UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Perfis proteômicos, expressão gênica e metabolismo antioxidativo em folhas de plantas jovens de cacau submetidas à toxicidade de cádmio mitigada por zinco

CARLOS HENRIQUE DE CARVALHO NETO

Ilhéus – Bahia – Brasil
Abril – 2022

CARLOS HENRIQUE DE CARVALHO NETO

Perfis proteômicos, expressão gênica e metabolismo antioxidativo em folhas de plantas jovens de cacau submetidas à toxicidade de cádmio mitigada por zinco

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Ilhéus – Bahia – Brasil
Abril – 2022

D278 de Carvalho Neto, Carlos Henrique.
Potencial mitigatório da toxicidade de Cádmio por Zinco em plantas jovens de cacau: repostas moleculares em nível foliar / Carlos Henrique de Carvalho Neto. – Ilhéus, BA: UESC, 2022.
102f. : il.

Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Inclui referências.

1. Theobroma cacao. 2. Metal pesado. 3. Mitigação. I. Título.

CDD: XXX.XXX

CARLOS HENRIQUE DE CARVALHO NETO

Perfis proteômicos, expressão gênica e metabolismo antioxidativo em folhas de plantas jovens de cacau submetidas à toxicidade de cádmio mitigada por zinco

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA:

_____	_____
Dr. [ ]	Dr. [ ]
UESC	UESC
_____	_____
Dr. [ ]	Dr. [ ]
UESC	UESC

Ilhéus – Bahia – Brasil
Abril – 2022

Dedico este trabalho àqueles que perderam suas vidas devido à pandemia de COVID-19, em memoria de Agusto Lázaro, Leonardo Moreira e Miriam Reis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a todos os grandes cientistas e pesquisadores que vieram antes de mim, pois pavimentaram o caminho da Ciência para que hoje eu pudesse realizar este trabalho.

Agradeço às pessoas que acreditaram em mim quando nem mesmo eu fui capaz de acreditar.

Ao professor Alex-Alan, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, pela orientação, confiança, respeito pelas diferenças e retidão de caráter.

Ao professor Priminho, pela co-orientação, pelo uso dos laboratórios de Genômica e Proteômica e pela concessão de reagentes, sempre que necessário.

À professora Luciene Gastalho, por todas as orientações a respeito da análise de expressão gênica em tempo real.

Aos que me ajudaram na execução das diferentes análises, em especial Mácia, Keilane, Letícia, Yuli e Cid.

À Dra. Thayse Tosto, pelo treinamento técnico em genética e biologia molecular ao longo de minha graduação, pois foi de essencial utilidade na condução das atividades de laboratório.

Aos colegas de curso, em especial Thainá, Larissa e Aline, pelas conversas e companheirismo virtual durante essa jornada.

Aos colegas de laboratório e de grupo de pesquisa, em espcial Bruna, Nayra, Victor e Francinne.

Aos amigos que cuidaram de mim, em especial, Gabriel, Carol, Bruno, Gleison, Vitor, Tamires e Alex.

Aos meus avós, Carlos e Genilda, por me apoiarem sempre.

Aos meus irmãos Carol, Felipe, Ricardinho, Eduardo e Miguel.

Ao meu sobrinho Arthur, que sempre me trouxe muita alegria com sua inocência de criança.

Aos meus pais, pelo apoio inquestionável.

Ao meu gato, Frodo, por toda a companhia durante as incontáveis madrugadas.

E a todos os demais que contribuíram para a realização deste trabalho.

DE CARVALHO NETO, Carlos Henrique. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, abril de 2022. **Perfis proteômicos, expressão gênica e metabolismo antioxidativo em folhas de plantas jovens de cacau submetidas à toxicidade de cádmio mitigada por zinco.** Orientador: Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida. Coorientador: Dr. Carlos Priminho Pirovani.

RESUMO

A absorção de cádmio (Cd) pelas plantas cultivadas, um elemento altamente tóxico aos seres humanos, tem sido foco da investigação científica por anos. Em 2014, a União Europeia mudou sua legislação por meio da Regulamentação da Comissão n° 488/2014, onde estabeleceu, pela primeira vez, limites máximos de Cd permitidos em produtos à base de cacau. Essa regulamentação alterou a importação de amêndoas de cacau dos países produtores, cujos teores de Cd são muito elevados. O Cd pode se acumular em diversas partes da planta e promover alterações em níveis bioquímicos, fisiológicos e moleculares, interferindo no seu desenvolvimento por meio da alteração do seu metabolismo primário. Em resposta ao estresse metálico, as células vegetais iniciam diversos sistemas de controle para o ajuste da sua homeostase, a exemplo do aumento na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no combate ao estresse, como as proteínas do choque térmico. Em contrapartida, o zinco (Zn), um nutriente essencial para as plantas, possui diversas funções biológicas, como cofator funcional, estrutural ou regulatório de um grande número de enzimas, regulador de expressão gênica e preservador da integridade de membranas celulares. Em função das semelhanças físicas e químicas entre Cd e Zn, e da ausência de um transportador específico para Cd em plantas, ambos podem competir pelos mesmos transportadores durante a sua absorção do solo. No presente trabalho foi investigado o potencial de atuação de Zn sobre alguns mecanismos bioquímicos e moleculares de resposta à toxicidade provocada por Cd, a fim de entender se a possível relação antagônica resultante da competição entre esses dois metais foi capaz de favorecer o metabolismo das plantas a combater o estresse oxidativo induzido pelo Cd. Para isso, foi conduzido um experimento com plantas jovens seminais do genótipo de cacau CCN 51, utilizando diferentes doses de Zn aplicadas no solo em combinação com Cd. Constatou-se que a expressão de genes relacionados com as enzimas do metabolismo antioxidativo não foi um bom marcador do estresse induzido por Cd, nem do potencial efeito de mitigação de Zn, uma vez que poucas diferenças foram observadas entre os tratamentos. A comparação dos perfis de abundância das proteínas diferencialmente expressas, por meio de *heat maps*, possibilitou verificar como o Cd afetou o metabolismo primário das plantas e induziu respostas características de estresses abióticos. As respostas, em nível de proteoma, foram dependentes do tempo de exposição aos metais, sendo que a exposição prolongada (24h) teve maior efeito sobre o acúmulo das proteínas no tratamento onde foi aplicado apenas Cd. O tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) foi o que melhor respondeu ao estresse induzido pelo Cd, uma vez que sofreu menos redução na abundância de proteínas comuns aos demais tratamentos.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, metais pesados, mitigacao da toxicidade de Cd, espécies reativas de oxigënio, respostas bioquímicas e moleculares

DE CARVALHO NETO, Carlos Henrique. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, dezembro de 2021. **Proteomic profiles, gene expression and antioxidant metabolism in leaves of young cacao plants subjected to zinc-mitigated cadmium toxicity.** Advisor: Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-advisor: Dr. Carlos Priminho Pirovani.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) uptake by cultivated plants, an element highly toxic to humans, has been the focus of scientific investigation for years. In 2014, the European Union changed its legislation through Commission Regulation No. 488/2014, where it established, for the first time, maximum Cd limits allowed in cacao-based products. This regulation changed the import of cacao beans from producing countries, whose Cd contents are very high. Cd can accumulate in different parts of the plant and promote changes at biochemical, physiological and molecular levels, interfering with its development by altering its primary metabolism. In response to metallic stress, plant cells initiate several control systems to adjust their homeostasis, such as the increase in the expression of genes that encode proteins involved in combating stress, such as heat shock proteins. On the other hand, zinc (Zn), an essential nutrient for plants, has several biological functions, such as a functional, structural or regulatory cofactor of a large number of enzymes, a regulator of gene expression and a preserver of the integrity of cell membranes. Due to the physical and chemical similarities between Cd and Zn, and the absence of a specific transporter for Cd in plants, both can compete for the same transporters during their uptake from the soil. In the present work, the potential for action of Zn on some biochemical and molecular mechanisms of response to toxicity caused by Cd was investigated, in order to understand whether the possible antagonistic relationship resulting from the competition between these two metals was able to favor the metabolism of plants to combat Cd-induced oxidative stress. For this, an experiment was carried out with young seminal plants of the cacao genotype CCN 51, using different doses of Zn applied to the soil in combination with Cd. It was found that the expression of genes related to antioxidative metabolism enzymes was not a good marker of Cd-induced stress, nor of the potential mitigating effect of Zn, since few differences were observed between treatments.The comparison of the abundance profiles of the differentially expressed proteins, through heat maps, made it possible to verify how Cd affected the primary metabolism of plants and induced responses characteristic of abiotic stresses. The responses, at the proteome level, were dependent on the time of exposure to the metals, and the prolonged exposure (24h) had a greater effect on the accumulation of proteins in the treatment where only Cd was applied. The T5 treatment (1.6 mmol Zn kg^{-1} soil + 0.8 mmol Cd kg^{-1} soil) was the one that best responded to the stress induced by Cd, since it suffered less reduction in the abundance of proteins common to the other treatments.

Keywords: *Theobroma cacao*, heavy metals, mitigation of Cd toxicity, reactive oxygen species, biochemical and molecular responses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese, em gel de agarose a 1%, de RNA total extraído de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas nos períodos de 3 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D), 48 (E) e 96h (F) após aplicação dos tratamentos. Marcador 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific).....36

Figura 2 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott (p<0,05).....45

Figura 3 – Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott (p<0,05).....46

Figura 4 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott (p<0,05).....47

Figura 5 – Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott (p<0,05).....48

Figura 6 – Expressão rela tiva de genes relacionados às enzimas do metabolismo antioxidativo (*SODCyt*, *SODChl* e *per-1*), à biossíntese das proteínas intrínseca (*psbA*) e extrínseca (*psbO*) ao fotossistema 2 da fotossíntese e à biossíntese de metalotioneína (*Mt-2*), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas nos

períodos de 3 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D), 48 (E) e 96h (F) após aplicação dos tratamentos. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas indicam comparação entre os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p<0,05$).....51

Figura 7 – Gráfico biplot, gerado a partir da análise multivariada de componentes principais, para as variáveis bioquímicas CAT, GPX e SODcyt com factors loadings > 0.70. C = controle, sem adição de Zn e Cd no solo; T1 = 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; T2 = 0,4 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; T3 = 0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; T4 = 1,2 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; e T5 = 1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo. Cada nomenclatura foi acompanhada de um número correposdente ao período de coleta daquele tratamento.....53

Figura 8 – Perfis proteicos de amostras foliares em SDS-PAGE de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. M = marcador pré-corado *PageRuler*™ (10 - 180 kDa). Foram utilizados 100 µg de proteínas para cada amostra. Tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).....54

Figura 9 – *Western blot*, utilizando anticorpos das subunidades beta da sintase do ATP e da catalase, de amostras de proteínas totais foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. (A) detecção de anticorpos das proteínas alvo. (B) análise de acúmulo realizada com o auxílio do *software GelQuant.Net.* Foram utilizados 20 µg de proteínas para cada amostra. Tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).....55

Figura 10 – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas no período de 3h após aplicação dos tratamentos. (**A**) Tratamento T0 (controle), (**B**) Tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), (**C**) Tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e (**D**) Tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).....56

Figura 11 – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas no período de 24h após aplicação dos tratamentos. (**A**) Tratamento T0 (controle), (**B**) Tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), (**C**) Tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo e (**D**) Tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).....57

Figura 12 – Diagramas de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas aos tratamentos com Cd e Zn + Cd no solo. Em (A) T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparado com ele mesmo, nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos. Em (B) T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparado com ele mesmo, no período de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos. E em (C) T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparado com ele mesmo, nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.....57

Figura 13 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas no período de 3h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.....69

Figura 14 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas no período de 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.....70

Figura 15 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas entre os períodos. Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.....71

Figura 16 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas entre os períodos. Parâmetros utilizados para a análise de clustering: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.....72

Figura 17 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas entre os períodos. Parâmetros utilizados para a análise de clustering: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.....73

Figura 18 – Classificação funcional das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, de acordo com os processos biológicos com os quais estão envolvidas, coletadas nos períodos de (**A**) 3h e (**B**) 24h, respectivamente, após aplicação dos tratamentos. As proteínas foram classificadas em processos biológicos de acordo com a distribuição dos termos GO no nível 3, considerando os cinco grupos de processos mais abundantes, correpondendo às proteínas identificadas nos tratametos T0, T1, T3 e T5.....75

Figura 19 – Classificação funcional das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, de acordo com as funções moleculares com as quais estão envolvidas, coletadas nos períodos de (**A**) 3h e (**B**) 24h, respectivamente, após aplicação dos tratamentos. As proteínas foram classificadas em processos biológicos de acordo com a distribuição dos termos GO no nível 3, considerando os cinco grupos de processos mais abundantes, correpondendo às proteínas identificadas nos tratametos T0, T1, T3 e T5.....76

Figura 20 – Classificação funcional das proteínas identificadas conforme os processos biológicos com os quais estão envolvidas e com suas funções moleculares. **A** e **D** - correspondem à categorização das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 do tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo); **B** e **E** - correspondem à categorização das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 do tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo); e **C** e **F** - correspondem à categorização das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 do tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparados com eles mesmos, coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, agrupadas por processos biológicos e funções moleculares, respectivamente. As proteínas foram agrupadas de acordo com a distribuição dos termos GO no nível 3, considerando os cinco grupos de processos e funções mais abundantes.....78

Figura 21 – Representação esquemática das alterações mais relevantes encontradas no presente trabalho.....81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Pares de *primers* de genes específicos usados na análise de RT-qPCR.....40

Quadro 2 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas no período de 3h após aplicação dos tratamentos.....64

Quadro 3 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo); T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas no período de 24h após a aplicação dos tratamentos.....66

Quadro 4 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.....69

Quadro 5 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.....70

Quadro 6 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.....71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....18
2.1 *Theobroma cacao* L. 18
2.2 Metais pesados em plantas cultivadas.....18
2.3 Cádmio (Cd).....21
2.4 Zinco (Zn).....23
2.5 Absorção e transporte de Zn e de Cd em plantas.....25
2.6 Estresse ocasionado por Cd e mecanismos de respostas em plantas...28
2.7 Impactos da contaminação por Cd no cultivo de *Theobroma cacao*.....31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....34
3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....34
3.2 Metabolismo antioxidativo.....35
3.2.1 Atividade da dismutase do superóxido (EC - 1.15.1.1).....35
3.2.2 Atividade de catalase (EC - 1.11.1.6).....36
3.2.3 Atividade da peroxidase do ascorbato (EC - 1.11.1.11).....36
3.2.4 Atividade da peroxidase do guaiacol (EC - 1.11.1.7).....37
3.3 Expressão gênica.....37
3.3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....37
3.3.3 Análise de RT-qPCR.....38
3.4 Análise multivariada de componentes principais.....40
3.5 *Western Blot*.....41
3.6 Análise proteômica.....41
3.6.1 Extração de proteínas totais de amostras foliares.....41
3.6.2 Quantificação de proteínas totais e eletroforese em gel SDS-PAGE.....43
3.6.3 Digestão peptídica.....43
3.6.4 Espectrometria de massas.....44
3.6.5 Identificação de peptídeos em banco de proteínas.....45
3.6.6 Identificação de proteínas diferencialmente abundantes.....45
3.7 Análises estatísticas.....46
4. RESULTADOS.....47
4.1 Atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo.....47
4.2 Análise de expressão gênica por RT-qPCR.....51

4.3 Análise multivariada de componentes principais.....53
4.4 Perfis proteicos de amostras foliares.....55
4.5 Análise de acúmulo de proteínas por meio de *Western Blot*.....56
4.6 Identificação de proteínas.....57
4.7 Classificação funcional das proteínas identificadas.....74
5. DISCUSSÃO.....78
6. CONCLUSÕES.....88
7. REFERÊNCIAS.....89

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados são agentes severos de poluição, em consequência da sua difícil remoção do meio ambiente, afetando não só a qualidade da água e do solo por eles contaminados, mas também podendo causar danos à saúde humana e dos animais, devido ao seu transporte para a cadeia alimentar (LI et al., 2019). Como as plantas são organismos sésseis, elas tiveram que evoluir uma série de estratégias adaptativas flexíveis que lhes permitiram adequar o seu metabolismo à presença de diferentes quantidades desses elementos metálicos (DALCORSO et al., 2019).

Plantas submetidas às condições de estresse, provocado por Cd, podem sofrer alterações metabólicas que afetam o seu crescimento e desenvolvimento, como por exemplo, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), que induzem a peroxidação lipídica (YANG et al., 2021). A produção de ERO é uma das principais causas da toxicidade dos metais pesados em plantas. Os danos causados por esses metais aos processos biológicos ocorrem devido à sua semelhança com os íons que desempenham funções essenciais no metabolismo (SHAHID et al., 2015).

Muitas ferramentas têm sido utilizadas para elucidar o efeito dos metais pesados sobre o metabolismo das plantas, como, por exemplo, a análise proteômica. You et al. (2014), utilizando uma estratégia de espectrometria de massas, com pré-fracionamento de extrato proteico, por meio de eletroforese bidimensional, compararam o comportamento de duas cultivares contrastantes de citrus em reposta à toxicidade provocada por Mn nas raízes das plantas. Estes autores observaram que a diferença mais notável da cultivar tolerante, em relação a não tolerante, foi no acúmulo de proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos nucléicos, glicólise e transporte celular, sendo estas proteínas *down* reguladas na cultivar tolerante, ao passo que foram *up* reguladas na cultivar não tolerante.

É sabido que as plantas alteram a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas nas respostas ao estresse ocasionado por metais pesados, como, por exemplo, genes relacionados à biossíntese de fitoquelatinas, metalotioneínas e proteínas do choque térmico (HASAN, et al., 2017). Souguir et

al. (2015) demonstraram, por meio de análise de RT-qPCR em tempo real, que o Cd induziu a expressão de genes codificantes para metalotioneínas, proteínas do choque térmico e algumas enzimas do metabolismo antioxidativo em *Vicia faba*.

Buscando reforçar os padrões de segurança alimentar e atender às exigências de um público consumidor cada vez mais atento a certos atributos da matéria-prima usada na fabricação de seus alimentos, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) estabeleceu, pela primeira vez, limites máximos permitidos para a presença de cádmio (Cd) em produtos à base de cacau, como chocolate e cacau em pó, por meio do Regulamento da Comissão n°488/2014 (EC, 2014). Entretanto, apesar de significar um avanço nas medidas de proteção públicas contra a contaminação de sua população por metais pesados, a União Europeia colocou em risco a importação de cacau de países da América Latina, uma vez que concentrações mais elevadas de Cd foram encontradas em produtos a base de amêndoas de cacau provenientes desses países (ABT et al., 2018).

A dieta é a principal via de exposição ao Cd na população em geral. Sua ingestão semanal recomendada é de 2,5 µg/kg de peso corporal. Doses maiores estão associadas com o surgimento de distúrbios graves, como disfunção renal, resultante de sua acumulação nos rins (EFSA, 2011). Como o Cd pode ser transferido do solo para as plantas e assim entrar na cadeia alimentar a partir das amêndoas de cacau (GRAMLICH et al., 2018), as estratégias para reduzir a ingestão deste contaminante devem incluir principalmente a redução de sua biodisponibilidade e de sua absorção pelas plantas (SCHAEFER; DENNIS; FITZPATRICK, 2020).

O Cd é um metal pesado sem função biológica conhecida, que pode se acumular em diversas partes da planta, e sua toxicidade provoca redução do crescimento, murcha, danos no aparato fotossintético e, consequentemente, a redução no metabolismo do carbono (SANTOS; MONTEIRO; DIAS, 2010; SANTOS et al., 2020). Solos contendo Cd são as fontes predominantes desse elemento para as plantas. A origem desse metal nos solos pode ser natural, proveniente da rocha subjacente ou material de origem, mas também fruto de ações antropogênicas, como uso excessivo de fertilizantes, resíduos de indústrias de mineração e fundição, tratamento com lôdo de esgoto, etc. (TRAN;

POPOVA, 2013). A absorção, translocação e deposição de Cd é regulada por diversos fatores, como seu teor no solo, teor de matéria orgânica, pH, potencial redox e presença de outros elementos minerais (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; OLIVEIRA et al., 2022).

Em contrapartida, o zinco (Zn), um nutriente essencial para as plantas, possui diversas funções biológicas, como cofator funcional, estrutural ou regulatório de um grande número de enzimas. Também é necessário à síntese de triptofano, precursor do ácido indolacético, conhecido como hormônio do crescimento em plantas (TSONEV; CEBOLA LIDON, 2012). Sua absorção do solo é regulada por fatores físicos e químicos, como pH, valor total de Zn e teor de matéria orgânica (MOUSAVI; GALAVI; REZAEI, 2013).

A absorção de Zn da solução do solo pode ocorrer na forma de Zn^{2+} ou como complexos metal-orgânicos (STURIKOVA et al., 2018). Já o Cd pode ser absorvido pelas raízes das plantas na sua forma de Cd^{2+} através do transporte oportunista via canais para outros cátions divalentes, como Fe^{2+}, Zn^{2+} e Ca^{2+} (SONG; JIN; WANG, 2016).

O Cd pode provocar danos às principais enzimas do metabolismo antioxidativo, como catalase, redutase da glutationa e dismutase do superóxido (SANDALIO et al., 2009). Contudo, estudos sugerem que a relação antagônica na absorção de Cd e Zn pode ser usada para reduzir o acúmulo de Cd nos tecidos vegetais (WU; ZHANG, 2002; SARWAR et al., 2014), além de trazer benefícios indiretos do Zn na ativação do mecanismo de defesa contra a toxicidade, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e, desse modo, reduzindo o estresse oxidativo (FAIZAN et al., 2021).

As ERO são produzidas constantemente pelas células em níveis que não afetam o metabolismo celular, pois são removidos pela maquinaria antioxidante. Entretanto, seu excesso pode provocar peroxidação lipídica, extravazamento de eletrólitos, em consequência de perda da seletividade de membranas, inativação de enzimas e quebras de DNA ou mutações, dentre outras alterações metabólicas (SANDALIO et al., 2009).

Em função das semelhanças físicas e químicas entre Cd e Zn, e da ausência de um transportador específico para Cd em plantas, o mesmo compete com cátions divalentes durante a sua absorção do solo (QIN et al., 2022). Logo, a maior disponibilidade Zn no solo pode reduzir a absorção de Cd pelo sistema

radicular e mitigar a toxicidade de Cd. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os mecanismos de ação de Zn na mitigação do efeito tóxico de Cd em plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, por meio de análises de mudanças no perfil de proteínas exclusivas e diferencialmente abundantes, atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo, expressão gênica e *western blot* de proteínas de resposta ao estresse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - ***Theobroma cacao*** **L.**

Theobroma cacao L. (cacau), uma espécie dicotiledônea da família Malvaceae, nativa de regiões tropicais úmidas da América do Sul, domesticada há cerca de 3000 anos (ALMEIDA; VALLE, 2007; ARGOUT et al., 2011), possui grande importância socioeconômica, cujas sementes de seus frutos maduros são fermentadas e secas (amêndoas) e usadas como matéria-prima para a fabricação de chocolate e de outros subprodutos (ALMEIDA; VALLE, 2007; MÜLLER; VALLE, 2012). A partir do seu centro de origem se espalharam dois grandes grupos, comumente chamados de Crioulo e Forasteiro (ALMEIDA; VALLE, 2007). A hibridização natural entre eles deu origem a um terceiro grupo, chamado de Trinitário (ALMEIDA; VALLE, 2007; NAIR, 2021). O cacau foi introduzido na Bahia em 1746, com sementes vindas do Pará (MONTEIRO; LOPES; CLEMENT, 2009). Os primeiros trabalhos de melhoramento genético dessa cultura datam da década de 30, contudo, somente a partir de meados dos anos 60 foram distribuídos os primeiros híbridos de cacau pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) (AHNERT et al., 2018).

O Brasil ocupa a sétima posição no *ranking* de maiores produtores mundiais de cacau (BARBOZA et al., 2020), tendo destaque principalmente nos estados do Pará e da Bahia, que são, respectivamente, o primeiro e o segundo maiores produtores do país (IBGE, 2019). A Bahia participa de quase 100% das exportações de derivados de cacau do Brasil (BRAINER, 2021). Os principais mercados brasileiros de exportação de amêndoas de cacau no ano de 2020 foram Japão, Países Baixos, França, Bélgica e Estados Unidos (Trend Economy, 2021).

Apesar de o cacau ser produzido principalmente em países tropicais localizados em zonas de baixa latitude (WIKLE, 2021), os maiores mercados consumidores de chocolate se encontram na Europa Ocidental, destacando-se a Suíça (9 kg per capita), a Alemanha (7,9 kg per capita), a Áustria (7,8 kg per capita), o Reino Unido (7,5 kg per capita) e a Noruega (6,6 kg per capita) (ALBERTS; CIDELL, 2015; PURBA, 2019). Espera-se que a taxa composta de crescimento anual do mercado global de amêndoas de cacau cresça 7,3% de 2019 a 2025, sobretudo, devido às demandas dos mercados tradicionais por novos produtos alimentícios à base de cacau, bem como devido ao aumento na demanda por ingredientes derivados de cacau pelo mercado asiático (VOORA; BERMÚDE; LARREA, 2019). Entre as novas tendências do mercado internacional destacam-se a procura por chocolates orgânicos, com características funcionais ou nutracêuticas, que contenham selo de indicação geográfica ou certificação *fairtrade*, entre outros (OTTER; PRECHTEL; THEUVSEN, 2018; KIM; JEON, 2019; MERLINO et al., 2021).

2.2 **- Metais pesados em plantas cultivadas**

O termo metal pesado é comumente utilizado na literautura científica para se referir a qualquer elemento do grupo dos metais e metalóides que provoque poluição ambiental, toxicidade e efeitos adversos ao meio ambiente. Mais precisamente, podem ser definidos como quaisquer metais de ocorrência natural, com número atômico (Z) maior que 20 e densidade elementar maior que 5 g cm^{-3} (ALI; KHAN, 2018). Para fins de efeito prático, também são referidos na literatura como metais traços, microelementos ou oligoelementos, e compreendem elementos essenciais e não essenciais (incluindo elementos tóxicos) (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

Alguns desses metais são necessários para o bom funcionamento metabólico dos organismos. Elementos como Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Cobalto (Co), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Molibdênio (Mo), são demandandos em pequenas quantidades pelas plantas, pois atuam em atividades funcionais de um grande número de proteínas necessárias ao seu crescimento e desenvolvimento, e, por isso, são considerados essenciais. Outros, como arsênio (As), mercúrio (Hg), cromo (Cr), cádmio (Cd) e chumbo

(Pb), não possuem função biológica conhecida, além de serem potencialmente tóxicos mesmo em pequenas quantidades (VARMA, 2021).

Existem diferentes fontes de origens naturais e antropogênicas de metais pesados no meio ambiente. As pricnipais fontes naturais são as rochas de origem e os solos formados a partir dessas rochas. Durante o processo natural de formação das rochas primárias, os metais pesados são incorporados na estrutura cristalográfica dos minerais recém-formados, a partir de um processo chamado de substituição isomórfica, por exemplo, o Cd pode substituir em parte o Zn presente na esfalerita (Zn [Cd] S). Entre as fontes antropogênicas, estão os resíduos de atvidade agrícola, como uso de fertilizantes, esterco animal e pesticidas, e os resíduos de atividades insdutriais, como mineração e fundição de metais. Esses resíduos podem possuir forma gasosa, particulada, aquosa ou sólida (BRADL, 2005).

A agricultura pode ser uma das fontes mais proeminentes de metais pesados para as plantas cultivadas, pois é uma atividade difundida no mundo todo e que não está restrita somente a áreas cuja presença desses elementos é naturalemnte abundante. O uso constante de fertilizantes fosfatados e o longo tempo de persistência dos metais no solo podem levar ao acúmulo perigosamente alto de alguns oligoelementos. Fungicidas, fertilizantes inorgânicos e fertilizantes fosfatados têm níveis variáveis de Cd, Cr, Ni, Pb e Zn, dependendo de suas fontes (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Um estudo de Nacke et al. (2013) investigou a disponibilidade dos metais pesados Cd, Pb e Cr para o solo e para plantas de *Zea mays* fertilizadas com diferentes fontes e doses Zn. Apesar de o Pb ter sido o único metal que apresentou acúmulo na parte aérea de *Z. mays*, em relação ao solo, foi observado que os fertilizantes das diferentes fontes disponibilizam Cd, Pb e Cr em quantidades crescentes e proporcionais ao aumento das doses de Zn, evidenciando a importância dos fertilizantes minerais para o fornecimento desses elementos ao meio ambiente.

Em geral, as plantas terrestres absorvem metais através de suas raízes e os transportam pelo xilema até a parte aérea. Esses metais podem ser absorvidos tanto na forma de íons hidratados quanto de complexos metal-quelato. Ambas as formas podem ser absorvidas e transportadas por meio de inúmeras proteínas de canal e/ou proteínas transportadoras. Comumente os

metais não essenciais chegam às celulas através de transportadores específicos para metais essenciais devido às semelhanças entre eles, como por exemplo, os raios iônicos (SOLYMOSI; BERTRAND, 2010).

A maior fração de metais pesados presente em um solo está associada à sua fase sólida. O problema surge quando esses elementos são transferidos para a solução do solo, tornando-se disponíveis para a absorção pelas raízes das plantas (SHERENE, 2010). Uma vez presentes na solução do solo, sua biodisponibilidade será regulada por uma série de fatores, como a interação com outros elementos e com substâncias presentes na fase aquosa. O pH, o potencial redox e o teor de matéria orgânica afetarão a tendência do metal de existir na forma iônica disponível para as plantas (TANGAHU et al., 2011).

Alguns metais pesados não essenciais podem ser bioacumulados em cultivos alimentares importantes para a dieta dos seres humanos. Plantas cultivadas em solos com alto teor de metais pesados podem acumular esses elementos em quantidades acima dos limites de consumo estabelecidos pelos órgãos de segurança alimentar, a exemplo de *Brassica oleracea*, *Daucus carota*, *Solanum tuberosum* e *Triticum aestivum* (DZIUBANEK et al., 2015; YANG; NAN.; ZHAO, 2014). Além disso, os metais pesados podem reduzir os componentes nutricionais em cultivos alimentares contaminados, tornando-os mais pobres em seus teores de proteínas, gorduras e carboidratos. Os riscos associados à saúde dependem do teor ingerido e do tempo de exposição ao metal (KHAN et al., 2015). Os efeitos relacionados à intoxicação por metais pesados nos seres humanos podem incluir retardo no desenvolvimento, surgimento de vários tipos de cânceres, danos renais, desregulação endócrina, efeitos imunológicos e neurológicos negativos, dentre outros distúrbios (MAHURPAWAR, 2015).

A produtividade dos cultivos alimentares pode reduzir em função dos danos provocados pelos efeitos tóxicos dos metais pesados ao interferir nos processos fisiológicos das plantas, promovendo alterações na fotossíntese, na absorção de água e minerais e no metabolismo do nitrogênio, o que pode resultar em redução do crescimento do cultivo e do aporte de biomassa, e, em último caso, causar a morte das plantas (SHAHID et al., 2015). Um estudo de Sheetal et al. (2016), com uma variedade de *Brassica juncea*, cultivada em um solo que recebeu diferentes doses de metais pesados (Ni, Cr, Pb, Cd e Hg),

verificou-se, conforme ao aumento das doses aplicadas no solo, que houve redução significativa na biomassa, na taxa fotossintética e no teor de clorofila, em comparação às plantas do grupo controle. Por outro lado, o número de folhas, entrenós e frutos, a área foliar, a taxa de crescimento absoluto e a biomassa de *Cucumis sativus* diminuíram em resposta à aplicação de lodo de esgoto contaminado com metais pesados, ainda que os teores desses elementos estivessem dentro do limite permitido para aplicação de lodo de esgoto em solos (Eid et al., 2017).

2.3 **- Cádmio (Cd)**

Cd (número atômico = 48 e massa atômica = 112,41 u) é um metal não essencial, de relativa mobilidade no sistema solo-planta, bastante estudado devido ao seu potencial de toxicidade aos seres humanos (SINGH; MCLAUGHLIN, 1999). Possui grande similaridade com outros elementos do grupo 12 (IIB) da tabela periódica, como Zn e Hg, com os quais se encontra comumente conjugado em ambientes geológicos naturais (TRAINA, 1999). A abundância desse elemento na crosta terrestre varia entre 0,1 e 0,5 ppm, mas valores acima e abaixo dessa faixa de abrangência também foram relatados, pois dependem de um grande número de fatores (MORROW, 2010). Existem muitas formas químicas estáveis e instáveis nas quais o Cd pode aparecer na natureza, mas quase todos os compostos de Cd tem o número de oxidação de +2 (RAPISARDA et al., 2018).

O teor total de Cd em um solo é função da contribuição do material geológico de origem e das entradas de fontes exógenas, que em sua maioria são fontes antropogênicas. O equilíbrio relativo entre os mecanismos de adsorção, lixiviação e absorção pelas plantas determina o destino do Cd, uma vez que este elemento se encontre disponível no solo (ALLOWAY; STEINNES, 1999). Estima-se que os aumentos nos teores de Cd, nos compartimentos ambientais (ar, solo e água), se devem, principalmente, à atividade industrial, como a de beneficiamento de metais, tais como Zn, Fe e aço (HUTTON, 1983).

Um estudo conduzido por Cheng et al. (2014) demonstrou que as maiores fontes de poluição atmosférica de Cd na China, no ano de 2009, advieram dos processos industriais de fundição de metais e das fontes de combustão de

carvão, totalizando 56,6 e 43,4% das emissões atmosféricas naquele ano, respectivamente. Outro estudo conduzido por Yuan et al. (2019) avaliou as emissões de Cd na cidade de Dingshu, conhecida como a “Capital Chinesa da Cerâmica”, durante o ano de 2015, demonstrando que 90,4% das emissões de Cd foram destinadas para a água, 9,5% para o solo e apenas 0,1% para a atmosfera. A produção industrial foi a fonte mais proeminente de emissões antrópicas de Cd, contribuindo com 62,1% das emissões totais.

Em regiões do mundo com menor atividade urbana e industrial, a contaminação por Cd no solo ocorre predominantemente devido ao uso de fertilizantes, corretivos de solo, adubos e biossólidos de esgoto. Dessa forma, as concentrações de Cd no solo têm aumentado lentamente em sistemas agrícolas que utilizam essas tecnologias (SINGH; MCLAUGHLIN, 1999). Fertilizantes fosfatados podem ser um dos maiores contribuintes para a contaminação de Cd em solos agrícolas. Williams e David (1976) investigaram o acúmulo de Cd e Zn nos solos por meio da aplicação de fertilizantes fosfatados associada a diferentes práticas culturais. Os resultados indicaram o aumento substancial de Cd presente no solo em todos os sistemas de cultivo experimentais, envolvendo diferentes fertilizantes e práticas culturais utilizadas. As impurezas dos fertilizantes aumentaram em dez vezes o Cd solúvel em vários dos solos estudados. Pelo menos 80% das impurezas derivadas dos fertilizantes fosfatados aplicados estavam nas camadas cultiváveis do solo.

Lambert, Grant e Suavé (2007) investigaram o efeito, em longo prazo, na solubilidade de Cd e Zn nos solos de dois experimentos, um realizado em condições de campo e outro em laboratório, após a aplicação de fertilizantes fosfatados, por meio da determinação dos teores desses metais na água do solo. Os fertilizantes fosfatados aumentaram o teor de Cd nos extratos do solo nos experimentos de campo e laboratório em 87% e 80% em relação ao controle, respectivamente. O experimento de campo foi realizado durante o período de três anos utilizando três fertilizantes de fosfato monoamônico, enquanto o experimento de laboratório simulou a adição desses fertilizantes a um período equivalente a 15 anos de aplicação. Por outro lado, a aplicação de fertilizantes na forma de cloreto, como cloreto de potássio (KCl), também pode colaborar para o aumento da disponibilidade de Cd no solo, uma vez que o teor

de Cl^- na solução do solo contribui para o aumento da mobilidade de Cd e, portanto, para sua disponibilidade para as plantas (FIJAŁKOWSKI et al., 2012).

As quantidades de Cd emitidas por fontes naturais são mais difíceis de serem estimadas, principalmente porque existem poucas medições das taxas de emissão provocadas por processos naturais (HUTTON, 1983). O vulcanismo é considerado uma das mais importantes fontes naturais de Cd atmosférico. Entretanto, devido à variação considerável no grau de enriquecimento relatado para diferentes vulcões, bem como suas localizações frequentemente remotas e mal monitoradas, a estimativa das descargas mundiais desta fonte é dificultada. Outras fontes naturais incluem *sprays* oceânicos, incêndios florestais e liberação através da vegetação (HUTTON et al., 1987). Estima-se que cerca de 25.000 t por ano de Cd sejam liberadas no meio ambiente devido às fontes naturais (PANDIT; MUKHERJEE, 2018).

2.4 **- Zinco (Zn)**

Zn (número atômico = 30 e massa atômica = 65,38 u) é um elemento metálico essencial para a vida terrestre, em razão de sua participação como componente estrutural ou cofator de inúmeras protéinas, cujos domínios de ligação ao Zn são altamente conservados entre as espécies (BARAK; HELMKE, 1993). Este elemento metálico desempenha um papel muito importante em diversas rotas metabólicas em plantas, e está relacionado a uma ampla gama de processos biológicos, como participação no metabolismo de carboidratos, na preservação da integridade de membranas celulares, na biossíntese de proteínas, na regulação da síntese de auxinas e na formação de pólen (HAFEEZ; KHANIF; SALEEM, 2013).

A principal forma de entrada de Zn nos solos ocorre por meio do intemperismo físico e químico da rocha matriz. Rochas ricas em minerais intemperizados de Zn, como esfalerita, zincosita e zincinto, podem dar origem a solos contendo altas concentrações de Zn (BROADLEY et al., 2007). Apesar disso, a deficiência de Zn é um problema amplamente generalizado na produção agrícola, relatado na maioria dos tipos de solo. A deficiência de Zn é mais comumente associada a solos inundados, com aeração insuficiente, do que a solos de sequeiro ou de textura franco-arenosa. (TAKKA; WALKER, 1993). O Zn

é absorvido pelo sistema radicular das plantas principalmente como cátion divalente (Zn^{2+}), porém, em princípio, também pode ser absorvido como cátion monovalente ($ZnOH^{+}$) em pH alto (MARSCHNER, 2011).

A absorção de Zn do solo é regulada por fatores físicos e químicos, como pH, valor total de Zn e teor de matéria orgânica. Solos muito acidificados geralmente possuem valor total de Zn baixo, devido à intensa lixiviação. Diante disso, a correção desses solos deve levar em conta que a usabilidade de Zn diminui com o aumento do pH, pois resulta em sua imobilização e precipitação (MOUSAVI; GALAVI; REZAEI, 2013). O uso de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) como corretor da acidez do solo pode levar à precipitação de Zn na forma de carbonato de zinco ($ZnCO_3$) ou hidróxido de zinco ($Zn(OH)_2$) (MALAKOUTI, 2007).

A deficiência de Zn resulta no surgimento de anormalidades nas plantas, que são percebidas na forma de sintomas visuais, como crescimento atrofiado, clorose e dimuinuição do tamanho das folhas. Essa deficiência pode resultar em perda da produtividade e redução da qualidade dos produtos agrícolas colhidos, bem como aumentar a susceptibilidade das plantas a injúrias e doenças (HAFEEZ; KHANIF; SALEEM, 2013). A deficiência de Zn afeta não somente o crescimento e o desenvolvimento das plantas, mas também tem efeitos negativos sobre os seres humanos. Estima-se que 17,3% da população mundial estejam sujeitos a riscos de deficiência de Zn, principalmente em países de baixa renda. Isso se deve ao baixo teor de Zn presente nas plantas agrícolas cultivadas em solos com deficiência de Zn, e, por isso, a biofortificação de alimentos que compõem a base da piramide alimentar é uma alternativa para incrementar dietas pobres em Zn (KACHINSKI; VIDIGAL; ÁVILA, 2020; RUDANI; VISHAL; KALAVATI, 2018).

O Zn é o segundo maior metal de transição mais abundante nos organimos, atrás apenas do Fe, além de ser o único presente em todas as classes de enzimas (oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases) (BROADLEY et al., 2007). Suas funções metabólicas são influenciadas por sua forte tendência de formar complexos tetraédricos com ligantes doadores de N-, O- e S-, e assim desempenha um papel catalítico e estrutural nas reações enzimáticas (MARSCHNER, 2011). Além disso, o Zn está envolvido na expressão de genes que codificam enzimas de defesa contra o

estresse oxidativo, como peroxidase do ascorbato e redutase da glutationa (TSONEV; CEBOLA LIDON, 2012).

Em condições de deficiência de Zn, há diminuição da atividade da enzima dismutase do superóxido (Cu-Zn SOD), o que resulta no aumento dos radicais livres como o superóxido (O_2^-), uma molécula nociva aos tecidos vegetais, podendo causar danos às membranas lipídicas e aumentar sua permeabilidade indesejadamente (SUGANYA; SARAVANAN; MANIVANNAN, 2020). Por outro lado, a regulação e a manutenção, da expressão gênica necessária para a tolerância a estresses ambientais em plantas são dependentes de Zn (HAFEEZ; KHANIF; SALEEM, 2013). Um estudo realizado por Khatun et al. (2018) mostrou que os mecanismos de tolerância à deficiência de Zn em um genótipo tolerante de *Z. mays* podem estar relacionados ao aumento na expressão de genes transportadores de Zn, como *ZmZIP1*, *ZmZIP4* e *ZmIRT1*, e ao aumento da atividade das enzimas do metabolismo antioxidante, como SOD e peroxidases (POD).

Em altas concentrações, o excesso de Zn biodisponível pode causar toxicidade às plantas, gerando respostas típicas de estresse provocado por metais pesados, como declínio da biomassa, murcha, necrose nas folhas e inibição de alongamento e divisão celular (TSONEV; CEBOLA LIDON, 2012). Entretanto, as células vegetais desenvolveram mecanismos de regulação homeostática para lidar com a toxicidade, quando expostas à grande disponibilidade de Zn em seu ambiente. Dentre estes mecanismos, incluem a redução do influxo de Zn para as células, a estimulação do efluxo de Zn do citosol, o sequestro de Zn nos vacúolos e a quelação de Zn por ligantes específicos (CARDINI et al., 2021).

2.5 **- Absorção e transporte de Zn e de Cd em plantas**

A absorção de metais pesados pelas plantas é regulada por uma série de mecanismos que envolvem a ação de bombas de prótons, co- e antitransportadores e proteínas de membrana. Cada mecanismo de transporte pode absorver uma variedade de íons, dependendo das interações dessas espécies iônicas durante sua absorção, incluindo metais indesejados (TANGAHU et al., 2011). Esses transportadores atuam tanto na membrana

plasmática, promovendo a entrada de metais no citoplasma, quanto nas membranas de organelos celulares resposáveis pela remobilização de metais em compartimentos intracelulares (HALL; WILLIAMS, 2003).

O Zn é absorvido principalmente na froma de Zn^{2+} e pode ser transportado das raízes a longa distância via xilema até a parte aérea da planta na forma de complexos com ácidos orgânicos ou de íons divalentes livres. No floema, Zn é encontrado em teores relativamente altos, associado a compostos orgânicos de baixo peso molecular, demonstrando que este metal é translocado através dos tecidos do xilema e do floema (MARSCHNER, 2011).

A absorção e a homeostase de Zn nas plantas dependem da atividade de vários produtos gênicos. O primeiro gene relacionado a transportadores de Zn em plantas foi sequenciado em *Arabidopsis thaliana*. Esse gene pertence à família gênica das “proteínas transportadoras reguladas por zinco” (ZIP, *ZRT/IRT-like transporter proteins/zinc-regulated transporter- iron-regulated transporter proteins*) (TSONEV; CEBOLA LIDON, 2012). As proteínas semelhantes à ZRT/IRT (ZIP) compõem uma das famílias de transportadores mais importantes para Zn^{2+} e outros íons metálicos do espaço extracelular para o citoplasma (NISHIDA; MIZUNO; OBATA, 2008). Membros da família ZIP são capazes de transportar não somente Zn, mas também metais como Fe, Mn e Cd (YANG et al., 2009). A expressão desses genes é regulada negativamente em função da fertilização com Zn. O aumento na expressão de genes associados aos transportadores ZIP pode estar relacionado aos mecanismos de tolerância à deficiência de Zn em plantas de *Z. mays* genótipo-tolerantes (KHATUN et al., 2018). Em *Citrus sinensis*, a expressão dos genes *ZIP1*, *ZIP3* e *ZIP4* é induzida pela deficiência de Zn, similar ao comportamento de seus homólogos em *Oryza sativa* e *A. thaliana* (XING et al., 2016).

Outra família de genes que codificam para transportadores de Zn é a dos facilitadores de difusão de cátions (CDF, *Cation Diffusion Facilitator*). Por exemplo, a MTP1 – proteína 1 de tolerância a metais – (MTP, *Metal Tolerance Proteins*), designada inicialmente como transportador de zinco de *A. thaliana* (ZAT, *zinc transporter of A. thaliana*), atua na mediação da desintoxicação causada por Zn por meio de sequestro vesicular/vacuolar desse elemento metálico (DESBROSSES-FONROUGE et al., 2005; TSONEV; CEBOLA LIDON, 2012). Em *Populus trichocarpa*, uma espécie candidata ao uso em

fitorremediação de solos contaminados, os produtos dos genes *PtrMTPs* foram previstos para estarem localizados no vacúolo e, ou membrana celular, possuindo característica típica das MTPs: domínio de efluxo catiônico (GAO et al., 2020).

Essas duas famílias de genes, que codificam para transportadores de Zn, são bem conservadas em todos os níveis filogenéticos e suas principais distinções se devem ao fato de que os transportadores da família ZIP estão envolvidos mais comumente na absorção celular de Zn, enquanto os membros da família CDF medeiam o efluxo de Zn ou facilitam seu transporte para os compartimentos celulares responsáveis por seu armazenamento e detoxicação (GAITHER; EIDE, 2001).

Outros transportadores de Zn em plantas incluem as ATPases tipo P, conhecidas como ATPases de metais pesados (HMAs, *Heavy Metal ATPases*), como por exemplo a HMA2 e a HMA4, importantes para a homeostase celular (TSONEV; CEBOLA LIDON, 2012). Maiores expressões de *AhHMA4* em *Arabidopsis halleri* estão associadas à hiperacumulação e à hipertolerância de metais, devido a alta eficiência na translocação de elementos metálicos, como Zn e Cd (TALKE; HANIKENNE; KRÄMER, 2006). Como foi observado por Wong e Cobbett (2009), as ATPases transportadoras de Zn (HMA2 e HMA4) são os principais mecanismos de translocação de Cd da raiz para a parte aérea em *A. halleri*, e sua perda de função está associada à perda da capacidade de hiperacumulação desse metal.

A família gênica das proteínas de macrófagos, associadas à resistência natural de plantas (NRAMPs, *Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins*), descreve uma família altamente conservada de proteínas integrais de membrana que estão envolvidas no transporte de íons metálicos essenciais, como Fe^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+}, e não essenciais, como Cd^{2+} (HALL; WILLIAMS, 2003). Em *Sedum alfredii*, uma espécie vegetal hiperacumuladora capaz de acumular quantidades significativas de Cd e Zn sem exibir efeitos prejudiciais ao seu crescimento e metabolismo, possui alta expressão do gene *SaNRAMP1* nos tecidos vegetativos jovens da parte aérea, sendo esta 10 vezes maior nas folhas jovens do que nas folhas maduras, mas não apresenta expressão nas raízes, indicando seu possível papel na retranslocação de metais pesados no floema (ZHANG et al., 2020).

Devido à falta de função metabólica de Cd, é improvável que os organismos tenham evoluído mecanismos ativos de absorção desse elemento metálico. A compreesão dos mecanismos de absorção de elementos essenciais tem mostrado que essas vias são responsáveis pela absorção e pelo transporte de Cd, em função da baixa especifidade pelo substrato e, ou das características químicas em comum entre o Cd e outros elementos, como Zn e Ca (SMITH; WEI; LEE, 2016). Por exemplo, o transportador OsHMA2 desempenha um papel no carregamento de Zn e de Cd no xilema e participa da translocação, da raiz para a parte aérea, desses metais em *O. sativa* (TAKAHASHI et al., 2012). Em *T. aestivum* e *Triticum turgidum*, Hart et al. (2002) demonstraram que há uma interação competitiva na cinética de absorção de Cd^{2+} e de Zn^{2+}, indicando que Cd^{2+} e Zn^{2+} compartilham um sistema de transporte comum na membrana plasmática das células das raízes dessas duas variedades de trigo.

Genes da família NRAMPs podem ter um papel importante na absorção de Cd pelas raízes de *T. cacao*. Ullah et al. (2018) investigaram a família gênica de NRAMPs em *T. cacao*, a fim de identificar seu papel na absorção e no transpote de Cd nessa espécie. Eles identificaram cinco genes da família NRAMP em *T. cacao* e demonstraram que um deles (*TcNRAMP5*) pode codificar para uma proteína capaz de transportar Cd. A partir desses resultados, os referidos autores realizaram estudos de expressão gênica em plantas jovens de *T. cacao* cultivadas hidroponicamente com várias combinações de cátions divalentes e na ausência deles. De acordo com estes autores, verificou-se que o transcrito de *TcNRAMP5* é expresso principalmente nas raízes de plantas jovens de *T. cacao*. Por fim, realizaram a expressão heteróloga desse gene em cepas de leveduras. As células de levedura que expressam *TcNRAMP5* acumularam até três vezes mais Cd em comparação com as células do controle. A análise funcional por expressão em levedura forneceu evidências de que *TcNRAMP5* codifica uma proteína capaz transportar Cd^{2+}, evidenciando o papel desse gene na regulação da absorção de Cd em plantas de *T. cacao*. Esses resultados são condizentes com os obtidos por Rodríguez-Bolaño, Marín Véleza e Villanueva-Mejía (2020), ao realizarem uma análise *in silico* de metadados em busca de genes-chave associados ao processo de acumulação de Cd em *T. cacao. Eles* verificaram que o gene *TcNRAMP5*, homólogo ao *OsNRAMP5* de *O. sativa*, está

fortemente relacionado ao processo de absorção de Cd na raiz, fazendo dele um forte candidato para o silenciamento gênico por meio de edição genética.

2.6 - **Estresse provocado por Cd e mecanismos de defesa em plantas**

Em plantas, as alterações fisiológicas responsivas a fatores que perturbam o equilíbrio metabólico são consideradas como estresse. Entretanto, como os processos metabólicos normais são muito flexíveis, as mudanças nas condições ambientais, que variam em ciclos diários e sazonais, podem resultar em alteração do metabolismo normal sem necessariamente resultar em estresse. Portanto, o estresse é uma alteração imposta aos processos metabólicos normais, ocasionando prejuízos ao organismo, como lesões, doenças ou alterações fisiológicas (BANO; AMIST; SINGH, 2019).

A primeira barreira imposta para tentar impedir a entrada de Cd nas plantas está localizada ainda nas raízes. Por meio da secreção de exsudados, compostos por diferentes tipos de ácidos orgânicos, o Cd pode ser complexado e precipitado no solo ou ser retido na epiderme de células radiculares. Os grupos funcionais hidroxila, tiol e carboxila, abundantes na celulose, hemicelulose e pectina da parede celular, podem se ligar ao Cd^{2+} para que este possa ser retido nas paredes das células da raiz, promovendo seu acúmulo nos tecidos corticais dos pelos e das pontas radiculares (YANG et al., 2021).

A quelação de íons de Cd e sua compartimentalização no vacúolo são considerados mecanismos de detoxificação desse metal pesado nas plantas, o que ocorre pela ação de importantes agentes antioxidativos não-enzimáticos, como as fitoquelatinas (FQ), as metalotioneínas (MT) e a glutationa no estado reduzido (GSH) (GONZÁLEZ; LAPORTE; MOENNE, 2021). As PCs são pequenos peptídeos de ligação a metais com a estrutura (γ-Glu-Cys)nGly, onde o valor de n varia de 2 a 11, cuja síntese é induzida por vários metais, especialmente por Cd (MISHRA et al., 2006). Já as MTs são pequenas proteínas ricas em cisteína (cerca de 10 kDa) que desempenham um papel importante na tolerância e acúmulo de Cd em plantas genótipo-tolerante, atuando como quelantes de íons metálicos por meio dos grupos sulfidrila das cisteínas (GONZÁLEZ; LAPORTE; MOENNE, 2021).

García de La Torre et al. (2021) investigaram os efeitos do estresse induzido por Cd em raízes de dois acessos contrastantes de *Medicago truncatula* e encontraram forte expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de glutationa e de fitoquelatina (*MtCYS*, *MtgECS* e *MtGSHS*), como reposta diferencial do genótipo não-tolerante. Apesar disso, essas respostas não foram suficientes para evitar o desbalanço no estado redox e os consequentes danos oxidativos, como demonstraram os resultados da peroxidação lipídica. Entretanto, isso sugere que a tolerância ao Cd em plantas genótipo-tolerantes de *M. truncatula* não depende tanto da quelação com a fitoquelatina, mas sim que essa é uma resposta comum em variedades sensíveis ao estresse induzido por Cd.

Outro importante mecanismo molecular, que auxilia no aumento da tolerância ao estresse oxidativo, é a prolina, um aminoácido multifuncional que atua na manutenção da integridade de proteínas, membranas e estruturas subcelulares, além de auxiliar na proteção das funções celulares pela eliminação de ERO (KAUR; ASTHIR, 2015). O teor de prolina livre pode aumentar devido ao tratamento com Cd. Dinakar et al. (2008) estudaram a fitotoxicidade provocada por Cd em *Arachis hypogaea* após 10 dias de exposição ao Cd. Os teores de prolina aumentaram significativamente nas folhas e raízes, em todas as doses de Cd aplicadas, em comparação ao controle, além de terem sido maiores nas folhas do que nas raízes. A aplicação de prolina exógena também parece ter um papel ativo na proteção das membranas celulares, bem como no aumento das atividades de SOD e CAT (ISLAM et al., 2009).

Para manter seu estado redox e mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo frente à produção excessiva de ERO, as plantas também utilizam de enzimas capazes de catalisar reações que convertem os radicais livres em moléculas inofensivas. Várias enzimas antioxidantes como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaicol (GPX) e redutase da glutationa (GR) estão envolvidas nos processos de combate ao estresse oxidativo (AMIST; BANO; SINGH, 2019). As SODs são metaloprotéinas que constituem a primeira linha de defesa enzimática contra ERO nas plantas, por meio da dismutação de $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2, seguida da conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 pela ação da catalase e da peroxidase da glutationa (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). A atividade das enzimas

antioxidativas pode ser alterada em decorrência do estresse causado por Cd em diferentes espécies vegetais (HASHEM, 2014; NIKOLIC et al., 2008; ZENG et al., 2017).

2.7 - Impactos da contaminação por Cd no cultivo de *Theobroma cacao*

Devido à crescente preocupação com a exposição alimentar a elementos metálicos tóxicos por sua população, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos recentemente impôs um limite máximo permitido para o Cd em produtos à base de cacau, que entrou em vigor a partir janeiro de 2019. Como a quantidade de Cd, nos produtos à base de cacau, está relacionada com o teor total de cacau presente nesses alimentos, foram estabelecidos diferentes porcentagens de cacau utilizadas nas formulações. Os teores máximos de Cd por kg de sólidos secos totais de cacau foram definidos como: 0,10 mg kg^{-1} para chocolate ao leite com teor de cacau <30%; 0,30 mg kg^{-1} para chocolate ao leite com teor de cacau ≥30% e para chocolate com teor de cacau <50%; 0,80 mg kg^{-1} para chocolate com teor de cacau ≥50% e e 0,60 mg kg^{-1} para cacau em pó (EU, 2014).

Embora a nova regulamentação da União Europeia tenha impactos sobre a cadeia global de produção de cacau, os países produtores da América Latina e do Caribe podem sofrer mais fortemente com as sanções e eventos decorrentes dessa regulamentação, uma vez que dentre as regiões produtoras de cacau do mundo, essa é a que possui maior teor de Cd presente nas amêndoas (METER; ATKINSON; LALIBERTE, 2019). Vanderschueren et al. (2021) realizaram uma metanálise (n= 780) buscando entender a distribuição percentual dos teores de Cd em amêndoas de cacau originárias do Equador e Honduras. Nesse estudo, os autores verificaram que os teores médios de Cd em amêndoas de cacau, advindas dessas regiões, variam entre 0,02 e 12 mg Cd kg^{-1}, e em muitos casos sendo consideravelmente acima do limite adotado pelos autores como ideal para a exportação (0,60 mg kg^{-1}). Além disso, os resultados mostraram que a fonte principal de Cd nessas regiões é de origem geogênica, ao invés de antropogênica, e que o teor de Cd nas amêndoas se dá em função do teor total de Cd nos solos, do pH e do carbono orgânico presente nesses solos.

Para que os produtos à base de cacau estejam dentro dos padrões de segurança estabelecidos, em relação ao teor de Cd, é preciso que a matéria prima utilizada na fabricação tenha teores mínimos possíveis desse contaminante. Meter, Atkinson e Laliberte (2019) apontaram que a redução da absorção de Cd pelas plantas de *T. cacao* é uma das estratégias mais promissoras de mitigação, uma vez que essa prática permite que baixos teores de Cd cheguem às amêndoas de cacau, sem a diminuição das qualidades organolépticas que poderiam ser ocasionadas por métodos de processamento pós-colheita de mitigação de Cd, o que poderia comprometer a qualidade final dos produtos.

O Regulamento da Comissão n° 488/2014 se aplica apenas aos produtos finais vendidos aos consumidores, não às amêndoas de cacau, o que gera dúvidas nos produtores em saber quais teores de Cd são aceitáveis para a venda. Vanderschueren et al. (2021) assinalaram que a indústria de processamento tem utilizado os limites aceitos para os produtos finais como requisitos relativos aos teores máximos de Cd presente nas amêndoas de cacau fermentadas e secas. Esses limites não oficiais da indústria variam entre 0,50 e 1,10 mg Cd kg^{-1}, mas alguns cacauicultores relataram exigências ainda menores para conseguirem vender suas amêndoas. Rofner (2021) propôs que o limite adotado para as amêndoas de cacau fermentadas e secas esteja entre 1,14 e 1,22 mg Cd kg^{-1}.

A seleção de genótipos de *T. cacao* capazes de acumular teores menores de Cd é extremamente dificil, pois a qualidade do chocolate e a resistência às doenças dependem do genótipo em questão, o que dificulta o trabaho de melhoramento (MADDELA et al., 2020). Entretanto, um estudo conduzido no Peru, com 53 genótipos de *T. cacao* comumente cultivados em países da América-Latina, a fim de verificar quais deles acumulam menos Cd na parte aérea, identificou que 11 genótipos estudados apresentam baixo acúmulo de Cd (ARÉVALO-HERNÁNDEZ et al., 2020).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil (14° 47' S, 39° 10' W). Foram utilizadas sementes do genótipo de *T. cacao* CCN 51, provenientes de frutos maduros de plantas matrizes autopolinizadas, com oito a dez anos de idade, do Banco de Germoplasma de Cacau do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Bahia, Brasil. O genótipo de *T. cacao* CCN 51(*Colección Castro Naranjal 51*) é resultado do cruzamento do híbrido IMC 67 (amazônico) x ICS 95 (trinitário) com um genótipo equatoriano denominado de "*Canelos*", sendo, portanto, um híbrido duplo (SARANGO BRAVO, 2009). Além disso, CCN 51 é autocompativel, altamente produtivo, resistente a doenças e capaz de produzir a partir do segundo ano de idade. Suas amêndoas possuem um dos maiores rendimentos de manteiga para a indústria de cacau, em torno de 54% (BOZA et al., 2014).

As sementes foram pré-germinadas em bandejas plásticas, parcialmente imersas em água destilada, por um período de 48h, até a protrusão da radícula. Em seguida, foram transplantadas diretamente no solo, de textura franco-arenosa, em vasos com capacidade para 5 L. O pH do solo foi corrigido previamente, de acordo com as análises físico-químicas realizadas e com as exigências nutricionais de *T. cacao*. Fez-se adubação de cobertura 15 dias após o transplantio e a cada 15 dias, por cinco vezes, de acordo com resultados da análise de solo, sem adição de Zn. Durante todo o período experimental as plantas foram irrigadas com água de chuva, mantendo o solo próximo à capacidade de campo.

Aos 126 dias após o transplantio foram adicionados 100 mL de solução de Cd ou combinada de Zn+Cd por vaso, de acordo com os tratamentos equimolares de Cd e Zn+Cd, mantendo sempre a dose de Cd constante, exceto no controle, perfazendo um total de seis tratamentos [T0 (controle, sem adição de Zn e Cd no solo), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T2 (0,4 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T4 (1,2 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8

mmol Cd kg^{-1} solo)], utilizando $ZnCl_2$ e $CdCl_2$ como fontes de Zn e Cd, respectivamente. A dose de Cd e as de Zn foram preestabelecidas baseadas no trabalho realizado por SANTOS et al. (2020), que, também, utilizaram o mesmo genótipo de *T. cacao* e as mesmas fontes de Cd e Zn.

Para as análises bioquímicas e de expressão gênica, foram coletadas a segunda ou terceira folha madura a partir do ápice de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, no período de 3, 6, 12, 24, 48 e 96h após a aplicação dos tratamentos (AAT), ao passo que para as análises proteômicas foram selecionados os tratamentos e os períodos de coleta de material vegetal mais contrastantes, baseado nas análises de atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo e da expressão de genes associados à biossíntese de algumas proteínas do metabolismo antioxidativo, do fotossistema 2 (PS2) da fotossíntese e da quelação e transporte de metais, por meio de análise multivariada de componentes principais.

3.2 **- Metabolismo antioxidativo**

Para a determinação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo, foram macerados 40 mg de tecido vegetal de folhas liofilizadas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, coletadas nos períodos de 3, 6, 12, 24, 48 e 96h AAT. Foram adicionados 0,028 g de polivinilpirrolidona (PVP) ao tecido macerado (0,7 g de PVP/g de tecido). Em seguida, foram acrescentados 800 uL de tampão de extração, específico para a determinação da atividade de cada enzima estudada, seguido de agitação em vórtex. Logo após, as amostras foram sonicadas em um ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W), sob amplitude de 70%, 8 pulsos de 5s, com intervalos de 10s, seguida de centrifugação (14000 rpm, rotor com 100 mm de diâmetro) por 10min a 4°C. Imediatamente após, coletou-se o sobrenadante, transferindo-o, em seguida, para um novo tubo que, posteriormente, foi usado para a determinação das atividades enzimáticas. Os ensaios foram realizados com um *pool* de cinco repetições biológicas por tratamento, em quadruplicata, em um espectrofotômetro de microplacas do tipo *Spectramax Paradigm* (Molecular Devices®).

3.2.1 - Atividade da dismutase do superóxido (SOD) (EC1.15.1.1)

A atividade de SOD foi determinada utilizando-se a metodologia proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. O princípio do ensaio se baseia na redução fotoquímica do nitroazul de tetrazólio (NBT), mediada por radicais superóxidos, levando à formação de formazana. A formação de formazana ocorre quando a riboflavina é submetida à luz, sofrendo fotólise, e perdendo um elétron para o oxigênio do ambiente (O_2), resultando na geração do ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Quando presente, SOD compete com NBT pelo radical superóxido e inibe a formação de formazana (WEYDERT; CULLEM, 2010).

Inicialmente, determinou-se, por meio de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda (ʎ) de 560 nm e à temperatura de 26°C, o tempo de reação necessário para a fotorredução completa do NBT e formação da formazana, sendo esse tempo igual a 15min. Em seguida, novas reações foram feitas contendo o extrato enzimático. As reações foram montadas por meio da adição de um tampão de reação, contendo tampão fosfato de potássio (44,5 mM, pH 7,8), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 2 µM e metionina a 13 mM, em 30 µL do extrato enzimático bruto. Em seguida, coletou-se 160 µL dessa mistura, aos quais foram adicionados 20 µL de NBT a 750 µM e 20 µL riboflavina a 1 mM, dando-se início à reação. A leitura inicial ocorreu depois de a microplaca ter sido incubada por 5min no escuro, seguida da segunda leitura, realizada logo após 15min de exposição à luz fluorescente de 15W. Foram considerados como branco os poços que não continham o extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática de SOD foi considerada como a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da redução fotoquímica do NBT.

3.2.2 - Atividade de catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

A atividade de CAT foi determinada pelo consumo de H_2O_2 em espectrofotômetro com ʎ de 240 nm e à temperatura de 30°C, segundo Havir e Mchale (1987), com modificações. As reações foram preparadas com tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e 15 µL do extrato enzimático bruto, totalizando 180 µL. A essa mistura foi adicionado 20 µL de H_2O_2 a 300 mM, iniciando-se a reação, que foi monitorada durante 300s. As reações em branco

foram feitas sem adição do extrato enzimático bruto. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 36 M^{-1} cm^{-1}.

3.2.3 - Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) (EC EC 1.11.1.11)

A determinação da atividade de APX foi realizada segundo a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), com modificações. O princípio do ensaio se baseia na capacidade da enzima em catalisar a oxidação de um micromol de ácido ascórbico por minuto. As reações foram montadas por meio da adição de um tampão de reação (contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,0, EDTA a 500 mM e ácido L-ascórbico a 5 mM) a 20 µL do extrato enzimático bruto. Em seguida, coletou-se 180 µL dessa mistura, a qual foram adicionados 20 µL de H_2O_2 a 300 mM. Fez-se a leitura do decréscimo na absorbância em ʎ de 290 nm, durante 210s, à temperatura de 26°C. As reações em branco foram feitas sem adição do extrato enzimático bruto e do H_2O_2. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM cm^{-1}.

3.2.4 - Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) (EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade de GPX foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pirovani et al. (2008), com modificações. As reações foram preparadas com a mistura de 140 µL de tampão de atividade (guaiacol a 40 mM, fosfato de potássio a 20 mM pH 6,0 e H_2O_2 a 0,0/6%), 120 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) e 20 µL do extrato enzimático bruto. As leituras de absorbância foram realizadas em ʎ de 470 nm, à temperatura de 25°C, durante 210s. Atividade enzimática foi calculada em função do aumento do consumo de guaiacol, em µmol min^{-1} g^{-1} MS, conforme a equação y= 0,01890 + 0,1284x (R^2 = 0,99) (REHEM et al. 2011), originada a partir de uma curva padrão para peroxidase-guaiacol.

3.3 **- Expressão gênica**

3.3.1 - Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a quantificação relativa de genes relacionados ao metabolismo antioxidativo, à biossíntese das proteínas do fotossistema 2 da fase fotoquímica da fotossíntese e à quelação e transporte de metais, foram coletadas a segunda ou terceira folha madura a partir do ápice de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51 no período de 3, 6, 12, 24, 48 e 96h AAT. Imediatamente após a coleta, as folhas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a - 80°C, sendo posteriormente liofilizadas. A extração de RNA foi realizada a partir de um *pool* de cinco repetições biológicas por tratamento, utilizando-se o *RNAqueous kit* (Ambion®), segundo protocolo do fabricante. Em seguida, a pureza das amostras foi avaliada a partir de quantificação em espectrofotômetro do tipo *NanoDrop™ 2000/2000c*, utilizando-se uma alíquota de 1 µL de RNA. A integridade do RNA foi testada por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 100 ng de RNA total por amostra (Figura 1**)**.

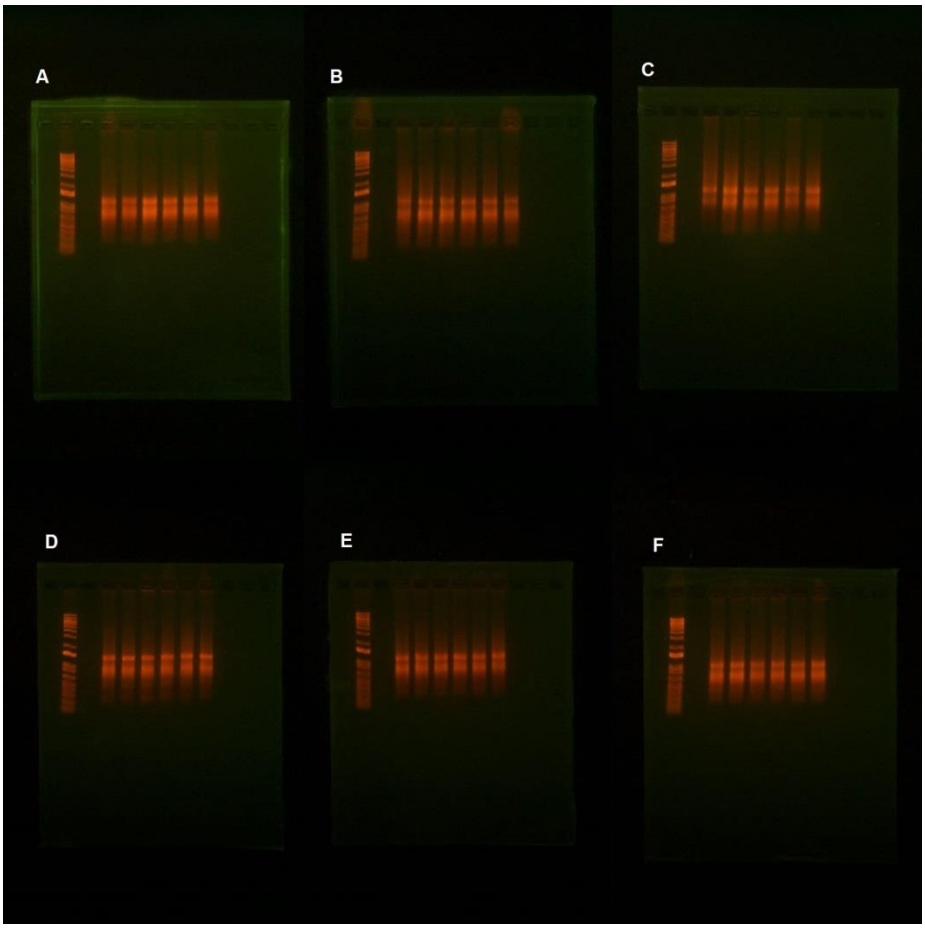

Figura 1 – Eletroforese, em gel de agarose a 1%, de RNA total extraído de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a

uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas nos períodos de 3 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D), 48 (E) e 96h (F) após aplicação dos tratamentos. Marcador 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)

Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com DNAse I (*Invitrogen Thermo Scientific*®) e incubadas a 37°C por 30min, seguido da adição de EDTA a 50 mM e incubação a 65°C por 10 min. Por fim, a síntese de cDNA foi realizada em reações de 20 uL, contendo 500 ng de RNA total cada, tratados com DNAse I, utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription (200 reactions) kit* (*Applied Biosystems*®), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram incubadas a 25°C por 10min, 37°C por 120min, 85°C por 5min e 4°C por 1min.

3.3.2 - Análise de RT-qPCR

A PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada em um termociclador específico para *real time PCR* modelo *ABI 7500* (*Applied Biosystems*®), usando sequência de detecção (fluoróforo) não específica *SYBR Green I* (*Applied Biosystems*®). A amplificação por PCR prosseguiu por 40 ciclos e consistiu na desnaturação a 95°C por 15s, anelamento e extensão do *primer* a 60°C por 1min e 30s. A abundância de transcritos foi analisada por meio de *primers* específicos dos genes associados ao metabolismo antioxidativo [*Cu-Zn SODCyt*, *Cu-Zn SODChl* e peroxidase (*per-1*)], à biossíntese das proteínas do PS2 da fase fotoquímica da fotossíntese (intrínseca - *psbA* e extrínseca - *psbO*) e à quelatação e transporte de metais (metalotioneína – *Mt-2*) em *T. cacao* (Quadro 1). Para testar a qualidade desses *primers* e a especificidade de seus produtos, os *amplicons* da RT-qPCR foram monitorados após 40 ciclos de PCR por uma curva de análise de produtos de reação (curva de *melting*), capaz de distinguir produtos de PCR gene-específico daqueles não específicos. A expressão relativa dos genes foi calculada utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram testados, como candidatos a controle endógeno, os genes envolvidos na biossíntese da desidrogenase do gliceraldeido-3-fosfato (GAPDH), actina, β-tubulina e malato desidrogenase (MDH). Dentre estes, foram escolhidos MDH e actina como normalizadores, por apresentarem maior estabilidade, conforme teste realizado

utilizando-se o software *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004). Reações de controle negativo (no *template control* - NTC) foram montadas para todos os genes envolvidos no experimento.

Quadro 1 - Pares de *primers* de genes específicos usados na análise de RT-qPCR.

Nome do Gene	Sequência do *primer*	Tamanho amplicon (pb)	GC (%)	Tm (°C)	Descrição
PER-1	Forward: 5'CAGGTGTCGTGGGATCAAGA - 3'	75	55.00	59.39	*Theobroma cacao* peroxidase 15 (LOC18589661)
	Reverse: 5' TGGAAAAACTACGCCAAATATGC - 3'		39.13	58.26	
ChlCuZnSOD	Forward: 5' AATGGATGCATGTCAACAGGAGC - 3'	98	61.74	61.74	*Theobroma cacao* superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic (LOC18590466)
	Reverse: 5' ATGTTTCCCAGGTCACCCGC - 3'		62.76	62.76	
CytCuZnSOD	Forward: 5' GATGATGGCTGTGTGAGTTTCTCT - 3'	85	45.83	60.86	*Theobroma cacao* superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC18599890)
	Reverse: 5' CAACAACAGCTCTTCCAATAATTGA - 3'		36.00	58.32	
psbA	Forward: 5' GGTTTGCACTTTTACCCGA - 3'	1027	47.37	56.04	*Theobroma cacao* beta-amylase 3, chloroplastic (LOC18606751)
	Reverse: 5' CTCATAAGGACCGCCATT - 3'		50.00	53.99	
psbO	Forward: 5' GCAAACGCTGAAGGAGTT - 3'	137	50.00	55.92	*Theobroma cacao* oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (LOC18611024)
	Reverse: 5' GGCTTGAAGGCAAATGAGTC - 3'		50.00	57.36	
GAPDH	Forward: 5' GATGCTCCTATGTTTGTTGTGG - 3'	222	45.45	57.64	*Theobroma cacao* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (LOC18605057)
	Reverse: 5' TCTTCCTCCTCTCCAGTCCTT - 3'		52.38	59.28	
β –Tubulina	Forward: 5' TGCAACCATGAGTGGTGTTCA - 3'	100	60.41	47.62	*Theobroma cacao* ABC transporter G family member 13 (LOC18589878)
	Reverse: 5' CAGACGAGGGAAGGGAATGA - 3'		58.80	55.00	
Actina	Forward: 5' TCCTCTTCCAGCCATCTCTC - 3'	171	55.00	58.21	*Theobroma cacao* actin-7 (LOC18611763)
	Reverse: 5' TCTCCTTGCTCATTCGGTCT - 3'		50.00	58.44	
MDH	Forward: 5' AAAATGGAGTTGGTGGATGC - 3'	102	45.00	56.57	*Theobroma cacao* malate dehydrogenase (LOC18603218)
	Reverse: 5' AACCATGACTGCGATGTTGA - 3'		45.00	57.82	
Metalotin2	Forward: 5' GACAACCCTTGCACTTGTAAATG - 3'	136	43.48	58.70	*Theobroma cacao* metallothionein-like protein type 2 (LOC18597760)
	Reverse: 5' CAAGCCATGGCAACTTTATTCTAA - 3'		37.50	58.04	

3.4 - **Análise multivariada de componentes principais (MCP)**

A análise MCP foi realizada a partir dos resultados da atividade das enzimas do estresse oxidativo (SOD, CAT, APX e GPX) e da expressão relativa de genes (*SODchl*, *SODcyt*, *per-1*, *psbA*, *psbO* e *Mt-2*) de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, submetidas a doses crescentes de Zn no solo na presença de Cd.

Inicialmente, os valores de cada variável foram padronizados para média qualquer e variância 1 por meio da equação $Z_{ij}= X_{ij}/S(X_j)$, onde X_{ij} é o valor da i-ésima observação da variável X_j, e S(Xj) é o desvio padrão da variável X_j. Em seguida, os valores padronizados foram submetidos à análise fatorial multivariada usando como critério *factors loadings* > 0.70. Para cada variável selecionada pelo valor de *factor loading,* a média de cada tratamento foi utilizada como entrada de dados na análise de componentes principais com biplot e os valores foram obtidos a partir da decomposição em valores singulares.

Entre as variáveis bioquímicas inicialmente analisadas, somente SODcyt, CAT e GPX apresentaram *factors loadings* > 0.70, sendo tais variáveis selecionadas para a análise de MCP.

3.5 - ***Western Blot***

A análise do acúmulo de proteínas, em resposta ao estresse, foi feita utilizando-se 20 µg de proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, extraídas de acordo com o protocolo descrito por Pirovani et al. (2008) e posteriormente separadas em um mini gel SDS-PAGE (acrilamida a 12,5%). Em seguida, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi imersa no corante *Ponceau* por 10min, a fim de observar se o processo de transferência ocorreu adequadamente. Logo após, foram feitas lavagens com tampão de TBS-T 1x (Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0; NaCl a 140 mM e Tween 20 a 0,05%) para remover o excesso de corante da membrana. Imediatamente após, a membrana foi bloqueada com 2,5% de leite desnatado (w/v) em tampão de TBS-T. Em seguida, foram feitas três lavagens com o tampão TBS-T 1x na membrana,

retirando todo o excesso de leite restante. As subunidades beta da catalase (CAT, 55 kDa) e da sintase de ATP (β ATP-sintase, 53 kDa) foram detectadas utilizando os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-catalase de *Arabidopsis thaliana* (Agrisera-AS095001) na proporção de 1:1000 e anti-sintase de ATP de *A. thaliana* (Agrisera-AS05085) na proporção de 1:2000, incubados por 24h em temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e incubada com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina, por 2h. Por fim, foi feita a revelação utilizando-se 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCip) e azul de nitrotetrazólio (NBT) para a detecção colorimétrica da fosfatase alcalina presente no anticorpo secundário. O acúmulo foi determinado a partir das imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o *software GelQuant.Net*.

3.6 **- Análise proteômica**

3.6.1 - Extração de proteínas totais de amostras foliares

As proteínas foram extraídas a partir de um *pool* de cinco repetições biológicas por tratamento, de acordo com a metodologia descrita por Pirovani et al. (2008), recomendada para a extração de proteínas de tecidos ricos em compostos fenólicos. Os tratamentos foram escolhidos de acordo com os resultados da análise multivariada de componentes principais (MCP). Inicialmente, foram ressuspendidos 0,2 g de tecido liofilizado e macerado de folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, correspondentes aos tratamentos selecionados a partir da análise de MCP, em 1,5 mL de acetona a 100%, agitados em vórtex por 30s, seguido de centrifugação (14000 rpm, rotor com 100 mm de diâmetro) por 5min a 4°C. A lavagem foi repetida por cinco vezes, até a perda máxima de pigmentação do tecido. Na última lavagem o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco em temperatura ambiente por 40min. Após esse tempo, o *pellet* foi ressuspendido em uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% com acetona a 100%, seguido de centrifugação, conforme o passo anterior. Esse procedimento foi repetido de três a quatro vezes, até a total perda de coloração do *pellet*. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em TCA a 10% em água.

Nessa etapa, o material foi sonicado em um ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W), em amplitude de 70%, por 12 pulsos de 5s, com intervalos de 10s, e deixado para precipitar por 1h30min a - 20°C. Depois disso, o *pellet* foi lavado em acetona a 80% de três a quatro vezes, seguido de agitação em vortex e de centrifugação. Na última lavagem, o *pellet* foi seco completamente em temperatura ambiente. Posteriormente, o *pellet* foi ressupendido em 0,8 mL de fenol (tamponado com Tris, pH 8) + 0,8 mL de tampão SDS denso (sacarose a 30%, SDS a 2%, Tris a 0,1 M, pH 8,0 e β-mercaptoetanol a 5%) e misturado em vórtex por 30s. Logo após, as fases foram separadas por centrifugação a 10.000 rpm (rotor com 100 mm de diâmetro), por 15min a 4°C. Em seguida, coletou-se apenas a fase superior e a transferiu para um tubo limpo. Nesse tubo, foram adicionados cinco vezes o volume da fase superior coletada de metanol gelado, contendo acetato de amônio a 0,1 M, misturado e deixado para preciptar em *overnight* a - 20°C. No dia seguinte, as proteínas foram recuperadas por centrifugação a 10.000 rpm (rotor com 100 mm de diâmetro), por 5min a 4°C. Logo após, o *pellet* foi lavado duas vezes com metanol em acetato de amônio a 0,1 M, posteriormente com acetona a 80% também por duas vezes e por fim seco em temperatura ambiente. O precipitado final foi ressupendido em 400 µL de ureia a 8 M (preparada com água ultrapura).

3.6.2 - Quantificação de proteínas totais e eletroforese em gel SDS-PAGE

As amostras de proteínas foram quantificadas com o 2D *Quant Kit* (*GE Healthcare Life Sciences*), seguindo as recomendações do fabricante. A curva padrão de dosagem foi realizada utilizando-se diferentes teores de albumina de soro bovino (BSA). Foram utilizados 2 µL das amostras de proteínas em ureia a 8 M e as reações foram preparadas em triplicata. Posterior à quantificação, a qualidade da extração foi avaliada por meio de mini gel SDS-PAGE (8 x 10 cm), contendo 12,5% de acrilamida, de acordo com Laemmli (1970). Foram utilizados 10 µL do marcador pré-corado *PageRuler™* (10 – 180 kDa) e 100 µg de proteínas para cada amostra. Posteriormente, as proteínas foram fixadas no gel e coradas com comassie coloidal a 0,08 %, de acordo com Neuhoff et al. (1988), a fim de demonstrar seu padrão de bandas.

3.6.3 - Digestão peptídica

A digestão das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita no protocolo de digestão em solução, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), disponível em: http://Lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2012/11/protocolo_digestao_solucao.pdf. Foi utilizada uma massa de 100 µg de proteínas para cada amostra. Inicialmente, foram adicionadas às amostras ureia a 8 M na proporção 1:1, seguida da redução das proteínas com Ditiotreitol (DTT) a 5 mM, em bicarbonato de amônio a 50 mM e posterior alquilação com iodoacetamida (IAA) a 14 mM, em bicarbonato de amônio a 50 mM (no escuro), por 30min em cada etapa. O *quench* de IAA livre foi realizado adicionando-se de DTT a 5 Mm, incubado por 15min em temperatura ambiente e protegido da luz. Logo após, as amostras foram diluídas na proporção 1:5 com bicarbonato de amônio a 50 mM, seguida da adição de $CaCl_2$ a 1 mM. Posteriormente, foram adicionados às amostras 200 µL de uma solução de 20 ng/µL de tripsina (Promega) em bicarbonato de amônio a 50 mM, sendo, em seguida, incubadas *overnight* (por no mínimo de 16h) a 37°C. Ao término do período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de ácido trifluoacético (TFA) no teor final de 0.4% ou até o pH ficar abaixo de 2.0. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 10min em temperatura ambiente. Logo após, a solução foi recuperada para um novo tubo e o *pellet* foi descartado. Posteriormente, a solução contendo os peptídeos trípticos foi dessalinizada utilizando ponteiras com resina C18 (100 µL; *Thermofisher*®). Os peptídeos foram eluidos em 50 µL de solução contendo 50% de acetonitrila, 25% água e 0.1% de ácido fórmico. Os peptídeos foram mantidos a 4°C até o momento da análise por espectrometria de massas.

3.6.4 - Espectrometria de massas

Os peptídeos foram submetidos a análise em um sistema de cromatografia líquida (Agilent 1290 Infinity II HPLC) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo/Tempo-de-Voo (Agilent 6545 LC/QTOF). Foram injetadas três réplicas técnicas de 5 µL de cada amostra. As amostras foram separadas utilizando uma coluna de fase reversa (*C18; AdvanceBio Peptide Mapping 2.1 x*

250 mm; Agilent), mantendo uma temperatura de 55°C. Foi aplicado um gradiente de 20min com as fases móveis A (H_2O e ácido fórmico a 0,1%) e B (acetonitrila e ácido fórmico a 0,1%). As porcentagens de fase B, ao longo do gradiente, foram: de 5% a 35% (1-10min); de 35% a 70% (11-14min); de 70% a 100% (16-18min); 100% (16-20min) e foi programado um periodo final de 5min para estabilização da coluna.

As amostras foram injetadas no QTOF através de uma fonte do tipo electrospray. Foi utilizado o modo de aquisição AutoMSMS, com seleção de máximo 10 precursores por ciclo. Os parâmetros, para a seleção dos precursores, foram: *treshold* de 1000; 10.000 counts/espectro; restringência de pureza de 100%; corte de pureza de 30%; modelo isotópico: peptídeos; preferência de carga de 2, 3, >3 e *unknown*. A energia de colisão (em V) foi configurada para ser aplicada de acordo com a fórmula: (*slope*)*(m/z)/100+*Offset*, onde m/z representa a razão massa/carga do precursor e o *slope* e o *Offset* variam de 3,1 a 5 e de -4,8 a 10, respectivamente, dependendo se a carga do precursor é de 2, 3, >3 ou desconhecida. Os parâmetros do instrumento foram: temperatura do gás de 325°C; fluxo do gás de 13 L/min; voltagem do capilar de 4000; voltagem do *skimmer* de 56. Nitrogênio gasoso foi utilizado para a colisão de dissociação induzida. O controle do instrumento (HPLC e QTOF) e a configuração dos parâmetros foram realizados por meio do *software Agilent MassHunter Acquisition*.

3.6.5 - Identificação de peptídeos em banco de proteínas

Os espectros resultantes foram processados por triplicata para identificação de peptídeos utilizando o *software Spectrum Mill* (Rev B.06.00.203 SP1; *Agilent*). Os parâmetros para extração de espectros foram: *MSNoiseThreshold* de 10 counts; modificações fixas de *carbamidomethylation*; precursor MH+ de 200 a 6000 Da; tolerânica de tempo de retenção de ± 60s; tolerância m/z ± 1,4; e carga precursora *find*. Após a extração dos espectros MS/MS, foi realizada a busca em banco de dados. O banco utilizado foi o de *Theobroma cacao* baixado da UniProt (https://www.uniprot.org). Os parâmetros para comparação de espectros MS/MS no banco de proteínas foram: número máximo de clivagens perdidas igual a 4; modificações fixas de carbamidomethylation (C); modificações

variáveis de o*xidized methionine* (M), *pyroglutamic acid* (N-termQ), *deamidated* (N), *phosphorylated* S (S), *phosphorylated* T (T), *phosphorylated* Y (Y); intensidade de pico mínima combinada de 10%; e tolerância de massa do precursor de ± 20 ppm. Os resultados da busca foram validados e filtrados para aqueles que tiveram uma taxa de falso positivo (FDR) < 1%. Os resultados foram exportados no modo de *protein-protein comparision* no formato de arquivo MPP APR.

3.6.6 - Identificação de proteínas diferencialmente abundantes

As proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas considerando-se as seguintes comparações: controle + tratamentos, em diferentes horários de coleta; cada tratamento consigo mesmo, em diferentes horários de coleta. As análises estatísticas, para identificação das proteínas diferencialmente abundantes, foram realizadas no *software Mass Profiler Professional* 15.1 (MPP; *Agilent*). A abundância das proteínas foi calculada por meio da mediana da abundância de peptídeos. Foram comparados os resultados das triplicatas do controle com as triplicatas dos tratamentos correspondentes. As proteínas foram filtradas por frequência de peptideos, de acordo com o seguinte critério: retém proteínas que aparecem em pelo menos 66% das triplicatas (duas das três réplicas) em pelo menos uma condição. A análise de significância estatística foi feito pelo Teste t não emparelhado (controle vs. tratamentos). O cálculo do *p-value* foi assintótico e a correção de multi-teste foi realizada utilizando-se o método Benjamini-Hochberg. Só proteínas que tiveram um *p-value* < 0.05 e *fold-change* > 1,5 foram consideradas diferencialemente expressas. A análise multivariada de componentes (MCP) principais, o diagrama de Venn e o *heat map* com análise de *clustering* foram realizados no mesmo *software*. Para a análise MCP, foram contempladas todas as proteínas identificadas. Para o diagrama de Venn e o *heat map* foram contempladas apenas aquelas proteínas que satisfizeram aos critérios de *p-value* < 0,05 e *fold change* > 1,5. Os parâmetros utilizados para a análise de *clustering* foram: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação *Ward*.

3.7 **- Análises estatísticas**

O delineamento estatístico utilizado no experimento foi o de blocos casualizados, com seis tratamentos (dose de Cd e Zn+Cd e controle), 10 repetições e uma planta jovem por unidade experimental.

Para as análises bioquímicas e moleculares foram usadas cinco repetições de cada um dos tratamentos. Fez-se análise de variância (ANOVA) e comparação de médias utilizando-se o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 - Atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo

4.1.1 - Dismutase do superóxido (EC 1.15.1.1)

Observou-se que a atividade de SOD foi significativamente ($p < 0,05$) maior para o tratamento T1, em relação ao tratamento T0, nos períodos de 6, 12, 24 e 48 h AAT (Figura 2). Houve pouca variação significativamente estatísica ($p < 0,05$) para a atividade de SOD, quando se comparou os demais tratamentos, em relação a T0, para a maioria dos períodos de coleta de material vegetal. No período de 3h AAT, a maior atividade de SOD foi observada para o tratamento T3, sendo esta 0,3 vez maior que a de T0. Apesar disso, houve uma queda na atividade de SOD de 0,53 e 0,19 vezes, respectivamente, para o tratamento T3, quando comparados os períodos de coleta de 24 e 48h ao período de 3h AAT.

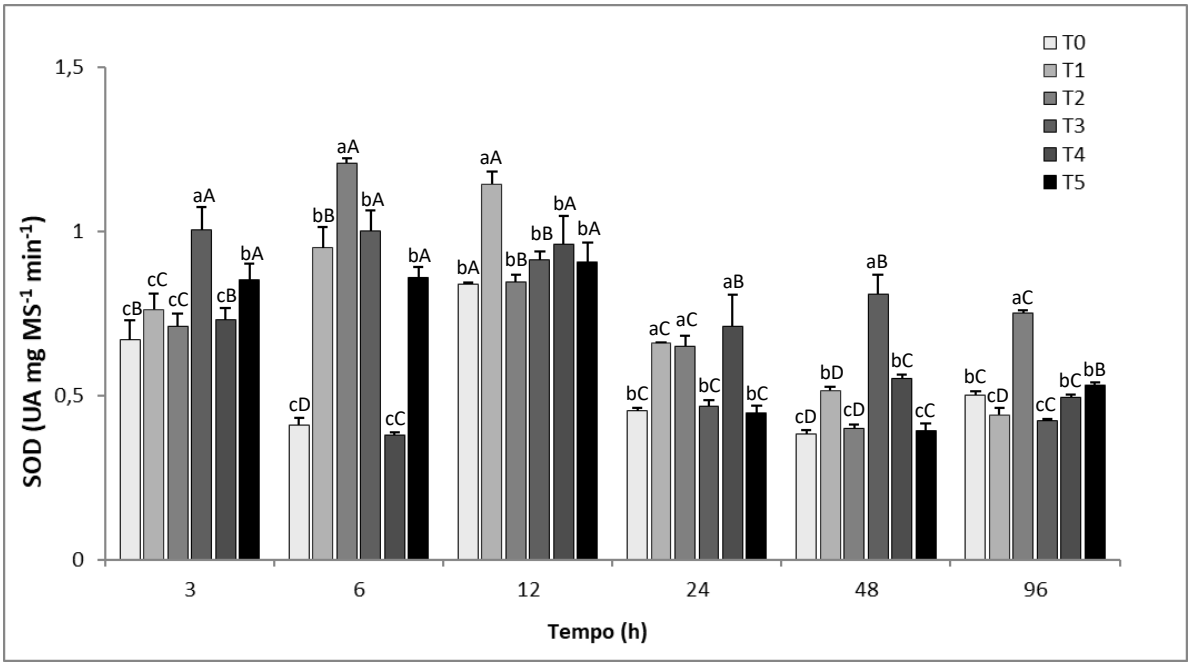

Figura 2 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

4.1.2 Catalase (EC 1.11.1.6)

Observou-se para o tratamento T1, nos períodos de coleta de 3, 6 e 12h AAT, a maior atividade de CAT, quando comparado a T0 e aos demais tratamentos (Figura 3). Às 3h AAT, as atividades de CAT, para os tratamentos T2 e T3, foram significativamente ($p< 0,05$) menores em relação a T0 e aos demais tratamentos, sendo 40 e 43 vezes, respectivamente, menores que o tratamento onde houve a maior atividade neste período de tempo. Entretanto, às 6 e 48h AAT, a atividade de CAT, para todos os tratamentos, foi maior do que para T0. A maior diferença observada na atividade de CAT, dentro de um mesmo tempo de coleta, ocorreu para os tratamentos T0 e T4, no período de 48h AAT, sendo 86 vezes maior para o tratamento T4, em relação ao T0. Ao final do período de tempo analisado (96h), houve maior atividade de CAT para os tratamentos T1 e T4, dentre todos os tratamentos, cujas atividades foram estatisticamente semelhantes entre si ($p< 0,05$).

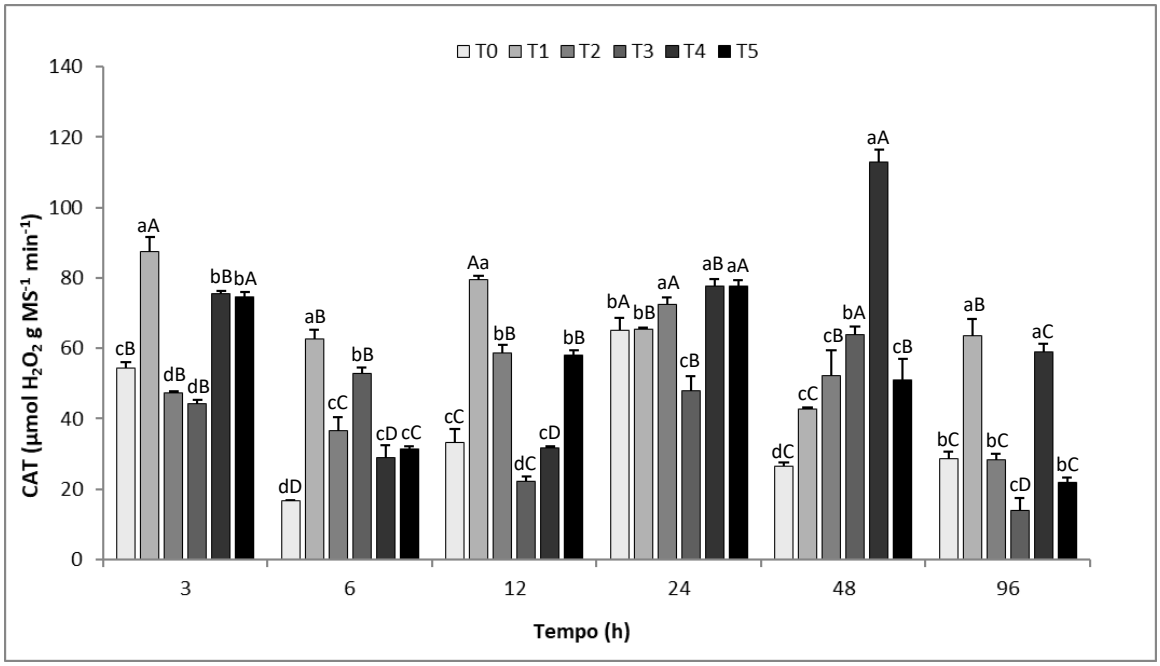

Figura 3 – Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

4.1.3 Peroxidase do Ascorbato (EC EC 1.11.1.11)

Observou-se que a atividade de APX foi maior para os tratamentos T0 e T1 nos tempos de coleta correspondentes a 6, 12 e 24h ATT (Figura 4). Entretanto, às 12 e 24h AAT, a atividade de APX foi menor para o tratamento T2, em relação a T0 e aos demais tratamentos. Às 3h AAT, a atividade de APX foi significativamente ($p < 0,05$) menor para o tratamento T1 em relação aos demais tratamentos. Posteriormente, houve um pico de atividade de APX, para o tratamento T1, às 24h AAT, cuja atividade foi a maior observada durante os tempos de coleta analisados neste experimento. A maior diferença na atividade de APX, observada dentro de um mesmo tempo de coleta, ocorreu às 24h AAT, para os tratamentos T1 e T2, sendo 6,3 vezes menor para o tratamento T2.

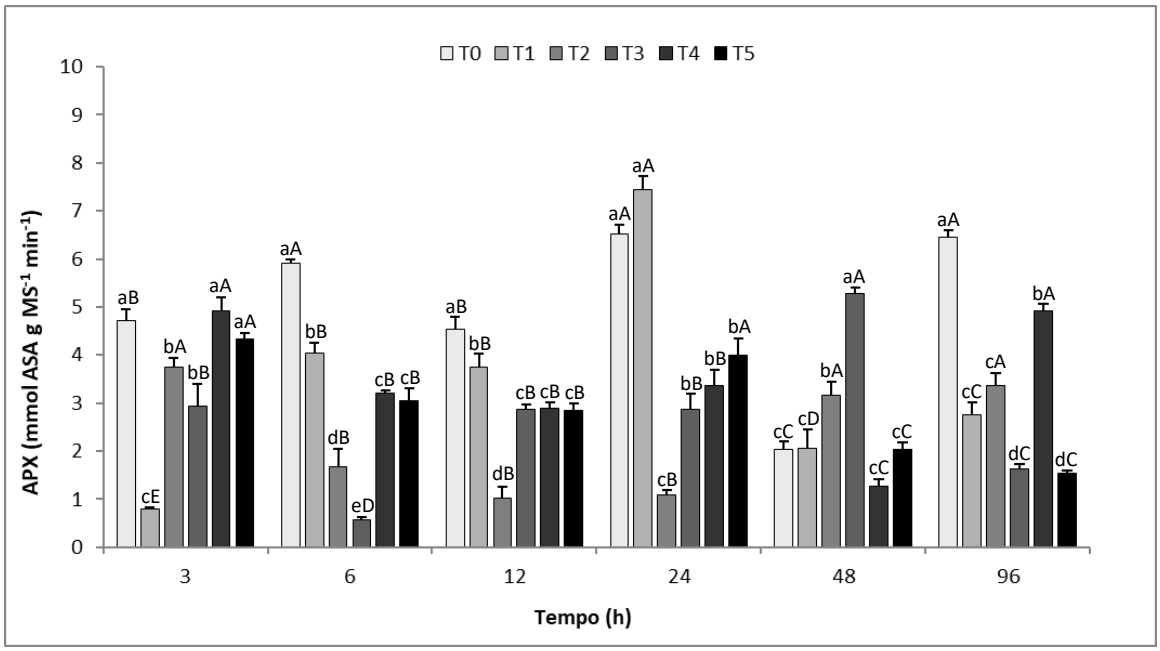

Figura 4 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

4.1.4 Peroxidase do Guaiacol (EC 1.11.1.7)

Observou-se que a atividade de GPX foi significativamente ($p < 0,05$) menor para o tratamento T0, em relação aos demais tratamentos, às 3, 12 e 24h AAT (Figura 5). Entretanto, às 24, 48 e 96h AAT, ainda que sua atividade não tenha sido a menor, houve uma forte tendência, para este tratamento, em apresentar uma baixa atividade de GPX. Fato este observado pela ausência de diferença estatística ($p < 0,05$) entre T0 e os tratamentos que apresentaram as menores atividades de GPX dentro de cada um dos tempos avaliados. Por outro lado, verificou-se maior atividade de GPX para o tratamento T1 às 12h AAT. Além disso, às 96h AAT, este tratamento, juntamente com o T5, foram os que tiveram as maiores atividades de GPX. Em relação aos tratamentos onde foram aplicadas doses de Zn, a atividade variou ao longo dos tempos avaliados, sendo que as maiores atividades de GPX ocorreram para os tratamentos T2, T3 e T5, às 48h AAT.

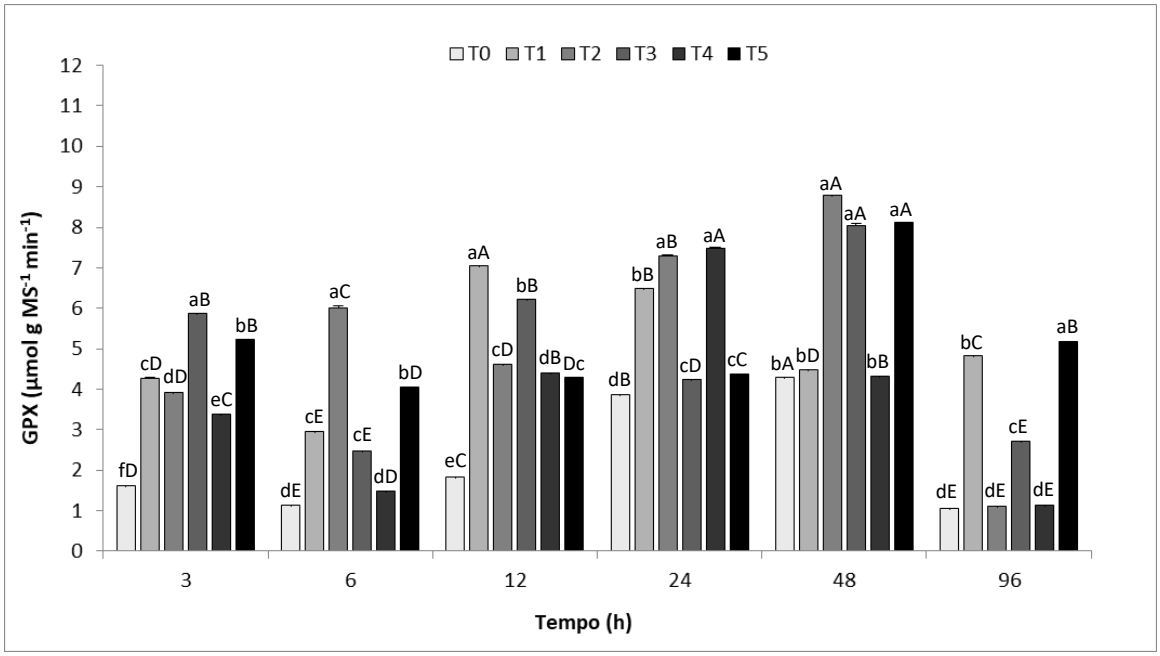

Figura 5 – Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas comparam as diferenças entre os tratamentos em cada horário de coleta e as letras maiúsculas comparam as diferenças entre os horários de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

4.2 **Análise de expressão gênica por RT-qPCR**

A abundância de transcritos relacionados a algumas das enzimas do metabolismo antioxidativo, à biossíntese de proteínas de PS 2 e à biossíntese de metalotioneína, foram analisadas por meio de RT-qPCR em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, nos períodos de 3, 6, 12, 24, 48 e 96h AAT (Figura 6).

Verificou-se, às 3h AAT, que as expressões dos genes *SODchl, SODcyt e per-1* foram reguladas negativamente em todos os tratamentos em relação a T0 (Figura 6 A). Verificou-se, para o tratamento T5, uma redução na expressão do gene *SODcyt* cerca de 30% em relação a T0, ao passo que para o tratamento T1 (sem adição de Zn) esta redução foi cerca de 70% em relação a T0. A maior expressão de *per-1* foi observada para o tratamento T4, entretanto, a mesma não diferiu ($p < 0,05$) estaticamente de T0. Por outro lado, observou-se, para o tratamento T4, uma maior expressão do gene *psbA*, cujo valor foi cerca de 34% maior do que o de T0.

Houve, às 6h AAT, uma redução de 51% na abundância de transcritos de *SODchl* para o tratamento T5, quando comparado ao T0. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de expressão de *SODcyt* entre os tratamentos. Entretanto, a expressão do gene *per-1* teve aumento de 70% na abundância de transcritos para o tratamento T1 em relação a T0 (Figura 6 B). Além disso, a maior diferença observada foi nos níveis de expressão de *psbO* para o tratamento T2, cujo valor foi 89% maior do que a de T0.

Constatou-se, às 12h AAT, que a maioria dos genes estudados sofreu regulação negativa em relação a T0 (Figura 6 C). A abundância de transcritos de *SODcyt* foi regulada negativamente em todos os tratamentos, exceto para o tratamento T5. O mesmo fato foi observado em relação às expressões de *psbA* e *Mt-2*. Em relação à expressão de *per-1*, o maior incremento no número de transcritos ocorreu para o tratamento T1. Por outro lado, às 24h AAT, apenas o tratamento T1 apresentou regulação positiva na abundância de transcritos do gene *SODchl* (Figura 6 D), cujo valor foi cerca de 40% maior que o de T0, ao passo que para o tratamento com a maior dose de Zn+Cd (T5) foi 40% menor que o de T0. Ao contrário do observado nos períodos de coleta anteriores,

verificou-se, para o tratamento T5, maior expressão de *per-1*, cujo valor foi cerca de 100% maior do que o de T0.

Observou-se, às 48h AAT, que todos os tratamentos tiveram maior expressão de *SODcyt* em relação a T0, sendo os maiores incrementos apresentados pelos tratamentos T3 e T4, cujos valores, de ambos os tratamentos, foram proximadamente 60% maior que o de T0 (Figura 6 E). Além disso, em relação à expressão de *per-1*, verificou-se para o tratamento T3 como o único tratamento cujo gene foi regulado positivamente, sendo sua expressão cerca de 60% maior em relação a T0. Por outro lado, às 96h AAT, verificou-se que a expressão de *SODcyt* foi maior para todos os tratamentos em relação a T0. Houve, para os tratamentos T1 e T3, as maiores expressões do gene *per-1*, cujos valores foram 120% e 118% maiores do que o de T0, respectivamente (Figura 6 F). Já a expressão de *Mt-2* foi regulada negativamente em todos os tratamentos em relação a T0.

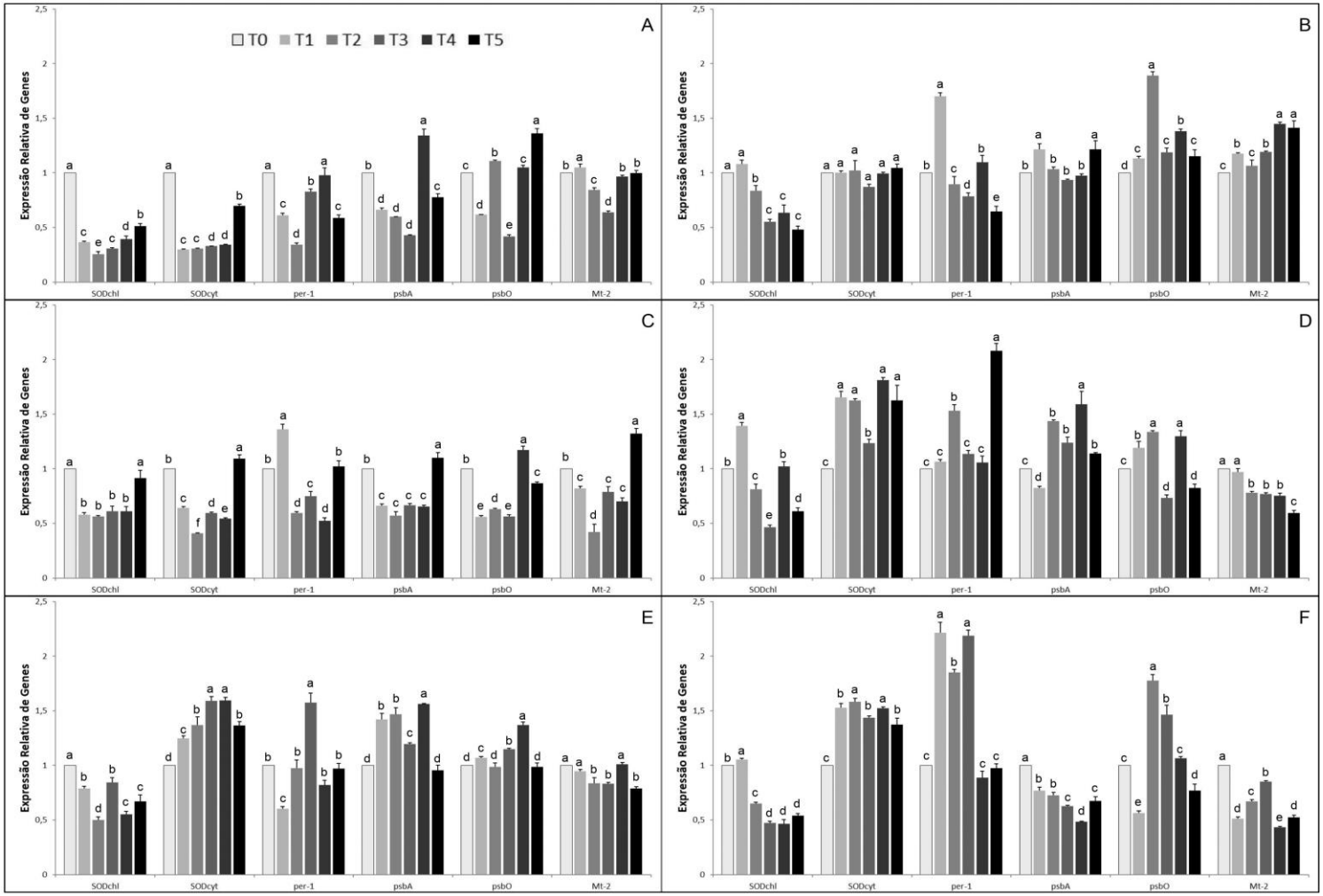

Figura 6 – Expressão rela tiva de genes relacionados às enzimas do metabolismo antioxidativo (*SODCyt*, *SODChl* e *per-1*), à biossíntese das proteínas intrínseca (*psbA*) e extrínseca (*psbO*) ao fotossistema 2 da fotossíntese e à biossíntese de metalotioneína (*Mt-2*), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas nos períodos de 3 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D), 48 (E) e 96h (F) após aplicação dos tratamentos. Valores médios de cinco repetições biológicas (± EP). As letras minúsculas indicam comparação entre os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

4.3 Análise multivariada de componentes principais (PCA)

A PCA resumiu 81,7% da variância total contida na matriz de dados, sendo a contribuição relativa da componente principal 1 (PC1), definida pelo *eigenvalue*, maior do que a contribuição relativa da componente principal 2 (PC2). Especificamente, a porcentagem de variância total explicada pela PC1 foi de 51,53%, enquanto que 30,17% foi explicada pela PC2 (Figura 7).

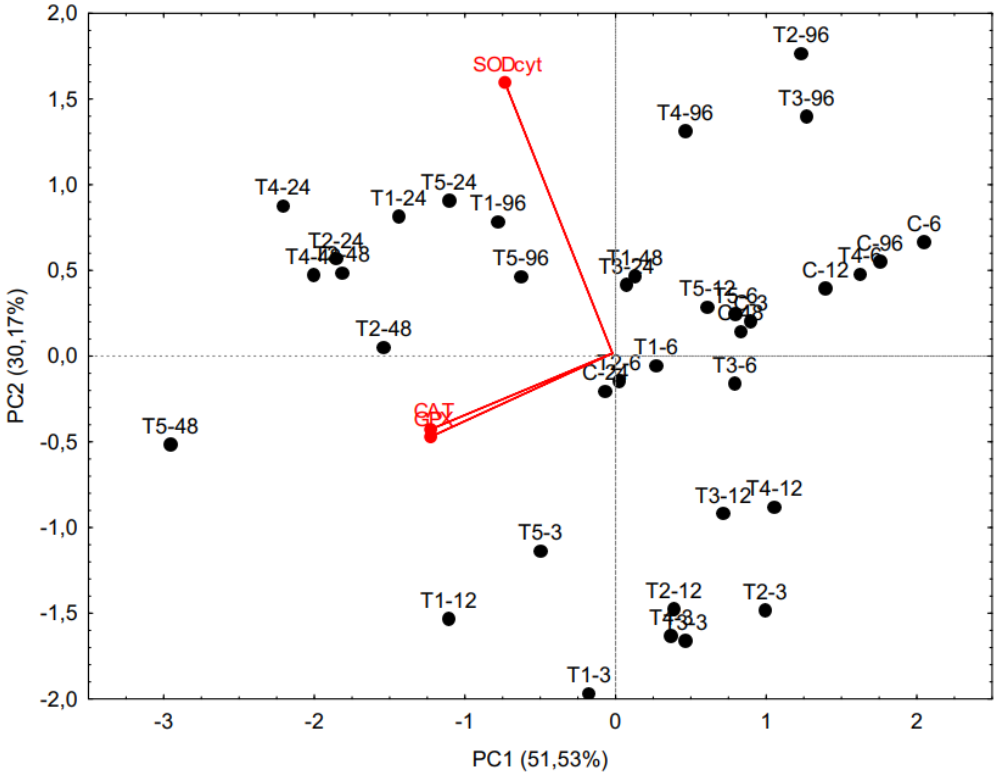

Figura 7 – Gráfico biplot, gerado a partir da análise multivariada de componentes principais, para as variáveis bioquímicas CAT, GPX e SODcyt com factors loadings > 0.70. C = controle, sem adição de Zn e Cd no solo; T1 = 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; T2 = 0,4 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; T3 = 0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; T4 = 1,2 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo; e T5 = 1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo. Cada nomenclatura foi acompanhada de um número correposdente ao período de coleta daquele tratamento.

As variáveis com maior *loading score* na PC1 foram CAT e GPX, enquanto que, na PC2, o maior *loading score* foi observado para *SODcyt*. Nesse

caso, a porcentagem de variância total acumulada na PC1 e PC2, foi composta em sua maior parte, pela variação originada de CAT + GPX e de *SODcyt*, respectivamente.

Em relação à contribuição de cada tratamento para a porcentagem de variância total acumulada na PC1, foi observada maior contribuição do tratamento T5-48, seguido por T4-24, C-6, T4-48, T2-24 e T3-48. Já para a PC2, a maior contribuição observada foi a do tratamento T1-3, seguido pelos tratamentos T2-96, T3-3, T4-3, T1-12, T2-3, T2-12, T3-96 e T4-96.

Os tratamentos mais contrastantes, tanto para melhor quanto para pior desempenho em relação às variáveis estudadas, estão localizados nas bordas da dispersão. Os tratamentos coletados às 24 e 48h AAT foram os que apresentaram melhor desempenho em relação às variáveis CAT, GPX e *SODcyt*. Dessa forma, foram escolhidos o controle e os tratamentos T1, T3 e T5, nos períodos de 3 e 24h AAT, para a realização das análises proteômicas e de *western blot.*

4.4 **Perfil proteico de amostras foliares obtidos por meio de SDS-PAGE**

O perfil proteico, realizado em mini gel SDS-PAGE, revelou um padrão de bandas de proteínas altamente definidos, sem a presença de arrastes, característicos de proteínas degradadas (Figura 8), sendo, portanto, ideal para as análises que requerem proteínas de alta qualidade.

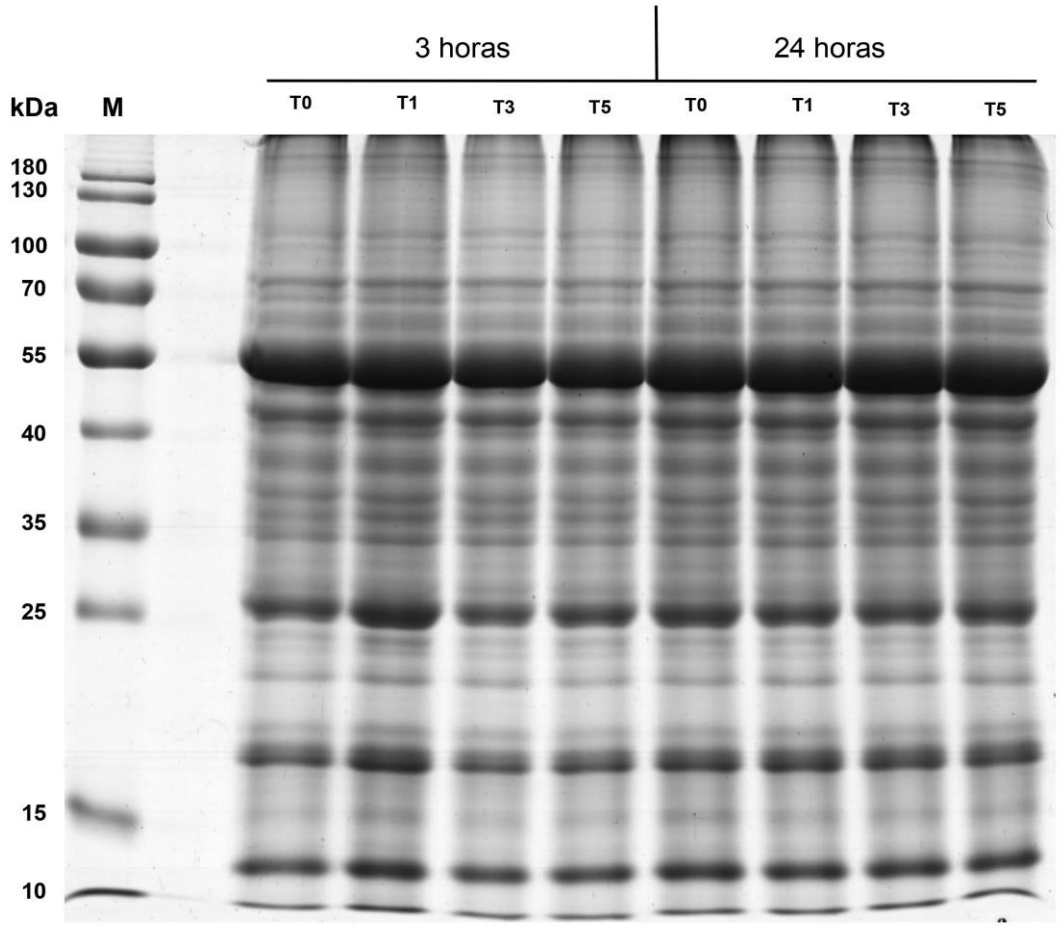

Figura 8 – Perfis proteicos de amostras foliares em SDS-PAGE de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. M = marcador pré-corado PageRulerTM (10 - 180 kDa). Foram utilizados 100 µg de proteínas para cada amostra. Tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).

4.5 Análise de acúmulo de proteínas por meio de *Western Blot*

O acúmulo das protéinas ATP-sintase e catalase foi investigado a partir de *western blot*, para as amostras de proteínas totais foliares correspondentes aos tratamentos T0, T1, T3 e T5 (Figura 9). Observou-se menor acúmulo de ATP-sintase para o tratamento T1, às 3h AAT, ao passo que às 24h AAT esse foi o tratamento que teve o maior acúmulo dessa proteína. Em relação ao acúmulo da proteína catalase, em ambos os tempos de coleta, constatou-se que o seu menor acúmulo ocorreu para o tratamento T3. Os tratamentos T1 e T3 tiveram

menor acúmulo de catalase às 24h ATT quando comparados às 3h ATT, ao passo que os tratamentos T0 e T5 tiveram um aumento.

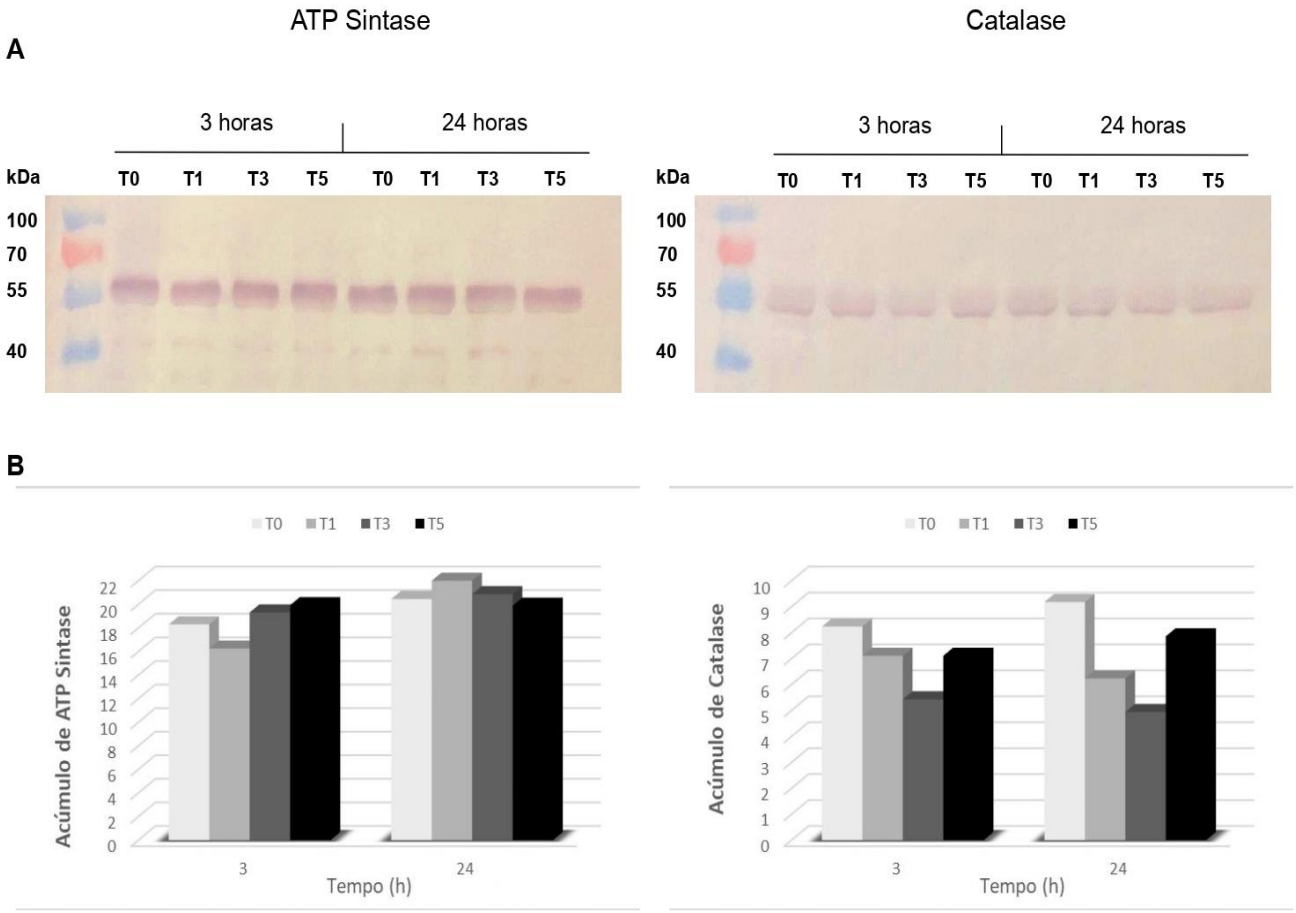

Figura 9 – *Western blot*, utilizando anticorpos das subunidades beta da sintase do ATP e da catalase, de amostras de proteínas totais foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo. (A) detecção de anticorpos das proteínas alvo. (B) análise de acúmulo realizada com o auxílio do software *GelQuant.Net*. Foram utilizados 20 µg de proteínas para cada amostra. Tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).

4.6 Identificação de proteínas

Identificaram-se, às 3h AAT, um total de 1076, 705, 729 e 1012 proteínas para os tratamentos T0, T1, T3 e T5, respectivamente. Além disso, às 24h AAT, foram também identificadas 746, 1030, 1517 e 1128 proteínas para os tratamentos T0, T1, T3 e T5, respectivamente. A partir de análises estatísticas,

determinou-se a abundância diferencial das proteínas identificadas em cada um destes tratamentos. Identificaram-se, às 3h AAT, 14, 13, 12 e 15 proteínas diferencialmente abundantes para os tratamentos T0, T1, T3 e T5, respectivamente (Figura 10). Destas proteínas, 8 foram comuns entre T0 e os demais tratamentos. Entretanto, às 24h AAT, foram identificadas 30, 24, 29 e 26 proteínas diferencialmente abundantes para os tratamentos T0, T1, T3 e T5, respectivamente (Figura 11). Destas proteínas, 17 foram comuns entre T0 e os demais tratamentos.

Figura 10 – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas no período de 3h após aplicação dos tratamentos. (A) Tratamento T0 (controle), (B) Tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), (C) Tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo e (D) Tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).

Figura 11 – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a uma dose constante de Zn e a diferentes doses de Cd em combinação com Zn no solo, coletadas no

período de 24h após aplicação dos tratamentos. (A) Tratamento T0 (controle), (B) Tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), (C) Tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo e (D) Tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo).

A fim de se determinar alterações na abundância de proteínas entre os tempos de coleta de 3 e 24h AAT, cada tratamento foi comparado consigo mesmo entre os respectivos tempos de coleta de folhas, exceto para T0. Para o tratamento T1, foram identificadas 23 e 14 proteínas diferencialmente abundantes às 3h e 24h AAT, respectivamente, sendo 7 proteínas comuns entre os dois tempos de coleta (Figura 12 A). Já para o tratamento T3, foram identificadas 11 e 28 proteínas diferencialmente abundantes às 3h e 24h AAT, respectivamente, sendo 5 proteínas comuns entre os dois tempos de coleta (Figura 12 B). Por fim, para o tratamento T5, foram identificadas 9 e 21 proteínas diferencialmente abundantes às 3h e 24h AAT, respectivamente, sendo 2 proteínas comuns entre os dois tempos de coleta (Figura 12 C).

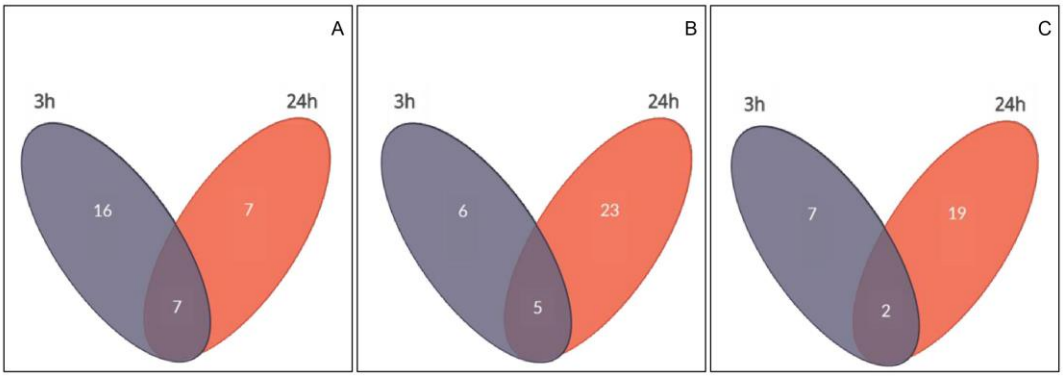

Figura 12 – Diagramas de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum), em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas aos tratamentos com Cd e Zn + Cd no solo. Em (**A**) T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparado com ele mesmo, nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos. Em (**B**) T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparado com ele mesmo, no período de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos. E em (**C**) T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparado com ele mesmo, nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.

Listaram-se, nos Quadros 3 e 4, as proteínas diferencialmente abundantes (exclusivas e em comum) referentes às comparações entre T0 e os tratamentos T1, T3 e T5, às 3 e 24h AAT, repesctivamente. Nos Quadros 5, 6 e 7 foram listadas as proteínas diferencialemnte abundantes (exclusivas e em

comum) referentes às comparações entre os tempos de 3 e 24h AAT, correspondentes aos tratamentos T1, T3 e T5.

Quadro 2 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas no período de 3h após aplicação dos tratamentos.

N° ACESSO	PROTEÍNA	MM (KDa)	PI	TRATAMENTO
A0A061DL74	*Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic*	28707,2	5,45	T0; T1 ↑; T3 ↓; T5 ↑
A0A061FHB6	*Chlorophyll A-B binding family protein*	29097,4	8,8	T0; T1 ↑; T3*; T5 ↑
E3VTY6	*Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2*	82516,6	6,71	T0; T1 ↑; T3 ↓; T5 ↑
A0A061FLC9	*Sedoheptulose-bisphosphatase*	42717,9	6,56	T0; T1 ↑; T3 ↓; T5 ↑
A0A061GD16	*PSI-F*	24809,4	9,75	T0; T1 ↑; T3 ↓; T5 ↑
A0A061FPW8	*Thioredoxin M-type 4*	20693,2	6,92	T0; T1 ↑; T3*; T5 ↑
A0A061GJ62	*Auxin-responsive protein*	32337,6	8,92	T0
A0A061GQ08	*Carboxypeptidase*	53756	5,64	T0; T3*
A0A061DNS9	*PSI subunit V*	23069,4	9,94	T0
A0A061ECB2	*FtsH extracellular protease family isoform 1*	107671	8,77	T0
A0A061G1N4	*Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein*	74777,4	5,87	T0
A0A061GPX9	*Cellulose synthase*	119423,8	6,1	T0; T3*; T5 ↑
A0A061G0X9	*OBP3-responsive gene 1 isoform 1*	76781,5	10,12	T0; T1 ↑; T3 ↓; T5 ↑
A0A061GQT9	*FLZ-type domain-containing protein*	24710,1	7,95	T0; T1↑; T3 ↑; T5 ↑
A0A061GWC1	*Superoxide dismutase [Cu-Zn]*	22950,8	6,34	T1 ↑

A0A061EW39	*Pyruvate kinase*	56857,6	7,83	T1 ↑; T5 ↑
A0A061FPI6	*RNA recognition motif and CCHC-type zinc finger domains containing protein*	28814,3	7,82	T1 ↑
A0A061FJ12	*Calcium-binding EF-hand family protein, putative*	12755,1	9,3	T1 ↑
A0A061F9U6	*BTB/POZ domain-containing protein, putative isoform 1*	115807,2	7,54	T1 ↑
A0A061GFT3	*ATPase, F1 complex, gamma subunit protein*	42288,2	9,15	T3 ↑; T5 ↑
A0A061GXL5	*Ribulose bisphosphate carboxylase small chain*	28115	9,56	T3 ↑
A0A061EQQ9	*Isoleucyl-tRNA synthetase*	136131,8	5,82	T5 ↑
A0A061EF34	*Vesicle transport v-SNARE family protein*	24802,2	9,59	T5 ↑
A0A061FPN6	*p-aminobenzoic acid synthase*	104243	6,51	T5 ↑
A0A061F7R6	*Receptor-like serine/threonine-protein kinase*	93251,6	8,62	T5 ↑

MM corresponde à massa molecular;
PI corresponde ao ponto isoelétrico;
↑ Proteínas “up-regulated” no tratamento com relação ao controle;
↓ Proteínas “down-regulated” no tratamento com relação ao controle;
* Proteínas com abundância igual ao controle.

Quadro 3 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo); T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas no período de 24h após a aplicação dos tratamentos.

N° ACESSO	PROTEÍNA	MM (KDa)	PI	TRATAMENTO
E3VTZ5	*Ribulose bisphosphate carboxylase large chain*	54378,8	6,04	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061FWL5	*21 kDa seed protein*	24278,9	5,71	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061E5Q6	*ATP synthase subunit beta*	53725,6	5,29	T0; T3 ↓; T5 ↑
A0A061EQW2	*Rubisco activase isoform 2*	52404,3	5,26	T0
A0A061FDD3	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*	48512,4	6,77	T0; 0 Zn ↓; T3*; 100 Zn ↓
A0A061GD33	*Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic*	28236,6	5,13	T0; T1 ↓; T3 ↓
A0A061DFD1	*Fructose-bisphosphate aldolase*	43305,7	8,75	T0
A0A061FA06	*(S)-2-hydroxy-acid oxidase*	40826,6	9,41	T0; T1↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061FRA0	*Arginase*	37134,7	6,09	T0
A0A061FLC9	*Sedoheptulose-bisphosphatase*	42717,9	6,56	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061GRX0	*TCP-1/cpn60 chaperonin family protein*	64551,7	5,62	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061F976	*Pathogenesis-related protein P2*	30666,5	4,15	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061GFT3	*ATPase, F1 complex, gamma subunit protein*	42288,2	9,15	T0; T3 ↓; T5 ↑
A0A061ETY3	*Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin*	24103,1	9,22	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061GD16	*PSI-F*	24809,4	9,75	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061FPW8	*Thioredoxin M-type 4*	20693,2	6,92	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓

A0A061DX77	*Malate dehydrogenase*	38090,5	9,24	T0; T1 ↓
A0A061ELW2	*Sulfate adenylyltransferase*	65209,2	6,42	T0
E3VTW8	*Photosystem II protein D1*	39033,9	5,12	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061F2B8	*Cysteine synthase*	34445,2	5,22	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061EVI6	*Thioredoxin-dependent peroxiredoxin*	29447,1	7,83	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061DN75	*Photosystem I subunit E-2*	15144,8	9,77	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5*
A0A061E1F5	*Tetratricopeptide repeat-like superfamily protein, putative*	83090,2	6,28	T0; T3 ↓
A0A061EM25	*Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein*	29635,4	7,88	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061GPE7	*Pleiotropic drug resistance 12*	164823,1	9,03	T0; T3 ↑
A0A061GCS5	*Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein, putative*	62393,5	9,89	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061GKA8	*Binding isoform 2*	105933,7	5,98	T0
A0A061FPN6	*p-aminobenzoic acid synthase*	104243	6,51	T0; T3 ↓; T5 ↑
A0A061FX35	*Homeobox-leucine zipper protein ATHB-15, putative isoform 2*	51951,2	9,74	T0; T1 ↓; T3 ↓; T5 ↓
A0A061GWN3	*GDP-L-fucose synthase*	35554,1	6,31	T0; T1 ↑
A0A061G7Y7	*Nbs-lrr resistance protein*	109923,3	8,91	T1 ↑
A0A061EVX5	*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]*	60817,4	5,88	T1 ↑
A0A061FXE0	*Integrase catalytic domain-containing protein*	101475	9,24	T1 ↑; T5 ↑
A0A061EQT0	*NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein*	35534,2	6,27	T1 ↑; T3 ↑; T5 ↑

A0A061GXL5	*Ribulose bisphosphate carboxylase small chain*	28115	9,56	T3 ↑
A0A061FWY3	*Heat shock protein 101*	60817,4	5,88	T3 ↑
A0A061DIG8	*(+)-delta-cadinene synthase*	69820,4	5,44	T3 ↑
A0A061EM31	*Heat-shock protein 70T-2*	62708,2	5,42	T3 ↑
A0A061DNH5	*Tetraspanin family protein, putative*	33583,9	5,64	T3 ↑
A0A061DQS0	*Photosystem I subunit D-2*	23298,3	9,67	T5 ↑
A0A061GLL2	*Duplicated homeodomain-like superfamily protein, putative*	67885,3	6,41	T5 ↑
A0A061E0P6	*Global transcription factor group, putative isoform 4*	54837,4	9,42	T5 ↑

MM corresponde à massa molecular;
PI corresponde ao ponto isoelétrico;
↑ Proteínas “up-regulated” no tratamento com relação ao controle;
↓ Proteínas “down-regulated” no tratamento com relação ao controle;
* Proteínas com abundância igual ao controle.

Quadro 4 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.

N° ACESSO	PROTEÍNA	MM (KDa)	PI
A0A061F616	*Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic*	28236,6	5,13
E3VU13	*Photosystem II CP47 reaction center protein*	56283,3	6,27
A0A061EKX7	*Photosystem I subunit D-2*	23298,3	9,67
A0A061GD16	*PSI-F*	24809,4	9,75
E3VTW8	*Photosystem II protein D1*	39033,9	5,12
A0A061DH85	*Malate dehydrogenase*	41750,7	9,43
A0A061EVI6	*Thioredoxin-dependent peroxiredoxin*	29447,1	7,83
A0A061F233	*2-phosphoglycolate phosphatase 1*	48103,4	9,68
A0A061GWC1	*Superoxide dismutase [Cu-Zn]*	22950,8	6,34
A0A061FGZ5	*Alcohol dehydrogenase 1 isoform 3*	40261,6	7,18
A0A061FPI6	*RNA recognition motif and CCHC-type zinc finger domains containing protein*	28814,3	7,82
A0A061GI46	*DDB1-CUL4 associated factor 1*	217424,6	4,98
A0A061DFX3	*Vacuolar iron transporter family protein, putative*	50681,6	9,33
A0A061GV93	*Chloroplast, nucleus, chloroplast envelope, putative*	30932,3	6,03
A0A061EY06	*Cultured cell, putative isoform 1*	84010	6,31
A0A061F9U6	*BTB/POZ domain-containing protein, putative isoform 1*	115807,2	7,54
Q946A5	*NBS/LRR resistance protein-like protein (Fragment)*	19945,9	9,38
A0A061F2Q6	*Glycoside hydrolase family 2 protein isoform 6*	89416,9	5,97
A0A061DFI3	*Catalase*	57293,5	6,92
A0A061GLK6	*RecA DNA recombination family protein*	45632,4	7,8
A0A061GPE7	*Pleiotropic drug resistance 12*	164823,1	9,03
A0A061G1K4	*Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein*	50231,8	9,72
A0A061DYY1	*PPO1_KFDV domain-containing protein*	24915,8	6,08
A0A061GWN3	*GDP-L-fucose synthase*	35554,1	6,31
A0A061G7Y7	*Nbs-lrr resistance protein*	109923,3	8,91
A0A061EVX5	*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]*	51905,8	6,3
A0A061EIE9	*Chloroplast heat shock protein 70 isoform 1*	71625,8	5,67

A0A061DZ58	*Tetratricopeptide repeat-like superfamily protein, putative*	70600,6	5,86
A0A061EI30	*Peptidylprolyl isomerase*	30920,1	9,64
A0A061G2I8	*Protein-serine/threonine phosphatase*	45183,8	4,99

MM corresponde à massa molecular;
PI corresponde ao ponto isoelétrico.

Quadro 5 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.

N° ACESSO	PROTEÍNA	MM (KDa)	PI
A0A061FVK5	*21 kDa seed protein*	24277,9	5,94
A0A061FLC9	*Sedoheptulose-bisphosphatase*	42717,9	6,56
A0A061DV41	*Transketolase*	81055,2	6,34
A0A061EBF1	*Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein*	74694,9	8,44
A0A061FAW8	*ATP-dependent DNA helicase*	69934,2	7,29
E3VTW8	*Photosystem II protein D1*	39033,9	5,12
A0A061GQT9	*FLZ-type domain-containing protein*	24710,1	7,95
A0A061GPX9	*Cellulose synthase*	119423,8	6,1
A0A061F058	*Benzoyl coenzyme A: Benzyl alcohol benzoyl transferase*	63099,3	7,9
A0A061G0X9	*OBP3-responsive gene 1 isoform 1*	76781,5	10,12
A0A061GQ08	*Carboxypeptidase*	53756	5,64
A0A061E5Q6	*ATP synthase subunit beta*	53725,6	5,29
A0A061GD33	*Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic*	28236,6	5,13
A0A061DH85	*Malate dehydrogenase*	41750,7	9,43
A0A061FM99	*FIZZY-related 3 isoform 1*	53575,1	9,75
A0A061E1F5	*Tetratricopeptide repeat-like superfamily protein, putative*	83090,2	6,28
A0A061GFW4	*Protein-serine/threonine phosphatase*	111311,2	5,5
A0A061GCS5	*Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein, putative*	62393,5	9,89
A0A061FWY3	*Heat shock protein 101*	101342,7	5,77
A0A061FXL7	*p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein isoform 2*	59360,7	9,03
A0A061DIG8	*(+)-delta-cadinene synthase*	61187,2	6,5

A0A061EW39	*Pyruvate kinase*	56857,6	7,83
A0A061DV65	*LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein, putative*	159544,1	6,47
A0A061GNQ0	*Signal peptidase I*	19075,1	9,3
A0A061EM31	*Heat-shock protein 70T-2*	62708,2	5,42
A0A061GBY9	*Alanine aminotransferase 2*	59877,9	6,01
A0A061GB27	*Multidrug resistance protein ABC transporter family*	110196,8	9,2
A0A061EAW3	*1,3-beta-glucan synthase*	202832	9,21
A0A061FPI8	*Transcription factor, putative*	65057,2	6,09
A0A061F9U6	*BTB/POZ domain-containing protein, putative isoform 1*	115807,2	7,54
A0A061G1B5	*Alpha-L-fucosidase*	55820,4	6,99
A0A061FVM2	*Winged-helix DNA-binding transcription factor family protein, putative isoform 1*	42022	10,65
A0A061FJ12	*Calcium-binding EF-hand family protein, putative*	12755,1	9,3
A0A061DNH5	*Tetraspanin family protein, putative*	33583,9	5,64

MM corresponde à massa molecular;
PI corresponde ao ponto isoelétrico.

Quadro 6 – Proteínas de amostras foliares de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), identificadas por meio de espectrometria de massas (MS/MS), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos.

N° ACESSO	PROTEÍNA	MM (KDa)	PI
A0A061GHX3	*Aminomethyltransferase*	44735,5	9,18
A0A061DJQ1	*RNA-directed DNA polymerase*	74817,2	9,05
A0A061EQQ9	*Isoleucyl-tRNA synthetase*	136131,8	5,82
A0A061EF34	*Vesicle transport v-SNARE family protein*	24802,2	9,59
A0A061FAW8	*ATP-dependent DNA helicase*	69934,2	7,29
A0A061DSR0	*Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein*	78980,8	6,73
A0A061GPE7	*Pleiotropic drug resistance 12*	164823,1	9,03
A0A061F7Z1	*Ubiquitin-conjugating enzyme 25, putative isoform 1*	74149	5,77
A0A061F7R6	*Receptor-like serine/threonine-protein kinase*	93463,7	6,19
A0A061E5Q6	*ATP synthase subunit beta*	53725,6	5,29
A0A061DFD1	*Fructose-bisphosphate aldolase*	43208,5	8,48

A0A061DQS0	*Photosystem I subunit D-2*	23298,3	9,67
A0A061ERE1	*Histone H2A*	16184,8	10,62
A0A061EMF9	*Malate dehydrogenase*	36119	6,61
A0A061E630	*Carbonic anhydrase*	28541,1	5,31
A0A061DWF1	*Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein*	26440,2	6,22
A0A061FGA7	*Mechanosensitive ion channel protein*	102162,4	9,34
A0A061DLD3	*Glucose-1-phosphate adenylyltransferase*	56835,6	6,43
A0A061F008	*Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein isoform 3*	34303,5	8,67
A0A061G0D5	*Leucine-rich repeat protein kinase family protein isoform 1*	114076,9	6,36
A0A061EQS2	*Cysteine synthase*	42699,3	6,8
A0A061EQT0	*NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein*	35534,2	6,27
A0A061GG29	*Pentatricopeptide repeat-containing protein, putative*	43641,7	9,35
A0A061E0P6	*Global transcription factor group, putative isoform 4*	54837,4	9,42
A0A061EDR9	*Retrotransposon protein, unclassified, putative*	113898,9	9,43
A0A061FUQ0	*S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein, putative*	15378,4	8,01
A0A061EP43	*Chromatin-remodeling protein 11 isoform 2 (Fragment)*	137218,9	5,97
A0A061GBP2	*Aldehyde dehydrogenase 7B4 isoform 1*	53948,3	8,52

MM corresponde à massa molecular;
PI corresponde ao ponto isoelétrico.

Posteriormente, foram gerados *heat maps* de expressão proteica com a abundância diferencial das proteínas identificadas em cada um dos tratamentos, utilizando-se o $\log_2$ do valor de *fold*. As Figuras 13 e 14 correspondem a T0 e aos tratamentos T1, T3 e T5, às 3h e 24h AAT, respectivamente, ao passo que as Figuras 15, 16 e 17 correpondem às comparações entre os tempos de 3 e 24h AAT, realizadas para os tratamentos T1, T3 e T5.

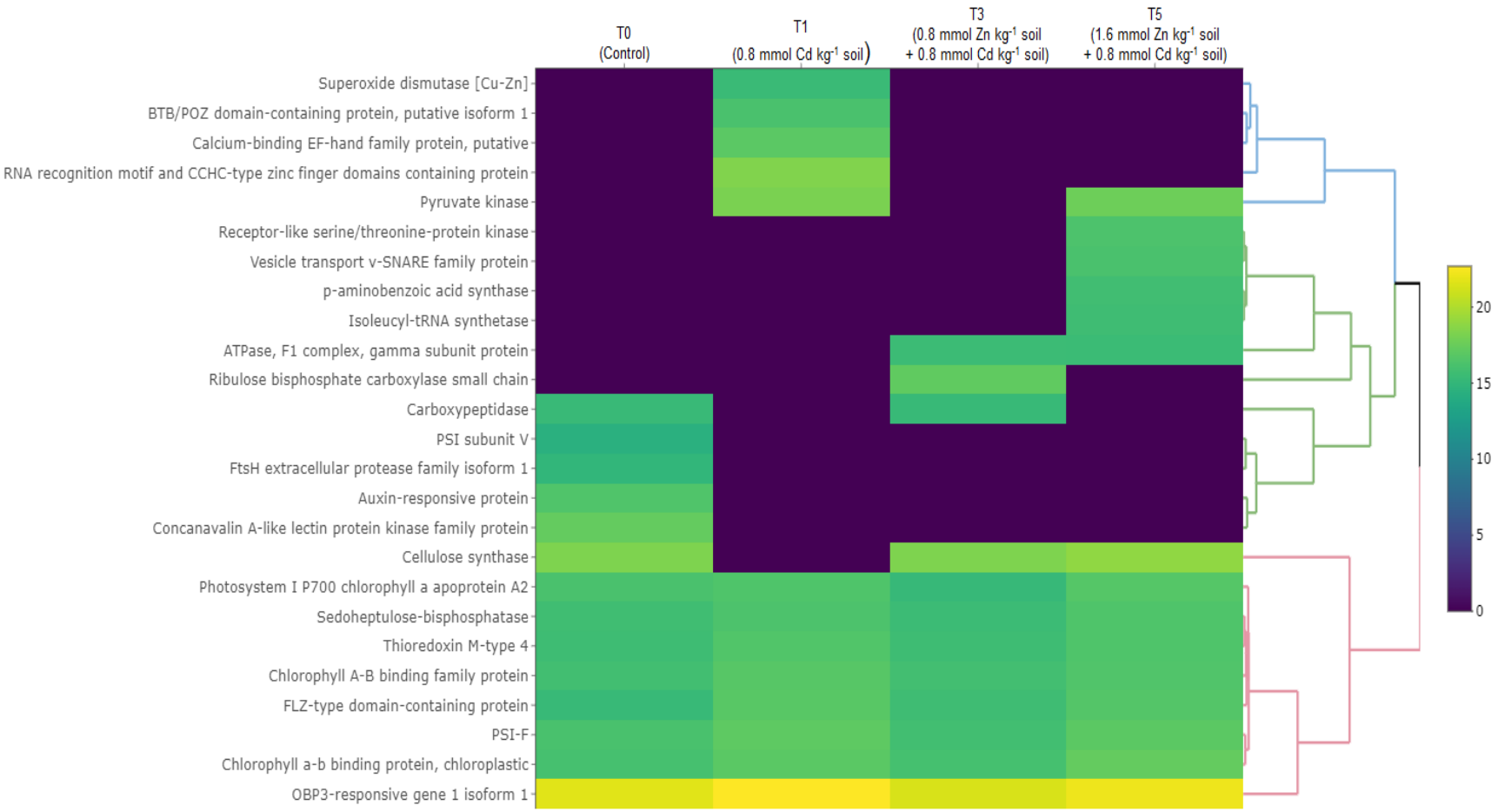

Figura 13 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas no período de 3h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas. Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.

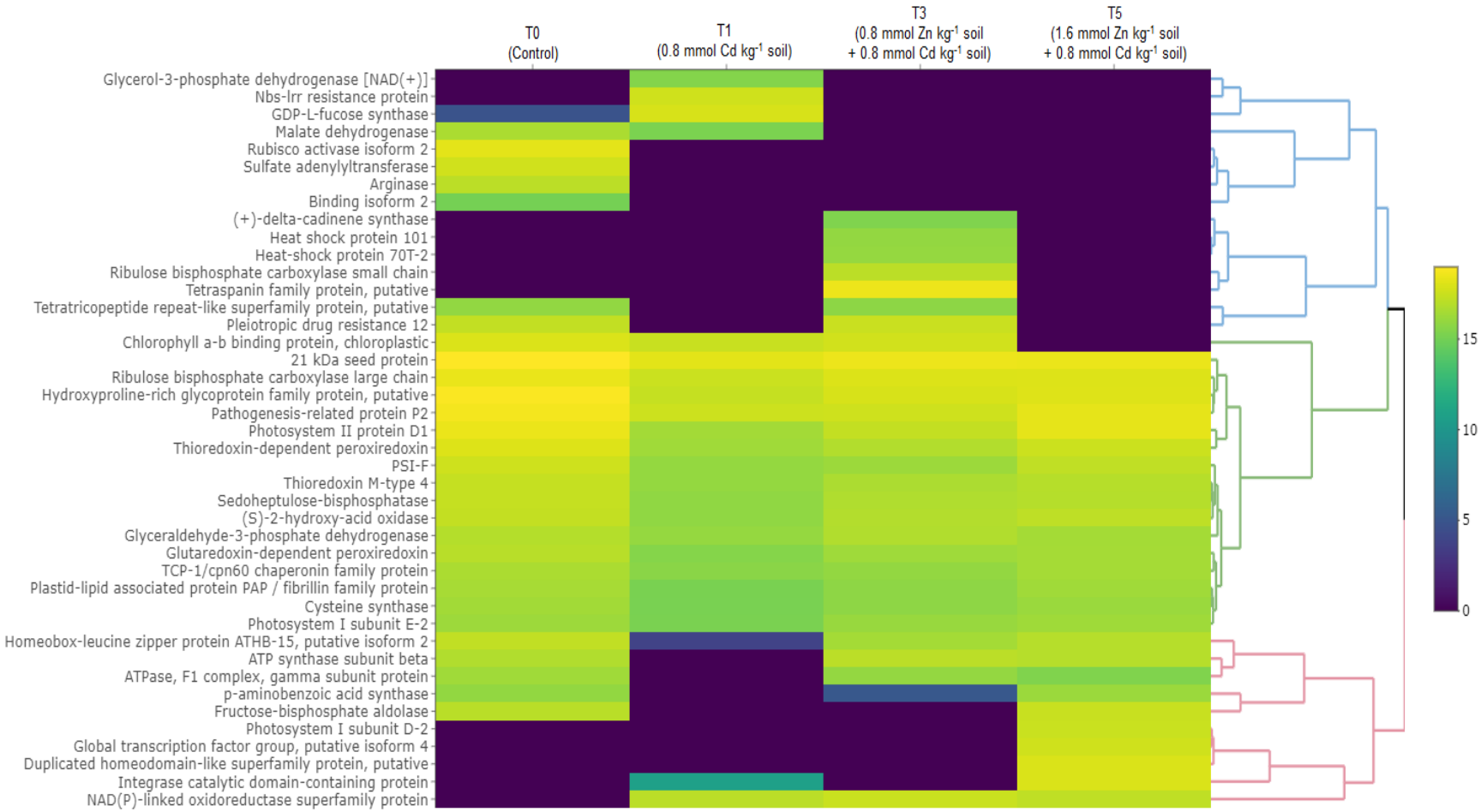

Figura 14 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas aos tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas no período de 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas. Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.

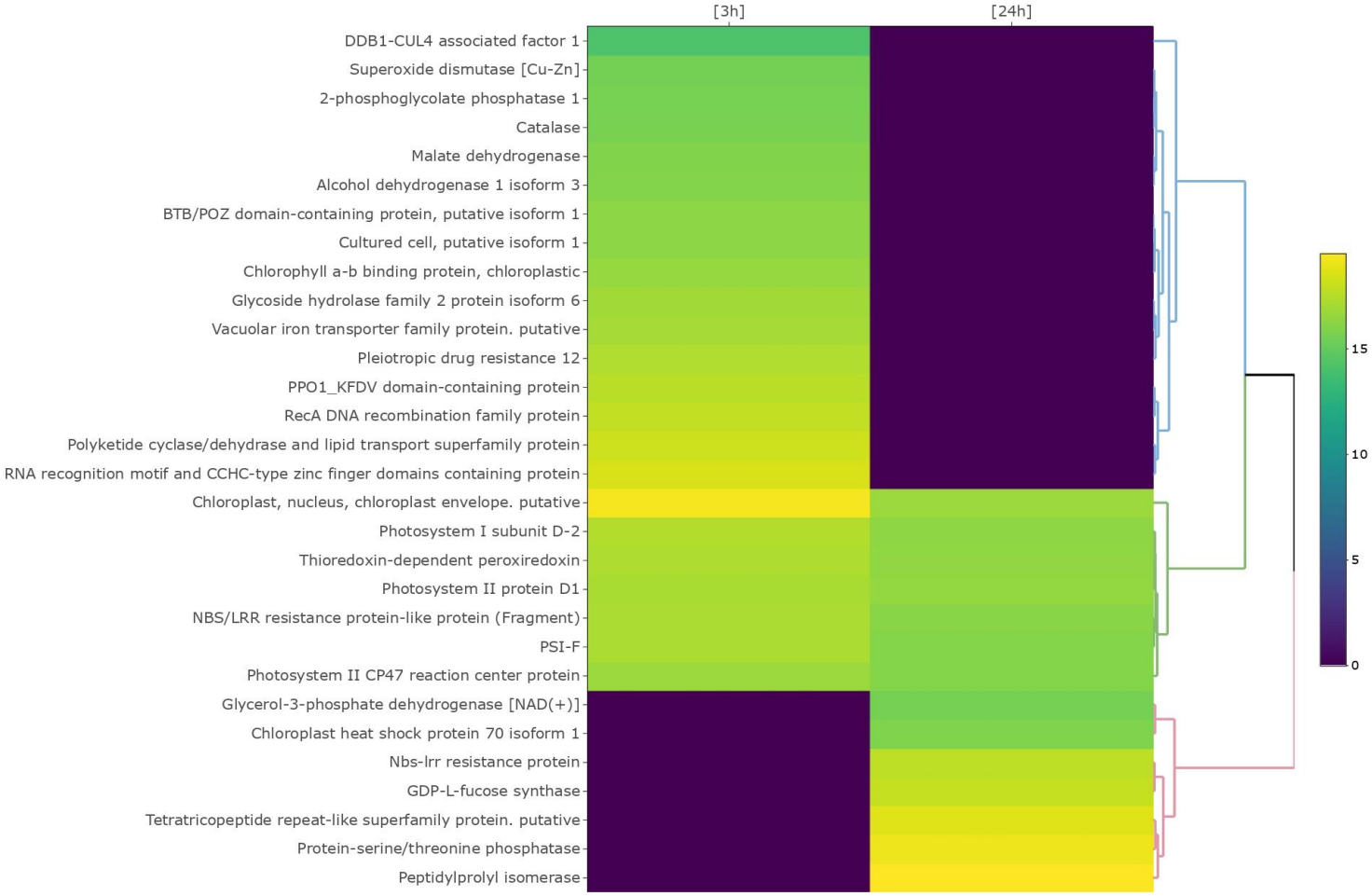

Figura 15 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas entre os períodos. Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.

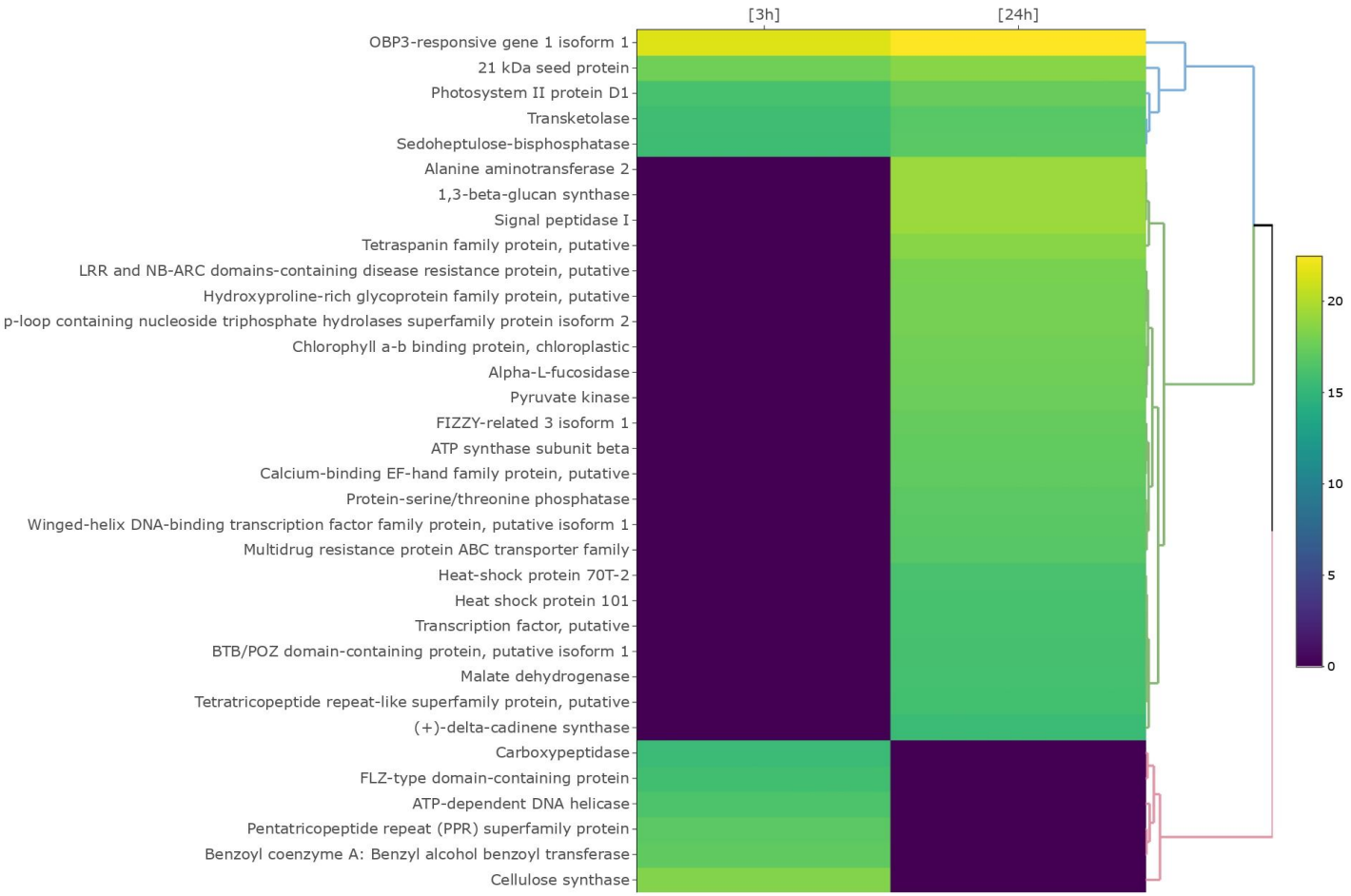

Figura 16 - *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas entre os períodos. Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.

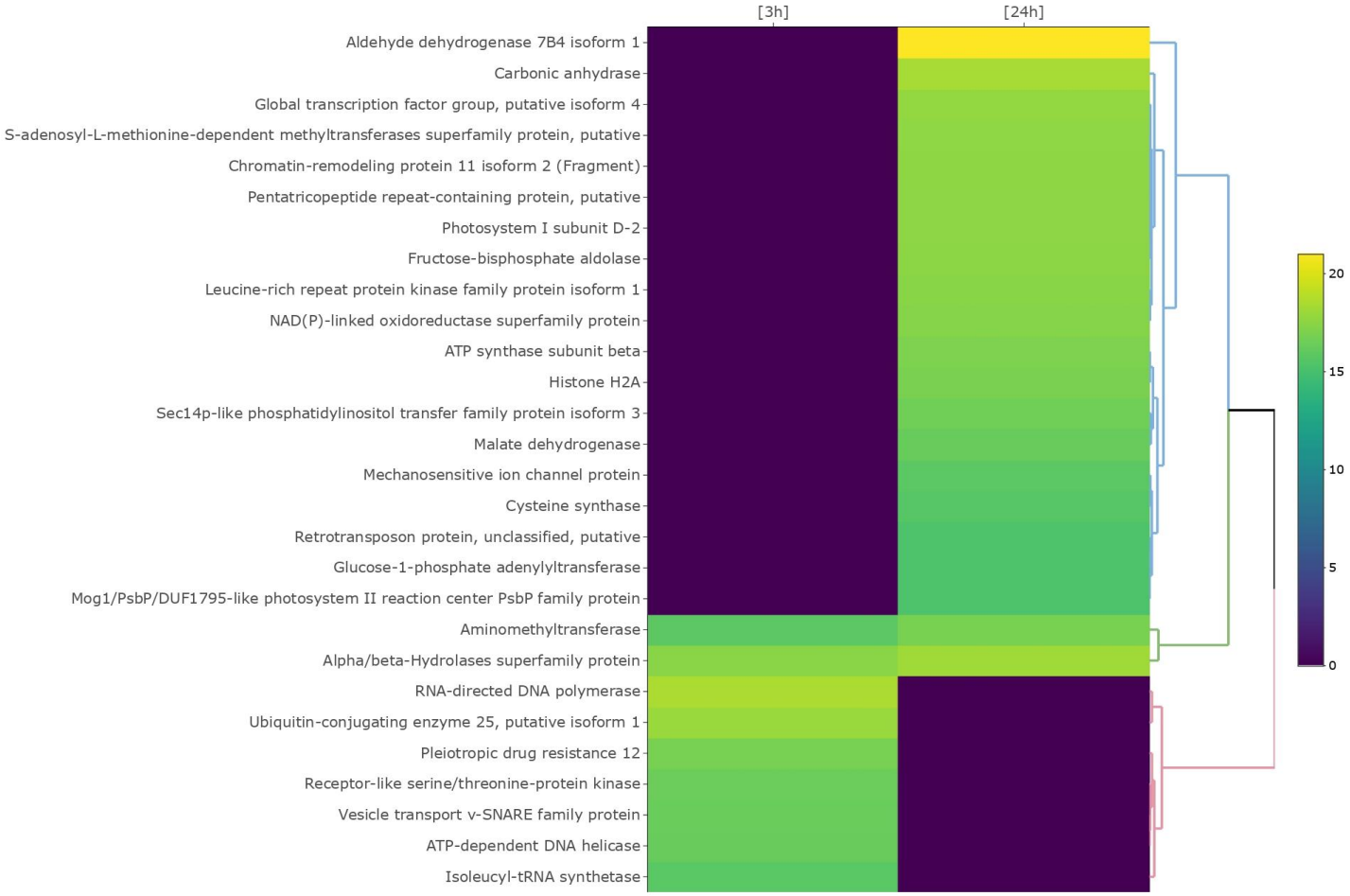

Figura 17 – *Heat map* de expressão proteica em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas ao tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, mostrando o perfil de abundância das proteínas entre os períodos. Parâmetros utilizados para a análise de *clustering*: valores de intensidade normalizados; distância métrica euclidiana; e método de ligação Ward.

4.7 Classificação funcional das proteínas identificadas

A anotação funcional das proteínas diferencialemnte abundantes, identificadas nas diferentes comparações, foi realizada utilizando a análise do *Gene Ontology (GO)* pelo software *Blast2GO*. As proteínas foram categorizadas em grupos de acordo com seu envolvimento em processos biológicos e funções moleculares.

Houve maior participação das proteínas diferencialemnte abundantes nos processos de resposta ao estresse às 24h do que às 3h AAT, quando comparado T0 com os tratamentos T1, T3 e T5 (Figura 18). Essa categoria de termo de ontologia genética inclui qualquer processo, obrigatoriamente exógeno, que resulta em mudança no estado ou atividade de uma célula ou organimos. Dentre as proteínas incluídas no grupo correspondente aos processos de resposta ao estresse, algumas foram identificadas somente às 24h AAT, como a *heat shock protein 101*, a *heat-shock protein 70T-2*, a *pathogenesis-related protein P2*, *(S)-2-hydroxy-acid oxidase*, a *cysteine synthase*, a *thioredoxin-dependent peroxiredoxi*, a *sulfate adenylyl transferase*, a *glutaredoxin-dependent peroxiredoxin*, a *(+)-delta-cadinene synthase* e a *TCP-1/cpn60 chaperonin family protein*, entre outras.

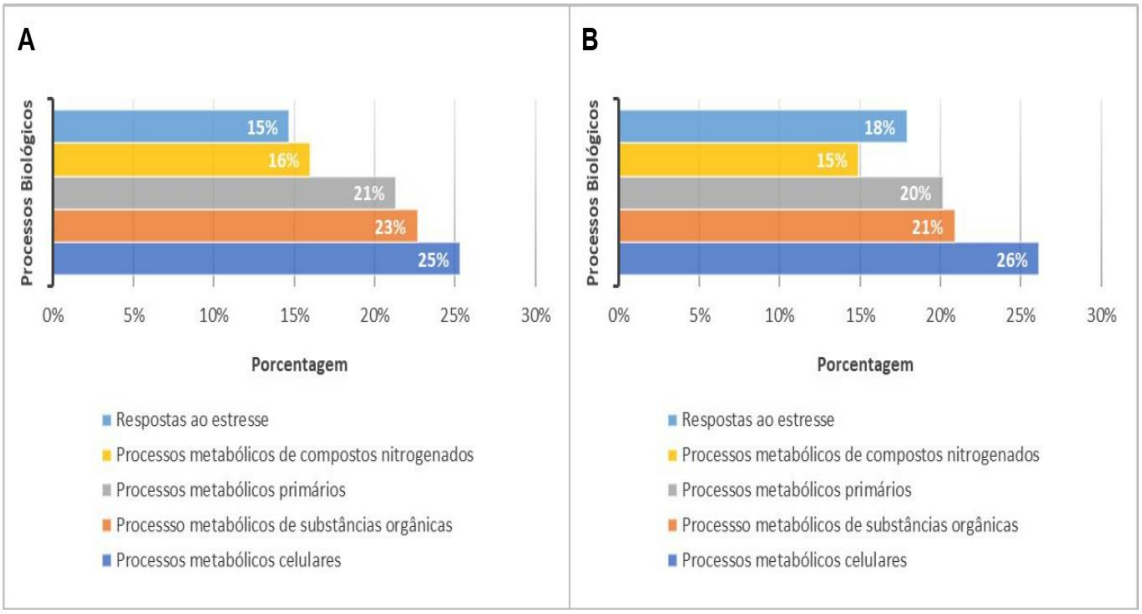

Figura 18 – Classificação funcional das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, de acordo com os processos biológicos com os quais estão envolvidas, coletadas nos períodos de (**A**) 3h e

(**B**) 24h, respectivamente, após aplicação dos tratamentos. As proteínas foram classificadas em processos biológicos de acordo com a distribuição dos termos GO no nível 3, considerando os cinco grupos de processos mais abundantes, correpondendo às proteínas identificadas nos tratametos T0, T1, T3 e T5.

Em relação à classificação funcional das proteínas por funções moleculares, houve uma redução, às 24h AAT, na porcentagem de proteínas envolvidas nos processos de ligação a íons (Figura 19). Essa categoria de termo de ontologia genética inclui proteínas que apresentam funções de ligação a um íon, átomos carregados ou grupos de átomos, como por exemplo, as proteínas *FtsH extracellular protease family isoform*, *RNA recognition motif and CCHC-type zinc finger domains containing protein* e *calcium-binding EF-hand family protein*, entre outras. Além disso, o quinto termo mais abundante, às 24h AAT, foi o do grupo relacionado às proteínas com função de ligação a pequenas moléculas, enquanto às 3h AAT foi o do grupo relacionado às proteínas com atividade de transferase.

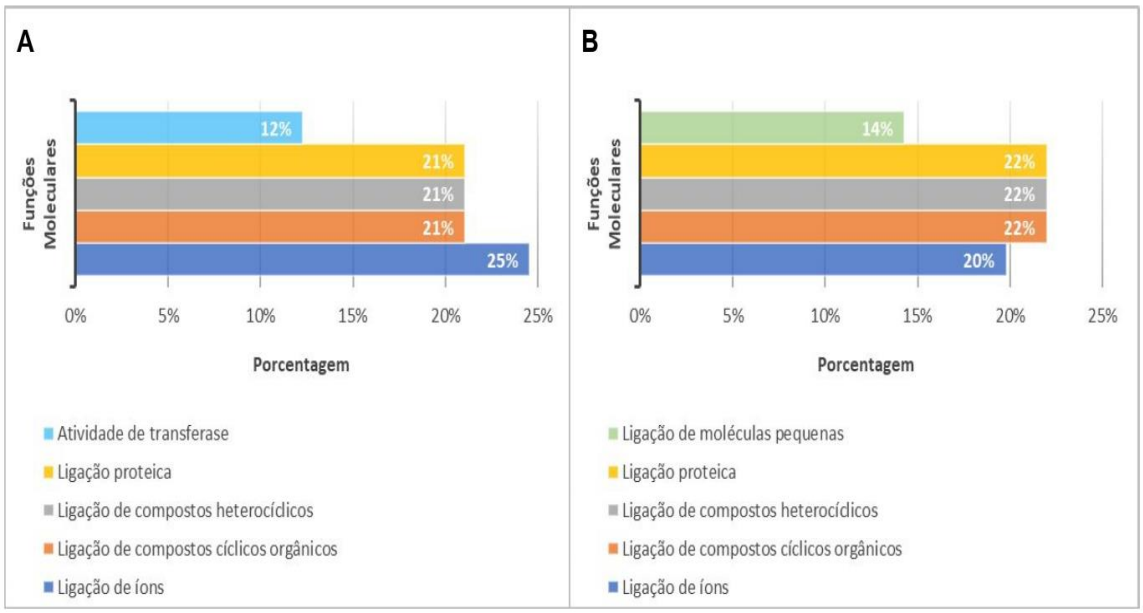

Figura 19 – Classificação funcional das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, de acordo com as funções moleculares com as quais estão envolvidas, coletadas nos períodos de (**A**) 3h e (**B**) 24h, respectivamente, após aplicação dos tratamentos. As proteínas foram classificadas em processos biológicos de acordo com a distribuição dos termos GO no nível 3, considerando os cinco grupos de processos mais abundantes, correpondendo às proteínas identificadas nos tratametos T0, T1, T3 e T5.

O agrupamento das proteínas diferencialmente abundantes em processos biológicos, referentes às comparações entre os tempos de 3 e 24h AAT, dos

tratamentos T1, T3 e T5, estão presentes na Figura 20 A, B e C, respectivamente. De forma geral, a porcentagem de proteínas identificadas, participando dos processos biológicos, foi muito semelhante nesses tratamentos.

O agrupamento por funções moleculares estão presentes na Figura 20, onde D, Ee F correspondem aos tratamentos T1, T3 e T5, respectivamente. Para o tratamento T1, o quinto termo mais abundante de funções moleculares observadas foi o de proteínas com atividade oxidorredutase. Esta categoria de termo de ontologia genética inclui proteínas que apresentam função de catálise de reações de oxidação-redução (redox), como por exemplo, a proteína *photosystem II protein D1*, a *malate dehydrogenase*, a *GDP-L-fucose synthase* e a *superoxide dismutase [Cu-Zn]*, entre outras. Em relação aos tratamentos T3 e T5, o quinto grupo mais abundante de funções moleculares observado foi o das proteínas com atividade de ligação a pequenas moléculas. Essa categoria de termo de ontologia genética inclui proteínas capazes de se ligar a monossacarídeos. Além disso, foi observado, para o tratamento T5, que foi maior a categoria de termo de ontologia que contém proteínas com atividade de ligação a outras proteínas.

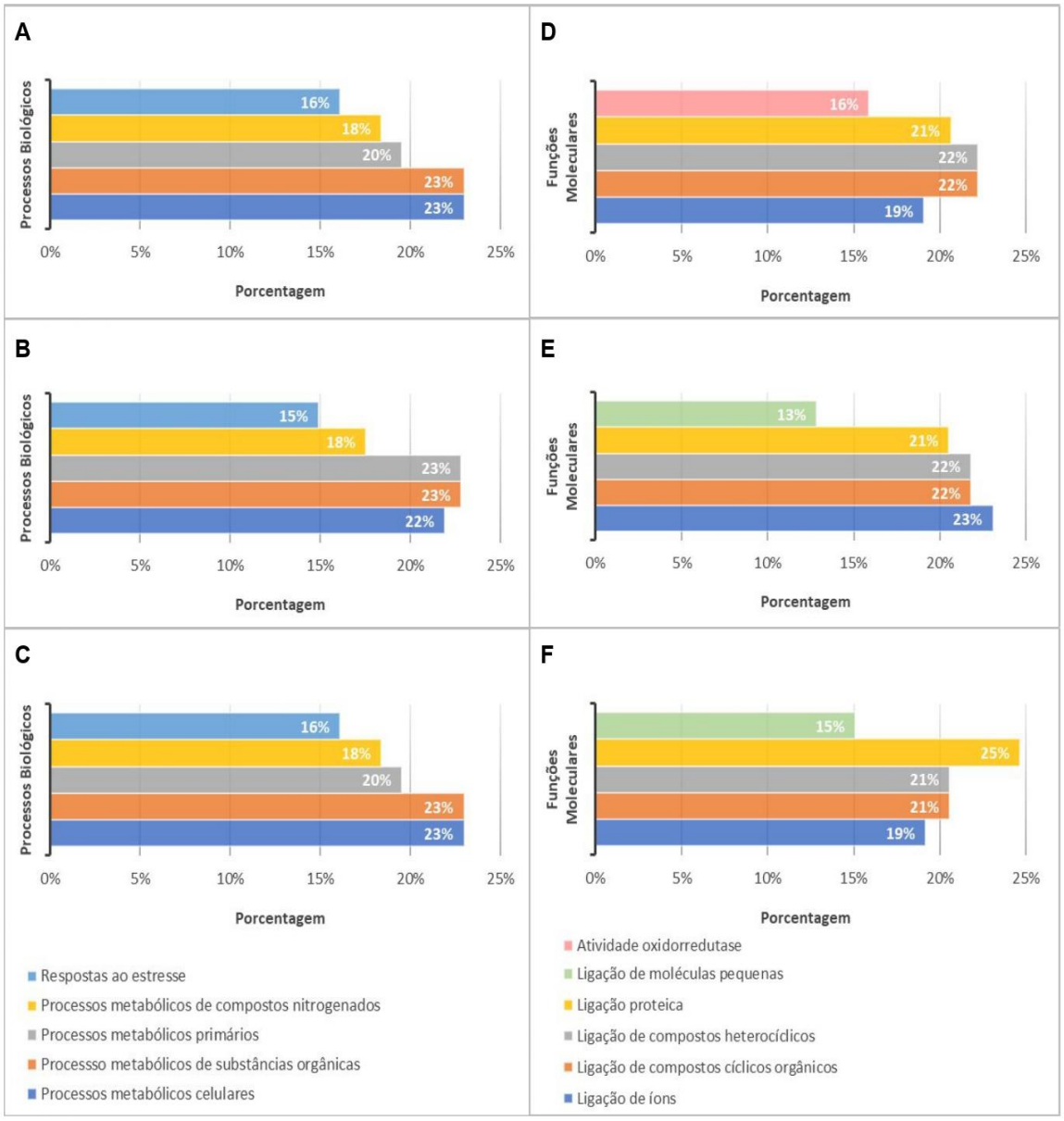

Figura 20 – Classificação funcional das proteínas identificadas conforme os processos biológicos com os quais estão envolvidas e com suas funções moleculares. **A** e **D** - correspondem à categorização das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 do tratamento T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo); **B** e **E** - correspondem à categorização das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 do tratamento T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo); e **C** e **F** - correspondem à categorização das proteínas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 do tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), quando comparados com eles mesmos, coletadas nos períodos de 3 e 24h após aplicação dos tratamentos, agrupadas por processos biológicos e funções moleculares, respectivamente. As proteínas foram agrupadas de acordo com a distribuição dos termos GO no nível 3, considerando os cinco grupos de processos e funções mais abundantes.

4.8 **Resumo dos principais resultados**

Encontra-se na Figura 21 o resumo dos principais resultados encontrados no presente trabalho. A cor larajana indica que o tratamento em questão foi o mais afetado para um dado parâmetro avaliado, enquanto que a seta para cima indica que ele foi afetado positivamente (por exemplo, maior atividade enzimática que os demais) e a seta para baixo indica que ele foi afetado negativamente (por exemplo, menor abundância de uma determinada proteína). Consideram-se apenas os tratamentos utilizados na análise proteômica comparativa, incluindo apenas as proteínas diferencialmente abundantes em comum entre os tratamentos T0 (controle), T1 (0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), T3 (0,8 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) e T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), às 3 e 24h AAT, respectivamente.

		3 horas				24 horas			
		T0	T1	T3	T5	T0	T1	T3	T5
Atividade Enzimática	SOD			↑			↑		
	CAT		↑					↓	
	APX		↓					↓	
	GPX			↑			↑		
Expressão Gênica em Tempo Real	*SODchl*		↓	↓			↑		
	SODcyt		↓				↑		↑
	per-1		↓		↓				↑
	psbA		↓	↓			↓		
	psbO			↓				↓	↓
	Mt-2			↓					↓
Western Blot	ATP Sintase		↓				↑		
	Catalase			↓				↓	
Proteômica comparativa	Subunidade F do PSI		↑				↓		
	Sedoheptulose-bisfosfatase				↑		↓		
	Tiorredoxina M – T4		↑				↓		
	Apoproteína A2 da clorofila a do PSI P700			↓					
	Proteína de ligação à clorofila a/b PSII				↑				
	Proteína 1 do gene responsivo a OBP3		↑						
	Proteína contendo domínio do tipo FLZ		↑						
	Proteína D1 do PSII						↓		
	Subunidade F do PSI						↓		
	RuBisco						↓		
	GAPDH						↓		
	(S)-2-hidroxiácido oxidase						↓		
	Chaperonina TCP-1/cpn 60							↓	
	Proteína 2 relacionada à patogênese						↓		
	Peroxirredoxina dependente de tiorredoxina						↓		
	Peroxirredoxina dependente de glutarredoxina						↓		

Figura 21 – Representação esquemática das alterações mais relevantes encontradas no presente trabalho.

5. DISCUSSÃO

A SOD é considerada a primeira enzima a atuar no processo de desintoxicação causado pelo excesso der ERO (HASANUZZAMAN et al., 2017). Esta enzima utiliza o ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) como substrato e o converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é, posteriormente, eliminado por peroxidases (DEMIDCHIK, 2015). Neste estudo, a aplicação de Cd e da combinação Zn+Cd no solo induziu alterações na atividade de SOD em folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51. De forma geral, observou-se que a tividade de SOD variou ao longo dos tempos de coleta. Entretanto, quando se analisou cada tempo de coleta de folha, verificou-se que houve pouca diferença estatística em relação à atividade de SOD entre T0 e os demais tratamentos comparados entre si (Figura 2). Apesar disso, para o tratamento T1, houve uma atividade significativamente ($p< 0,05$) maior do que a de T0, às 6, 12, 24 e 48h AAT, finalizando com a atividade significativamente ($p< 0,05$) menor que a de T0, às 96h AAT. Um efeito temporal semelhante na atividade de SOD foi observado em folhas de plantas de *Zea mays* (cv. 777) cultivadas em hidroponia, tratadas com 50 µM de $CdSO_4$. Nesse caso, a atividade de SOD aumentou significativamente em relação ao controle até os sete primeiros dias após a aplicação de Cd, tornando-se estatísticamente insignificante aos 14 dias após o tratamento (KUMAR; TEWARI; SHARMA, 2008).

Não houve redução significativa da atividade de SOD nos tratamentos onde foram aplicadas as diferentes doses de Zn+Cd, quando comparados ao controle (T0) e ao tratamento que recebeu apenas Cd (T1). Entretanto, o tratamento T5 foi estatisticamente semelhante ao T0, às 12, 24, 48 e 96h AAT. Em plantas de *Oryza sativa* de dois genótipos contrastantes para a tolerância ao Cd, cultivados em condições de hidroponia, a aplicação de diferentes doses de Cd (0, 1 e 5 µM) combinadas, cada uma delas, com duas doses de Zn (0,2 e 1 µM), resultou na redução significativa da atividade de SOD apenas nas combinações onde a maior dose de Zn foi aplicada (HASSAN et al., 2005). Resultado semelhante foi observado por Cherif et al. (2011), onde a aplicação da maior dose de Zn, combinado com Cd (150 µmol $ZnCl_2$ L^{-1} + 10 µmol $CdCl_2$ L^{-1}), resultou em menor atividade de SOD, em folhas de *Solarium lycopersicum*, do que nos tratamentos com as doses de 10, 50 e 100 µmol $ZnCl_2$ L^{-1} combinados

com 10 µmol $CdCl_2$ L^{-1}. Nesse caso, a atividade de SOD, no tratamento contendo a maior dose de Zn+Cd, foi menor que a do tratamento contendo apenas Cd e estatisticamente semelhante a T0. Segundo Rizwan et al. (2019), a diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, mediada pela aplicação de Zn, na presença de Cd, é um indicador de que esse metal tem a capacidade de aliviar o estresse oxidativo induzido pelo Cd, por meio de mecanismos moleculares que regulam os níveis de ERO.

Os resultados da análise proteômica comparativa, por espectrometria de massas, revelaram que a isoforma Cu-Zn-SOD foi exclusiva para o tratamento T1, às 3h AAT (Figura 13). Quando esse tratamento foi comparado com ele mesmo, entre os tempos de 3 e 24h AAT, verificou-se que Cu-Zn-SOD foi *up* regulada às 3h AAT (Figura 15). Romero-Puertas et al. (2007) demonstraram que o Cd possui efeito negativo, principalmente sobre a isoforma de SOD dependente de Cu e Zn, reduzindo drasticamente o acúmulo dessa enzima em plantas de *Pisum sativum* na presença de Cd, ao passo que a isoforma dependente de Mn foi menos afetada. Entretanto, os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que o Cd induziu o aumento na abundância de Cu-Zn-SOD somente no tratamento que recebeu apenas Cd (T1), indicando que o metabolismo antioxidativo das plantas de *T. cacao* foi mais requerido na ausência de Zn.

O perfil de transcrição dos genes para Cu-Zn-SOD citoplasmática (*CytCuZnSOD*) e cloroplastídica (*ChlCuZnSOD*) revelou, às 3h AAT, que a expressão destes genes foi *down*-regulada em todos os tratamentos em relação a T0. Apesar disso, a menor redução nos níveis de transcritos de ambos os genes foi observada no tratamento com a maior dose de Zn+Cd (T5) (Fgura 6 A). A partir das 24h AAT, a expressão de *CytCuZnSOD* foi regulada positivamente em todos os tratamentos, ao contrário do observado para o gene de *ChlCuZnSOD*, que foi down-regulado ou não diferiu significativamente ($p < 0,05$) de T0 ao longo dos tempos de coleta analisados no presente trabalho; exceto para o tratamento T1, às 24 e 96h AAT, que foi cerca de 39% e 5% maior que T0, respectivamente (Figura 6 D e F). Lou et al. (2011) mostraram que a expressão de *CytCu-Zn-SOD* foi *up*-regulada mais tardiamente (às 6 e 24h AAT) em relação à expressão de *ChlCu-Zn-SOD* (às 4 e 6h AAT) em folhas de *Lolium perenne*, quando foi adicionado 0,2 mM Cd à solução nutritiva. Porém, conforme

o tempo de exposição aumentou (48h), a expressão de ambos os genes dimunuiu para um nível estatisticamente semelhante ou abaixo do observado para as plantas controle. Segundo Wang et al. (2016), a expressão de genes, para as diferentes isoformas de SOD, é governada pelos eventos que ocorrem em níveis subcelulares, nos quais é gerado o estresse oxidativo.

A isoforma Cu-Zn-SOD tem um papel crucial na aclimatação de espécies vegetais contra o estresse oxidativo induzido por Cd. De acordo com Li et al. (2017), a superexpressão do gene CuZn-SOD de *Sedum alfredii*, uma espécie co-hiperacumuladora de Cd, em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, aumentou a capacidade de defesa antioxidante e reduziu os danos associados à superprodução de H_2O_2 e de radicais superóxidos na presença de Cd. Diversos estudos demonstram que a aplicação de Cd regula positivamente a expressão de genes Cu-Zn-SOD em diferentes espécies vegetais. Por exemplo, em folhas de *Festuca arundinacea*, expostas, durante 24h, a 50 e 150 mg Cd L^{-1}, a expressão de Cu-Zn-SOD foi *up*-regulada em ambas as condições experimentais (LOU et al., 2017). Por outro lado, em raízes de *Cicer arietinum*, a aplicação de 50, 100 e 200 µM Cd *up*-regulou a expressão de Cu-Zn-SOD até às 12h AAT. Entretanto, houve uma diminuição dos níveis de expressão às 48h nas raízes tratadas com as duas maiores doses de Cd (KAR, 2018). Ademais, em folhas de *S. alfredii*, a aplicação de 400 µM Cd reprimiu a expressão de Cu-Zn-SOD nas primeiras 6h AAT (LI et al., 2017). Porém, às 12, 24 e 48h houve um aumento significativo na expressão deste gene, que finalizou sendo reprimido às 72h e 96h AAT, ao passo que a expressão nas raízes foi *down*-regulada durante todos os tempos analisados (LI et al., 2017). Os resultados descritos anteriormente demonstram que a regulação de genes Cu-Zn-SOD é dependente da dose de Cd e principalmente do órgão vegetal e do tempo de exposição ao metal.

No presente trabalho, a atividade de CAT, para o tratamento T1, foi significativamente ($p< 0,05$) maior que a de T0 e dos demais tratamentos, às 3, 6 e 12h AAT. No tratamento onde foi aplicada a maior dose de Zn+Cd (T5), também foi observado que a atividade de CAT foi significativamente ($p< 0,05$) superior a T0, porém significativamente ($p< 0,05$) inferior a T1 (Figura 3). A enzima CAT é reponsável por eliminar H_2O_2 dos compartimentos subcelulares por meio da reação de dismutacão de duas moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 (2

$H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + ½\ O_2$) (ZAMOCKY; FURTMÜLLER; OBINGER, 2008). Apesar de a função de H_2O_2 como sinalizador e regulador da expressão de alguns genes, seu acúmulo excessivo pode levar ao estresse oxidativo em plantas (QUAN et al., 2008). Guan et al. (2009) mostraram que a biossíntese de CAT é induzida pela aplicação de Cd em plantas de *Nicotiana tabacum* (tipo selvagem) e que a superexpressão de um gene de CAT de *Brassica juncea* (*BjCAT3*) pode mitigar os efeitos deletérios provocados pelas ERO em plantas de *N. tabacum* transgênicas, por meio da redução dos níveis de H_2O_2 e, consequentemente, da morte celular programada.

O acúmulo de CAT, investigado por meio de *western blot*, revelou que houve redução no nível dessa proteína para os tratamentos T1, T3 e T5 em relação a T0, tanto no tempo de 3h quanto no de 24h AAT (Figura 9). Em ambos os tempos, o acúmulo de CAT foi menor para o tratamento T3. Porém, observou-se um aumento acentuado para o tratamento T5 em relação ao anterior. Conforme demonstrado por Romero-Puertas et al. (2007), o Cd pode provocar redução no acúmulo de CAT, embora a expressão do gene, que codifica para a proteína em questão, tenha sido *up*-regulado, o que sugere, nesse caso, que algum tipo de modificação pós-traducional tenha sido responsável pela redução nos níveis desta proteína.

As enzimas antioxidantes podem atuar em sinergia para restaurar o equilíbrio redox celular. Além de CAT, as enzimas APX e GPX podem contribuir para a dimunuição dos níveis de H_2O_2. Essas duas enzimas necessitam de moléculas redutoras para dismutar o H_2O_2. Geralmente, são utilizados como substratos os redutores ascorbato, para APX, e guaiacol, para GPX, embora essa última possa também oxidar o ascorbato, bem como utilizar compostos fenólicos complexos como substrato (MEHLHORN et al., 1996; VAN DOORN; KETSA, 2014). Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para maior atividade de GPX, no processo de eliminação de H_2O_2, em relação à atividade de APX. A atividade de APX foi reduzida ou não apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) em relação a T0 no decorrer de todo período de coleta analisado (Figura 4). Em contrapartida, a atividade de GPX, para a maioria dos tratamentos, foi significativamente maior que a de T0 ao longo de todo período de coleta (Figura 5). A alta atividade de GPX, para os tratamentos onde foram aplicadas as diferentes doses de Zn em combinação com Cd, sugere que a teor

de H_2O_2 se manteve elevado mesmo na presença de Zn. Por outro lado, o Cd pode induzir a geração de ERO, por meio do bloqueio da transferência de elétrons entre a semiquinona e o citocromo b, no complexo respiratório III, da membrana mitocondrial interna (WANG et al., 2004). Heyno, Klose e Krieger-Liszkay (2008) demonstraram que a formação de H_2O_2 foi induzida em mitocôndrios de células vegetais expostas ao Cd. Além disso, existem evidências de que altos teores intracelulares de Zn livre também podem levar à inibição do transporte de elétrons em nível mitocôndrial (GOMES et al., 2016).

O padrão de expressão de *per-1* variou ao longo do período de coleta analisado, sendo significativamente ($p < 0,05$) inferior ao de T0, às 3h AAT, e superior às 6h e 12h AAT. Posteriormente, às 24h e 48h AAT, houve redução significativa ($p < 0,05$) da expressão de *per-1,* cujo valor foi inferior a de T0, seguido de aumento às 96h AAT (Figura 6). Os demais tratamentos tiveram um incremento no número de transcritos de *per-1* somente a partir das 24h AAT. Entretanto, para o tratamento T4, houve a manutenção da expressão desse gene, em nível semelhante ao de T0, ao longo de todo o período de coleta. O gene *per-1* codifica para uma peroxidase do grupo III, no qual estão incluídas proteínas com função localizada na parede celular, associadas à formação de lignina e suberina (VAN DOORN; KETSA, 2014). Além de regular os níveis de H_2O_2 na parede celular, as peroxidases do grupo III podem estimular o alongamento celular, por meio da geração de certas ERO que atuam como sinalizadoras, a exemplo do radical hidroxila (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004).

Algumas enzimas reguladoras do estado redox, denominadas peroxirredoxinas (*Prxs*), também tiveram sua abundância alterada nos diversos tratamentos avaliados (Figura 14). Essas enzimas auxiliam no balanço redox por meio de grupos tióis, participando de processos centrais do metabolismo primário das plantas, como a fotossíntese (VASEGHI et al., 2019). Além de catalisar a redução de diversos peróxidos, as *Prxs* vegetais desempenham um papel na sinalização redox (TOVAR-MÉNDEZ, 2011). No presente trabalho, foram identificadas duas diferentes *Prxs*, uma dependente de glutarredoxina e outra de tiorredoxina, cuja abundância foi afetada de maneira semelhante nos diversos tratamentos avaliados, a exceção de T1 e de T5 que apresentaram a menor e a maior abundância, de ambas as proteínas, respectivamente.

O Cd é bem conhecido por seu efeito nocivo sobre a fotossíntese. Segundo Parmar, Kumari e Sharma (2013), a inibição da fotossíntese pelo Cd é devido à interrupção das reações de evolução de O_2 no fotossistema 2 (PS2) e à alteração do fluxo de elétrons, tanto no fotossistema 1 (PS1) quanto no PS2. Os resultados do presente trabalho demonstraram que a expressão do gene *psbA* sofreu alteração para os diversos tratamentos em relação ao T0. Observou-se, para os tratamentos T1, T4 e T5, um incremento no número de transcritos de *psbA* mais precocimente (às 3, 6 e 12h AAT) do que os demais tratamentos (Figura 6 A, B e C). O aumento na expressão de *psbA*, nestes tratamentos, pode indicar o comprometimento da proteína D1 de PS2. A proteína D1, codificada pelo gene *psbA*, é um componente chave no processo de transferência de elétrons de PS1, sendo considerada, juntamente com a proteína D2, o seu centro de reação (SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008). A análise da expressão diferencial das proteínas, identificadas no tempo de coleta de 24h AAT, mostrou que a proteína D1 foi *down*-regulada para os tratamentos T1, T3 e T5. Entretanto, na ausência de Zn, o efeito deletério sobre a abundância da proteína D1 foi maior, ao passo que na presença da maior dose de Zn+Cd (T5) foi menos pronunciada (Figura 16). Franco et al. (1999) mostraram que a síntese líquida da proteína D1 foi inicialmente estimulada em plantas de *P. sativum* e *Vicia faba* para o tratamento correspondente a 1 mM de $CdCl_2$ durante as primeiras 5h de indução do estresse, porém foi inibida à medida que o estresse se tornou prolongado (24h).

A expressão de uma das proteínas que atuam no complexo antena de PS2 também foi alterada com aplicação dos tratamentos. A proteína de ligação às clorofilas *a* e *b* foi *up*-regulada para os tratamentos T1 e T5, às 3h AAT (Figura 13). Entretanto, às 24h AAT, para todos os tratamentos analisados, a referida proteína de ligação foi *down*-regulada, sendo o tratamento T5 o mais afetado (Figura 14). As proteínas de ligação às clorofilas *a* e *b* são apoproteínas do complexo coletor de luz de PS2, que estão normamelmente associadas aos pigmentos fotossintéticos no complexo antena. Este complexo antena é responsável pela absorção de luz solar e pela transferência de energia de excitação para o centro de reação de PS2 (LIU et al., 2013).

O sítio catalítico de PS2 é onde ocorre a fotooxidação da molécula de água, que libera oxigênio e prótons H^+. A PsbO é uma das várias proteínas

extrínsecas que ajudam na estabilização do sítio catalítico de PS2, além de ser essencial para a evolução eficiente e estável de O_2 (MURAKAMI et al., 2005). No presente trabalho, a expressão do gene *psbO* variou ao longo do período de coleta, para os diferentes tratamentos analisados. Entretanto, não foi observado um padrão dependente da dose aplicada. Apesar disso, mesmo às 96h AAT, alguns tratamentos apresentaram uma alta expressão de mRNA codificado por esse gene. Zsiros et al. (2020) demonstraram que PS2 é o principal alvo da exposição prolongada ao Cd no aparato fotoquímico de *Chlorella variabilis*, especialmente devido à degradação da proteína D1 e da proteína PsbO do complexo de evolução de oxigênio.

Verificou-se, também, alteração na abundância de proteínas que compõem o complexo macroproteico de PSI, como, por exemplo, a subunidade F. Para o tratamento T1, esta proteína teve sua abundância *up*-regulada, às 3h AAT, e *down*-regulada às 24h AAT (Figuras 13 e 14). Por outro lado, houve para o tratamento T5, às 24h AAT, uma abundância menos afetada de proteínas de PSI em relação a T0 e aos demais tratamentos (Figura 15). Além disso, a abundância de outras proteínas que compõem PS1 foi bastante semelhante entre si nos respectivos períodos de coleta analisados. Como, por exemplo, a apoproteína A2 da clorofila *a* de PS1 (P700), que teve sua abundância afetada de maneira bastante semelhante ao observado para a subunidade F de PS1, às 3h AAT. Já a subunidade E, responsável pelo encaixe dos aceptores de elétrons solúveis, como a ferredoxina (SUBRAMANYAM et al., 2010), teve sua abundância semelhante a da subunidade F de PS1, às 24h AAT, sendo principalmente afetada no tratameto T1 (Figura 14). Isso mostra que a interação entre tempo de exposição x tratamento influencia na expressão dessas proteínas de forma bastante parecida. Provavelmente, Cd, na ausência de Zn, promove o desarranjo da macroorganização do complexo proteíco formador de PS1, comprometendo alguns de seus componentes, mais severamente, conforme o aumento do tempo de exposição ao Cd, semelhante ao efeito prolongado de Cd sobre a degradação das proteínas PsbA (D1) e PsbO, observado por Zsiros et al. (2020).

O metabolismo energético das plantas do genótipo de cacau CCN 51 foi também afetado pelo tratamento com Cd e pela combinação Zn+Cd no solo. A subunidade maior da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase

(RuBisco) foi altamente abundante nas plantas de T0, ao passo que o tratamento com Cd reduziu seu acúmulo, o que foi parcialmente restaurado pelo tratamento T5, correspondente à maior dose de Zn (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo), às 24h AAT (Figura 14). A RuBisco catalisa a primeira reação do ciclo de Calvin & Benson, que resulta na fixação do dióxido de carbono, o que possibilita a biossíntese líquida de carboidratos (HARTMAN; HARPEL, 1994). Lopes Júnior et al. (2015) também encontraram menor acúmulo da RuBisco ao avaliar a expressão diferencial do proteoma de plantas de *Helianthus annuus* tratadas com Cd. Dias et al. (2013) evidenciaram que íons Cd^{2+} interferem na ativação da RuBisco e danificam sua estrutura, ao substituir os íons Mg^{2+}. Esse mecanismo de interferência de Cd na estrutura da RuBisco pode ser o principal fator que ocasionou a redução da sua abundância na ausência de Zn.

A sedoheptulose-bisfosfatase, outra enzima que atua no ciclo de Calvin & Benson, cliva a sedoheptulose-1,7-bisfosfato em sedoheptulose-7-fosfato, o que resulta na liberação de um íon fosfato inorgânico na solução (RAINES; LLOYD; DYER, 1999). A abundância dessa proteína foi parecida com o foi observado para a RuBisco, às 24h AAT, onde o tratamento T1 foi o mais afetado. Isso, por sua vez, pode apontar que o comprometimento das enzimas-chave mais à montante do ciclo metabólico de Calvin & Benson pode vir a comprometer a eficiência de todo o restante do ciclo, uma vez que cada enzima atua sobre o substrato da reação anterior.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), por outro lado, foi *down*-regulada nos tratamentos T1 e T5, às 24h AAT. Apesar disso, a abundância dessa proteína foi menos afetada no tratamento T5. Já no tratamento T3, seu acúmulo foi equivalente ao do tratamento T0. A GAPDH é uma enzima que atua em diversas rotas metabólicas, por exemplo, na glicólise, no catabolismo de frutose e na via de pentose fosfato (PLAXTON, 1996). Na via glicolítica, GAPDH catalisa a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato (GAP) em 1,3-bisfosfoglicerato, utilizando como cofatores a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e o fosfato inorgânico (WHITE; GARCIN, 2015). Alguns estudos mostram que o estresse induzido por Cd em plantas pode resultar na inativação da GAPDH, na redução de sua atividade e, especialmente, na translocação nuclear (BURZYŃSKI; ŻUREK, 2007; VESCOVI et al., 2013). Sua translocação para o

núcleo tem sido atribuída à ativação da transcrição de certos genes (MIAO et al., 2019).

Proteínas relacionadas aos processos biológicos de resposta a agentes estressores foram mais induzidas às 24h AAT em relação às 3h AAT (Figura 18). Algumas dessas proteínas foram exclusivas de certos tratamentos, como as proteínas do choque térmico (HSP) e a proteína de resistência NBS-LRR, enquanto outras foram comuns a todos os tratamentos. A indução da expressão da HSP101 está relacionada com alguns estresses abióticos, como desidratação e, principalmente, estresse térmico (CAMPBELL et al., 2001; ALMESELMANI; DESHMUKH; CHINNUSAMY, 2012). Já as proteínas HSP70, apesar de serem fortemente induzíveis por choque térmico e outras formas de estresse celular, são expressas constitutivamente (MAHMOOD et al., 2010). Tanto HSP101 quanto HSP70 são conhecidas por prevenir ou reverter a inativação e a agregação de proteínas sensíveis ao calor (MCLOUGHLIN et al., 2016). O papel de HSP, na tolerância a metais pesados em plantas superiores, está igualmente associado à sua capacidade de reparação das proteínas desnaturadas por meio do seu redobramento, bem como em promover a degradação seletiva de proteínas mal dobradas ou desnaturadas (HASAN et al., 2017). Estas protéinas foram encontradas somente para o tratamento T3, apesar de o efeito de Cd ter sido notamente mais nocivo à abundância de proteínas observada para o tratamento T1, como já foi discutido anteriormente. Basile et al. (2015) demonstraram que a expressão de HSP70, em um experimento *in vitro* com *Lemna minor*, foi induzida sobretudo pela aplicação de metais pesados não-essenciais, como Cd e Pb, e menos induzida por metais essenciais, como Cu, ao passo que os tratamentos com diferentes doses de Zn não tiveram alteração em relação ao controle. Neste caso, para os metais que induziram a expressão de HSP70, foi verificada uma relação dose x tempo, onde o Cd induziu a expressão de HSP70 logo nas primeiras 12 h AAT, nas três doses de Cd aplicadas (10^{-6}, 10^{-5} e 10^{-4} M), mas reduziu a expressão drasticamente na maior dose de 3 a 7 dias AAT, enquanto o Cu induziu a expressão somente na maior dose (10^{-4} M) de 6h até 7 dias AAT.

CONCLUSÕES

A expressão de genes relacionados com as enzimas do metabolismo antioxidativo não foi um bom marcador do estresse induzido por Cd, nem do potencial efeito de mitigação de Zn, uma vez que poucas diferenças foram observadas entre os tratamentos;

A comparação dos perfis de abundância das proteínas diferencialmente expressas, por meio de *heat maps*, possibilitou verificar como o Cd afetou o metabolismo primário das plantas e induziu respostas características de estresses abióticos;

As respostas, em nível de proteoma, foram dependentes do tempo de exposição aos metais, sendo que a exposição prolongada (24h) teve maior efeito sobre o acúmulo das proteínas no tratamento onde foi aplicado apenas Cd;

O tratamento T5 (1,6 mmol Zn kg^{-1} solo + 0,8 mmol Cd kg^{-1} solo) foi o que melhor respondeu ao estresse induzido pelo Cd, uma vez que sofreu menos redução na abundância de proteínas comuns aos demais tratamentos.

REFERÊNCIAS

ABT, E. et al. Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 2, p. 92-102, 2018. DOI: 10.1080/19393210.2017.1420700.

AHNERT, D. et al. Melhoramento Genético e Produtividade do Cacaueiro no Brasil. In: SOUZA JÚNIOR, J.O. (org.). **Cacau: cultivo, pesquisa e inovação**, p. 151, 2018. ISBN: 978-85-7455-484-6.

ALBERTS, H.C.; CIDELL, J. Chocolate consumption, manufacturing, and quality in Europe and North America. In: SQUICCIARINI, M.P.; SWINNEN, J. (ed.). **The Economics of Chocolate**, v. 119, 2015. ISBN: 978-0-19-872644-9.

ALI, H.; KHAN, E. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals'–proposal of a comprehensive definition. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 6-19, 2018. DOI: doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652.

ALLOWAY, B.J.; STEINNES, E. Anthropogenic additions of cadmium to soils In: MCLAUGHLIN, M.J; SINGH, B.R. (ed.). Cadmium in Soils and Plants. **Developments in Plant and Soil Sciences**, Springer, Dordrecht, p. 97-123, 1999. DOI: 10.1007/978-94-011-4473-5_5.

ALMEIDA, A-A.F.; VALLE, R.R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology,** v. 19, p. 425-448, 2007.

ALMESELMANI, M.; DESHMUKH, P.S.; CHINNUSAMY, V. Effects of prolonged high temperature stress on respiration, photosynthesis and gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties differing in their thermotolerance. **Plant Stress**, v. 6, n. 1, p. 25-32, 2012.

AMIST, N.; BANO, C.; SINGH, N.B. Antioxidative Machinery for Redox Homeostasis During Abiotic Stress. In: ROYCHOUDHURY, A; TRIPATHi, D.K. (ed.). **Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology**, p. 65-90, 2019. DOI: 10.1002/9781119463665.ch4.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

ARÉVALO-HERNÁNDEZ, C.O. et al. Growth and nutritional responses of wild and domesticated cacao genotypes to soil cd stress. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 144021, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144021.

ARGOUT, X. et al. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, 43, 101–108, 2011. DOI: 10.1038/ng.736.

BANO, C.; AMIST, N; SINGH, N.B. Morphological and Anatomical Modifications of Plants for Environmental Stresses. In: ROYCHOUDHURY, A; TRIPATHI, D.K. (ed.). **Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology**. Wiley-Blackwell, ed.1, 2019.

BARAK, P.; HELMKE, P.A. The chemistry of zinc. In: ROBSON, A.D. (ed). Zinc in Soils and Plants. **Developments in Plant and Soil Sciences**. Springer, Dordrecht, p. 1-13, 1993. DOI: 10.1007/978-94-011-0878-2_1.

BARBOZA, M.E.S. et al. Scientometric Analysis of the Main Cocoa Diseases. **International Journal of Forestry and Wood Science**, v. 7, n. 2, p. 076-079, 2020.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 21-34, 2005. ISSN: 1677-0420.

BOZA, E.D. et al. Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: its impact and significance on global cacao improvement and production. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 139, n. 2, p. 219-229, 2014. DOI: 10.21273/JASHS.139.2.219.

BRADL, H.B. Sources and origins of heavy metals. In: **Interface Science and Technology**. Elsevier, p. 1-27, 2005. DOI: 10.1016/S1573-4285(05)80020-1.

BRAINER, M.S.D.C.P. Produção de cacau. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, **Caderno Setorial ETENE**, ano 6, n.149, 2021.

BROADLEY, M.R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x.

CAMPBELL, J.L. et al. Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) *Moench*) inducible by heat, dehydration, and ABA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1517, n. 2, p. 270-277, 2001. DOI: 10.1016/S0167-4781(00)00292-X.

CARDINI, A. et al. Transcriptional regulation of genes involved in zinc uptake, sequestration and redistribution following foliar zinc application to *Medicago sativa*. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 476, 2021. DOI: 10.3390/plants10030476.

CHENG, K. et al. Atmospheric emission inventory of cadmium from anthropogenic sources. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 605-616, 2014. DOI: 10.1007/s13762-013-0206-3.

DALCORSO, G. et al. Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3412, 2019. DOI: 10.3390/ijms20143412.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.

DESBROSSES-FONROUGE, A.G. et al. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. **FEBS Letters**, v. 579, n. 19, p. 4165-4174, 2005. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.046.

DINAKAR, N. et al. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 2, p. 199-206, 2008. DOI: 10.1016/j.flora.2008.03.004.

DZIUBANEK, G. et al. Contamination of food crops grown on soils with elevated heavy metals content. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 183-189, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.032.

EC European Commission. Commission Regulation (EU) N° 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) N° 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2014.

EFSA European Food Safety Authority. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. **EFSA Journal**, v. 9, n. 2, p. 1975, 2011. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.1975.

EID, E.M. et al. The effects of different sewage sludge amendment rates on the heavy metal bioaccumulation, growth and biomass of cucumbers (*Cucumis sativus* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16371-16382, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-9289-6.

FAIZAN, M. et al. Zinc oxide nanoparticles alleviates the adverse effects of cadmium stress on *Oryza sativa* via modulation of the photosynthesis and antioxidant defense system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, p. 112401, 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112401.

FIJAŁKOWSKI, K. et al. The influence of selected soil parameters on the mobility of heavy metals in soils**. Inżynieria i Ochrona środowiska**, v. 15, p. 81-92, 2012.

GAITHER, L.A.; EIDE, D.J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis**, p. 65-84, 2001. DOI: 10.1007/978-94-017-3728-9_5.

GAO, J. et al. Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. Plos One, v. 8, n. 6, p. e64643, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0064643.

GAO, Y. et al. Genome-wide identification of metal tolerance protein genes in *Populus trichocarpa* and their roles in response to various heavy metal stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1680, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051680.

GARCÍA DE LA TORRE, V.S. et al. Cadmium-Tolerant and-Sensitive Cultivars Identified by Screening of *Medicago truncatula* Germplasm Display Contrasting Responses to Cadmium Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 293, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.595001.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. DOI:10.1104/pp.59.2.309.

GOMES, M.P. et al. Modulation of *Dimorphandra wilsonii* Rizz. seed germination through H_2O_2 production in response to Zn interference of the mitochondrial electron transport chain. **Environmental and Experimental Botany**, v. 128, p. 51-58, 2016. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2016.04.003.

GONZÁLEZ, A.; LAPORTE, D.; MOENNE, A. Cadmium Accumulation Involves Synthesis of Glutathione and Phytochelatins, and Activation of CDPK, CaMK, CBLPK, and MAPK Signaling Pathways in *Ulva compressa.* **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.669096.

GRAMLICH, A. et al. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. **Science of The Total Environment**, v. 612, p. 370-378, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.145.

GUAN, Z.Q. et al. Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. **Chemosphere**, v. 76, n. 5, p. 623-630, 2009.DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.04.047.

HAFEEZ, B.M.K.Y.; KHANIF, Y.M.; SALEEM, M. Role of zinc in plant nutrition-a review. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 374-391, 2013. DOI: 10.9734/AJEA/2013/2746.

HALL, J.A.; WILLIAMS, L.E. Transition metal transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 393, p. 2601-2613, 2003. DOI: 10.1093/jxb/erg303.

HART, J.J. et al. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 1, p. 73-78, 2002. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160109.x.

HARTMAN, F.C.; HARPEL, M.R. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 197-232, 1994. DOI: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001213.

HASAN, M. K.et al. Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1492, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01492.

HASAN, M.K. et al. Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1492, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01492.

HASANUZZAMAN, M. et al. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 2, p. 249-268, 2017. DOI: 10.1007/s12298-017-0422-2.

HASHEM, H A. Cadmium toxicity induces lipid peroxidation and alters cytokinin content and antioxidant enzyme activities in soybean. **Botany**, v. 92, n. 1, p. 1-7, 2014. DOI:10.1139/cjb-2013-0164.

HASSAN, M.J. et al. Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, n. 2, p. 255-261, 2005. DOI: 10.1002/jpln.200420403.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987. DOI: 10.1104/pp.84.2.450.

HEYNO, E.; KLOSE, C.; KRIEGER-LISZKAY, A. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. **New Phytologist**, v. 179, n. 3, p. 687-699, 2008. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02512.x.

HUTTON, M. et al. Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment. **Nueva York: John Wiley and Sons** Ltd, p. 35-41, 1987.

HUTTON, M. Sources of cadmium in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 7, n. 1, p. 9-24, 1983. DOI: 10.1016/0147-6513(83)90044-1.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático Da Produção Agrícola. **Estatística Da Produção Agrícola**, 2019.

IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine,** v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001.

ISLAM, M.M. et al. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 15, p. 1587-1597, 2009. DOI: 10.1016/j.jplph.2009.04.002.

KACHINSKI, W.D.; VIDIGAL, J.C.B.; ÁVILA, F.W. Zinc in soil, plant and human health: a review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i7.3544.

KAR, M. Determination of the expression level of stress-related genes in *Cicer arietinum* root cell under Cd stress and the relationship to H_2O_2 concentrations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 8, p. 1087-1094, 2018. DOI: 10.1007/s10646-018-1961-1.

KAUR, G.; ASTHIR, B.J.B.P. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609-619, 2015. DOI: doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3.

KHAN, A. et al. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13772-13799, 2015. DOI: 10.1007/s11356-015-4881-0.

KHATUN, M.A. et al. Zinc deficiency tolerance in maize is associated with the up-regulation of Zn transporter genes and antioxidant activities. **Plant Biology**, v. 20, n. 4, p. 765-770, 2018. DOI: 10.1111/plb.12837.

KIM, S.-H.; JEON, H.-M. Chocolate choice motives and attitudes in foodservice market: Fine store product vs. manufactured product consumers. **Journal of Foodservice Business Research**, v. 23, n. 2, p. 149-168, 2019. DOI: 10.1080/15378020.2019.1706701.

KUMAR, P.; TEWARI, R.K.; SHARMA, P.N. Cadmium enhances generation of hydrogen peroxide and amplifies activities of catalase, peroxidases and superoxide dismutase in maize. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, n. 1, p. 72-80, 2008. DOI: 10.1111/j.1439-037X.2007.00285.x.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0.

LAMBERT, R.; GRANT, C; SAUVÉ, S. Cadmium and zinc in soil solution extracts following the application of phosphate fertilizers. **Science of The Total Environment**, v. 378, n. 3, p. 293-305, 2007. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.02.008.

LI, C. et al. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 28, n. 4, p. 380-394, 2019. DOI: 10.1080/15320383.2019.1592108.

LI, Z. et al. Overexpressing the *Sedum alfredii* Cu/Zn superoxide dismutase increased resistance to oxidative stress in transgenic Arabidopsis. Frontiers in **Plant Science**, v. 8, p. 1010, 2017. DOI: doi.org/10.3389/fpls.2017.01010.

LIU, R. et al. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins, positively involved in abscisic acid signalling, require a transcription repressor, WRKY40, to balance their function. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 18, p. 5443-5456, 2013. DOI: 10.1093/jxb/ert307.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

LOPES JÚNIOR, C.A. et al. Evaluation of proteome alterations induced by cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultures. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 119, p. 170-177, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.05.016.

LOU, Yanhong et al. Germination, physiological responses and gene expression of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) growing under Pb and Cd. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169495, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169495.

LUO, H. et al. Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 770-778, 2011. DOI: 10.1007/s10646-011-0628-y.

MADDELA, N.R. et al. Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy: A critical view. **Science of The Total Environment**, v. 720, p. 137645, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137645.

MAHMOOD, T. et al. An overview on the small heat shock proteins. African **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 927-939, 2010. DOI: 10.5897/AJB09.006.

MAHURPAWAR, M. Effects of heavy metals on human health. International **Journal of Research-Granthaalayah**, v. 3, n. 9SE, p. 1-7, 2015. DOI: 0.29121/granthaalayah.v3.i9SE.2015.3282.

MALAKOUTI, M.J. Zinc is a neglected element in the life cycle of plants. **Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2007.

MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, 2011.

MCLOUGHLIN, F. et al. Class I and II small heat shock proteins together with HSP101 protect protein translation factors during heat stress. **Plant Physiology**, v. 172, n. 2, p. 1221-1236, 2016. DOI: 10.1104/pp.16.00536.

MEHLHORN, H. et al. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. **FEBS Letters**, v. 378, n. 3, p. 203-206, 1996. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01448-9.

MERLINO, V.M. et al. Chocolate culture: Preferences, emotional implications and awareness of Italian consumers**. International Journal of Gastronomy and Food Science**, 2021. DOI: 10.1016/j.ijgfs.2021.100374.

METER, A.; ATKINSON, R.J.; LALIBERTE, B. Cadmium in Cacao From Latin America and The Caribbean. **A Review of Research and Potential Mitigation Solutions**. Caracas: CAF, 2019. ISBN: 978-980-422-163-7.

MIAO, L. et al. Genome-wide identification, characterization, interaction network and expression profile of GAPDH gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). **PeerJ**, v. 7, p. e7934, 2019. DOI: 10.7717/peerj.7934.

MISHRA, S. et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 25-37, 2006. DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.01.007.

MONTEIRO, W.R.; LOPES, U.V.; CLEMENT, D. Genetic improvement in cocoa. In: **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical species**. Springer, New York, NY, 2009. p. 589-626. DOI: 10.1007/978-0-387-71201-7_16.

MORROW, H. Cadmium and cadmium alloys. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, p. 1-36, 2010. DOI: 10.1002/0471238961.0301041303011818.a01.pub3.

MOUSAVI, S.R.; GALAVI, M.; REZAEI, M. Zinc (Zn) importance for crop production - a review. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, v. 4, n. 1, p. 64-68, 2013. ISSN : 2051-1914.

MÜLLER, M.W.; VALLE, R.R. Ecofisiologia do cultivo do cacaueiro. In: VALLE, R.R. (ed.). **Ciência Tecnologia e manejo do cacaueiro**. MAPA: CEPLAC Brasil, p. 31-66, 2012.

MURAKAMI, R. et al. Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins: PsbO1 and PsbO2. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 9, p. 2165-2175, 2005. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04636.x.

NACKE, H. et al. Availability of heavy metals (Cd, Pb, and Cr) in agriculture from commercial fertilizers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 4, p. 537-544, 2013. DOI: 10.1007/s00244-012-9867-z.

NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010. DOI: 10.1007/s10311-010-0297-8.

NAIR, K.P. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In: **Tree Crops**. Springer, Cham, p. 153-213, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-62140-7_5.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-262, 1988. DOI: 10.1002/elps.1150090603.

NIKOLIC, N. et al. Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 50, n. 2, p. 95-103, 2008.

NISHIDA, S.; MIZUNO, T.; OBATA, H. Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 5-6, p. 601-606, 2008. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.02.011.

OLIVEIRA, B.R.M; ALMEIDA, A.-A.F.; SANTOS, N.A.; PIROVANI, C.P. Tolerance strategies and factors that influence the cadmium uptake by cacao tree. **Scientia Horticulturae**, v. 293, 110733, 2022. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110733.

OTTER, V.; PRECHTEL, B.; THEUVSEN, L. Country of origin effect for food products from developing and transition countries: A pls analysis of german consumers' perception. **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, v. 30, n. 4, p. 355-381, 2018. DOI: 10.1080/08974438.2018.1449695.

PANDIT, T.K.; MUKHERJEE, D. Cadmium enrichment in soil: Plant physiological manifestation. **Molecular Physiology of Abiotic Stresses in Plant Productivity**, v. 141, 2018.

PARMAR, P.; KUMARI, N.; SHARMA, V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. **Botanical Studies**, v. 54, n. 1, p. 1-6, 2013. DOI: 10.1186/1999-3110-54-45.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 11, p. 534-540, 2004. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.09.002.

PIROVANI, CP. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2391-2401, 2008. DOI: 10.1002/elps.200700743.

PLAXTON, W.C. The organization and regulation of plant glycolysis. Annual review of Plant Biology, v. 47, n. 1, p. 185-214, 1996. DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.185.

PURBA, H.H. Quality Development of Products Based on Consumer Preferences: A Case Study of the Bread and Chocolate Cake Product.

International Journal of Industrial Engineering, v. 6, n. 2, p. 21-25, 2019. ISSN: 2349 – 9362.

QIN, S. et al. Toxicity of Cadmium and Its Competition with Mineral Nutrients for Uptake by Plants: A Review. **Pedosphere**, v. 30, p. 168-180, 2020. DOI: 10.1016/S1002-0160(20)60002-9.

QUAN, L.J. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 2-18, 2008. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x.

RAINES, C.A.; LLOYD, J.C.; DYER, T.A. New insights into the structure and function of sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase; an important but neglected Calvin cycle enzyme. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 330, p. 1-8, 1999. DOI: 10.1093/jxb/50.330.1.

RAPISARDA, V. et al. Cadmium exposure and prostate cancer: insights, mechanisms and perspectives. **Front Biosci** (Landmark Ed), v. 23, p. 1687-1700, 2018.

REHEM, B.C. et al. Photosynthesis, chloroplast ultrastructure, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the lethal gene Luteus-Pa mutant. **Photosynthetica**, v. 49, n. 1, p. 127-139, 2011. DOI: 10.1007/s11099-011-0021-3.

RIZWAN, M. et al. A critical review on the effects of zinc at toxic levels of cadmium in plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6279-6289, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-04174-6.

RODRÍGUEZ BOLAÑO, J.A.; MARÍN VÉLEZ, N.A.; VILLANUEVA-MEJÍA, D.F. Desarrollo de líneas de cacao (*Theobroma cacao* L.) editadas genéticamente que limiten la acumulación de cadmio en sus tejidos: FASE-I. **Universidad EAFIT**, Bachelor's thesis, 2020.

ROFNER, N.F. Review on Maximum Limits of Cadmium in Cocoa (*Theobroma Cacao* L.). **La Granja: Revista de Ciencias de La Vida**, v. 34, n. 02, 2021. DOI: 10.17163/lgr.n34.2021.08.

ROMERO-PUERTAS, M.C. et al. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 10, p. 1346-1357, 2007. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.06.018.

RUDANI, L.; VISHAL, P.; KALAVATI, P. The importance of zinc in plant growth-A review. **International Research Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 38-48, 2018.

SANDALIO, L.M. et al. Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity. In: ALFONSO DEL RÍO, A.; PUPPO, A. (ed.). **Reactive oxygen species**

in plant signaling. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 175-189, 2009. DOI: 10.1007/978-3-642-00390-5_11.

SANTOS, C.; MONTEIRO, M.; DIAS, M.C. Cadmium toxicity in crops: a review. **Environmental Science, Engineering and Technology**. Nova Publishers, Novinka, 2010. ISBN: 978-1617281693.

SANTOS, M.L.S.; ALMEIDA, A.-A.F.; SILVA, N.M.; OLIVEIRA, B.R.M.; SILVA, J. V.S.; SOUZA JUNIOR, J.O.; AHNERT, D.; BALIGAR, V.C. Mitigation of cadmium toxicity by zinc in juvenile cacao: Physiological, biochemical, molecular and micromorphological responses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 179, 104211, 2020. DOI:10.1016/j.envexpbot.2020.104201.

SARANGO BRAVO, C.I. Efecto de tres niveles de fertilización química en el cultivo de cacao *Theobroma cacao* L, variedad ramilla CCN 51, parroquia San Jacinto Del Búa – cantón Santo Domingo. Tesis Agrícola, **Universidad Nacional de Loja**, Ecuador, 2009.

SARWAR, N. et al. Effectiveness of zinc application to minimize cadmium toxicity and accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Environmental Earth Sciences**, v. 71, n. 4, p. 1663-1672, 2014. DOI: doi.org/10.1007/s12665-013-2570-1.

SCHAEFER, H.R.; DENNIS, S.; FITZPATRICK, S. Cadmium: Mitigation strategies to reduce dietary exposure. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 260-267, 2020. DOI: 10.1111/1750-3841.14997.

SHAHID, M. et al. Heavy metal stress and crop productivity. In: HAKEEM, K. (ed.). **Crop Production and Global Environmental Issues**, Springer, Cham, p. 1-25, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-23162-4_1.

SHEETAL, K.R. et al. Heavy metal accumulation and effects on growth, biomass and physiological processes in mustard. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 2, p. 219-223, 2016. DOI: 10.1007/s40502-016-0221-8.

SHEN, J.-R.; HENMI, T.; KAMIYA, N. Structure and function of photosystem II. In: FROMME, F. (Ed.). **Photosynthetic protein complexes: a structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verla Gmbh & Co, p. 83-101, 2008. DOI: 10.1002/9783527623464.

SHERENE, T. Mobility and transport of heavy metals in polluted soil environment. In: **Biological Forum - An International Journal**, p. 112-121, 2010. ISSN : 0975-1130.

SINGH, B.R.; MCLAUGHLIN, M.J. Cadmium in soils and plants. In: MCLAUGHLIN, M.J; SINGH, B.R. (ed.). Cadmium in Soils and Plants. **Developments in Plant and Soil Sciences**, Springer, Dordrecht, p. 257-267, 1999. DOI: 10.1007/978-94-011-4473-5_10.

SMITH, N.; WEI, W.; LEE, J. Cadmium transport in eukaryotes. In: Scott, R.A. **Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, p. 195, 2016.

SOLYMOSI, K.; BERTRAND, M. Heavy metals and plastid metabolism. **Handbook of Plant and Crop Stress**, p. 675-711, 2010.

SONG, Y.; JIN, L.; WANG, X. Cadmium absorption and transportation pathways in plants. International. **Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 2, p. 133-141, 2016. DOI: 10.1080/15226514.2016.1207598.

SOUGUIR, D. et al. Transcript accumulation of stress-related genes in *Vicia faba* roots under a short exposure to cadmium. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 149, n. 2, p. 280-288, 2015. DOI: 10.1080/11263504.2013.822432.

STURIKOVA, H. et al. Zinc, zinc nanoparticles and plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 349, p. 101-110, 2018. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.01.0.

SUBRAMANYAM, R. et al. Structural and functional changes of PSI-LHCI supercomplexes of *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown under high salt conditions. **Planta**, v. 231, n. 4, p. 913-922, 2010. DOI: 10.1007/s00425-009-1097-x.

SUGANYA, A.; SARAVANAN, A.; MANIVANNAN, N. Role of zinc nutrition for increasing zinc availability, uptake, yield, and quality of maize (*Zea mays* L.) grains: An overview. **Commun. Soil Sci. Plant Anal**, v. 51, n. 15, p. 2001-2021, 2020.

TAKAHASHI, R. et al. The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 11, p. 1948-1957, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02527.x.

TAKKAR, P.N.; WALKER, C.D. The Distribution and Correction of Zinc Deficiency. In: Robson, A.D. (ed.). Zinc in Soils and Plants. **Developments in Plant and Soil Sciences**, Springer, Dordrecht, p. 151-165, 1993. DOI: 10.1007/978-94-011-0878-2_11.

TALKE, I.N.; HANIKENNE, M.; KRÄMER, U. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Plant Physiology**, v. 142, n. 1, p. 148-167, 2006. DOI: 10.1104/pp.105.076232.

TANGAHU, B.V. et al. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/939161.

TRAINA, S.J. The Environmental Chemistry of Cadmium. In: MCLAUGHLIN, M.J; SINGH, B.R. (ed.). Cadmium in Soils and Plants. **Developments in Plant and**

Soil Sciences, Springer, Dordrecht, p. pp 11-37, 1999. DOI: 10.1007/978-94-011-4473-5_2.

TRAN, T.A.; POPOVA, L.P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2013. DOI: 10.3906/bot-1112-16.

TrendEconomy, **"Exports of commodity group 1801 - Cocoa beans, whole or broken, raw or roasted from Brazil"**, acessado em 14 de maio de 2021. Disponível em: https://trendeconomy.com/data/h2/Brazil/1801.

TSONEV, T.; CEBOLA LIDON, F.J. Zinc in plants - an overview. **Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)**, v. 24, n. 4, 2012.

ULLAH, I. et al. Evolution, and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from *Theobroma cacao* and their role in cadmium accumulation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

VAN DOORN, W.G.; KETSA, S. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. **Postharvest Biology and Technology**, v. 95, p. 64-69, 2014. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.04.002.

VANDERSCHUEREN, R. et al. Mitigating the level of cadmium in cacao products: reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. **Science of The Total Environment**, p. 146779, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146779.

VARMA, Suraj. Heavy metals stress and defense strategies in plants: An overview. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 10, n. 1, p. 608-614, 2021. E-ISSN: 2278-4136.

VASEGHI, M.-J. et al. The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. **Elife**, v. 7, p. e38194, 2018. DOI: 10.7554/eLife.38194.001.

VESCOVI, M. et al. Nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cadmium-stressed *Arabidopsis roots*. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 333-346, 2013. DOI: 10.1104/pp.113.215194.

VOORA, V.; BERMÚDEZ, S.; LARREA, C. Global Market Report: Cocoa. **International Institute for Sustainable Development**, 2019.

WANG, W. et al. Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 5, p. 465-480, 2016. DOI: 10.1134/S0006297916050047.

WANG, Y. et al. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 11, p. 1434-1443, 2004. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010.

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010. DOI: 10.1038/nprot.2009.197.

WHITE, M.R.; GARCIN, E.D. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure and function. **Macromolecular Protein Complexes**, p. 413-453, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-46503-6_15.

WIKLE, T.A. Chocolate and the Ugly Secret of Cacao Production on São Tomé Island. **Focus On Geography**, v. 64, p. 1-18, 2021. DOI: 10.21690/foge/2021.64.2f.

WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J. The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizers and their effect on the cadmium content of plants. **Soil Science**, v. 121, n. 2, p. 86-93, 1976. DOI: 10.1097/00010694-197602000-00004.

WONG, C.K.E.; COBBETT, C.S. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 181, n. 1, p. 71-78, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02638.x.

WU, F.; ZHANG, G. Alleviation of cadmium-toxicity by application of zinc and ascorbic acid in barley. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 12, p. 2745-2761, 2002. DOI: 10.1081/PLN-120015536.

XING, F. et al. Physiological changes and expression characteristics of ZIP family genes under zinc deficiency in navel orange (*Citrus sinensis*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 4, p. 803-811, 2016. DOI: 10.1016/S2095-3119(15)61276-X.

YANG, G-L. et al. Research on the Mechanisms of Plant Enrichment and Detoxification of Cadmium. **Biology**, v. 10, n. 6, p. 544, 2021. DOI: 10.3390/biology10060544.

YANG, X. et al. Cloning and functional identification of two members of the ZIP (Zrt, Irt-like protein) gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 2, p. 281-287, 2009. DOI: 10.1007/s11033-007-9177-0.

YANG, Y.; NAN, Z.; ZHAO, Z.. Bioaccumulation and translocation of cadmium in wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) from the polluted oasis soil of Northwestern China. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 26, n. 1, p. 43-51, 2014. DOI: 10.3184/095422914X13888342841789.

YOU, X. et al. Proteomic changes of Citrus roots in response to long-term manganese toxicity. **Trees**, v. 28, n. 5, p. 1383-1399, 2014. DOI: 10.1007/s00468-014-1042-x.

YUAN, Z. et al. Tracing anthropogenic cadmium emissions: from sources to pollution. **Science of The Total Environment**, v. 676, p. 87-96, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.250.

ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P.G..; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1527-1548, 2008. DOI: 10.1089/ars.2008.2046.

ZENG, Q. et al. Genotypic differences in growth and antioxidant enzyme activities under cadmium stress in sugarcane. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 5, p. 607-613, 2017. DOI: 10.1007/s00128-017-2185-4.

ZHANG, J. et al. A novel plasma membrane-based NRAMP transporter contributes to Cd and Zn hyperaccumulation in *Sedum alfredii* Hance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 176, p. 104121, 2020. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104121.

ZSIROS, O. et al. Similarities and differences in the effects of toxic concentrations of cadmium and chromium on the structure and functions of thylakoid membranes in *Chlorella variabilis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1006, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.01006.