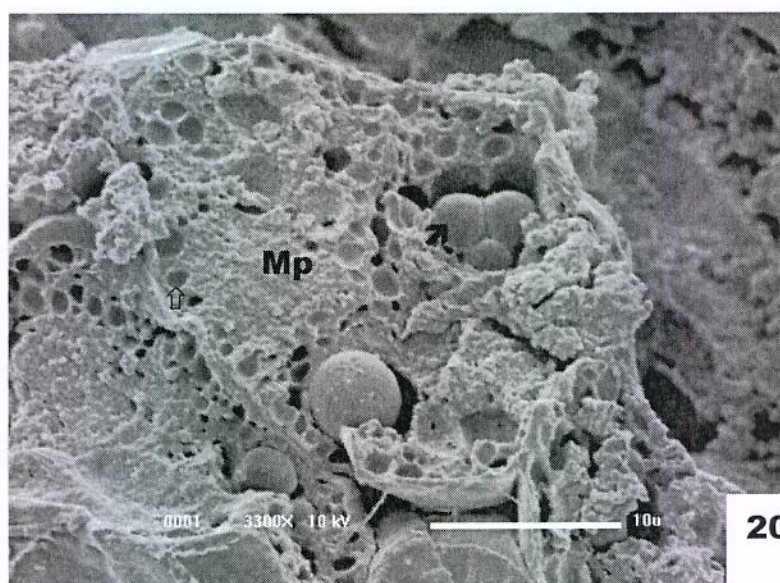
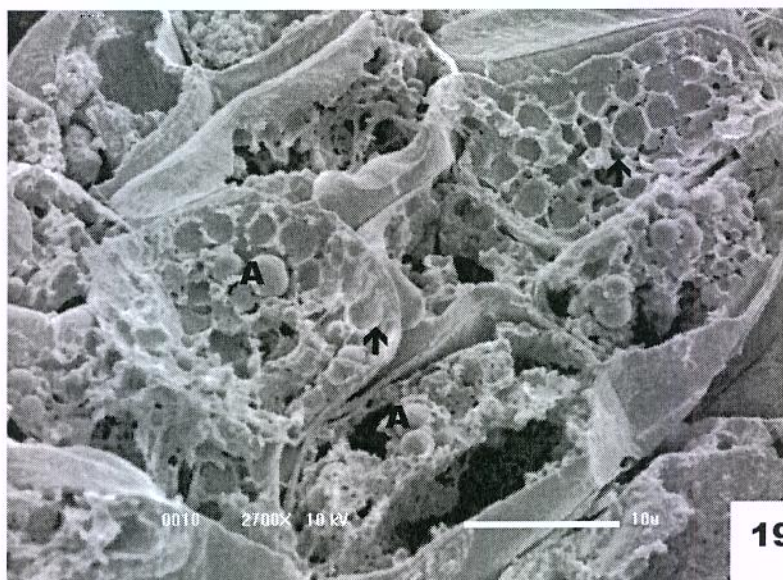


Figura 19. *T. obovatum*, MEV (2700x).

As células de reserva em *T. obovatum* também apresentam os espaços vazios (↑) na matriz protéica, antes ocupados pelos glóbulos de lipídeo. Os grãos de amido (A) estão imersos na mesma matriz..

Figura 20. *T. obovatum*, MEV (3300x).

A disposição das gotículas de lipídeo (↑), adjacentes à parede celular, é típica e ocasionalmente a matriz protéica (Mp) formará massas centrais. As setas (↗) indicam grãos de amido.

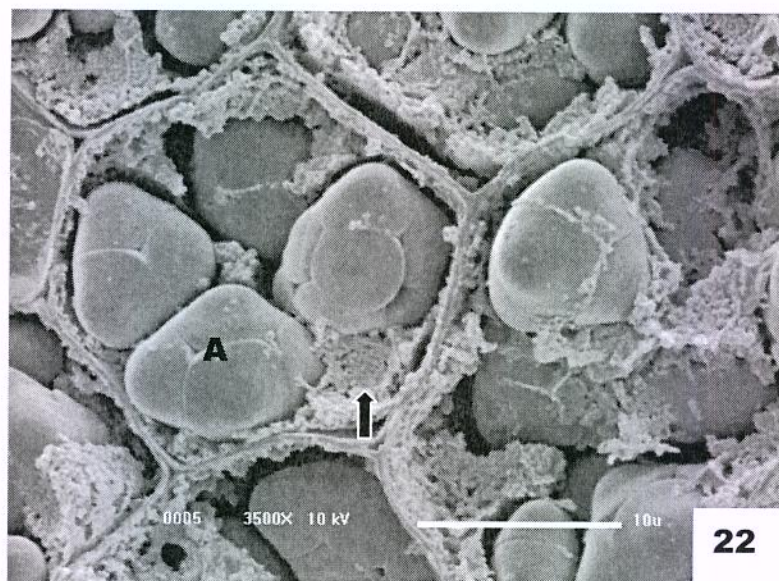
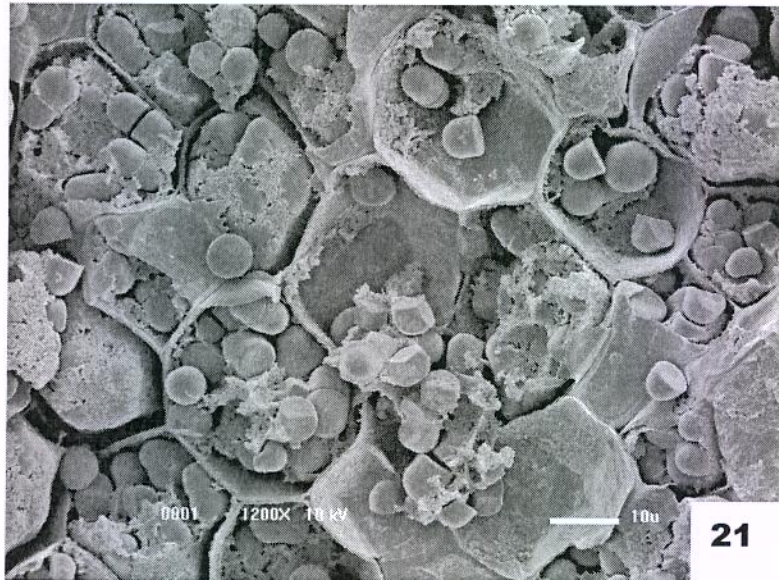


Figura 21. *T. microcarpum*, MEV (1200x).

Pode-se observar o formato poligonal das células ricas em amido.

Figura 22. *T. microcarpum*, MEV (3500x).

Nota-se que o amido está armazenado sob a forma de grânulos compostos e sua proporção em relação à matriz protéica (↑) é evidentemente maior.

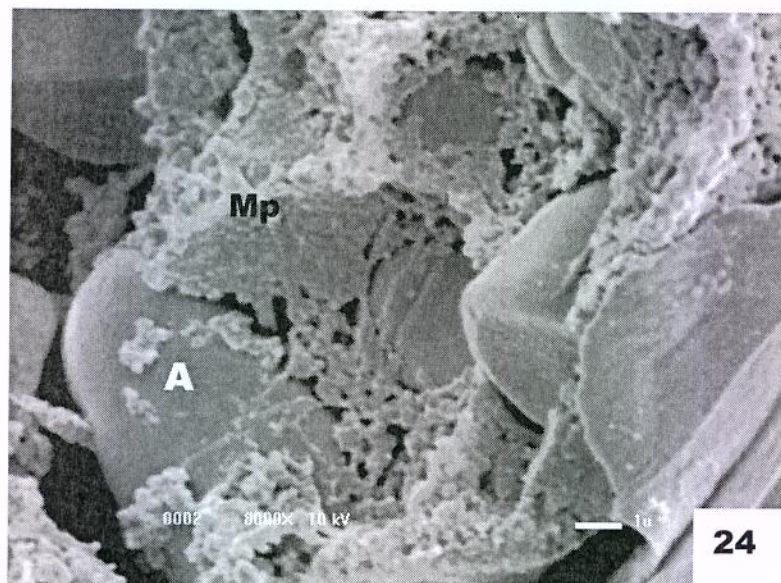
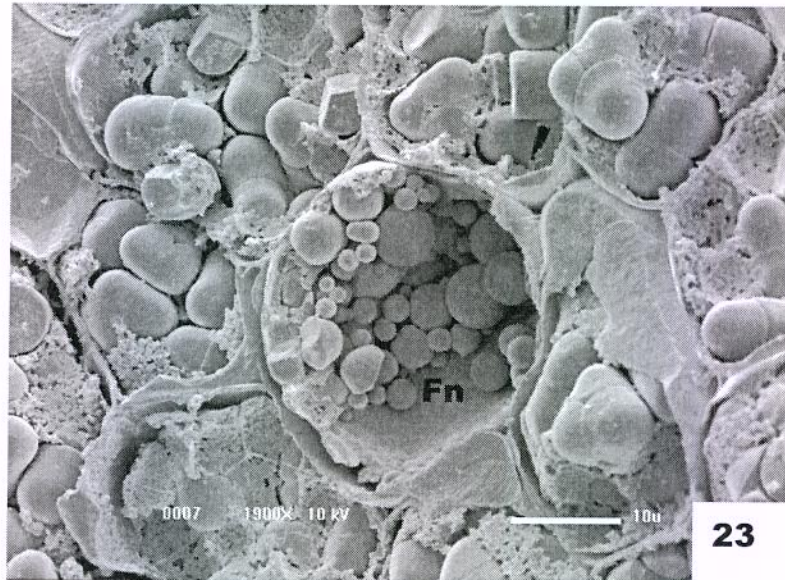


Figura 23. *T. microcarpum*, MEV (1900x).

Ao centro nota-se a célula distinta das demais, possivelmente uma célula fenólica (Fn) que em *T. microcarpum* é maior e freqüentemente observada isolada em meio às células de reserva.

Figura 24. *T. microcarpum*, MEV (8000x).

Detalhe da matriz protéica (Mp) envolvendo os grãos de amido (A); ao MEV, a proteína se mostrou menos compactada em relação às duas outras espécies estudadas.

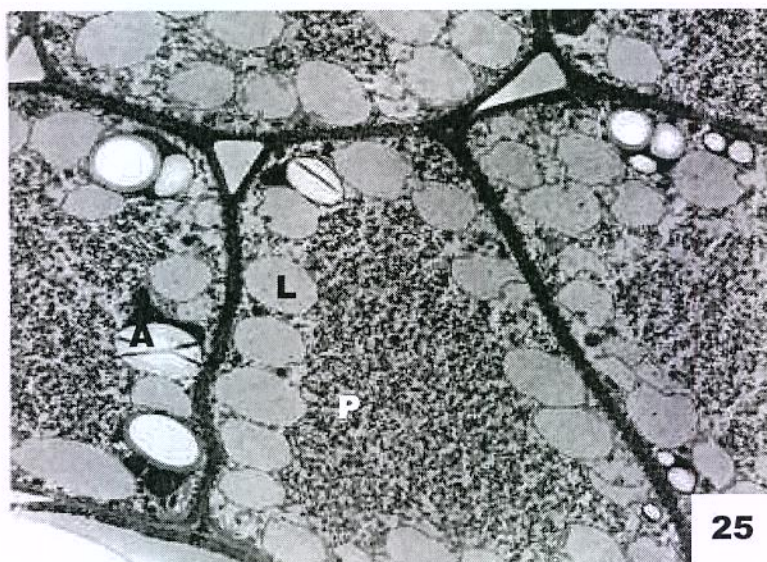


Figura 25. *T. cacao* em estágio de maturação incompleta, MET (3500x).

Ultraestrutura da célula do parênquima de reserva de *T. cacao** em estágio de maturação incompleta, para efeito ilustrativo. Nota-se o padrão de deposição das reservas de lipídeo e proteína, nesse estágio a proteína (p) aparece circundada pelos glóbulos de lipídeo (L) . Nota-se ainda a presença de pequenos grãos de amido (A). (*Foto cedida por Martini, M. H., dados não publicados)

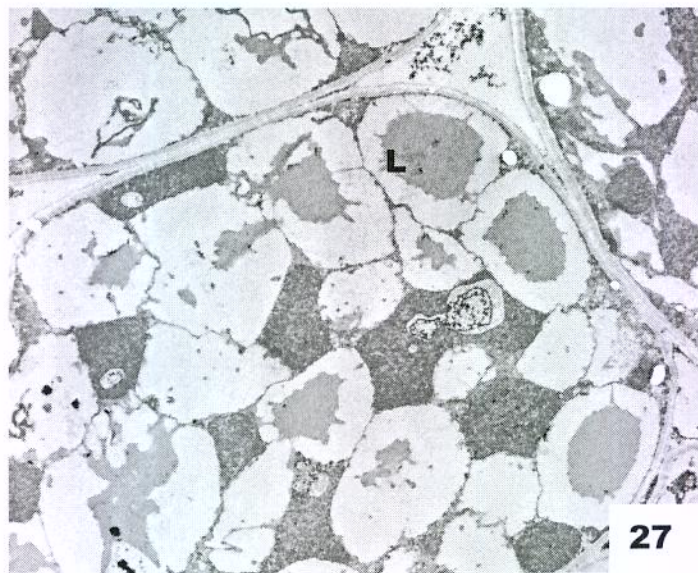


Figura 26. *T. obovatum*, MET (3500x).

Nota-se duas porções de células da epiderme (E), com características de célula jovem onde se distinguem organelas citoplasmáticas (➡), alguns cristais (⏚), dois glóbulos de fenol (F) e pequenas vesículas próximas à parede. O segundo tipo presente corresponde às células do parênquima de reserva nas quais é possível observar glóbulos de lipídeo (L) e vacúolos protéicos (p) comprimidos entre eles.

Figura 27. *T. obovatum*, MET (4500x).

Nota-se o padrão dos glóbulos lipídicos de *T. obovatum*, com a formação de duas porções de eletrondensidade diferentes (L). A matriz protéica apresenta densidade regular e porções alteradas.

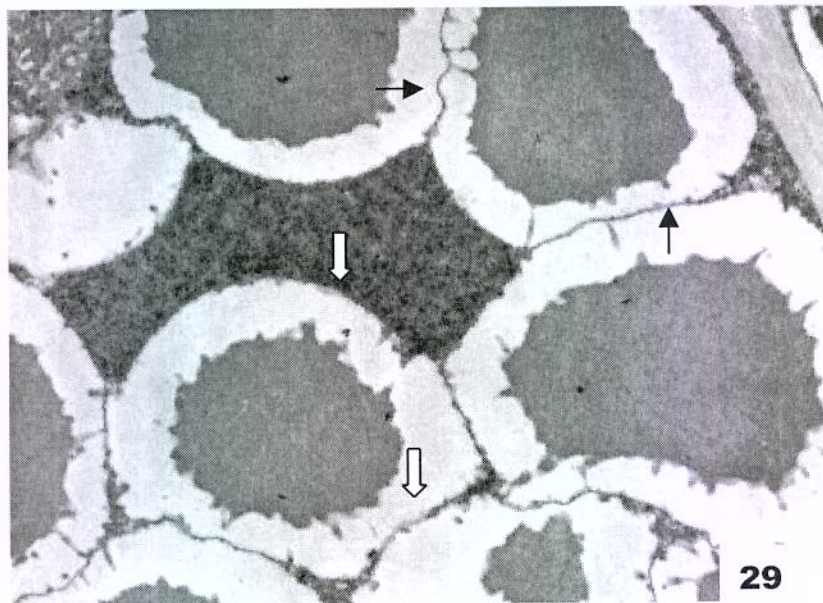
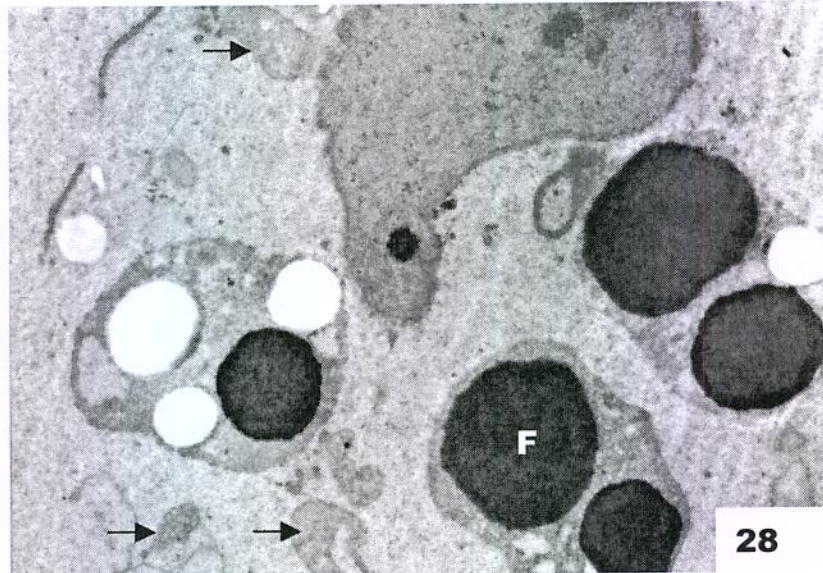


Figura 28. *T. obovatum*, MET (9600x).

Nota-se a presença de glóbulos de polifenol elétron densos (F), circundados por estrutura possivelmente protéica. As setas apontam mitocôndrias imersas na matriz.

Figura 29. *T. obovatum*, MET (12400x)

Em maior aumento percebe-se a formação de uma falsa membrana [→] ao redor dos glóbulos lipídicos. [⇔] indica os locais de descontinuidade dessa membrana, sugerindo que sejam apenas artefatos protéicos.

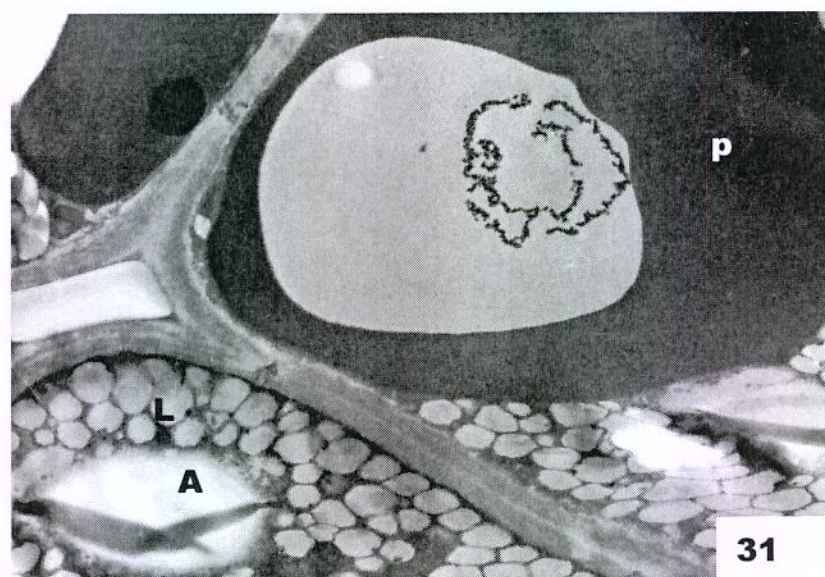
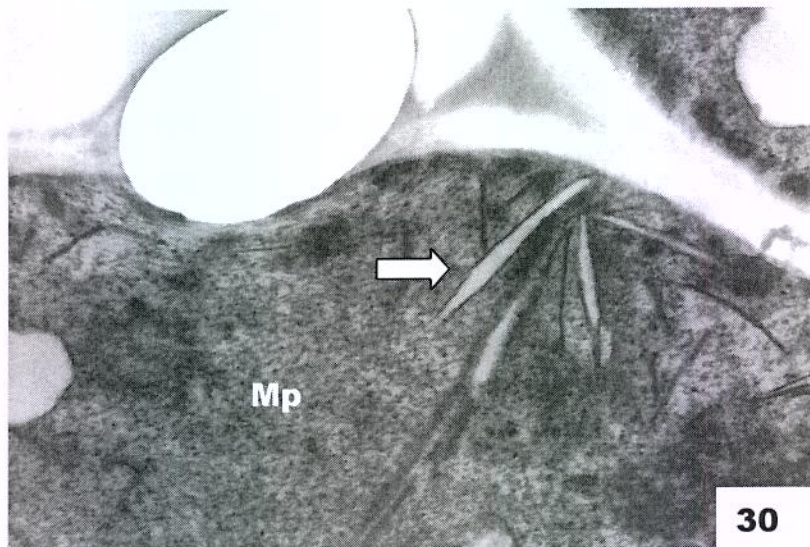


Figura 30. *T. obovatum*. (26700x)

[⇒] indica a presença de cristais imersos na matriz protéica.

Figura 31. *T. microcarpum*, MET (9000x).

As células do parênquima de reserva apresentam pequenos glóbulos lipídicos próximos à membrana (L) e duas porções elétrons densas possivelmente vacúolos protéicos (p) com inclusão. (A – amido)

5.6. Resultados da Análise de Imagem

A análise de imagem permitiu a comparação do tamanho das células e grãos de amido entre as três espécies (Tabela 5). A área média foi calculada através da seguinte equação:

$$\mu_A = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n}$$

Onde:

μ_A = área média dos grãos (ou células)

A = área de um grão (ou célula)

n = número de grãos (ou células) observados

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenças significativas entre as médias foram determinadas através do teste de Tukey por comparação múltipla ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Como já era esperado pelas observações ao microscópio óptico, *T. microcarpum* tem células e grãos de amido maiores que as outras duas espécies. Em *T. cacao* foi observada uma variação intraespecífica no tamanho dos grãos de amido das amostras de diferente origem geográfica (Tabela 5).

A avaliação da proporção de células fenólicas no tecido cotiledonar revelou resultados semelhantes aos obtidos na análise colorimétrica de fenóis totais. Os valores encontrados estão expressos na Tabela 5.

Considerando a especificidade dos métodos citoquímicos, a análise de imagem por software poderia ser avaliada como um método alternativo na determinação da proporção dos componentes de reserva em tecidos vegetais.

Tabela 5: Resultados da análise de imagem.

	Área Média (μm^2)			Proporção de células fenólicas (%)
	Célula de reserva	Célula fenólica	Grão de amido	
<i>T. cacao</i>	395,1 $\pm$ 97,1 ^a	540,1 $\pm$ 182,9 ^a	9,6 $\pm$ 2,9 ^a	7,39 $\pm$ 0,64
			*37,1 $\pm$ 10,5 ^b	
<i>T. obovatum</i>	310,2 $\pm$ 89,2 ^b	389,3 $\pm$ 94,2 ^b	8,6 $\pm$ 3,7 ^a	5,51 $\pm$ 0,14
<i>T. microcarpum</i>	543,2 $\pm$ 133,3 ^c	786,7 $\pm$ 132,6 ^c	79,9 $\pm$ 19,9 ^c	2,41 $\pm$ 0,49

* média *T. cacao* grupo 2.

Valores: média $\pm$ desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES

T. cacao, *T. obovatum* e *T. microcarpum* guardam características específicas no que se refere à morfologia de fruto e semente. Tamanho, forma e coloração dos frutos são diferentes entre as três espécies assim como a anatomia dos cotilédones.

Nas três espécies de *Theobroma* os glóbulos lipídicos estão mais próximos à periferia das células, circundando o material protéico e os grãos de amido. Os mesmos glóbulos mostraram-se instáveis, coalescendo após alguns minutos de exposição do material fresco ao microscópio óptico. Assim como descrito para *T. cacao* (LePrince et al., 1998) parece não haver uma membrana composta por proteínas estruturais (oleosinas) delimitando os glóbulos lipídicos de *T. obovatum* e *T. microcarpum* o que explicaria sua rápida fusão.

Do ponto de vista morfológico, pode-se observar alguma semelhança entre as células que compõe o parênquima de reserva de *T. cacao* e *T. obovatum*. No entanto, as duas espécies guardam diferenças quanto ao tamanho das células e proporção de células fenólicas no tecido; porém os tamanhos dos grãos de amido das sementes do grupo G1 dessas duas espécies não são diferentes ao nível de significância de 5%.

6.1. *Theobroma cacao* L.

- Entre as sementes das espécies analisadas, *T. cacao* tem a maior expressão de compostos fenólicos (8% em média);
- O principal componente de reserva é o lipídeo (média de 49%), seguido das proteínas (média de 27%);

- O material protéico pode ser encontrado em grandes vacúolos ora ocupando a porção central da célula ora comprimido entre os glóbulos de lipídeo;
- Em *T. cacao* as inclusões não protéicas estão presentes no parênquima de reserva e nas células epidérmicas.

6.2. *Theobroma obovatum*

- Lipídeo é o principal componente de reserva das sementes de *T. obovatum* (cerca de 60%); o teor de proteína atinge aproximadamente 25% na semente seca;
- Em *T. obovatum* é comum a presença de inclusões não protéicas, birrefringentes, nas células que constituem a epiderme dos cotilédones; tais inclusões não foram observadas com frequência nas células do parênquima cotiledonar.

6.3. *Theobroma microcarpum*

- *T. microcarpum* diferiu das outras 2 espécies na maior parte dos aspectos analisados neste estudo, os resultados corroboram com a hipótese de evolução paralela em outra direção, que pode ter favorecido a síntese do amido como principal componente de reserva das sementes;
- O lipídeo tem baixa expressão nas sementes de *T. microcarpum* (6,54%);
- Inclusões de natureza não protéica, birrefringentes sob luz polarizada, são freqüentes nos vacúolos protéicos das células do parênquima de reserva;
- A espécie apresentou células e grãos de amido maiores em relação às outras duas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDISON, G. O. & TAVARES, R. M. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**, Belém, v. 25, p. 3-20, 1951.

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Methods for analysis of musts and wines**. 2. ed. New York: Wiley & Sons Inc., s.d. 337p.

AMIM, S. J. I. & JAMILAH, B. Vicilin-class globulins and their degradation during cocoa fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 1-5, 1997.

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

ARNOTT, H. J.; WEBB, M. A. Scanning electron microscopy and histochemistry of oilseeds. In: BECHTEL, D. B. (Ed.). **New frontiers in food microstructure**. St. Paul: AACC, 1983. cap. 5, p. 149-198.

ASHIHARA, H. & CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 407-413, 2001.

BARNETT, V. **Elements of Sampling Theory**. London: The English Universities Press, 1974. 152p.

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. 443p.

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

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1994. 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**, Itabuna, 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, 1982a.

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, 1982c.

BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; ZIEGELER-BERGHAUSEN, H.; 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 Botanik**, Berlim, v. 67, p. 59-65, 1993.

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.

BROWSE, J., & SOMERVILLE, C. R. Glycerolipid biosynthesis: biochemistry and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 467-506, 1991.

BYTOF, G.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; VOIGT, J. Specific and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, Oxford, v. 54, p. 15-21, 1995.

CARPENTER, D.R.; HAMMERSTONE, J. F., Jr.; ROMANCZYK, L. J., Jr.; AITKEN, W. M. Lipid composition of *Herrania* and *Theobroma* seeds. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 71, n. 8, p. 845 – 851, 1994.

CHASERI, S.; ARRUDA, D. H.; DIMICK, P. S.; ENRIQUEZ, G. A. Thermal characteristics and composition of fats from *Theobroma* species. **Turrialba: Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas**, San Jose, v. 39, n. 4, 468-472, 1989.

CHANDEL, K.P.S.; CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S.K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of Botany**, London, v. 76, p. 443 – 450, 1995.

COCHRAN, W. G. **Sampling Techniques**. 3. ed. New York: J. Wiley, 1977. 428p.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1981. 658p.

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

CORTELAZZO, A. L. **Caracterização topoquímica e bioquímica de sementes de *Canavalia ensiformes* DC e *Canavalia gladiata* DC**. Campinas, 1989. n. 140. Tese (Doutor em Ciências) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

CROS, E. Cocoa flavor development: effects of post-harvest processing. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, p. 70-77, Feb., 1999.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions From The United States National Herbarium**, Washington, v. 35, p. 379 – 614, 1964. Apud **Melhoramento genético do cacau**. Goiás: FUNAPE-UFG, 2001. p.49-80.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2. ed. New York: John Wiley, 1977. 550p.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, p. 135 – 144, 1997.

FERNÁNDEZ BARBERY, S. D. Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (*Annona squamosa* L.) e tratamento térmico não convencional. Campinas, 1999. 76 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580p.

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

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.

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.

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

HAMMERSTONE Jr, J. F.; ROMANCZYK Jr, L. J.; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. **Phytochemistry**, New York, v. 35, n. 5, p. 1237–1240, 1994.

HARRIS, J. R. **Electron microscopy in biology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1991. 308p.

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

HERNANDEZ, B.; CASTELLOTE, A. I.; PERMANYER, J. J. Triglyceride analysis of cocoa beans from different geographical origins. **Food Chemistry**, Oxford, v. 41, p. 269-276, 1991.

HIGGINS, T.J.V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 191-221, 1984.

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 other 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.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1336, p. 323-330, 1997.

JAENICKE, J. Elektronenmikroskopische untersuchungen an embryonen von *Theobroma cacao* L. (kakao) wahrend der embryogenese und der samenkeimung. Hannover, 1973. 120p. Tese (Doutor em Ciências Naturais), Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade Técnica de Hannover.

KING, M. W. & ROBERTS, E. H. The imbibed storage of cocoa (*Theobroma cacao*) seeds. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 10, p. 535-540, 1982.

LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Chichester: J. Wiley, 1993. 312p.

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.

LIENDO, R.; PADILLA, F. C.; QUINTANA, A. Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. **Food Research International**, Essex, v. 30, n. 9, p. 727-731, 1997.

- LING-LEE, M.; CHILVERS, G. A.; ASHFORD, A. E. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane and Maiden. **New Phytologist**, Cambridge, v. 78, 313-328, 1977.
- MÜLLER, S.; ROHSUIS, C.; REISDORFF, C. GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R. Anatomical and physiological Characteristics of *Theobroma spec.* seeds and their relevance to processing. **Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu (Malaysia), 2000.
- MUMFORD, P. M. & BRETT, A. C. Conservation of cacao seed. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 59, n. 4, p. 306–310, October, 1982.
- MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 298, p. 605-622, May, 1996.
- MÜNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 77-99, 1998.
- NEVES, C.S.V.J. Sementes recalcitrantes - revisão de literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1459-1467, 1994.
- NORMAH, M. N.; RAMIYA, S. D.; GINTANGGA, M. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on tropical fruit species. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, p. 179-183, 1997.
- O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure, principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi, 1981.
- PATE, J. S.; RASINS, E.; RULLO, J.; KUO, J. Seed nutrient reserves of proteaceae with special reference to protein bodies and their inclusions. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 747–770, 1986.

PATEL, V. K.; SHANKLIN, J.; FURTEK, D.B. Changes in fatty-acid composition and stearyl-acyl carrier protein desaturase expression in developing *Theobroma cacao* L. embryos. **Planta**, Berlim, v. 193, p. 83-88, 1994.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and applied. London: 3ed., 1968.

PERNOLLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry**, New York, v. 17, p. 1473-1480, 1978.

PRICE, M. L. & BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

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. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 8, p. 225 – 296, 1958.

RÜHL, G. & BIEHL, B. Untersuchungen zu den ursachen der kühlungs- und trocknungsempfindlichkeit tropischer samen am beispiel des kakao: ultrastruktur des speicherparenchyms der kotyledonen trocknender kakaosamen. **Landbauforschung Völkenrode**, Braunschweig, v. 39, n.1, p. 15 – 27, 1989.

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. 555-557, 1980.

- SHIRLEY, B. W. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, 415-422, 1998.
- 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 cacauero**. Goiás: FUNAPE-UFG, 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.
- SOTELO, A & ALVAREZ, R. G. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cocoa bean. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 39, p. 1940-1943, 1991.
- HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTÍAS, 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.
- VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amendôas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Campinas, 1999. 114 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular & Molecular Biology**, Noisy Le Grand, v. 22, p. 45 – 64, 1977.

VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 347p.

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

VOIGT, J.; WRANN, D.; HEINRICHS, H.; BIEHL, B. The proteolytic formation of essential cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. **Food Chemistry**, Oxford, v. 51, p. 197–205, 1994.

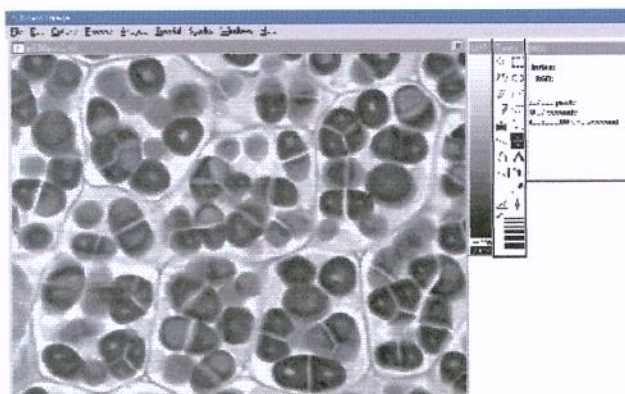
VOIGT, J. & BIEHL, B. Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class (7s) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 108, p. 283-289, 1995.

WERKER, E. **Seed Anatomy**: encyclopedia of plant anatomy. Stuttgart: Borntraeger, 1997. 424p.

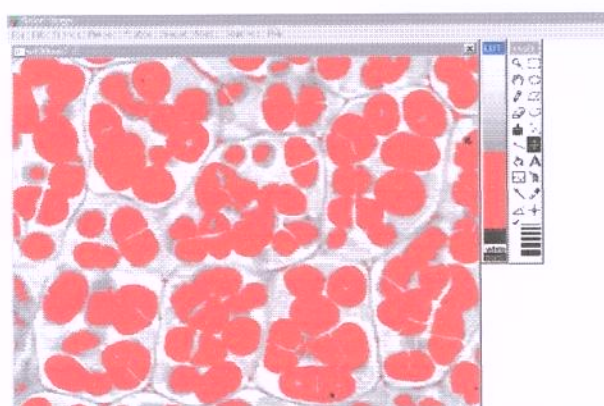
WOLLGAST, J. & ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, v.33, p. 423-447, 2000.

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

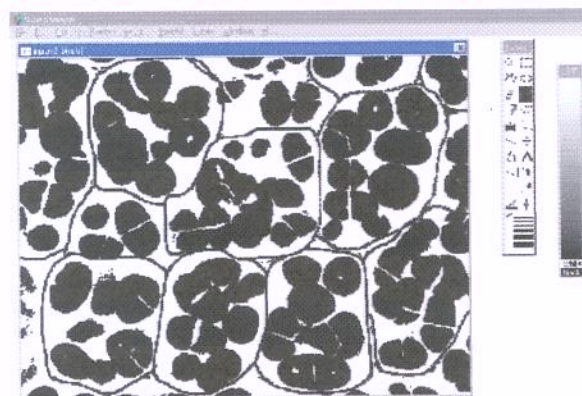
ANEXO 1



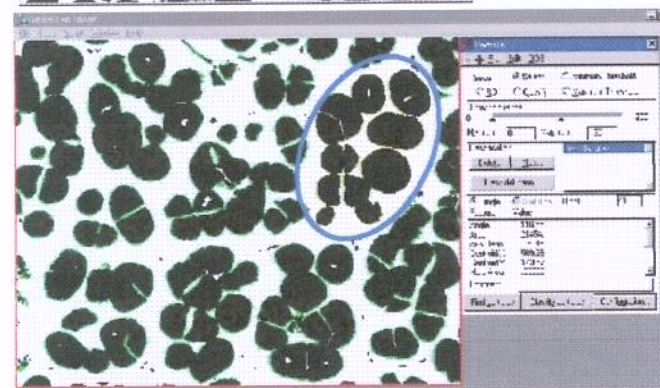
1. Exibição de tela: imagem do tecido cotiledonar de *T. microcarpum* (PAS) em analisador de imagens *Scion Image*.



2. Exibição de tela: *density slice*, marcando os grãos de amido, por correspondência de cinza.

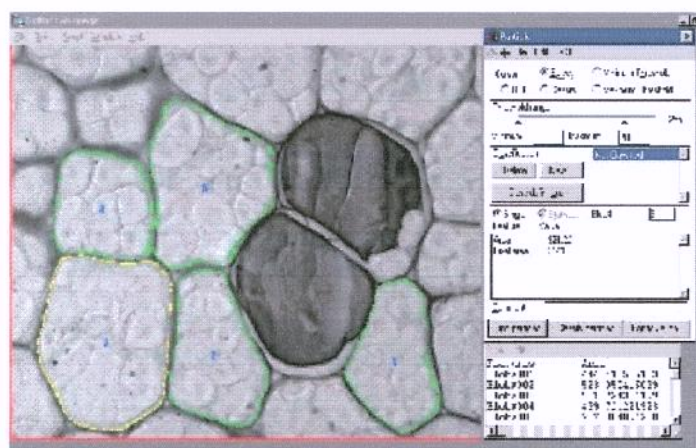


3. Exibição de tela: imagem binária gerada e delimitação manual das paredes celulares.

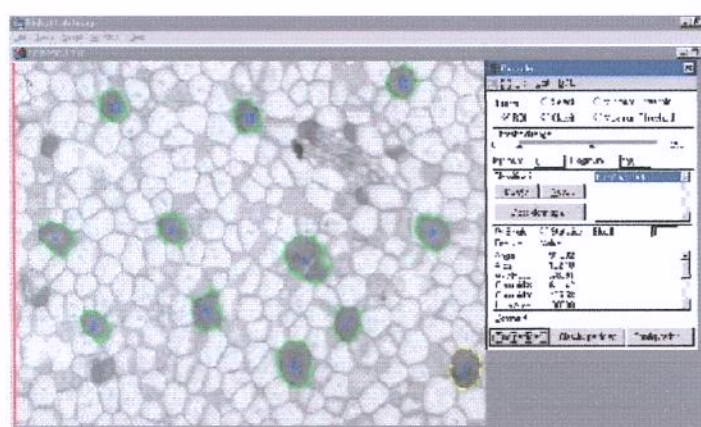


4. Exibição de tela: análise de partículas em analisador de imagens *Global Lab Image*.

ANEXO 2



1. Exibição de tela:
Análise de partículas no *Global Lab Image*, para determinação da área das células cotiledonares.



2. Exibição de tela:
Análise de partículas no *Global Lab Image*, para determinação da área e proporção de células fenólicas no tecido cotiledonar.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ERRATA

Errata tabela 3 (página 33)

Tabela 3: Dados da composição química das sementes maduras.

Composição química das sementes maduras base seca (%)						
	Proteína ^a	Proteína ^b	Lipídeo	Cinzas	Umidade	Carboidrato ^c
<i>T. cacao</i> G1	25,44 (24,1)*	14,20	47,25	3,01	1,34	34,20
<i>T. cacao</i> G2	28,68	14,50	51,22	3,20	2,16	28,92
<i>T. obovatum</i>	24,88 (27,1)	10,44	60,77	3,14	0,89	24,75
<i>T. microcarpum</i>	13,27 (14,4)	13,11	6,54	2,75	2,86	74,73

^a proteína total das amostras desengorduradas.

^b proteína total na amostra íntegra.

^c obtido por diferença.

* entre parênteses: valores obtidos por Silva, 2000.

Errata: legenda da figura 13 (página 63)

Figura 13. Distribuição típica do amido em *T. microcarpum*.

Fotos A e B – *T. microcarpum* sob luz polarizada. Pode-se notar a presença do amido em seu aspecto característico de “cruz de malta”; nas células do parênquima (células de reserva ➤ e células fenólicas ↗) e em células da camada epidérmica (E). (Foto A – 500x; Foto B – 1400x)