

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Avaliação *in vivo* do potencial tóxico e genotóxico das lectinas ConA e
MuHL, do ponto quântico AgIn₅Se₈@ZnS-GSH e do bioconjugado
AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL**

ANTONIO MARCOS DE OLIVEIRA DOS SANTOS

Porto Alegre – RS
Março de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Avaliação *in vivo* do potencial tóxico e genotóxico das lectinas ConA e
MuHL, do ponto quântico AgIn₅Se₈@ZnS-GSH e do bioconjugado
AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL**

ANTONIO MARCOS DE OLIVEIRA DOS SANTOS

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Genética e Biologia Molecular**.

Orientadora: Dr^a Vera Lúcia da Silva Valente
Coorientadora: Dr^a Maríndia Deprá

Porto Alegre - RS
Março de 2024

Instituições e Fontes Financiadoras

A presente Tese de doutorado foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Campus de Vitória de Santo Antão.

Laboratório de Biologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri.

Laboratório de Biologia e Estrutura Molecular do Departamento do Centro de Ciências Agrárias e Biodiversidade da Universidade Regional do Cariri.

Laboratório de Eletrossíntese do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

Fontes financiadoras da presente Tese:

- O discente recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- As instituições governamentais que fomentaram a execução do projeto da presente Tese de Doutorado foram: CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

- Martin Luther King -

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Departamento de Genética pela oportunidade, ao CNPq pelo suporte financeiro durante o doutorado.

As Professoras Vera Lúcia da Silva Valente, minha orientadora, e a Maríndia Deprá, coorientadora, por terem guiado meu percurso acadêmico, abrindo novas perspectivas e enriquecendo meu conhecimento. Agradeço também por aceitarem o desafio desta tese, fornecendo valiosos ensinamentos, sugestões e demonstrando paciência ao longo desses anos.

Ao Elmo, secretário da Pós Graduação, pela presteza e gentileza.

Aos professores Claudener Souza Teixeira e Claudia Rohde que me acolheram durante o período de pandemia. Foram uma luz em meu caminho quando estava perdido e guiaram-me com sabedoria ao longo deste doutorado.

Aos colegas e amigos que trilharam estes caminhos comigo nos laboratórios em que estive, em especial a Danilo Silva que me ensinou pacientemente todas as técnicas de síntese de Quantum dot e se tornou um amigo que vou levar para o resto da vida; a Érima Amorim, que sempre deixava o ambiente mais leve, com empolgação e alegria e por várias vezes me acalmou, quando achava que nada iria dar certo; aos demais colegas Romério, Helena, Adrielle (Lab. Biologia estrutural e Molecular), Aleson, Samuel, Gislaine, Lizandra, Danubia, Thiago (Lab. Genética), Henrique, Ane e Vitor (lab. *Drosophila*) pelos ensinamentos, companheirismo, cafés, conversas e amizade, vocês ajudaram a deixar o caminho mais leve.

À minha família, meus irmãos, Élide e Junior, por estarem ao meu lado ao longo desta jornada. Minha mãe, Enedina, que sempre foi meu porto seguro, orientando-me com dedicação. Mesmo diante das adversidades impostas pela vida, ela sempre priorizou a educação dos filhos.

Encontrei nesta jornada meu outro porto seguro, chamado Livia, minha esposa. Agradeço a ela por me ensinar diariamente, por meio de suas atitudes, o verdadeiro significado de companheirismo, otimismo, respeito e paciência. Expresso minha gratidão pelo estímulo constante para me tornar uma pessoa melhor e por trazer tranquilidade nos momentos de ansiedade. Saiba que reconheço cada gesto seu e sou imensamente grato por tê-la em minha vida.

Por fim, expresso minha gratidão a todos que, de alguma maneira, colaboraram para a concretização deste trabalho, e peço desculpas àqueles que não foram mencionados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
LISTA DE QUADROS	10
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Lectinas	13
1.1.2 Características estruturais e classificação de lectinas de plantas	14
1.2 Lectinas vegetais	17
1.2.1 Lectinas de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	18
1.2.2 Lectinas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (MuHL)	20
1.3 Atividades biológicas e aplicações biotecnológicas de lectinas.....	21
1.4 Pontos Quânticos (PQ)	22
1.4.1 Aplicação biológicas dos PQs e toxicidade	26
1.5 <i>Drosophila melanogaster</i>	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral:.....	31
2.2 Específicos:	31
3. RESULTADOS.....	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 1 – Artigo - <i>Canavalia ensiformis</i> lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in <i>Drosophila melanogaster</i>	45
CAPÍTULO 2 – Manuscrito – Evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure of <i>Drosophila melanogaster</i> to the AgIn ₅ Se ₈ @ZnS-GSH nanoparticle ..	57
CAPÍTULO 3 – Manuscrito – AgIn ₅ Se ₈ @ZnS quantum dots conjugated with <i>Myracrodruon urundeuva</i> (MuHL) lectins as a potential fluorescent nano-tool for glycobiological studies in <i>Drosophila melanogaster</i>	58
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

BC	Banda de condução
BmoLL	<i>Bauhinia monandra</i>
BV	Banda de Valência
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
ConA	Concanavalina A
Cramoll	<i>Cratylia mollis</i>
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidrato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e-	Elétrons
Eg	Energia de band-gap
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ga	Gálio
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetilgalactosamina
Glc	Glicose
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GSH	Glutationa
h+	Prótons
Hg	Mercúrio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HL60	Leucemia pró-mielocítica humana – linhagem HL-60
In	Índio
kDa	Kilodaltons
Man	Manose
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
Mg	Magnésio

MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
MuHL	<i>Myracrodruon urundeuva</i>
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
NP	Nanopartículas
Pb	Chumbo
pH	Potencial de hidrogênio
PPL	<i>Parkia platycephala</i>
PQs	Pontos quânticos
QDs	Quantum dots
S	Enxofre
Se	Selênio
SejaBL	<i>Sebastiania jacobinensis</i>
SMART	Teste da recombinação e mutação somática
Sn	Estanho
Te	Telúrio
TGL	<i>Tulipa gesneriana</i> L.
WSMoL	Lectina de <i>Moringa oleifera</i> solúvel em água
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de zinco

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Famílias de lectinas vegetais classificadas de acordo com a similaridade de sequência, conservação do DRC e relações evolutivas.....16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação estrutural das lectinas de plantas.....15

Figura 2. Planta *Canavalia ensiformis*: Folhas, vagens e sementes.....19

Figura 3. Planta Inteira da *Myracrodruon urundeuva*.....20

Figura 4. Representação da estrutura de bandas de valência e banda de condução, da energia de bandgap (E_g) e do éxciton (par elétron-buraco), onde e^- representa o elétron e h^+ representa o buraco24

Figura 5. Alterações no comportamento óptico dos pontos quânticos associadas ao seu tamanho.....25

Figura 6. Organização corporal homóloga entre *Drosophila melanogaster* e seres humanos: comparando a similaridade organizacional e funcional entre ambas as espécies.....29

RESUMO

As lectinas, uma classe versátil de proteínas com diversas atividades biológicas, têm sido cada vez mais exploradas em aplicações biomédicas e biotecnológicas. Uma tendência crescente é a sua associação com pontos quânticos - PQs (nanopartículas fluorescentes) para criar nanossondas fluorescentes, visando compreender a glicobiologia relacionada a processos normais e patológicos. Essa abordagem promissora expande as fronteiras da pesquisa e aplicação dessas proteínas em diversas áreas. No entanto, é crucial avaliar a segurança *in vivo* dessas partículas. Neste estudo, objetivou-se desenvolver um nanossistema fluorescente através da bioconjugação por adsorção da lectina de *Myracrodruon urundeuva* (MuHL) com o PQ AgIn₅Se₈@ZnS-GSH (AlSe@ZnS), além de avaliar o perfil tóxico e genotóxico *in vivo* das lectinas MuHL e *Canavalia ensiformes* (ConA), do PQ AlSe@ZnS e do bioconjugado (AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL). Os resultados demonstraram que o sistema AlSe@ZnS-MuHL manteve suas propriedades ópticas e funcionais, além de apresentar alta estabilidade coloidal. Entretanto, a avaliação feita em *Drosophila melanogaster* revelou que as formas nativas das lectinas ConA e MuHL impactaram a sobrevivência, locomoção, viabilidade celular, induzindo estresse oxidativo e danos ao DNA, enquanto formas bloqueadas e desnaturadas não mostraram esses efeitos. Esses resultados sugerem a participação do seu domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) nesses efeitos. Por outro lado, o PQ AlSe@ZnS não demonstrou toxicidade, estresse oxidativo ou danos ao DNA. No entanto, o bioconjugado AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL mostrou ser tóxico e genotóxico, provavelmente devido à interação entre o DRC da MuHL e os resíduos de carboidratos na superfície celular. Em conclusão, enquanto os pontos quânticos por si só parecem ser seguros, sua bioconjugação com a lectina MuHL pode induzir efeitos tóxicos, provavelmente devido ao DRC da lectina. Assim, o bioconjugado PQ-lectina mostra um potencial promissor como sonda fluorescente, auxiliando na compreensão de processos biológicos desencadeados por lectinas.

Palavras-chave: Pontos quânticos, lectinas, genotoxicidade, toxicidade, *Drosophilas*.

ABSTRACT

Lectins, a versatile class of proteins with diverse biological activities, have been increasingly explored in biomedical and biotechnological applications. A growing trend is their association with quantum dots - QDs (fluorescent nanoparticles) to create fluorescent nanoprobess, with the aim of understanding glycobiology related to normal and pathological processes. This promising approach expands the frontiers of research and application of these proteins in various areas. However, it is crucial to evaluate the *in vivo* safety of these particles. In this study, we aimed to develop a fluorescent nanosystem through the bioconjugation by adsorption of *Myracrodruon urundeuva* lectin (MuHL) with the QD AgIn₅Se₈@ZnS-GSH (AlSe@ZnS) nanoparticles, in addition to evaluating the toxic and genotoxic profile *in vivo* of the lectins MuHL and *Canavalia ensiformes* (ConA), the QD AlSe@ZnS and the bioconjugate (AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL). The results showed that the AlSe@ZnS-MuHL system maintained its optical and functional properties, as well as having high colloidal stability. However, evaluation in *Drosophila melanogaster* revealed that the native forms of the ConA and MuHL lectins impacted survival, locomotion, cell viability, inducing oxidative stress and DNA damage, while blocked and denatured forms did not show these effects. These results suggest the involvement of its carbohydrate recognition domain (CRD) in these effects. On the other hand, QD AlSe@ZnS showed no toxicity, oxidative stress or DNA damage. However, the AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL bioconjugate was shown to be toxic and genotoxic, probably due to the interaction between MuHL's DRC and carbohydrate residues on the cell surface. In conclusion, while quantum dots by themselves appear to be safe, their bioconjugation with the lectin MuHL can induce toxic effects, probably due to the lectin's DRC. Thus, the QD-lectin bioconjugate shows promising potential as a fluorescent probe, aiding in the understanding of biological processes triggered by lectins.

Keywords: Quantum dots, lectins, bioconjugation, genotoxicity, toxicity, *Drosophilas*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

Lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imune, caracterizadas pela presença de pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar de maneira específica e reversível a um mono ou oligossacarídeo, assim como a glicoconjugados (Peumans; Van Damme, 1995; Van Holle; Van Damme, 2018). Essas proteínas já foram nomeadas de aglutininas ou hemaglutininas devido à sua capacidade de aglutinar células sanguíneas vermelhas. No entanto, as lectinas monoméricas não demonstram atividade aglutinante, tornando essa propriedade relevante apenas quando a especificidade é desconhecida, não sendo, portanto, um critério essencial para classificar uma proteína como lectina (Lagarda-Diaz; Guzman-Partida; Vazquez-Moreno, 2017; Macedo; Oliveira; Oliveira, 2015).

A maioria das lectinas são di ou polivalentes, permitindo-lhes interagir com carboidratos ou glicoproteínas em solução, fluidos fisiológicos ou que estejam conectados ao envoltório celular (Peumans *et al.*, 2001). Essa capacidade possibilita a detecção da presença de lectinas em uma amostra através de ensaios de aglutinação, nos quais as lectinas formam múltiplas ligações reversíveis por meio de seus sítios de ligação ao interagir com as células. O teste de hemaglutinação é frequentemente utilizado para evidenciar essa capacidade aglutinante, utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais (Naithani *et al.*, 2021).

Embora as lectinas tenham sido primeiramente identificadas em plantas, sabe-se, hoje, que estão amplamente distribuídas na natureza, incluindo vertebrados, invertebrados, microrganismos, vírus e frequentemente na superfície das células ou intracelular. São capazes de interagir com glico-componentes específicos de fluidos biológicos e que se projetam para fora das membranas celulares, atuando como moléculas de reconhecimento e decodificação da informação biológica que é apresentada sob a forma de glicoconjugados (Ingale; Hivrale, 2013; Ribeiro; Catarino; Ferreira, 2012; Sharon; Lis, 2004). A variabilidade de glicanos da superfície celular permite que eles funcionem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão. A

interação entre as lectinas e os glicanos presentes na superfície celular desempenha um papel de suma importância em inúmeros processos biológicos. Por exemplo, elas podem se ligar a receptores de membrana, desencadeando a ativação de linfócitos, além de promover o estímulo ao crescimento e à proliferação celular (Sharon; Lis, 2004; Silva *et al.*, 2012).

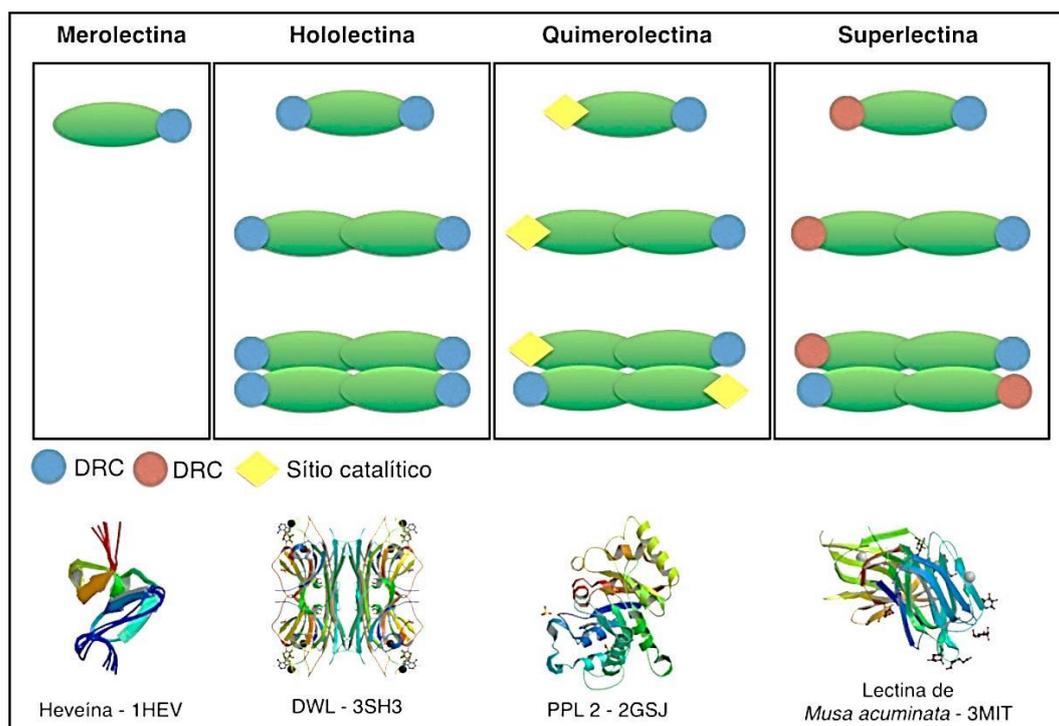
1.1.2 Características estruturais e classificação de lectinas de plantas

Estruturalmente as lectinas são proteínas com alta diversidade e especificidade para diferentes carboidratos. O aspecto comum entre lectinas é a presença de, pelo menos, um sítio específico de ligação a carboidrato, denominado domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) (Naithani *et al.*, 2021).

A capacidade das lectinas de se ligarem a carboidratos é determinada por suas estruturas tridimensionais, que exibem uma sequência altamente conservada de aminoácidos. Esta estrutura contém um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), naturalmente não catalítico, composto por sítios de ligação hidrofóbicos e íons metálicos que amplificam a afinidade e especificidade da ligação. Esses elementos posicionam os resíduos de aminoácidos de maneira específica dentro do DRC, preservando a integridade da subunidade (Chettri *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2019). Além disso, a interação entre a lectina e o carboidrato no DRC acontece através de pontes de hidrogênio, impulsionadas pela presença abundante de grupos hidroxila nos açúcares, que atuam como doadores ou receptores de hidrogênio. Adicionalmente, as interações hidrofóbicas e as forças de Van Der Waals também contribuem para essa interação lectina-carboidrato (Martínez-Alarcón; Blanco-Labra; García-Gasca, 2018).

Baseado na organização estrutural e número de domínios de reconhecimento a carboidratos, as lectinas vegetais são divididas em quatro classes: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Mazalovska; Kouokam, 2020; Peumans; Van Damme, 1995; Van Damme *et al.*, 1998). A Figura 1 ilustra as classes e estrutura de cada lectina.

Figura 1. Classificação estrutural das lectinas de plantas.



Fonte: Osterne (2016). Imagem adaptada de Van Damme *et al.* (1998). DRC: Domínio de Reconhecimento a Carboidratos.

1. **Merolectinas:** Apresentam apenas um domínio de reconhecimento a carboidratos na sua estrutura. Devido sua natureza monovalente, esse grupo de lectinas são incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados; um exemplo é a heveína, obtida a partir do látex de *Hevea brasiliensis* (Tsaneva; Van Damme, 2020; Van Damme *et al.*, 1998).
2. **Hololectinas:** Apresentam dois ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos idênticos ou com alto grau de homologia e se ligam aos mesmos carboidratos ou a carboidratos estruturalmente similares. Estas lectinas têm a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados (Tsaneva; Van Damme, 2020); Exemplos dessa classe é a Concanavalina A (ConA), obtida de sementes de *Canavalia ensiformis* (Van Damme *et al.*, 1998).
3. **Quimerolectinas:** São lectinas com um ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos e um outro com atividade biológica distinta (ex: atividade catalítica), cuja ação é independente dos DRCs (Macedo; Oliveira; Oliveira, 2015; Van Damme *et al.*, 1998). A ricina e a PPL, obtidas respectivamente de sementes de *Ricinus communis* L. e *Parkia*

platycephala exemplificam este grupo de lectinas (Cavada *et al.*, 2006; Van Damme *et al.*, 1998).

4. **Superlectinas:** Este grupo de lectinas apresenta pelo menos dois domínios de reconhecimento a carboidratos, como as hololectinas, porém reconhecem carboidratos estruturalmente e funcionalmente diferentes. Exemplo dessa classe é a lectina TGL da *Tulipa gesneriana* L., com um domínio de ligação a manose e outro para N-acetil-D-galactosamina (Tsaneva; Van Damme, 2020; Van Damme *et al.*, 1998).

Um método alternativo de classificação de lectinas está associado à sua especificidade por carboidratos, como os ligantes para manose, manose/glicose, GlcNAc, manose/maltose, galactose/GalNAc e as lectinas específicas para fucose. Embora esse sistema de classificação seja valioso na escolha de lectinas para aplicações específicas, ele é considerado artificial e não oferece informações relevantes sobre das relações moleculares e taxonômicas entre as espécies de plantas (Van Damme *et al.*, 1998; Van Damme, 2014).

O sistema de classificação mais recente, que demonstrou ser útil para lectinas de plantas, leva em conta dados de análises complexas do genoma e transcriptoma de plantas. Esse método organiza essas lectinas em 12 famílias com base na similaridade das sequências de seus polipeptídios, na conservação da estrutura de seus DRC e sobre as relações evolutivas. A representação dessas famílias pode ser observada no Quadro 1 (Macedo; Oliveira; Oliveira, 2015; Tsaneva; Van Damme, 2020; Van Damme, 2014).

Quadro 1 – Famílias de lectinas vegetais classificadas de acordo com a similaridade de sequência, conservação do DRC e relações evolutivas.

Família de lectinas	Especificidade
<i>Agaricus bisporus</i>	Antígeno T, N-glicanos
Amarantina	Antígeno T, GalNAc
Quitinase	N-glicanos, Manose específico

Cianovirina	N-glicanos, Manose específico
<i>Euonymus europaeus</i>	Galactosídeos, N-glicanos, manose específico
<i>Galanthus nivalis</i>	Subgrupos manose, N-glicanos específicos
Heveína	GlcNAc e (GlcNAc) n
Jacalina	Subgrupos manose, Subgrupos galactose específicos
Leguminosa	Man/Glc, Gal/GalNAc, (GlcNAc) n, fucose, Gal/GalNAc-sializado N -glicanos específicos
LysM	(GlcNAc)n
<i>Nicotiana tabacum</i>	(GlcNAc)n, Manose específico, N-glicanos específicos
Ricina-B	Gal/GalNAc, Gal/GalNAc-sializado

Fonte: Adaptado de Van Damme (2014).

1.2 Lectinas vegetais

A maioria das lectinas isoladas e identificadas são de origem vegetal, formando um conjunto diverso de proteínas que variam em suas origens, evolução, propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, função, especificidade para moléculas e atividades biológicas (Van Damme, 2014; Van DAMme et al., 2004). Devido à facilidade relativa de purificação, à especificidade por carboidratos e à conservação de suas sequências, as lectinas de plantas são frequentemente selecionadas para estudos moleculares (Cavada et al., 2001; Loris et al., 1998; Nascimento et al., 2020).

As lectinas estão amplamente distribuídas em todos os tecidos vegetais, com sua maior concentração sendo identificada nos tecidos ou órgãos de

reserva, como as sementes (Ingale; Hivrale, 2013). Devido a essa abundância, as sementes se destacam como fonte primária para a extração e purificação de lectinas em maior quantidade (Vandenborre; Smagghe; Van Damme, 2011). No entanto, pesquisas realizadas nas últimas décadas evidenciam que outros tecidos da planta vêm sendo reconhecidos como fontes promissoras para a extração de lectinas, incluindo: cascas (Araújo *et al.*, 2012), cerne (Alves *et al.*, 2019), flores (Pontual *et al.*, 2012), folhas (Silva *et al.*, 2021), frutos (Wang; Ng, 2006; Benito *et al.*, 1998; Peumans *et al.*, 1998), raízes (Souza *et al.*, 2011), tubérculos (Cheung *et al.*, 2018), bulbos (Bertrand *et al.*, 1998; Parisi *et al.*, 2008), rizomas (Santana *et al.*, 2012), coleóptilos (Martinez; Cordoba, 2000), cotilédones (Oliveira *et al.*, 2002; Gupta; Srivastava, 1998; Nomura *et al.*, 1998), e no látex de algumas espécies (Seshagirirao; Prasad, 1995; Stirpe *et al.*, 1993).

Nas plantas, as lectinas desempenham múltiplas funções essenciais, estando intimamente envolvidas em processos como a germinação, o armazenamento e o transporte de carboidratos em sementes (Pereira; Silva, 2019). Além disso, exercem funções estruturais, reguladoras e enzimáticas, contribuindo para o desenvolvimento e regulação do metabolismo. Essas proteínas também desempenham um importante papel na proteção contra patógenos parasitas, como vírus, fungos e bactérias (Chen *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020b; Silva *et al.*, 2019) e na defesa das plantas contra insetos nocivos (Tsaneva; Van Damme, 2020).

1.2.1 Lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA)

A lectina Concanavalina-A (ConA) é obtida das sementes da planta *Canavalia ensiformis*, também conhecida como feijão-de-porco, pertence à família Leguminosae e à tribo Phaseolae, sendo uma planta nativa das regiões tropicais e subtropicais das Américas (Figura 2). Essa lectina apresenta uma afinidade específica com D-glicose/D-manose (Cavalcanti *et al.*, 2018). Em 1919, a ConA foi a primeira lectina a ser purificada e, posteriormente, teve sua sequência de aminoácidos determinada, mantendo-se até hoje como a mais bem caracterizada entre as lectinas derivadas de leguminosas (Cavada *et al.*, 2019).

Essa lectina é composta por estruturas multiméricas formadas por monômeros de 25,5 KDa e exibe um equilíbrio característico entre dímeros e tetrâmeros que é dependente do pH. As ConA são metaloproteínas que

necessitam de íons divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para desempenhar suas atividades biológicas, isto é, para manter a conformação adequada, o que favorece a exposição correta dos sítios de reconhecimento de carboidratos. Adicionalmente, cada subunidade contém sítios de ligação para íons Ca^{2+} e Mn^{2+} e possui uma cavidade hidrofóbica que interage com ligantes hidrofóbicos, como fitormônios (Cavada *et al.*, 2001).

Figura 2 - Planta *Canavalia ensiformis*: Folhas, vagens e sementes.



Fonte: <http://nossacasa.net/nossosriachos/agroecologia/feijao-de-porco/>

A facilidade relativa na obtenção da ConA e sua capacidade de interagir com diversos carboidratos possibilitam inúmeros estudos sobre suas atividades biológicas em células de diversos organismos (Cavada *et al.*, 2001; Mazalovska; Kouokam, 2020). As aplicações da ConA abrangem desde o isolamento de glicoproteínas por cromatografia de afinidade até a marcação de estruturas de membrana em células normais e tumorais. Ela é utilizada no estudo da glicosilação em células transformadas, exerce atividade mitogênica em linfócitos, induzindo a proliferação de linfócitos T, além de possuir efeitos vasoativos, relaxando aorta pré-contraída de coelho com fenilefrina. Além disso, demonstra efeitos antiproliferativos e antitumorais em diversos tipos de células cancerígenas, envolvendo mecanismos como autofagia, apoptose, antiangiogênese e imunomodulação (Cavada *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2011; Mazalovska; Kouokam, 2020).

1.2.2 Lectinas de *Myracrodruon urundeuva* (MuHL)

Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae) é uma planta nativa da América do Sul, amplamente distribuída no Brasil, conhecida popularmente como “aroeira-do-sertão” (Figura 3). Do cerne da planta é isolada uma lectina denominada MuHL (do inglês *M. urundeuva* heartwood lectin) composta por uma única cadeia polipeptídica e massa molecular 14,4 KDa. Essa proteína reconhece N-acetilglicosamina e liga-se a quitina (Alves *et al.*, 2019; Napoleão *et al.*, 2012; Sá *et al.*, 2009).

Figura 3 - Planta Inteira da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: <https://faunafloraextincao.blogspot.com/2019/11/aroeira.html>.

As propriedades biológicas documentadas para as lectinas de *M. urundeuva* incluem seu papel como agente inseticida contra *Aedes aegypti* e *Nasutitermes corniger* (Napoleão *et al.*, 2011, 2012; Sá *et al.*, 2008, 2009). Além disso, demonstrou atividade antifúngica contra cepas fitopatogênicas de *Fusarium* e ação antibacteriana contra espécies patogênicas para humanos, como *Corynebacterium callunae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*

(Moura *et al.*, 2021; Sá *et al.*, 2009). Recentemente, Videres *et al.* (2023) relataram também a atividade citotóxica da MuHL em linhagens celulares de câncer, especificamente HL60 (leucemia pró-mielocítica), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Os autores afirmaram que a MuHL apresentou baixa citotoxicidade e não demonstrou genotoxicidade nos linfócitos.

1.3 Atividades biológicas e aplicações biotecnológicas de lectinas

As lectinas vêm despertando interesse de pesquisadores devido seu potencial de ligar-se a carboidratos e/ou glicoconjugados, tornando-as capazes de aglutinar células e precipitar carboidratos multivalentes. Além disso, são proteínas oligoméricas, podendo formar dímeros ou tetrâmeros e apresentam múltiplos sítios de ligação a carboidratos (Loris *et al.*, 1998). As lectinas são marcadores únicos de reconhecimento celular para carboidratos. Em um modelo que se assemelha ao mecanismo "chave e fechadura" de Fischer, elas desempenham o papel de chave mestra no código dos açúcares, ou seja, são o "conjunto de chaves" para o código glicídico. Enquanto os açúcares são portadores da informação biológica, as lectinas possuem a capacidade de decifrar esse código, tornando-se verdadeiros "decifradores" (Gemeiner *et al.*, 2009).

Devido às suas diversas propriedades biológicas, as lectinas vêm se mostrando uma preciosa ferramenta nas pesquisas bioquímicas e biomédicas devido a sua estabilidade química, fácil utilização e sua alta especificidade no reconhecimento de carboidratos distintos, associada a grande disponibilidade na natureza, sendo otimizadas em diversas aplicações biomédicas e biotecnológicas. Por exemplo, têm sido empregadas como ferramentas para investigar infecções microbianas e monitorar sua patogenicidade, além de serem utilizadas no diagnóstico e prognóstico de células cancerígenas, bem como em sondas histoquímicas para diferenciar tecidos (Cunha *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021). Outras atividades das lectinas incluem ação antiviral, especialmente notável em síndromes respiratórias agudas do coronavírus (SARS-CoV) (Keyaerts *et al.*, 2007; Llivisaca-Contreras *et al.*, 2021), efeitos antiproliferativos e citotóxicos em diversas células tumorais, ativando mecanismos de morte celular por meio da redução do potencial de membrana mitocondrial e produção

de espécies reativas de oxigênio (Andrade Luz *et al.*, 2017; Faheina-Martins *et al.*, 2012; Naik; Kumar, 2020). Estudos também indicaram baixa toxicidade e genotoxicidade das lectinas de *Sebastiania jacobinensis* (SejaBL) e da folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL) em bactérias e fungos (Sisenando *et al.*, 2009; Vaz *et al.*, 2010).

De acordo com Gemeiner *et al.* (2009), para aprimorar a eficiência e versatilidade na análise do perfil de glicanos associados às lectinas, é essencial explorar o potencial dessas proteínas como biomarcadores. Estudos realizados nas últimas décadas têm evidenciado o emprego das lectinas na criação de nanossondas, por meio de sua bioconjugação com nanopartículas (Cunha *et al.*, 2018; Pessoa *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2010). Neste sentido, lectinas conjugadas a pontos quânticos, do inglês quantum dot – QD, têm sido utilizadas como ferramentas para investigar os mecanismos envolvidos nas atividades biológicas destas proteínas (Alves *et al.*, 2019, 2022). Esse bioconjugado representa uma ferramenta valiosa para a identificação e caracterização de estruturas ricas em carboidratos, tais como células e tecidos, além de possibilitar a análise dos glicofenótipos presentes na superfície de células cancerígenas, fúngicas e na membrana peritrófica de insetos (Arruda *et al.*, 2020; Pessoa *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2021).

Neste contexto, muitos estudos utilizando lectinas têm sido realizados nas últimas décadas para compreender a glicobiologia relacionadas a processos normais e patológicos (Lima *et al.*, 2022). Os exemplos compreendem conjugados de QDs com (I) ConA (Concanavalina A) para detectar a glicose com base nas alterações da fluorescência (Wang *et al.*, 2010); (II) ConA para marcar a superfície celular e biofilme de *Candida albicans* (Tenório *et al.*, 2015); (III) Cramoll (*Cratylia mollis*) para avaliar o perfil de glicose/manose na superfície celular de *Aeromonas* spp. (Pessoa *et al.*, 2023); (IV) WSMoL (lectina de *Moringa oleifera* solúvel em água) para avaliar a interação desta lectina com a matriz peritrófica e o lúmen de *A. aegypti* (Arruda *et al.*, 2020); Cramoll (Cramoll 1,4) para elucidar o perfil glicose/manose em tecidos mamários normais, benignos e malignos (Carvalho *et al.*, 2019).

1.4 Pontos Quânticos (PQ)

A manipulação de materiais em escala atômica e molecular, associada à nanotecnologia, teve suas origens com Richard Feynman em 1959. Desde então, os avanços nessa área têm sido notáveis. A nanotecnologia consiste no estudo e na aplicação de materiais que se encontram na escala nanométrica (10^{-9} m) (Bayda *et al.*, 2019). Entre os materiais nanométricos, destacam-se os pontos quânticos (PQs) ou “quantum dots - QDs”, do inglês, que são nanocristais semicondutores coloidais, com diâmetros variando de 1 a 10 nm, formados, principalmente, por elementos dos grupos periódicos II-VI (CdTe, CdSe, CdS, ZnSe, ZnS, PbS, PbSe e SnTe) e dos grupos III-V, como In e Ga (Ben Daly *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2022). Devido a essa escala nanométrica, esses semicondutores encontram-se em regime de confinamento quântico em três dimensões, o que resulta em propriedades ópticas dependentes do tamanho do nanocristal, as quais diferem das propriedades observadas nos mesmos cristais de escala macroscópica (Silva *et al.*, 2010; Wang; Chen, 2011).

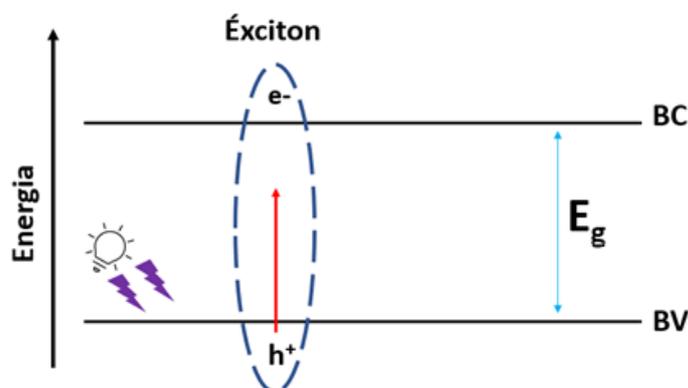
Os PQs podem ser obtidos por meio de duas abordagens principais. A primeira, conhecida como “bottom-up”, é mais familiar aos químicos. Nesse processo, precursores moleculares ou iônicos de PQs reagem em solução, dando origem a nanocristais que se comportam como coloides. A segunda abordagem, denominada “top-down”, é mais comum entre os engenheiros e envolve a redução das dimensões de um material pré-existente (ablação) por meio de técnicas eletroquímicas a partir de um substrato semicondutor. Além disso, recentemente, uma terceira classe, conhecida como “rota híbrida”, foi proposta como alternativa para a síntese de PQs. Nessa abordagem híbrida, precursores moleculares para PQs são produzidos e, posteriormente, reagem na fase gasosa, resultando em filmes finos depositados em substratos. Até o momento, a rota coloidal se estabeleceu como o método mais popular para a síntese de PQs, especialmente quando se trata de bioaplicações, em que exclusivamente nanocristais coloidais são utilizados (Mansur, 2010; Silva *et al.*, 2010).

Similar ao que ocorre com os semicondutores em escala macroscópica, os PQs têm suas propriedades eletrônicas descritas de forma simplificada pela teoria de bandas. A banda de valência (BV) é composta por orbitais ligantes de menor energia completamente ocupados, enquanto a banda de condução (BC) é formada por orbitais antiligantes, geralmente desocupados. A diferença de

energia entre essas duas bandas é referida como bandgap (intervalo de energia proibido - E_g), que representa a energia mínima necessária para que um elétron faça a transição da BV para a BC e que varia de acordo com o tamanho do nanocristal, como observado por Smith *et al.* (2004).

Em condições específicas, como o aumento da temperatura, tensão elétrica ou a absorção de um fóton com energia superior a E_g , os elétrons da BV podem ser impulsionados para a BC, resultando na formação de um par elétron-buraco, conhecido como éxciton (Figura 4). Esse éxciton representa um estado ligado entre um elétron e um buraco devido à atração Coulombiana. O éxciton assim gerado possui uma vida útil de alguns nanossegundos, e o processo de retorno de energia para a BV é denominado de recombinação excitônica (Mansur, 2010; Smith; Gao; Nie, 2004).

Figura 4 - Representação da estrutura de bandas de valência e banda de condução, da energia de band-gap (E_g) e do éxciton (par elétron-buraco), onde e^- representa o elétron e h^+ , representada o buraco.



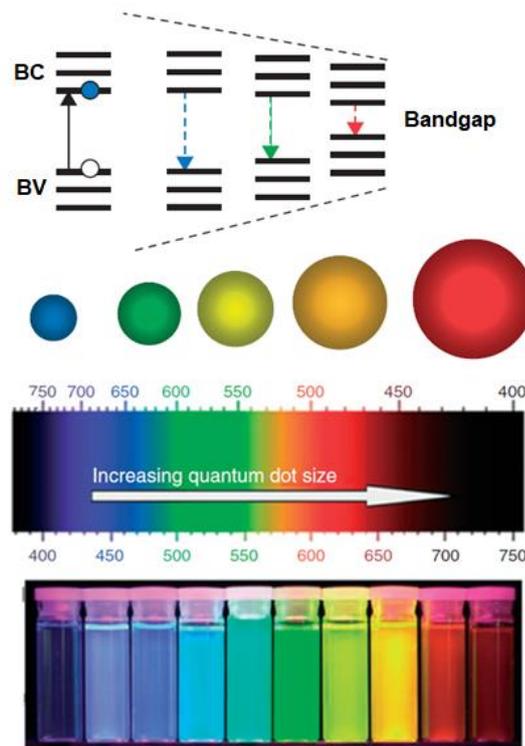
Fonte: Silva (2023).

De forma geral, quando o tamanho físico do semicondutor é reduzido abaixo do Raio de Bohr do éxciton - a distância média entre o elétron e o buraco - ocorre o efeito denominado confinamento quântico. Isso acontece porque a natureza quântica do éxciton é exposta à escala do cristal. Esse confinamento resulta em um aumento na energia entre a banda de valência e a banda de condução dos materiais, à medida que o tamanho diminui. Em outras palavras, quanto menor o material, maior o confinamento dos portadores de carga e, conseqüentemente, maior a sua energia de banda proibida. Isso implica que a

absorção e emissão ópticas dos materiais são fortemente influenciadas por seus tamanhos (Santos *et al.*, 2020a).

O tamanho das partículas de pontos quânticos desempenha um papel fundamental na determinação de muitas de suas propriedades, em particular o comprimento de onda da emissão de fluorescência. Em resumo, quanto menor for o tamanho da partícula, maior será a diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução, resultando em um bandgap mais elevado. Como resultado, partículas menores tendem a emitir luz na região de comprimento de onda próxima ao azul. Por outro lado, partículas maiores apresentam um bandgap de menor energia e, conseqüentemente, emitem luz na região de comprimento de onda próxima ao vermelho (Figura 5) (Smith; Gao; Nie, 2004). Portanto, a alteração da composição química, dimensões e estrutura desses nanocristais pode influenciar suas propriedades ópticas, tornando possível a produção de PQs em uma ampla diversidade de cores (Bilan; Nabiev; Sukhanova, 2016; Mansur, 2010).

Figura 5. Alterações no comportamento óptico dos pontos quânticos associadas ao seu tamanho.



Adaptado de Mansur, (2010).

Comparados aos corantes orgânicos e proteínas fluorescentes utilizados em técnicas de marcação celular e diagnóstico, os PQs exibem propriedades fluorescentes que os destacam como vantajosos para aplicações biológicas. Os PQs podem ser ajustados de maneira contínua e precisa para emitir luz em uma ampla faixa de comprimentos de onda, bastando alterar o tamanho e a composição das nanopartículas. Em contraste, corantes convencionais e fluoróforos apresentam absorção e emissão máximas em um comprimento de onda fixo. O controle sobre essas mudanças requer, muitas vezes, o desenvolvimento de novos compostos orgânicos e a implementação de protocolos de síntese complexos (Aladesuyi; Oluwafemi, 2020; Yao; Zhang; Tang, 2023).

Fluoróforos convencionais também exibem estreitos espectros de absorção, o que implica na necessidade de excitação por luz de comprimento de onda específico, variando para cada molécula orgânica (Chan *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). Em contraste, os PQs apresentam estreitos espectros de emissão simétricos, possibilitando a utilização de diversos tipos de PQs em marcações múltiplas. Dessa forma, cada PQ pode ser identificado individualmente, evitando sobreposições espectrais (Smith; Gao; Nie, 2004). Além disso, a estabilidade dos PQs em relação à fotodegradação e às mudanças no pH dos eletrólitos biológicos supera a dos fluoróforos orgânicos convencionais. Essa característica permite a aplicação dos PQs na microscopia de fluorescência, possibilitando a detecção de imagens nítidas e com bom contraste mesmo após longos períodos de observação. Em contrapartida, fluoróforos orgânicos, após poucos minutos de exposição, perdem a fluorescência e sofrem degradação química (Smith; Gao; Nie, 2004; Wang; Chen, 2011).

1.4.1 Aplicação biológicas dos PQs e toxicidade

Dentre as diversas nanossondas disponíveis, como nanopartículas de conversão ascendente, proteínas fluorescentes e nanomateriais à base de grafeno, os PQs semicondutores destacam-se na área de imagem devido ao seu tamanho, que permite uma eficiente penetração nos tecidos vivos, e a capacidade de alcançar locais específicos. Além disso, as características eletro-ópticas dos PQs, tais como fluorescência e brilho duradouros, desempenham um

papel fundamental em aplicações de detecção biológica (Filali; Pirot; Miossec, 2020). Essas propriedades superam as limitações dos corantes fluorescentes, destacando assim o potencial dos PQs como fluoróforos em pesquisas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, avançando continuamente desde sua descoberta na década de 1980 (H.R; Schiffman; Balakrishna, 2018).

Os primeiros estudos que investigaram as propriedades dos PQs para sua aplicação como marcadores biológicos foram publicados simultaneamente em 1998 por Bruchez et al. (1998) e Chan & Nie (1998). Bruchez e sua equipe desenvolveram nanocristais de semicondutores, utilizando CdSe no sistema core-shell, para servirem como sondas fluorescentes em aplicações de coloração biológica e diagnóstico. Por outro lado, Chan e Nie demonstraram que os PQs poderiam ser conjugados a biomoléculas, possibilitando a detecção ultrasensível de materiais biológicos específicos.

As aplicações biomédicas demandam PQs solúveis em água, que sejam estáveis e funcionalizados com biomoléculas como proteínas, peptídeos, anticorpos ou medicamentos. Pesquisas recentes evidenciam que os PQs podem ser conjugados a diversas moléculas, incluindo peptídeos, anticorpos, ácidos nucleicos e pequenas moléculas, para serem utilizados como sondas fluorescentes (Smith; Gao; Nie, 2004). Contudo, a principal barreira que impede a incorporação dos PQs em aplicações clínicas é a sua toxicidade e não biodegradação. Assim, vários esforços estão sendo direcionados para o desenvolvimento de PQs que sejam biocompatíveis e não tóxicos, e progressos significativos têm sido alcançados nesse campo (Bilan; Nabiev; Sukhanova, 2016).

Existem muitos tipos de PQs, e cada um deles tem vários efeitos tóxicos potenciais relacionados a sua composição química, método de síntese e modificação de superfície diferentes (Xue et al., 2022). PQs são geralmente feitos de elementos binários dos grupos II – IV e IV – VI. Exemplos comuns incluem PQs de calcogenetos, como CdTe, CdSe, PbSe e HgTe (Oluwafemi et al., 2019). Esses PQs convencionais são os mais investigados por possuírem uma química sintética bem desenvolvida e propriedades físicas amplamente documentadas (Chang et al., 2012; Oluwafemi et al., 2020). No entanto, apesar de suas propriedades ópticas atraentes, a toxicidade intrínseca de metais pesados tóxicos, como o cádmio e o chumbo, por exemplo, que têm dificultado

as suas aplicações práticas, especialmente na área biomédica, devido aos riscos que esses materiais representam para a saúde humana e o meio ambiente (Che *et al.*, 2016). Por exemplo, a oxidação superficial de PQs binários geralmente causa a liberação de íons metálicos das superfícies das partículas em sistemas biológicos, o que leva ao acúmulo de metais pesados em regiões subcelulares, à geração de espécies reativas de oxigênio e a consequentes danos celulares, incluindo ao DNA (Chang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2022; Radwan *et al.*, 2019).

Essa preocupação instigou os pesquisadores a investigar elementos menos tóxicos (desprovidos de Cd, Hg, Pb, etc) para a preparação de PQs, e isso levou à exploração de PQs ternários I – III – VI, como PQs de calcopirita $CuInS_2$, $AgInS_2$, Ag_2Se , etc. Esses PQs são uma alternativa mais segura em relação aos PQs baseados em Cd e são candidatos promissores para o desenvolvimento de PQs ecologicamente corretos devido às suas propriedades ópticas favoráveis e baixa toxicidade (Aladesuyi; Oluwafemi, 2020; Kang *et al.*, 2015). No entanto, apenas alguns estudos *in vitro* foram realizados sobre a toxicidade dos PQs de calcopirita foram realizados (Kang *et al.*, 2015; Oluwafemi *et al.*, 2019, 2020; Xue *et al.*, 2022). De acordo com Aladesuyi *et al.* (2020), é imprescindível realizar mais pesquisas para compreender a toxicidade dos QDs ternários em condições experimentais *in vivo*, pois eles não são completamente seguros para os sistemas biológicos

1.5 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, pertencente à família Drosophilidae (ordem Diptera), é um organismo modelo amplamente empregado na genética clássica e moderna, bioquímica e fisiologia (Mirzoyan *et al.*, 2019; Vêras *et al.*, 2020). Sua estrutura corporal é relativamente simples em comparação aos vertebrados, apresenta um ciclo de vida rápido e curto, bem como estágios de desenvolvimento distintos. Além disso, demandam baixo custo operacional em ambientes laboratoriais e facilidade de manutenção e manejo (Pinho *et al.*, 2014; Sario; Silva; Gaivão, 2018).

Popularmente conhecida como "mosca-da-fruta", *D. melanogaster* tem sido amplamente empregada como modelo animal em estudos relacionados à toxicidade e genotoxicidade de substâncias ou moléculas, com o intuito de buscar novas abordagens terapêuticas (Mirzoyan *et al.*, 2019). Além disso,

desempenha um papel fundamental na investigação dos mecanismos subjacentes a doenças humanas (Nunes *et al.*, 2019; Vêras *et al.*, 2020). A análise comparativa entre os genomas da *D. melanogaster* e do ser humano, ambos completamente sequenciados, revela que cerca de 75% dos genes associados a doenças humanas têm homólogos reconhecíveis no genoma dessa moscas-das-frutas. Por esse motivo, tornou-se um organismo de grande importância para o estudo e compreensão de doenças humanas e estudos toxicológicos, devido à sua genética bem caracterizada e compreensão detalhada de sua biologia do desenvolvimento (Figura 6). Dessa forma, ela se configura como uma alternativa viável para reduzir o uso de organismos superiores, como ratos e camundongos, em triagens de compostos e testes toxicológicos (Ahamed *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

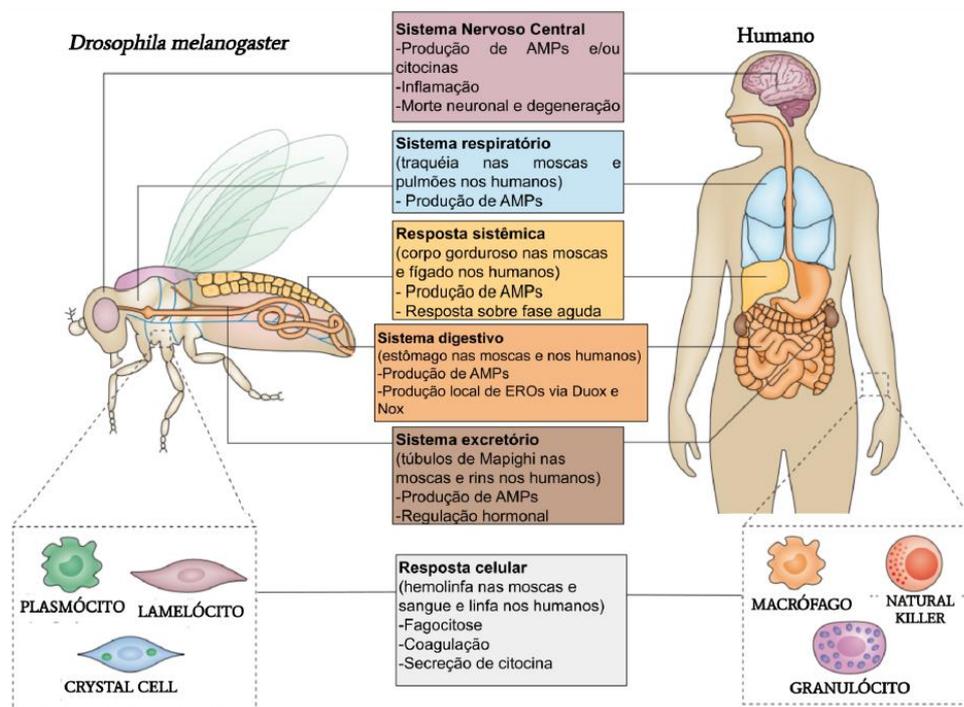


Figura 6 - Organização corporal homóloga entre *Drosophila melanogaster* e seres humanos: comparando a similaridade organizacional e funcional entre ambas as espécies. Adaptado de Buchon, Silverman & Cherry (2014).

Esses organismos se tornaram elementos essenciais em pesquisas genéticas e são usados em diversos estudos, tais como: avaliação do potencial tóxico e genotóxico de agentes retrovirais, que agem no mecanismo de replicação do HIV (Moraes Filho *et al.*, 2017), avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do extrato de *Myracrodruon urundeuva* em células somáticas

(Amorim *et al.*, 2020), avaliação tóxico-genética de inseticidas naturais e sintéticos, Dilapiol e Spinosad (Aciole *et al.*, 2014), entre outros tantos trabalhos.

O Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos afirma que *D. melanogaster* é um organismo modelo altamente eficaz para investigar a toxicidade de nanomateriais (Sario; Silva; Gaivão, 2018). De acordo com Alaraby *et al.* (2020), *Drosophila* é considerada um modelo *in vivo* confiável para avaliar a toxicidade e genotoxicidade de diversos nanomateriais, como demonstrado em estudos sobre nanopartículas de cobalto (CoNPs) e óxido de zinco (ZnO). Essas pesquisas incorporaram diversas abordagens nessa avaliação, tais como teste de viabilidade celular, estresse oxidativo, dano ao DNA (Ensaio cometa) e o teste de mutação e recombinação somática (SMART). Notavelmente, os testes demonstraram sensibilidade a partículas nanométricas acima de 50 nm e revelaram efeitos adversos em doses tão baixas quanto 0,08 mM.

Em 2006, Strawn, Cohen e Rzigalinski foram os primeiros a empregar *D. melanogaster* na investigação dos efeitos das NPs, especialmente para analisar os impactos da exposição às NPs de cério (Strawn; Cohen; Rzigalinski, 2006). Desde então, vários estudos têm empregado com sucesso a *Drosophila* para avaliar a toxicidade, a internalização, a geração de espécies reativas de oxigênio - EROs (estresse oxidativo), a pigmentação, as deformidades morfológicas, as alterações na expressão genética e a genotoxicidade (Ensaio Cometa) decorrentes da exposição a diversas nanopartículas (Alaraby *et al.*, 2016).

Portanto, a utilização da *D. melanogaster* como uma ferramenta de estudo oferece a vantagem de obter resultados em um período mais curto, facilitando a compreensão da toxicidade e viabilizando a produção de estudos sobre substâncias emergentes. Isso, por sua vez, contribui para a formulação de aplicações seguras dessas substâncias em diversas áreas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar os potenciais efeitos tóxicos e genotóxicos das lectinas isoladas das sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA) e do cerne da *Myracrodruon urundeuva* (MuHL), do ponto quântico AgIn₅Se₈@ZnS-GSH e do bioconjugado AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL, por meio de testes *in vivo*.

2.2 Específicos:

1. Isolar e purificar as lectinas ConA e MuHL em coluna de cromatografia de afinidade;
2. Sintetizar e caracterizar o PQ AgIn₅Se₈@ZnS-GSH e o bioconjugado AgIn₅Se₈@ZnS-MuHL por via eletroquímica;
3. Avaliar a toxicidade em *D. melanogaster* após exposição às lectinas ConA e MuHL, ao PQ e ao bioconjugado, através dos testes de sobrevivência, geotaxia negativa e análise fenotípica.
4. Avaliar a viabilidade celular (MTT) de homogenatos de *D. melanogaster* expostas as lectinas ConA e MuHL, ao PQ e ao bioconjugado;
5. Avaliar marcadores de estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica (TBARS), os níveis de tióis proteicos e não proteicos, o teor de Fe²⁺ livre e de óxido nítrico em *D. melanogaster* expostas às lectinas ConA e MuHL, ao PQ e ao bioconjugado;
6. Determinar o potencial genotóxico das lectinas ConA e MuHL, do PQ e do bioconjugado por meio do Ensaio Cometa em *D. melanogaster*.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em forma dos artigos científicos cada um compondo um capítulo, conforme descrição abaixo:

Capítulo 1 – Artigo: *Canavalia ensiformis* lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*.

Capítulo 2 – Evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure of *Drosophila melanogaster* to the AgIn₅Se₈@ZnS-GSH nanoparticle.

Capítulo 3 – Manuscrito: AgIn₅Se₈@ZnS quantum dots conjugated with *Myracrodruon urundeuva* (MuHL) lectins as a potential fluorescent nano-tool for glycobiological studies in *Drosophila melanogaster*.

REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, A. A. H. et al. Biomedical Applications of Quantum Dots: Overview, Challenges, and Clinical Potential. **International Journal of Nanomedicine** v. 17, p. 1951–1970, abr. 2022. doi: 10.2147/IJN.S357980.

ACIOLE, E. H. P. et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 559–565, abr. 2014. doi: 10.1002/ps.3573.

AHAMED, M. et al. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, n. 3, p. 263–269, 1 fev. 2010. doi: 10.1016/j.taap.2009.10.016.

ALADESUYI, O. A.; OLUWAFEMI, O. S. Synthesis strategies and application of ternary quantum dots — in cancer therapy. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 24, p. 100568, out. 2020. doi: 10.1016/j.nanoso.2020.100568.

ALARABY, M. et al. *Drosophila melanogaster* as a suitable *in vivo* model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 19, n. 2, p. 65–104, 17 fev. 2016. doi: 10.1080/10937404.2016.1166466.

ALARABY, M. et al. *In vivo* evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure to cobalt nanoparticles using *Drosophila melanogaster*. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 2, p. 610–622, 2020. doi: 10.1039/C9EN00690G.

ALVES, R. R. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730–736, 27 fev. 2019. doi: 10.1002/ps.5572.

ALVES, R. R. V. et al. *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin damages exochorionic cells and binds to the serosal cuticle of *Aedes aegypti* eggs. **3 Biotech**, v. 12, n. 5, p. 109, 9 maio 2022. doi: 10.1007/s13205-022-03172-9.

AMORIM, E. M. et al. Genotoxic Assessment of the Dry Decoction of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) Leaves in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster* by the Comet and SMART Assays. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 61, n. 3, p. 329–337, 3 mar. 2020. doi: 10.1002/em.22332.

ANDRADE LUZ, L. et al. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 44, n. June, p. 94–99, out. 2017. doi: 10.1016/j.tiv.2017.06.019.

ARAÚJO, R. M. S. et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20–26, fev. 2012. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.10.018.

ARRUDA, C. C. L. et al. CdTe-GSH as luminescent biomarker for labeling the larvicidal action of WSMoL lectin in *Aedes aegypti* larvae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 187, n. November 2019, p. 110672, mar. 2020. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110672.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 112, 27 dez. 2019. doi: 10.3390/molecules25010112.

BEN DALY, A. et al. Optical and structural properties in type-II InAlAs/AlGaAs quantum dots observed by photoluminescence, X-ray diffraction and transmission electron microscopy. **Superlattices and Microstructures**, v. 110, p. 1–9, out. 2017. doi: 10.1016/0025-5408(83)90146-0.

BILAN, R.; NABIEV, I.; SUKHANOVA, A. Quantum Dot-Based Nanotools for Bioimaging, Diagnostics, and Drug Delivery. **ChemBioChem**, v. 17, n. 22, p. 2103–2114, 17 nov. 2016. doi: 10.1002/cbic.201600357.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 12, p. 796–810, 25 dez. 2014. doi: 10.1038/nri3763.

CARVALHO, M. E. T. et al. Evaluating the glyco phenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 302–308, out. 2019. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.088.

CAVADA, B. et al. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 30, 21 dez. 2019. doi: 10.3390/ijms20010030.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, v. 2, n. 2, p. 123–35, jun. 2001. doi: 10.2174/1389203013381152.

CAVADA, B. S. et al. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **The FEBS journal**, v. 273, n. 17, p. 3962–74, 28 set. 2006. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05400.x.

CAVALCANTI, L. C. et al. Efeito eletrofisiológico cerebral da lectina da *Canavalia ensiformis* (ConA): interação com o ácido ascórbico em ratos. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 3, n. 1, p. 28, 28 set. 2018. doi: 10.25191/recs.v3i1.2194.

CHAN, W. C. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 40–46, fev. 2002. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00282-3.

CHAN, W. C. W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2016–2018, 1998. doi: 10.1126/science.281.5385.2016.

CHANG, J.-Y. et al. Strategies for photoluminescence enhancement of AgInS₂ quantum dots and their application as bioimaging probes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 10609, 2012. doi: 10.1039/c2jm30679d.

CHE, D. et al. Aqueous synthesis of high bright and tunable near-infrared AgInSe₂-ZnSe quantum dots for bioimaging. **Journal of Colloid and Interface**

Science, v. 463, p. 1–7, fev. 2016. doi: 10.1016/j.jcis.2015.10.039.

CHEN, C. S. et al. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 3, 3 dez. 2018. doi: 10.1186/s12870-017-1222-0.

CHEITRI, D. et al. Lectins: Biological Significance to Biotechnological Application. **Carbohydrate Research**, v. 506, n. June, p. 108367, 2021. doi: 10.1016/j.carres.2021.108367.

CHEUNG, R. C. F. et al. Tuber Lectins with Potentially Exploitable Bioactivities. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 42, p. 5986–6001, 6 fev. 2018. doi: 10.2174/0929867325666180517095308.

CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, n. June 2017, p. 85–91, jan. 2018. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020.

FAHEINA-MARTINS, G. V. et al. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1161–1169, out. 2012. doi: 10.1016/j.tiv.2012.06.017.

FILALI, S.; PIROT, F.; MIOSSEC, P. Biological Applications and Toxicity Minimization of Semiconductor Quantum Dots. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 163–177, fev. 2020. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.07.013.

GEMEINER, P. et al. Lectinomics. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 1–15, jan. 2009. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.003.

H.R, C.; SCHIFFMAN, J. D.; BALAKRISHNA, R. G. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 258, p. 1191–1214, abr. 2018. doi: 10.1016/j.snb.2017.11.189.

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 12, p. e26595, 28 dez. 2013. doi: 10.4161/psb.26595.

JAMIESON, T. et al. Biological applications of quantum dots. **Biomaterials**, v.

28, n. 31, p. 4717–4732, nov. 2007. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.014.

KANG, X. et al. Scaling up the Aqueous Synthesis of Visible Light Emitting Multinary AgInS₂/ZnS Core/Shell Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 14, p. 7933–7940, 9 abr. 2015. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b00413.

KEYAERTS, E. et al. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. **Antiviral research**, v. 75, n. 3, p. 179–87, set. 2007. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.03.003.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1242, 12 jun. 2017. doi: 10.3390/ijms18061242.

LI, W. et al. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p. 282–286, 22 out. 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.072.

LIMA, C. N. et al. Mannose-binding lectin conjugated to quantum dots as fluorescent nanotools for carbohydrate tracing. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 10, n. 2, p. 025002, 1 abr. 2022. doi: 10.1088/2050-6120/ac4e72.

LIU, Q. et al. Intracellular reactive oxygen species trigger mitochondrial dysfunction and apoptosis in cadmium telluride quantum dots-induced liver damage. **NanoImpact**, v. 25, n. January, p. 100392, jan. 2022. doi: 10.1016/j.impact.2022.100392.

LLIVISACA-CONTRERAS, S. A. et al. Plants and Natural Products with Activity against Various Types of Coronaviruses: A Review with Focus on SARS-CoV-2. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 4099, 5 jul. 2021. doi: 10.3390/molecules26134099.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1383, n. 1, p. 9–36, mar. 1998. doi: 10.1016/S0167-4838(97)00182-9.

BRUCHEZ, M. J. R , MORONNE, M. P. G, WEISS, S. A. P. A. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2013–2016, 1998.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 2, p. 2014–33, 27 jan. 2015. doi: 10.3390/molecules20022014.

MANSUR, H. S. Quantum dots and nanocomposites. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 2, p. 113–129, 17 mar. 2010. doi: 10.1002/wnan.78.

MARTÍNEZ-ALARCÓN, D.; BLANCO-LABRA, A.; GARCÍA-GASCA, T. Expression of Lectins in Heterologous Systems. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 616, 21 fev. 2018. doi: 10.3390/ijms19020616.

MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020. doi: 10.1155/2020/1631394.

MIRZOYAN, Z. et al. *Drosophila melanogaster*. A Model Organism to Study Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 1 mar. 2019. doi: 10.3389/fgene.2019.00051.

MORAES FILHO, A. V. et al. *In vivo* genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 820, n. May, p. 31–38, ago. 2017. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.05.012.

MOURA, M. C. et al. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 745–754, 14 mar. 2021. doi: 10.1111/jam.14811.

NAIK, S.; KUMAR, S. Biochemical Characterization of Lactose Binding Entadin Lectin from *Entada rheedii* Seeds with Cytotoxic Activity against Cancer Cell

Lines. **ACS Omega**, v. 5, n. 27, p. 16430–16439, 14 jul. 2020. doi: 10.1021/acsomega.0c00577.

NAITHANI, S. et al. Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond. **Journal of Plant Physiology**, v. 266, n. July, p. 153531, nov. 2021. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153531.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 52–59, jan. 2011. doi: 10.1016/j.ibiod.2010.05.015.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 609–616, 7 fev. 2012. doi: 10.1007/s00436-011-2529-7.

NASCIMENTO, K. S. et al. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 509–526, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.117.

OLUWAFEMI, O. S. et al. Cell viability assessments of green synthesized water-soluble AgInS₂/ZnS core/shell quantum dots against different cancer cell lines. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 24, p. 4037–4044, 30 dez. 2019. doi: 10.1557/jmr.2019.362.

OLUWAFEMI, O. S. et al. Facile, large scale synthesis of water soluble AgInSe₂/ZnSe quantum dots and its cell viability assessment on different cell lines. **Materials Science and Engineering: C**, v. 106, n. November 2018, p. 110181, jan. 2020. doi: 10.1016/j.msec.2019.110181.

OSTERNE, V. J. S. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anticâncer, Fortaleza 2016**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.

PEREIRA, R.; SILVA, A. L. C. Uma revisão do potencial biotecnológico de lectinas do gênero *Canavalia* e *Dioclea*. **Journal of Biology & Pharmacy and**

Agricultural Management, v. 15, n. 3, p. 184–205, 2019.

PESSOA, R. B. G. et al. Fluorescent nanoprobe based on quantum dots conjugated to Cramoll to assess surface carbohydrates of *Aeromonas* spp. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 7, p. 130373, jul. 2023. doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130373.

PEUMANS, W. J. et al. Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 491p. 27–54.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defence. **The Histochemical Journal**, v. 27, n. 4, p. 253–271, abr. 1995. doi: 10.1007/BF00398968.

PINHO, A. I. et al. Fumigant activity of the *Psidium guajava* var. pomifera (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 696785, 2014. doi: 10.1155/2014/696785.

PONTUAL, E. V. et al. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, n. 3, p. 135–152, mar. 2012. doi: 10.1002/arch.21012.

RADWAN, M. A. et al. Responses of oxidative stress, genotoxicity and immunotoxicity as biomarkers in *Theba pisana* snails dietary exposed to silver nanoparticles. **Chemistry and Ecology**, v. 35, n. 7, p. 613–630, 9 ago. 2019. doi: 10.1080/02757540.2019.1631816.

RIBEIRO, A.; CATARINO, S.; FERREIRA, R. B. Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. **Carbohydrate Research**, v. 352, p. 206–210, maio 2012. doi: 10.1016/j.carres.2012.01.024.

SÁ, R. A. et al. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 460–464, dez. 2008. doi: 10.1016/j.ibiod.2008.04.003.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300–306, abr. 2009. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.08.004.

SANTANA, G. M. S. et al. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56–60, jun. 2012. doi: 10.1016/j.bioelechem.2011.11.006.

SANTOS, A. M. O. et al. *Canavalia ensiformis* lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 2823–2832, 1 dez. 2022. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061.

SANTOS, C. et al. Síntese e caracterização de pontos quânticos ambientalmente amigáveis, um meio simples de exemplificar e explorar aspectos da nanociência e nanotecnologia em cursos de graduação. **Química Nova**, v. 43, n. 6, p. 813–822, 2020a. doi: 10.21577/0100-4042.20170558.

SANTOS, V. F. et al. The Galactose-Binding Lectin Isolated from *Vatairea macrocarpa* Seeds Enhances the Effect of Antibiotics Against *Staphylococcus aureus*-Resistant Strain. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, n. 1, p. 82–90, 9 mar. 2020b. doi: 10.1007/s12602-019-9526-z.

SARIO, S.; SILVA, A. M.; GAIVÃO, I. Titanium dioxide nanoparticles: Toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster* (SMART eye-spot test and comet assay in neuroblasts). **Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis**, v. 831, n. December 2017, p. 19–23, jul. 2018. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.05.001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 30 jun. 2004. doi: 10.1093/glycob/cwh122.

SILVA, A. R. et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 192, n. October, p. 232–240, dez. 2021. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.002.

SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933–1939, 2010. doi: 10.1590/S0100-40422010000900021.

SILVA, H. C. et al. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2347–2355, dez. 2012. doi: 10.1016/j.procbio.2012.09.014.

SILVA, P. M. S. et al. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 234–244, 2019. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.059.

SISENANDO, H. A. A. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 303–308, 2009. doi: 10.1016/j.fct.2008.11.010.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum Dot Nanocrystals for *In Vivo* Molecular and Cellular Imaging¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 377, 2004. doi: 10.1562/2004-06-21-IR-209.1.

SOUZA, J. D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696–702, ago. 2011. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.02.009.

STRAWN, E. T.; COHEN, C. A.; RZIGALINSKI, B. A. Cerium oxide nanoparticles increase lifespan and protect against free radical-mediated toxicity. **FASEB Journal**, v. 20, p. A1356, 2006. doi: <https://doi.org/10.1096/fasebj.20.5.A1356-c>.

TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243, jan. 2015. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.11.010.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533–551, 29 out. 2020. doi: 10.1007/s10719-020-09942-y.

VAN DAMME, E. J. . et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, nov. 1998.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 484–489, out. 2004.

VAN DAMME, E. J. M. History of plant lectin research. **Methods in Molecular Biology**, v. 1200, p. 3–13, 2014.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochemical Society transactions**, v. 46, n. 2, p. 217–233, 17 abr. 2018.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538–50, set. 2011. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.024.

VAZ, A. F. M. et al. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1507–1513, 2010. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.035.

VÉRAS, J. H. et al. Modulating effect of a hydroxychalcone and a novel coumarin–chalcone hybrid against mitomycin-induced genotoxicity in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 12 jun. 2020. doi: 10.1080/01480545.2020.1776314.

VIDERES, L. C. C. A. et al. *Myracrodruon urundeuva* lectins present anticancer and anticryptococcal activities with low cytotoxic or genotoxic effects. **South African Journal of Botany**, v. 157, p. 614–621, jun. 2023. doi: 10.1016/j.sajb.2023.04.030.

WANG, J. H. et al. Bioconjugation of concanavalin and CdTe quantum dots and the detection of glucose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and**

Engineering Aspects, v. 364, n. 1–3, p. 82–86, jul. 2010. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.04.041.

WANG, Q. et al. Direct Synthesis of High-Quality Water-Soluble CdTe:Zn²⁺ Quantum Dots. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 9208–9213, 3 set. 2012. doi: 10.1021/ic300473u.

WANG, Y.; CHEN, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 4, p. 385–402, ago. 2011. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.04.041.

XUE, D. et al. Cytotoxicity and transcriptome changes triggered by CuInS₂/ZnS quantum dots in human glial cells. **NeuroToxicology**, v. 88, n. January 2021, p. 134–143, jan. 2022. doi: 10.1016/j.neuro.2021.11.007.

YAO, Y.; ZHANG, T.; TANG, M. The DNA damage potential of quantum dots: Toxicity, mechanism and challenge. **Environmental Pollution**, v. 317, p. 120676, jan. 2023. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120676.

CAPÍTULO 1

Artigo publicado na revista International Journal of Biological Macromolecules

Canavalia ensiformis* lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Canavalia ensiformis lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*

Antônio Marcos de Oliveira dos Santos^a, Antônia Eliene Duarte^b, Adrielle Rodrigues Costa^c, Aleson Aparecido da Silva^d, Claudia Rohde^d, Danúbia Guimarães Silva^d, Érika Maria de Amorim^d, Maria Helena da Cruz Santos^c, Maria Gislaine Pereira^d, Maríndia Deprá^a, Samuel Lima de Santana^d, Vera Lúcia da Silva Valente^{a,*}, Claudener Souza Teixeira^{c,*}

^a Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

^c Agrarian and Biodiversity Sciences Center, Federal University of Cariri, Crato, CE, Brazil

^d Genetics laboratory, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Canavalia ensiformis lectin
Drosophila melanogaster
 Comet assay
 Oxidative markers

ABSTRACT

Mannose/glucose-binding lectin from *Canavalia ensiformis* seeds (Concanavalin A - ConA) has several biological applications, such as mitogenic and antitumor activity. However, most of the mechanisms involved in the *in vivo* toxicity of ConA are not well known. In this study, the *Drosophila melanogaster* model was used to assess the toxicity and genotoxicity of different concentrations of native ConA (4.4, 17.5 and 70 µg/mL) in inhibited and denatured forms of ConA. The data show that native ConA affected: the survival, in the order of 30.6 %, and the locomotor performance of the flies; reduced cell viability to levels below 50 % (4.4 and 17.5 µg/mL); reduced nitric oxide levels; caused lipid peroxidation and increased protein and non-protein thiol content. In the Comet assay, native ConA (17.5 e 70 µg/mL) caused DNA damage higher than 50 %. In contrast, treatments with inhibited and denatured ConA did not affect oxidative stress markers and did not cause DNA damage. We believe that protein-carbohydrate interactions between ConA and carbohydrates of the plasma membrane are probably the major events involved in these activities, suggesting that native ConA activates mechanisms that induce oxidative stress and consequently DNA damage.

1. Introduction

The use of medicinal plants is a common practice in the popular culture of several communities for the treatment of primary health problems, mainly because they are easily accessible and cheap. Therefore, traditional knowledge associated with the use of medicinal plants has been an important source, direct and indirect, of new drugs that, in most cases, are considered safe due to their long history of use and absence of more apparent side effects [1,2]. However, research has shown that substances extracted from plants with biological potential may have undesirable properties such as toxic effects, including DNA damage, mutagens and carcinogens, which may restrict their use as a therapeutic agent [2,3]. These plant substances include bioactive metabolites, peptides and proteins, especially lectins, which studies

demonstrate their toxic effects *in vivo* and *in vitro* [4–6].

Lectins are proteins of non-immune origin that reversibly and specifically interact with carbohydrates without modifying them [7,8]. They are widely distributed in nature and found in all kingdoms [9]. Among plant lectins, those obtained from the Fabaceae family are the most studied, with the largest group characterized and binding to a variety of carbohydrates [8,10]. These proteins bind preferentially to glycoconjugates (glycoproteins and glycolipids) on the cell surface. They can be inhibited by binding mono/oligosaccharides, for which they are specific [11]. Due to this specificity, lectins are valuable tools for investigating several biological events: cell-cell communication, cell adhesion, inflammatory processes, antitumor activity, mitogenic stimulation, induction of apoptosis and pathogen-host interaction [12].

In this sense, *Canavalia ensiformis* (Fabaceae), popularly known as

* Corresponding authors.

E-mail addresses: vera.valente@pq.cnpq.br (V.L. da Silva Valente), claudener@gmail.com (C.S. Teixeira).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061>

Received 27 July 2022; Received in revised form 6 October 2022; Accepted 7 October 2022

Available online 10 October 2022

0141-8130/© 2022 Published by Elsevier B.V.

jack bean, is a legume widely distributed in tropical countries [13]. Its seeds contain a lectin with specificity for D-glucose/D-mannose, called Concanavalin-A (ConA) [14], whose oligomeric state is pH-dependent and can be found in the dimeric or tetrameric form [15,16]. It has the ability to interact with glycans present in the cell membrane, demonstrating insecticidal [16], antibacterial [17], antiproliferative [18], vasoactive [19] and mitogenic [20] activity. In addition, ConA was used in several preclinical trials and proved to be effective as an inducer of cell death, apoptosis and necrosis in tumor cells *in vitro* [5,15]. ConA and other lectins also induce increased production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) from mitochondria or other sources, characterizing the condition of oxidative stress, which results in oxidation of amino acids in proteins, polyunsaturated fatty acids into lipids, DNA damage, as well as activating cell death pathways [7,21].

It is worth mentioning that little is known about the molecular mechanisms involved in ConA-induced toxic and genotoxic effects, especially using *in vivo* models. Despite the importance of *in vitro* studies, *in vivo* tests, in general, are considered more specific due to the existence of functional mechanisms of DNA metabolism and repair [22]. In recent decades the organism *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) has become a reliable eukaryotic model system and alternative to the use of small mammals for toxicological and genotoxic tests for understanding the molecular mechanisms of human diseases and the effect of plant compounds [23–27]. This is because this species has >75% of the genes related to human diseases, with at least one functional homolog in the fly [28–30].

Considering the biological importance of the ConA lectin and its promising pharmacological properties, the objective of this work was to investigate the effect and the mechanism by which ConA promotes toxicity and genotoxicity, using the model organism *D. melanogaster*.

2. Material and methods

2.1. Purification of native ConA from *Canavalia ensiformis* seeds

To purify the lectin of the species *C. ensiformis*, the seeds were crushed in an electric mill until obtaining the flour. Then, the total proteins were extracted in the presence of 0.15 M NaCl for 4 h, in a ratio of 1:10 (mass/volume). Soon after, the extract was centrifuged at 10,000 g for 5 min and the supernatant, called crude extract, was collected. Subsequently, 10 mL of the crude extract of *C. ensiformis* was applied to a Sephadex G-50 column previously equilibrated with 0.15 M NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 5.0 mM CaMg₂. After completely removing the unretained fraction, the retained fraction was eluted with 0.2 M glucose. All fractions were collected in test tubes with 1.5 mL of aliquots monitored in a spectrophotometer at 280 nm [31].

After the purification process, the lectin was dialyzed with distilled water and lyophilized for the biological assays. The purity of the lectin sample was assessed by electrophoresis on 12.5% SDS-PAGE as suggested in LAEMMLI [32].

2.2. Dilution, inhibition and denaturation of ConA

Three different concentrations (4.4, 17.5 and 70 µg/mL) of the *C. ensiformis* lectin (ConA) were prepared from the concentrated solution (100 µg/mL) obtained by diluting the lyophilized fraction of native ConA in saline solution (0.9% NaCl).

D-mannose-inhibited and denatured ConA (both at a concentration of 17.5 µg/mL) and only D-mannose were prepared. For this, native ConA (17.5 µg/mL) was respectively pre-incubated with the inhibitory carbohydrate D-mannose (0.1 M) for 60 min at room temperature and denatured in a water bath at 85 °C for 10 min. D-mannose (0.1 M) was also pre-incubated in a separate solution in the same experimental condition as the control. The effect of a) native ConA - 4.4, 17.5 and 70 µg/mL, b) D-mannose only, c) D-mannose plus 17.5 µg/mL of the native ConA and d) 17.5 µg/mL of the denatured ConA, was analyzed in the toxicity test,

oxidative stress markers and Comet assay (described below in Sections 2.4 to 2.6 items).

The choice of concentrations was based on the cytotoxic results of the ConA lectin required to inhibit 50% of cell proliferation (IC₅₀ = 3 µg/mL) in MOLT-4 and HL-60 tumor cell lines [33].

2.3. *Drosophila melanogaster* stock and culture

Adults of *D. melanogaster* Oregon-R strain were cultivated under 12 h photoperiod (light and dark), temperature of 24 °C and relative humidity (60–70%) in glass tubes (5 cm × 15 cm) with culture medium standard, based on corn flour, rye, sugar, yeast and agar.

2.4. Test of toxicity in *D. melanogaster*

2.4.1. Exposure and treatment

Different concentrations of the ConA lectin were prepared (4.4, 17.5 and 70.0 µg/mL), the D-mannose-inhibited and denatured forms of ConA (both at 17.5 µg/mL concentration), and the D-mannose only. Subsequently, 1.5 mL of each concentration was added to 15 g of culture medium, constituting the diet of the flies. The control diet was mixed with 1.5 mL of saline (0.9% NaCl). Then, 50 adult flies (male and female) aged 3–5 days were added to each vial containing the diet at different concentrations of ConA and maintained in this environment for 7 days, adapted from NUNES et al. [34]. Each treatment was performed in triplicate in a completely randomized design.

2.4.2. Survival assay and locomotor performance

The survival rate was determined by counting the percentage of the number of flies killed per treatment every 24 h during the 7 days of exposure. The mobility assay was evaluated by the negative geotaxis test [35]. Briefly, 3 groups of 10 flies per treatment were immobilized on ice for 1 min and placed in vertical glass columns. After recovery, gentle hits were given to the bottom of the glass tube and the number of flies that reached 6 cm from the column (top) during the 5 s period were counted. Each fly group was tested three times at 1 min intervals.

2.5. Oxidative stress markers

At the end of the exposure period of 7 days, as described in Section 2.4.1, the homogenate of flies was prepared for the biochemical assays. 25 flies per group were cryoanesthetized, weighed, manually homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (1 mg: 10 µL, weight: volume), and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant solution was used for the tests below. Three independent experiments were conducted for each test.

2.5.1. Cell viability

Mitochondria viability was evaluated with the MTT reagent [3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl) - 2,5-diphenyl-20-tetrazolium bromide]. A volume of 20 µL of the fly supernatant was added to 170 µL of potassium phosphate (0.1 M, pH 7.4), followed by the addition of 10 µL of 1 mg/mL of MTT prepared in ethanol. The mixture was incubated for 2 h, then 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added and incubated for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 492 nm and 630 nm by colorimetric assay using a microplate reader (TP-Reader, Brazil), and the A492-A630 network was taken as the cell viability index. Results were expressed as percentage [34].

2.5.2. Lipid peroxidation (LPO)

The reaction mixture containing 50 µL of the supernatant, 150 µL of 10% trichloroacetic acid and 100 µL of 0.75% 2-thiobarbituric acid was incubated for 60 min at 100 °C in a water bath. After cooling, it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the absorbance was measured at 405 nm in a microplate reader (TP-Reader, Brazil) using 250 µL of the reaction mixture [34,36]. MDA (malondialdehyde) was quantified using

a standard curve and the results expressed in $\mu\text{mol MDA/g}$ of tissue.

2.5.3. Determination of free Fe^{2+} content

To verify if there was a change in the content of free iron (II) ions, the intensity of the orange complex Fe^{2+} – 1,10-phenanthroline was measured. A reaction mixture containing 110 μL of saline (0.9%), 60 μL of Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), 20 μL of the supernatant and, 10 μL of 0.25% 1,10-phenanthroline, was incubated for 1 h at room temperature [34,35]. Subsequently, the absorbance was read at 492 nm in the microplate reader (TP-Reader, Brazil) and the free iron (II) of the supernatant was quantified using iron (II) sulfate for the standard curve. Results were expressed as $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ tissue.

2.5.4. Determination of total protein thiols (PSH) and non-protein thiols (NPSH)

To measure protein thiols (PSH) levels, 20 μL of the supernatant, 170 μL of phosphate buffer (pH 7.4) and then 10 μL of 5 mM DTNB (5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) were mixed. The plates were incubated for 30 min at room temperature; then the absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader (TP-Reader, Brazil). Glutathione (GSH) was used as a standard and the results were expressed as $\mu\text{mol GSH/g}$ tissue, as described by COSTA et al. [35].

For the measurement of non-protein thiols (NPSH) the supernatant was mixed with an equal volume of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 3 min at 10,000 rpm. The deproteinized supernatant was used for NPSH determination as described for PSH [34].

2.5.5. Nitric oxide

Nitric oxide was quantified as its stable oxidized form, nitrite, using the Griess reagent as described by BAYLIK et al. [37]. The reaction mixture containing 150 μL of phosphate buffer (pH 7.4), 25 μL of the supernatant, 25 μL of 1% Griess reagent and incubated for 10 min. The absorbance at 540 nm was measured on a microplate reader (TP-Reader, Brazil) and the concentration of nitrite was determined using a calibration curve made with standard sodium nitrite. Results were expressed in $\mu\text{mol NO/g}$ tissue.

2.6. Comet assay

2.6.1. Treatment of *Drosophila melanogaster* larvae

Adults of *D. melanogaster* females were transferred to glass vials for oviposition, containing oviposition medium prepared 24 h before, based on fresh baker's yeast (Itaipuara Alimentos SA, Tapiratiba, São Paulo, Brazil) supplemented with sucrose, and mounted on a solid agar base. Seventy-two hours after oviposition, 80 third instar larvae were collected and submitted to the treatments. The test medium were formulated with 0.9 g instant mashed potato (Yoki SA, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil) hydrated with 3 mL of each test solution.

Six treatments were tested: the native ConA (4.4, 17.5 and 70 $\mu\text{g/mL}$ concentrations), the α -mannose-inhibited and denatured forms of ConA (both at 17.5 $\mu\text{g/mL}$ concentration), and the α -mannose only. An additional set of 80 larvae was collected and used as a negative control, which was submitted to medium hydrated only with saline solution (0.9% NaCl). The positive control larvae were exposed to the genotoxic agent cyclophosphamide monohydrate (1.5 mg/mL) elute in distilled water, adapted from AMORIM et al. [2].

2.6.2. Hemolymph extraction, slide assembly, treatment and electrophoresis

For hemolymph extraction, 60 larvae were transferred to a Petri dish and cooled at 4 °C for 1 min. Subsequently, they were placed in an excavated plate containing 150 μL of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution. Under the stereoscopic microscope, a lateral cut was performed with the scalpel in the cuticle of each individual to exit the hemolymph [38].

The glass blades previously sanded and bathed with a standard

agarose solution (1.5% diluted in PBS) received a layer of 60 μL of cell suspension (larvae hemocytes), homogenized in 100 μL of a 0.5% agarose solution melting point (LM agarose) at 37 °C. After the homogenate was applied to the blade, a 24 mm \times 60 mm coverslip was placed over the material. The blades were submitted to 4 °C for 10 min, after which the coverslips were removed and the blades, with the biological material, transferred to a cuvette containing lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 and 10% DMSO) adjusted to pH 10, and kept at 4 °C for 72 h. At the end of the cell lysis period, the blades were submitted to a buffer solution at 4 °C (1 M NaOH; 200 mM EDTA, pH > 13) for 20 min. Soon after, the electrophoretic run was performed for 20 min at 40 V and 300 mA. After the run, the blades were immersed in neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min and then subjected to fixation in absolute ethanol for 5 min, air dried and stored at 4 °C until the time of microscopic analysis. All steps were performed in the absence of light, according to VERÇOSA et al. [38] and AMORIM et al. [2].

2.6.3. Microscopic analysis

The blades were stained with 50 μL of GelRed solution (Biotium), diluted in deionized water (1:500) and viewed under a fluorescence microscope (Zeiss-Imager, M2) with a 40 \times objective and Alexa Fluor 546 filter. The analysis consisted of observing 100 nucleoids, 50 per blade, from each of the three replicates of each treatment (a total of 300 nucleoids analyzed in each treatment).

Nucleoids were ranked 0–4 based on the visual inspection parameters were Class 0 includes intact nucleoids (no damage by the test compound), Classes 1, 2, and 3 represent minimal, intermediate, and intense damage, respectively, and Class 4 represents maximum damage to cells. The comet reflects strands of relaxed and supercoiled DNA embedded in agarose. The longer the comet's tail, the more breaks were induced in the DNA [38,39]. After microscopic analysis, genotoxicity was assessed by Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF%). DI values may vary from 0 (totally intact, 100 cells \times 0) to 400 (maximum damage, 100 cells \times 4) and was calculated using the equation: Total DI = 0 (class 0 comets) + 1 (class 1) + 2 (class 2) + 3 (class 3) + 4 (class 4). DF % represents the percentage of all comets with damage (class 1 to class 4) in relation to the total comets accounted and was calculated using the formula: DF = [(total comets – class 0 comets) \times 100] / total of comets.

2.7. Statistical analysis

Data was analyzed using GraphPad Prism 6.0 software. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied for toxicological tests, followed by Dunnett's multiple comparison test. In the Comet Assay, one-way ANOVA and a pairwise Bonferroni post-test were applied. Data was expressed as average \pm SD (standard deviation) and considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. ConA lectin purification

Native ConA was purified by affinity chromatography and final purity was confirmed by gel electrophoresis (SDS-PAGE). The Chromatogram shows two peaks (PI) and (PII), corresponding, respectively, to the unbound protein fraction and the retained protein fraction (Fig. 1A). In SDS-PAGE, ConA showed three bands (Fig. 1B), the first band corresponding to the α chain (25.5 kDa), the second to the β chain (14 kDa) and the third to the γ chain (12 kDa).

3.2. Test of toxicity in *D. melanogaster*

To assess the toxic effects of ConA, the survival curve and locomotor performance in adults of *D. melanogaster* were determined. The toxicity

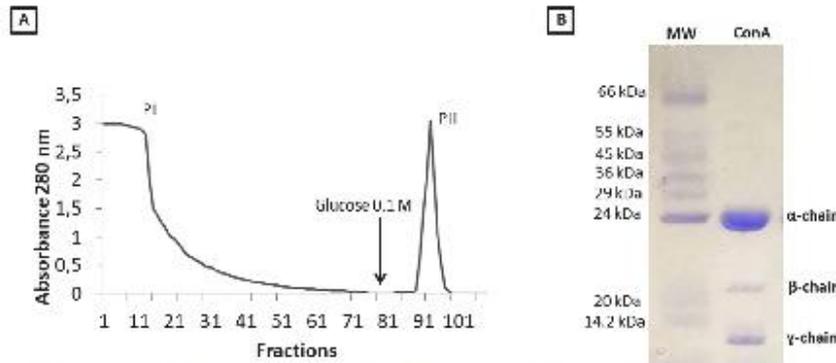


Fig. 1. *Conoclus esuiformis* (ConA) purification by affinity chromatography. (A) Chromatogram profile of *C. esuiformis* crude extract in Sephadex G-50 column; (B) SDS-PAGE from the ConA. Lane 1: Molecular weight marker (MW); Lane 2: P II (Purified ConA). Molecular weight marker: bovine serum albumin 66 kDa; glutamic dehydrogenase, 55 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor, 20 kDa; α-lactalbumin, 14.2 kDa; (ConA) α-chain, β-chain, and γ-chain of lectin.

test results (Fig. 2A and B) demonstrated that exposure of flies to native ConA (4.4, 17.5 and 70 µg/mL) caused a significant reduction in survival at the end of seven days of treatment when compared to the control group ($p < 0.05$). This reduction was, respectively, 28.3, 30.6 and 27.6 %, with no dose-dependent response. However, 17.5 µg/mL D-mannose-

inhibited and denatured ConA (Fig. 2C and D) did not affect fly survival when compared to the control group ($p > 0.05$), suggesting that ConA toxicity may be related to its CRD and integrity of its three-dimensional conformation.

Compromising in locomotor deficits was seen in all concentrations of

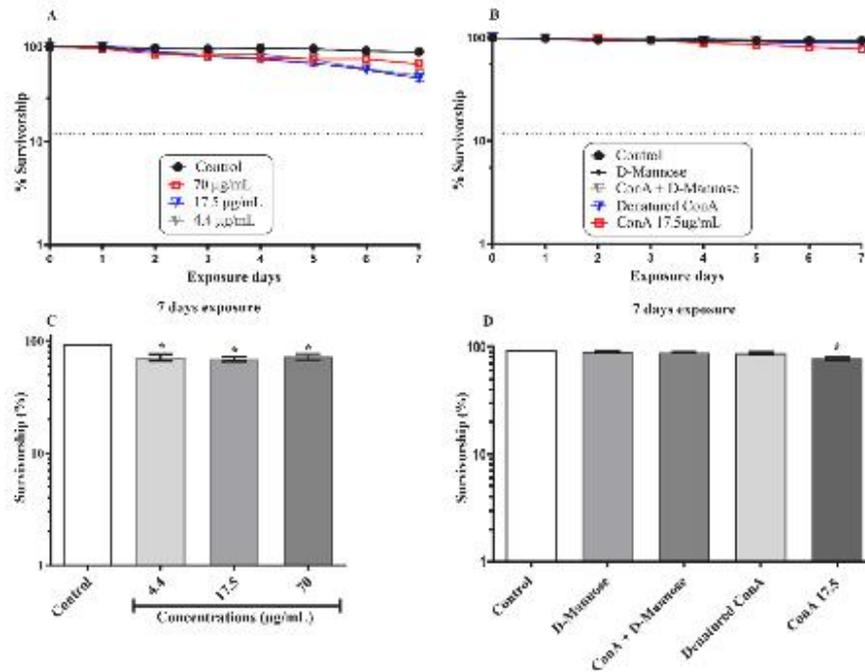


Fig. 2. (A) and (B) Survival curve of adults of *Drosophila melanogaster* over seven days of exposure to different concentrations of native, denatured and inhibited ConA; (C) and (D) survival rate on the seventh day of exposure. * Significant difference when compared to the control group ($*p \leq 0.05$).

native ConA (Fig. 3A) in relation to control ($p \leq 0.05$). This effect was more intense at the concentration of 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p \leq 0.0001$), when the surviving flies had more difficulty climbing to the top of the tube than at the other concentrations. Treatments with 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA inhibited by α -mannose and denatured did not compromise the locomotor performance of flies when compared to control ($p > 0.05$, Fig. 3B).

3.3. Oxidative stress markers

In order to clarify the potential mechanisms by which flies are affected by exposure to different concentrations of native ConA, biomarkers of oxidative stress were determined. In parallel, to verify whether the toxicity of this protein is related to its interaction with cell membrane carbohydrates, ConA was also tested after processes of CRD inhibition by α -mannose and denaturation.

The cell viability in fly homogenates (Fig. 4A) was evidenced by the loss of the cells' ability to reduce MTT to the formazan product when compared to the control. A reduction in cell viability was observed, below 50 % at concentrations 4.4 and 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and below 70 % at concentration 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p \leq 0.001$). In addition, there was a significant difference in the comparison between the groups ($p \leq 0.001$). ConA inhibited by α -mannose and denaturation did not change the cell viability of the supernatants when compared to the control ($p > 0.05$, Fig. 4B).

Lipid peroxidation in the fly homogenate was measured by malondialdehyde (MDA) quantification (Fig. 5A). A dose-dependent increase in MDA content was observed in the native ConA treatment when compared to the control. However, a significant difference was detected only in the highest concentration (70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) when compared to the control ($p \leq 0.01$). Treatments with α -mannose-inhibited ConA and denaturation did not change MDA levels (Fig. 5B) compared to control ($p > 0.05$).

In parallel, the levels of three indirect biomarkers of oxidative stress: free Fe^{2+} , protein (PSH) and non-protein (NPSH) thiols in the fly homogenate were investigated. The results presented in Fig. 6 A and B show that all concentrations of native, α -mannose-inhibited and denatured ConA did not significantly alter free Fe^{2+} levels when compared to the control ($p > 0.05$). The amount of PSH (Fig. 7A), quantified by the levels of GSH - an intracellular antioxidant, significantly increased at concentrations of 4.4 and 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ when compared to the control ($p \leq 0.05$). As for NPSH levels (Fig. 7B), they increased significantly in all concentrations of native ConA when compared to the control ($p \leq 0.05$). α -Mannose-inhibited and denatured ConA did not significantly alter PSH and NPSH levels (Fig. 7 C and D) when compared to control ($p > 0.05$).

Finally, the content of nitric oxide (NO), quantified by the levels of nitrite (NO_2^-), were significantly reduced in all concentrations from native ConA when compared to the control group ($p \leq 0.01$, Fig. 8A). α -

Mannose-inhibited and denatured ConA did not change NO levels when compared to control ($p > 0.05$, Fig. 8B).

3.4. Comet assay

The results obtained in the Comet assay show that native ConA at all concentrations tested was able to induce significant increases in the levels of DNA strand breaks in hemocytes of *D. melanogaster* larvae in relation to the negative control group (Table 1). All concentrations evaluated showed a significant increase in the means of Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF%), in a dose-dependent manner, when compared to the negative control group ($p \leq 0.001$). From the concentration of 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the damage increase was of the order of 50 %. At the 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the DF was higher than 70 % (Table 1).

To confirm whether ConA genotoxicity is mediated by binding to carbohydrate residues on the cell surface, ConA was tested after processes of CRD inhibition by mannose and denaturation. In this test system (Table 1) the DI and DF% values of the treatments performed did not differ from the results obtained in the negative control group ($p > 0.05$), indicating that the treatments with ConA α -mannose-inhibited, α -mannose only and denatured ConA did not cause significant lesions in the DNA strands.

4. Discussion

The present study aimed to evaluate the biochemical and genetic alterations resulting from the exposure of *D. melanogaster* to the ConA lectin. Previous studies have reported the toxicity and genotoxicity of ConA *in vitro* and *in situ* on tumor cells [33,40,41]; Therefore, this is the first report on molecular targets and mechanisms of toxicity and genotoxicity of ConA protein *in vivo*.

The exposure of flies to a diet containing ConA caused a significant decrease in survival and a deficit in locomotor activity. Lectins with mannose specificity bind to the glycoproteins of the peritrophic matrix of the insect intestine, interrupting the digestive processes and affecting the detoxification and antioxidant systems [42,43]. Therefore, the increase in reactive oxygen species (ROS) resulting from exposure to ConA could contribute to oxidative damage and behavioral impairment in flies by any of the mechanisms mentioned above [35]. They also corroborate CUNHA et al. [44] when they say that some plant-derived compounds induce toxicity in different insect orders by inducing oxidative stress.

It is possible to assume that the observed toxicity is due to the pro-oxidant condition established after the flies came into contact with the ConA lectin [45]. This effect is confirmed by markers that indicate toxicity at the molecular level, which showed a reduction in cell viability, evaluated here by MTT reduction, accumulation of lipid peroxidation end products (MAD) and reduction of nitric oxide levels in fly

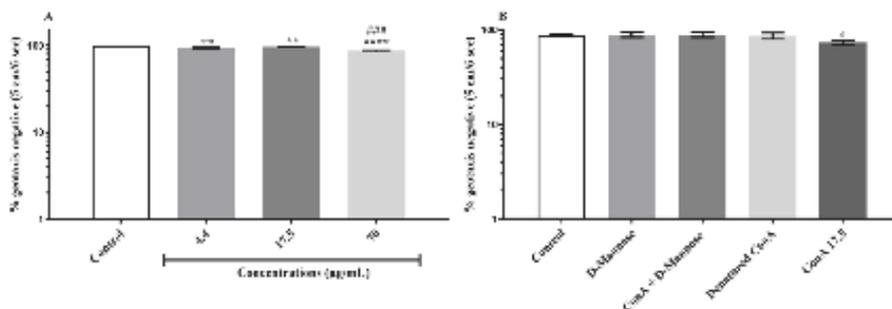


Fig. 3. (A) and (B) Effect on the locomotor system (negative geotaxis) of adults of *Drosophila melanogaster* treated with native, inhibited and denatured ConA. * Significant difference when compared to the negative control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$). # Significant difference between concentrations and control (### $p \leq 0.001$).

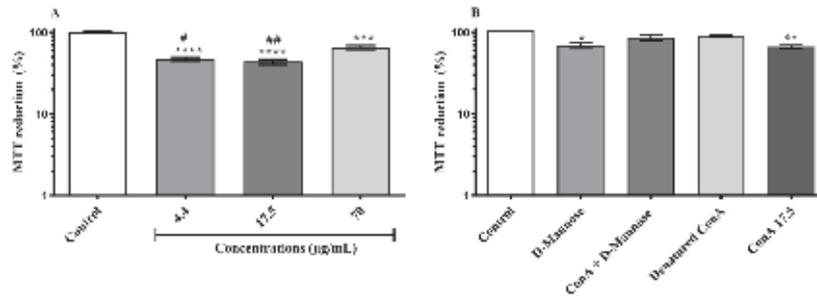


Fig. 4. (A) and (B) Effect on cell viability in fly homogenates treated with native, inhibited and denatured ConA. * Significant differences when compared to the control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). # Significant differences when compared to the 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group or between groups (# $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$). The absorbance was measured at 492 nm and 630 nm.

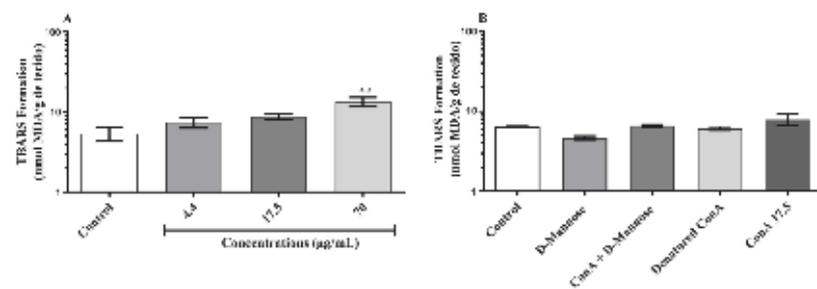


Fig. 5. (A) and (B) Malondialdehyde (MDA) content in fly homogenates treated with native, inhibited and denatured ConA. * Significant difference when compared to the control group (** $p \leq 0.01$). The absorbance was measured at 405 nm.

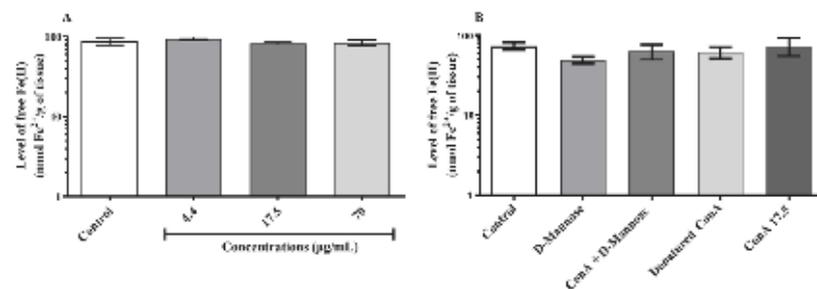


Fig. 6. (A) and (B) Free Fe²⁺ levels in fly homogenates treated with native, inhibited and denatured ConA. There was no significant difference between the groups when compared to the control ($p > 0.05$). The absorbance was measured at 492 nm.

homogenates, resulting from the oxidative stress caused by ConA.

Elevated levels of protein (PSH) and non-protein (NPSH) thiols and free Fe²⁺ also indicate of molecular toxicity. Thiols, evaluated by the levels of glutathione (GSH), represent most of the cellular antioxidant systems, with reducing properties that protect the cell against ROS, while Fe²⁺ is a pro-oxidant [35,46], which, did not have its level changed within the conditions established in this study.

Mitochondria, besides being responsible for regulating cellular energy production, in which the enzyme succinate dehydrogenase (SDH)

plays a central role in linking the tricarboxylic cycle to the electron transport chain, is also the main source of ROS production and nitrogen in living organisms, high levels of which can precede cell death. Several conditions can cause functional impairment in mitochondria, such as lipid peroxidation of the inner membrane and inhibition of SDH, resulting in cell death [34,47,48].

Lectins are able to affect mitochondrial metabolism by stimulating the production of ROS and causing cell death, as described by ANDRADE LUIZ et al. [7] using cMoL lectin in B16-F10 melanoma cells and

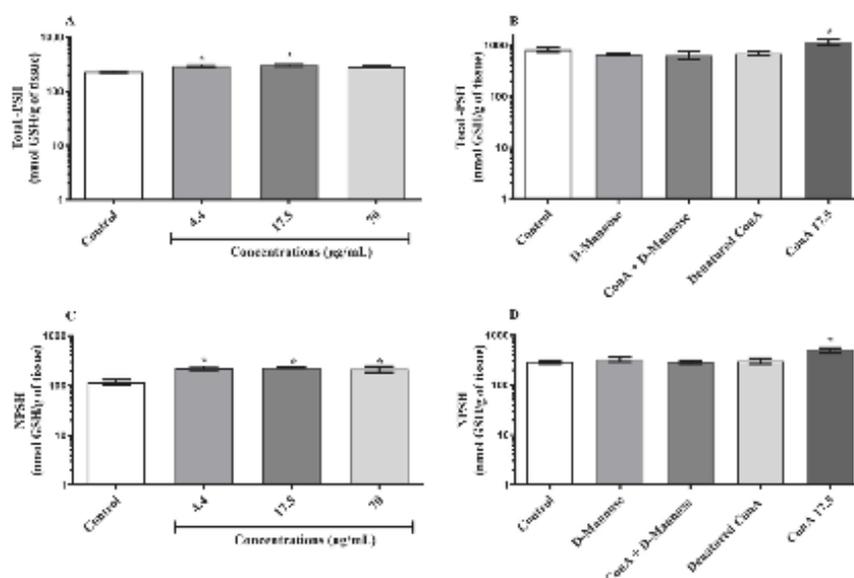


Fig. 7. (A) and (B) Total protein (PSH) and (C) and (D) non-protein (NPSH) thiol content in fly homogenates treated with ConA. * Significant differences when compared to the control group (* $p \leq 0.05$). The absorbance was measured at 405 nm.

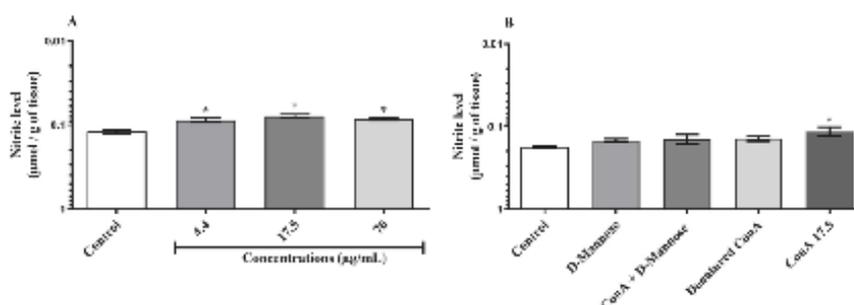


Fig. 8. (A) and (B) Amount of nitric oxide in homogenates from flies treated with native, inhibited and denatured ConA. * Significant differences when compared to the control group (* $p \leq 0.05$). The absorbance was measured at 540 nm.

Table 1

Mean genetic damage in hemocytes harvested from *Drosophila melanogaster* Oregon-R larvae of the Negative control (0.9 % NaCl), Positive control (Cyclophosphamide, 1.5 mg/mL), and different concentrations of the lectin from *Canavalia ensiformis* seeds (ConA).

Treatments	0	1	2	3	4	DI	DF %
Negative control	89.67 ± 0.58	3.00 ± 1.00	5.33 ± 1.15	2.00 ± 0.00	0	19.67 ± 1.53	10.33 ± 0.58
Positive control	17.67 ± 0.58	8.67 ± 0.58	14.33 ± 1.53	23.33 ± 0.58	35.00 ± 1.00	247.33* ± 3.79	82.33* ± 0.58
ConA 4.4 µg/mL	54.00 ± 1.00	15.33 ± 0.58	10.33 ± 0.58	10.33 ± 1.53	10.00 ± 1.00	107.00* ± 4.58	46.00* ± 1.00
ConA 17.5 µg/mL	40.67 ± 0.58	10.33 ± 0.58	16.00 ± 1.73	18.00 ± 1.00	15.00 ± 1.00	156.33* ± 2.89	59.33* ± 0.58
ConA 70.0 µg/mL	22.00 ± 1.00	11.33 ± 0.58	15.00 ± 1.00	19.67 ± 0.58	32.00 ± 1.00	228.33* ± 4.16	78.00* ± 1.00
D-Mannose 0.1 M	91.33 ± 1.15	2.67 ± 1.15	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	0	17.67 ± 1.15	8.67 ± 1.15
ConA 17.5 µg/mL + D-mannose 0.1 M	92.00 ± 0.00	2.67 ± 0.58	2.00 ± 0.00	3.33 ± 0.58	0	16.67 ± 1.15	8.00 ± 0.00
ConA 17.5 µg/mL at 85 °C	91.33 ± 1.53	1.33 ± 0.58	4.67 ± 2.52	2.67 ± 1.15	0	18.67 ± 2.08	8.67 ± 1.53

Damage level: zero (0) represents absence of genetic damage and 1–4 are the increasing levels of genetic damage.

Abbreviations: SD, standard deviation; DI, Damage Index; DF%, Damage Frequency; ConA, lectin from *C. ensiformis*.

* Significant differences ($p \leq 0.001$) compared to negative control group.

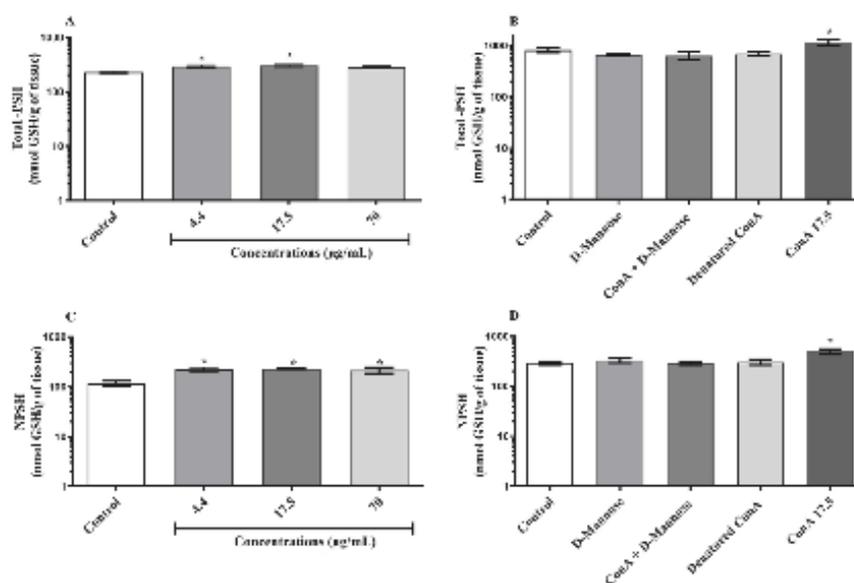


Fig. 7. (A) and (B) Total protein (PSH) and (C) and (D) non-protein (NPSH) thiol content in fly homogenates treated with ConA. * Significant differences when compared to the control group (* $p \leq 0.05$). The absorbance was measured at 405 nm.

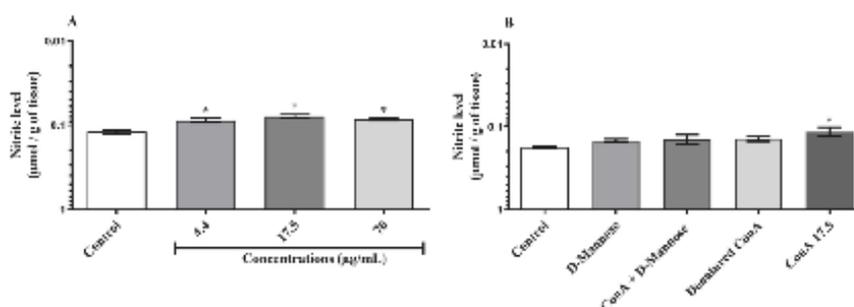


Fig. 8. (A) and (B) Amount of nitric oxide in homogenates from flies treated with native, inhibited and denatured ConA. * Significant differences when compared to the control group (* $p \leq 0.05$). The absorbance was measured at 540 nm.

Table 1

Mean genetic damage in hemocytes harvested from *Drosophila melanogaster* Oregon-R larvae of the Negative control (0.9 % NaCl), Positive control (Cyclophosphamide, 1.5 mg/mL), and different concentrations of the lectin from *Canavalia ensiformis* seeds (ConA).

Damage levels (mean \pm SD)							
Treatments	0	1	2	3	4	DI	DF %
Negative control	89.67 \pm 0.58	3.00 \pm 1.00	5.33 \pm 1.15	2.00 \pm 0.00	0	19.67 \pm 1.53	10.33 \pm 0.58
Positive control	17.67 \pm 0.58	8.67 \pm 0.58	14.33 \pm 1.53	23.33 \pm 0.58	35.00 \pm 1.00	247.33* \pm 3.79	82.33* \pm 0.58
ConA 4.4 µg/mL	54.00 \pm 1.00	15.33 \pm 0.58	10.33 \pm 0.58	10.33 \pm 1.53	10.00 \pm 1.00	107.00* \pm 4.58	46.00* \pm 1.00
ConA 17.5 µg/mL	40.67 \pm 0.58	10.33 \pm 0.58	16.00 \pm 1.73	18.00 \pm 1.00	15.00 \pm 1.00	156.33* \pm 2.89	59.33* \pm 0.58
ConA 70.0 µg/mL	22.00 \pm 1.00	11.33 \pm 0.58	15.00 \pm 1.00	19.67 \pm 0.58	32.00 \pm 1.00	228.33* \pm 4.16	78.00* \pm 1.00
D-Mannose 0.1 M	91.33 \pm 1.15	2.67 \pm 1.15	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	0	17.67 \pm 1.15	8.67 \pm 1.15
ConA 17.5 µg/mL + D-mannose 0.1 M	92.00 \pm 0.00	2.67 \pm 0.58	2.00 \pm 0.00	3.33 \pm 0.58	0	16.67 \pm 1.15	8.00 \pm 0.00
ConA 17.5 µg/mL at 85 °C	91.33 \pm 1.53	1.33 \pm 0.58	4.67 \pm 2.52	2.67 \pm 1.15	0	18.67 \pm 2.08	8.67 \pm 1.53

Damage level: zero (0) represents absence of genetic damage and 1–4 are the increasing levels of genetic damage.

Abbreviations: SD, standard deviation; DI, Damage Index; DF%, Damage Frequency; ConA, lectin from *C. ensiformis*.

* Significant differences ($p \leq 0.001$) compared to negative control group.

FERNANDES et al. [49] with the *Cratylia mollis* seed lectin that induced the death of *Trypanosoma cruzi* epimastigote. The reduction in viable cells may be a result of inhibition of SDH activity, assessed here by the reduction of MTT, parallel to the increase in MDA levels, as described for *D. melanogaster* treated with the herbicide Paraquat [34].

Since nitric oxide (NO) is a diffusible messenger molecule that acts on the nervous and immune system of insects, in *Drosophila* it is well established that in the larval stage it exerts an antiproliferative effect and in adults, despite the scarcity of information, it acts on the brain [50–52]. In this work, ConA significantly reduced the production of endogenous NO in flies. This reduction may impair its signaling role, however, it is not possible to state whether the reduced levels affected the survival rate and locomotor performance of the flies, although further studies are needed. Decreased NO content has also been described in *D. melanogaster* treated with the fungicide Mancozeb [53] and *Garcinia kola* seeds [54].

In insects, pro-oxidant substances can cause an imbalance in the antioxidant enzymatic system, causing a decrease in the bioavailability of NO, resulting from the increase in the levels of the superoxide anion (O_2^-) that reacts with NO, generating peroxynitrite (ONOO $^-$), a potent oxidant agent that causes damage to macromolecules, including single-stranded DNA breakage, has an effect upon mitochondrial function and triggers cell death [53–57]. Therefore, the decrease in NO levels may have potentialized the pro-oxidant effect of ConA and consequently the degradation of the end products of lipid peroxidation (MDA) and reduction of cell viability (MTT), as already reported for *D. melanogaster* treated with the fungicide Mancozeb [53].

Proposing that oxidative stress is one of the main factors inducing DNA damage, it is not surprising that ConA also acts as a genotoxic agent [22,57]. Several tests can be used to assess the genotoxic potential of plant extracts and isolated compounds [58,59]. In this work, genotoxicity was evaluated by the 'Single-Cell Gel (SGS) assay', which is used to detect DNA double-strand breaks, single-strand breaks, alkali-labile sites, DNA-DNA/DNA-protein cross-linking, and incomplete excision repair sites that, after processing, can result in mutations. Unlike mutations, detected lesions are subject to corrections [60].

Our results support ConA's ability to cause DNA damage as detected by the Comet assay. Although genotoxic tests are reported to provide information on the ability of molecules to cause changes in the sequence and organization of the cellular genome [61], *in vivo* studies involving lectins are still limited. It was found that only two studies brought this report. In the first, the genotoxicity of the *Microgramma vacciniifolia* lectin (MvRL) was analyzed by the comet and indirectly measured in mouse liver samples, but it was not genotoxic [62]. A similar result was found by RAMOS et al. [63] who using *Schinus terebinthifolia* lectin (Stell) observed the non-formation of micronuclei in mouse bone marrow cells. CHANG et al. [41] and VERAS et al. [61] reported that the biological activity of lectins is related to the specificity of binding to carbohydrate residues on the cell surface, through the CRD, and their toxic activity is selective.

Evidence linking ROS induction and genotoxic effects after exposure to lectins is demonstrated in *in vitro* studies. Using HeLa cancer cells exposed to *Glycine max* L lectin (SBL), high levels of ROS and DNA damage (Comet assay) were detected [64]. Cytotoxic and genotoxic studies with ConA demonstrated a high rate of DNA damage (Comet assay) in MOLT-4, HL-60, MCF-7 cells and an increase in ROS levels, both in a dose-response manner [33,40]. The authors also verified a decrease in cell viability and suggest that the production of ROS may contribute to cell death induction.

In all tests used here, the α -mannose-inhibited and denatured ConA were neither toxic nor genotoxic to the model organism *D. melanogaster*, which indicates the participation of the CRD and the three-dimensional structure in this process. Data from this analysis support the hypothesis that the ConA lectin is able to interact with carbohydrate/glycosylated receptors triggering the biological activities of this protein [10,65], when they reported that the toxic activity of plant lectins is mediated by

the recognition and binding to glycoconjugates distributed on the cell surface through their carbohydrate binding sites.

5. Conclusion

Our study demonstrated that the ingestion of native ConA induced locomotor impairment and death in *D. melanogaster*, which occurred in parallel with oxidative stress evidenced by increased levels of protein and non-protein thiols, decreased levels of nitric oxide that contributed to the oxidative damage to membranes and reduced cell viability. The pro-oxidant effect of ConA may have activated mechanisms that caused damage to the DNA of this organism. Tests with both α -mannose-inhibited and denatured ConA indicated that the mechanisms by which ConA induces oxidative stress may be related to CRD and its structural integrity. These data draw attention to the toxic and genotoxic effects of ConA on *D. melanogaster* and point to the importance of toxicological evaluations of substances extracted from plants with therapeutic potential, before their pharmacological use. Thus, it is suggested that future research addresses the potential risks of ConA in other organisms.

CRedit authorship contribution statement

A.M.O. Santos, A.E. Duarte, C. Rohde, C.S. Teixeira, M. Deprá and V. L.S. Valente designed the research. A.M.O. Santos and M.H.C. Santos purified the lectins. A.M.O. Santos, A.P. Silva, E.M. Amorim, D.G. Silva, M.G. Pereira and S.L. Santana performed the genotoxic experiments. A.M.O. Santos and A.R. Costa carried out the toxicological experiments. A.M.O. Santos, A.E. Duarte, C. Rohde and C.S. Teixeira analyzed the data with contributions from other authors. A.M.O. Santos, C. Rohde and C.S. Teixeira wrote the article with contributions and approval from all authors.

Declaration of competing interest

All authors of this manuscript declare no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (141835/2019-2 A.M.O. Santos, 426685-2018-0 V.L.S. Valente, 309863/2018-0 C. Rohde), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (APQ-0431-2.01/19 C. Rohde).

References

- H.A.A.C.N. Simionato, M.F.S. Macêdo, A.C.R.D. Soterrino, L.C.R.B. Coelho, S.R. B. de Medeiros, Evaluation of the genotoxic potential of *Besleria nusslandia* leaf lectin (BnLL), *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 303–308, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.010>.
- E.M. Amorim, S.L. Santana, A.S. Silva, N.C. Aquino, E.R. Silveira, R.M. Ximenes, C. Rohde, Genotoxic assessment of the dry decoction of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) leaves in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by the comet and SMART assays, *Environ. Mol. Mutagen.* 61 (2020) 329–337, <https://doi.org/10.1002/em.22332>.
- J.R. Vilar, F.L. Ferreira, P.H. Perri, L.A. Guillo, L.Chem Chem, Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice, *Braz. J. Biol.* 68 (2008) 141–147, <https://doi.org/10.1590/s1519-69842008000100020>.
- L.A.D.M.M. Bolim, M.F.S. Macêdo, H.A. Simionato, T.H. Napolitano, I. Pelzmeserwalb, C.A.F. Aroh, L.C.R.B. Coelho, S.R.B. Medeiros, P.M.G. Paiva, Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin, *J. Food Sci.* 76 (2011) T83–T88, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01990.x>.
- E.G. de Mejía, V.I. Prinsara, Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 425–445, <https://doi.org/10.1080/10408390591034445>.
- C. Valadez-Vega, O. Lugo-Magaña, J.A. Morales-González, L. Delgado-Olivares, J. A. Inguarido-Vega, M. Sánchez-Ouñá, L. López-Contreras, M. Bautista, C. Velázquez-González, Phytochemical, cytotoxic, and genotoxic evaluation of

- protein extract of *Ananasurus hypochondriacus* seeds. *CyTA - J. Food*. 19 (2021) 703–709. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1971771>.
- [7] L. Andrade Luz, F.A. Rosato, R.A.P. Costa, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B. B. Coelho, Cytotoxicity of the conopsea lectin (CoLc) to B16-F10 melanoma cells. *Toxicol. in Vitro* 44 (2017) 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.019>.
- [8] M. Yasuda, E.J.M. Van Damme, 130 years of plant lectin research. *Glycoconj. J.* 37 (2020) 533–551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>.
- [9] I. Lagerda-Dias, A.M. Guzman-Partida, L. Vazquez-Morales, Legume lectins: proteins with diverse applications. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>.
- [10] B. Cerada, V. Pinto-Junior, V. Osterse, K. Nascimento, ConA-like lectins: high similarity proteins as models to study Structure/Biological activities relationships. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 30. <https://doi.org/10.3390/ijms20010300>.
- [11] N. Sharon, H. Liu, Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4 (1990) 3198–3208. <https://doi.org/10.1096/physi.4.14.2227211>.
- [12] A. Mishra, A. Behra, S. Mawarwal, A. Kumar, L. Naik, S.S. Mohanty, D. Maras, P. Dokania, A. Mishra, S.K. Patra, R. Dhiman, Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem. Toxicol.* 134 (2019), 110827. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>.
- [13] R.E.S. López, *Conavalia ensiformis* (L.) DC (Fabaceae). *Rev. Hítox.* 7 (2012) 146–154.
- [14] L.C. Cavalcanti, G.S.F. Soares, C.B.L. Castro, R.C.A. Guedes, Efeito eletrofisiológico cerebral da lectina de *Conavalia ensiformis* (ConA): interação com o ácido ascórbico em ratos. *Rev. Expressão Científica Saúde* 3 (2018) 28. <https://doi.org/10.25191/rex.v3n1.2194>.
- [15] W. Li, J. Yu, H. Xu, J. Bao, Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 (2011) 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.072>.
- [16] I. Sprawa, S. Golawski, T. Parzycki, A. Golawski, P. Czerniewicz, H. Szytykiewicz, Mechanism of entomotoxicity of the concanavalin A in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). *J. Insect Sci.* 14 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1093/jisem/ieu094>.
- [17] T.T.A. Cavalcante, B.A.M. Rocha, V.A. Carneiro, F.V.S. Arruda, A.S.F. Nascimento, N.C. Sá, K.S. Nascimento, B.S. Cerada, E.H. Teixeira, Effect of lectins from *Conavalia ensiformis* against oral streptococci. *Molecules* 16 (2011) 3530–3543. <https://doi.org/10.3390/molecules16083530>.
- [18] Z. Liu, X. Li, X. Ding, Y. Yang, In silico and experimental studies of concanavalin A insights into its antiproliferative activity and apoptotic mechanism. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 134–145. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8694-9>.
- [19] C.A.A. Gadelha, F.R.M.B. Moreno, T. Sant’-Gadelha, J.B. Cajastrias, B.A.M. Rocha, A.M.S. Assery, M.R. Lima Mota, N.V. Pinto, A.V. Passos Meireles, J.C. Borges, E. T. Freitas, P. Canduri, E.P. Souza, F. Delatorre, D.N. Criddle, W.F. de Azevedo, E. S. Cerada, Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Conavalia maritima*. *J. Struct. Biol.* 152 (2005) 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.07.012>.
- [20] C.M.L. Melo, H. Melo, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.B. Silva, V.R.A. Pereira, Mitogenic response and cytokine production induced by concanavalin A lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scand. J. Immunol.* 73 (2011) 112–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02490.x>.
- [21] B. Liu, Y. Cheng, B. Zhang, H. Bian, J. Bao, Polyglutamine cytonema lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett.* 275 (2009) 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.042>.
- [22] M. Alaraby, E. Demir, J. Domenech, A. Velázquez, A. Hernández, R. Marcos, In vivo evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure to cobalt nanoparticles using *Drosophila melanogaster*. *Environ. Sci. Nano* 7 (2020) 610–622. <https://doi.org/10.1039/C9EN06900G>.
- [23] M.D. Rand, S.L. Montgomery, L. Prince, D. Voochikina, Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model. *Curr. Protoc. Toxicol.* 59 (2014) 1–20. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0112a59>.
- [24] M. Augustyniak, M. Gładysz, M. Dziwiewicka, The comet assay in insects - status, prospects and benefits for science. *Mutat. Res.* 767 (2016) 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.mr.2015.09.001>.
- [25] K. Panchal, A.K. Thawel, *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 1331–1345. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.001>.
- [26] Z. Mirzoyan, M. Sollazzo, M. Allocca, A.M. Valenza, D. Grifoni, P. Bellotti, *Drosophila melanogaster*: a model organism to study cancer. *Front. Genet.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>.
- [27] D. Baidridge, M.F. Wiegler, A.N. Bowman, S. Yamamoto, T. Schell, S.C. Pak, J. H. Postlethwait, J. Shin, L. Solnick-Krezel, H.J. Bellem, M. Westerfield, Model organisms contribute to diagnosis and discovery in the undiagnosed diseases network: current state and a future vision. *Ophthalmol. J. Rare Dis.* 16 (2021) 206. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01839-9>.
- [28] M.E. Fortini, M.P. Skupski, M.S. Boguski, K.K. Hariharan, A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J. Cell Biol.* 150 (2000) F23–F30. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.F23>.
- [29] U.B. Pandey, C.D. Nichols, Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63 (2011) 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>.
- [30] B. Ugar, K. Chen, H.J. Bellem, *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis. Model. Mech.* 9 (2016) 235–244. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>.
- [31] V.F. Santos, A.C.J. Araújo, P.R. Freitas, A.L.P. Silva, A.L.E. Santos, B.A. Matias Rocha, R.R.S. Silva, D.V. Almeida, W. Garcia, H.D.M. Coutinho, C.S. Teixeira, Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multi-drug-resistant strains when combined with *Conavalia ensiformis* lectin. *Microb. Pathog.* 152 (2021), 104639. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104639>.
- [32] U.K. Lemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [33] G.V. Falcão-Martins, A.L. Silveira, B.C. Cavalcanti, M.V. Ramos, M.G. Moraes, C. Passos, D.A.M. Araújo, Antiproliferative effects of lectins from *Conavalia ensiformis* and *Conavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol. Vitro* 26 (2012) 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.017>.
- [34] R.G.S. Nunes, P.S. Pereira, G.O. Hekofinski, R.R. Fideles, G.S. Silva, M. Ibrahim, L. M. Barros, F.A.B. Cunha, K.E. Lukong, L.R.A. Menezes, A. Toppo, A.E. Duarte, J. P. Kamdem, Possible involvement of transcriptional activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in the protective effect of caffeic acid on paraquat-induced oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 157 (2019) 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.pestip.2019.03.017>.
- [35] A.R. Costa, J.R.L. Silva, T.J.S. Oliveira, T.G. Silva, P.S. Pereira, E.F.O. Borba, E. S. Brito, P.R.V. Ribeiro, J.W. Almeida-Bezerra, J.T.C. Júnior, L.R.A. Menezes, J. P. Kamdem, A.E. Duarte, L.M. Barros, Phytochemical profile of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) and the cytotoxic and toxicological evaluation of its bark and leaf extracts. *S. Afr. J. Bot.* 135 (2020) 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.017>.
- [36] V.M.B. Filho, E.P. Wacznak, J.P. Kamdem, A.O. Abolaj, S.R. Lacerda, J.G.M. Costa, L.R.A. Menezes, A.A. Boligon, M.L. Athayde, J.B.T. Rocha, T. Posser, Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). *Ind. Crop. Prod.* 55 (2014) 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.021>.
- [37] M.M. Baylisk, H.V. Shmilul, M.P. Lylyk, O.M. Vytvytska, J.M. Storey, K.R. Storey, V.I. Lushchak, Alpha-ketoglutarate attenuates toxic effects of sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 (2015) 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.016>.
- [38] C.J. Verçosa, A.V. Moraes Filho, L.F.A. Castro, R.G. Santos, K.S. Cunha, D.M. Silva, A.C.L. Garcia, J.A. Navoni, V.S. Amarel, C. Robide, Validation of comet assay in Oregon-R and wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semi-arid region. *Biotoxicol. Environ. Saf.* 141 (2017) 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2017.03.024>.
- [39] A.R. Collins, A.A. Oczek, G. Brunborg, I. Gaivao, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. G. Smith, R. Steina, The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 25 (2008) 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gmn051>.
- [40] G.V. Falcão-Martins, A.L. Silveira, M.V. Ramos, L.F. Marques-Santos, D.A. M. Araújo, Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25 (2011) 290–296. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.20388>.
- [41] C.P. Chang, M.C. Yang, H.S. Liu, Y.S. Lin, H.Y. Lei, Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine *in situ* hepatoma model. *Hepatology* 45 (2007) 286–296. <https://doi.org/10.1002/hep.21509>.
- [42] P.R. Pereira, A.C.N.T.F. Corbis, M.A. Vericimo, V.M.F. Paschoalis, Tarin, a potential immunomodulator and COX-inhibitor lectin found in Taro (*Colocasia esculenta*). *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 878–891. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12358>.
- [43] N. Sarvion, C. Nardou, G. Febvey, A.M.R. Gatehouse, Y. Rahbè, Binding of the insecticidal lectin concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *J. Insect Physiol.* 50 (2004) 1137–1150. <https://doi.org/10.1016/j.jinphys.2004.10.005>.
- [44] F.A.B. Cunha, G.L. Wallan, A.I. Pinho, M.E.M. Nunes, N.F. Leite, S.R. Tintino, G. M. Costa, M.L. Athayde, A.A. Boligon, H.D.M. Coutinho, A.B. Pereira, T. Posser, J. L. Franco, *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Res. (Camb)* 4 (2015) 634–644. <https://doi.org/10.1039/C4TX00162A>.
- [45] A.I. Pinho, G.L. Wallan, M.E.M. Nunes, N.F. Leite, S.R. Tintino, L.C. Cruz, F.A. B. Cunha, J.G.M. Costa, H.Douglas Melo Coutinho, T. Posser, J.L. Franco, Pungent activity of the *Páidium guajava* var. *pomifera* (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2014 (2014), 696785. <https://doi.org/10.1155/2014/696785>.
- [46] D.B.D. Elias, R.M. Freitas, R.P. Gonçalves, H.Y.F. Magalhães, J.H. de Sousa, S.M. M. Magalhães, Avaliação das concentrações de malonaldeído e nitrato em pacientes com anemia falciforme em tratamento ao não com hidroxiureia. *Enxente (São Paulo)* 8 (2010) 414–418.
- [47] T.R. Figueira, M.H. Barros, A.A. Camargo, R.F. Castilho, J.C.B. Ferreira, A. J. Kowaltowski, F.E. Sique, N.C. Souza-Pinto, A.E. Verón, Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 2029–2074. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4729>.
- [48] G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87 (2007) 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.0013.2006>.
- [49] M.P. Fernandes, N.M. Inada, M.R. Chiaratti, F.P.B. Araújo, F.V. Meirelles, M.T. S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.J.M. Alves, F.R. Gadelha, A.E. Vercesi, Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by cratylia mollis seed lectin. *J. Biochem. Biophys.* 42 (2010) 69–78. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9268-2>.
- [50] G. Rinkolopov, J. Banerji, B. Kuzin, Nitric oxide and *Drosophila* development. *Cell Death Differ.* 6 (1999) 956–963. <https://doi.org/10.1038/cd.4400577>.

- [51] S.C. Wu, C.W. Liao, R.L. Pan, J.L. Jiang, Infection-induced intestinal oxidative stress triggers organ-to-organ immunological communication in *Drosophila*, *Cell Host Microbe* 11 (2012) 410–417, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.004>.
- [52] U. Müller, The nitric oxide system in insects, *Prog. Neurobiol.* 51 (1997) 363–381, [https://doi.org/10.1016/S0969-0958\(96\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0969-0958(96)00067-6).
- [53] M.A. Saraiva, E. Ross Ávila, G.F. Silva, G.E. Macedo, N.R. Rodrigues, P.B. Vieira, M.S. Nascimento, R.S. Picoloto, L.K. Martins, N.R. Carvalho, J.L. Franco, T. Pomer, Exposure of *Drosophila melanogaster* to mancozeb induces oxidative damage and modulates Nrf2 and HSP70/83, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2016 (2016), 5456928, <https://doi.org/10.1155/2016/5456928>.
- [54] G. Öböc, O.B. Ögünçay, M.T. Ojéade, S.F. Akomolafe, Effect of dietary inclusions of bitter kola seed on goitric behavior and oxidative stress markers in *Drosophila melanogaster*, *Food Sci. Nutr.* 6 (2018) 2177–2187, <https://doi.org/10.1002/fsn3.702>.
- [55] C. Carvalho, P.I. Moreira, Oxidative stress: a major player in cerebrovascular alterations associated to neurodegenerative events, *Front. Physiol.* 9 (2018) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00896>.
- [56] A. Magenta, S. Greco, M.C. Capogrossi, C. Gastano, F. Martelli, Nitric oxide, oxidative stress, and p66Shc interplay in diabetic endothelial dysfunction, *Biosci. Res. Int.* 2014 (2014) 1–16, <https://doi.org/10.1155/2014/193095>.
- [57] U. Forstermann, W.C. Sessa, Nitric oxide synthase: regulation and function, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 829–837, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs394>.
- [58] A.V.D. Binotto, L.C.D. Oliveira, A. Silva Fernandes, L.S. Silva, J.H. Vêras, C. G. Cardoso, C.R.E. Silva, A.V. Moraes Filho, C.C. Carneiro, L. Chen-Chen, Recombinogenic, genotoxic, and cytotoxic effects of azathioprine using in vivo assays, *J. Toxic. Environ. Health A* 84 (2020) 261–271, <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1864692>.
- [59] G.R. Villas Boas, F.H. Souza de Araújo, J. Moreira Marcelino, L.H. Almeida Castro, A. P. Stefanillo da Silveira, R. Silva Nacer, F. Rodrigues de Souza, C.A.L. Cardoso, R. Boengen de Lacerda, Z. de R. Guterra, S.A. Oesterreich, Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.HBKG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects, *Food Funct.* 9 (2018) 3707–3717, <https://doi.org/10.1039/c8fo01017j>.
- [60] E. Cordell, M. Siganzi, F. Pacchiarotti, Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing, *Toxicol. Res. (Camb)* 10 (2021) 66–78, <https://doi.org/10.1093/toxres/tfab093>.
- [61] J.H. Vêras, C.G. Cardoso, S.C. Puga, A.V.B. Melo, R.R. Roma, R.R. Santos Silva, C. S. Teixeira, L. Chen-Chen, Lactose-binding lectin from vanilla macrocarpa seeds induces in vivo angiogenesis via VEGF and TNF- α expression and modulates in vitro doxorubicin-induced genotoxicity, *Biochimie* 194 (2022) 55–66, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.12.011>.
- [62] G.C. Silva, A.M. Oliveira, J.C.B. Machado, M.R.A. Ferreira, P.I. Medeiros, L.A. L. Soares, L.A. Souza, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, Toxicity assessment of saline extract and lectin-rich fraction from *Microgramma vacciniifolia* rhizome, *Toxicol. 187* (2020) 65–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxicom.2020.08.021>.
- [63] D.B.M. Ramos, M.T.M.F. Araújo, T.C.L. Araújo, O.G.S. Neto, M.G. Silva, Y.A. Silva, D.J.L. Torres, L.L.S. Patriota, C.M.L. Melo, V.M.B. Lorena, P.M.G. Paiva, R. L. Mendes, T.H. Napoleão, Evaluation of antitumor activity and toxicity of schima *terebinthifolia* leaf extract and lectin (Stell.) in sarcoma 180-bearing mice, *J. Ethnopharmacol.* 233 (2019) 148–157, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.011>.
- [64] P.K. Panda, S. Mukhopadhyay, B. Behra, C.S. Bhoi, S. Dey, D.N. Das, N. Sinha, A. Elsayy, K. Pramanik, T.K. Maiti, S.K. Bhatta, Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway, *Life Sci.* 111 (2014) 27–35, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.004>.
- [65] R.S. Cavada, V.J.S. Ostera, C.F. Louro, V.R. Pinto-Junior, M.V. Oliveira, M.T. L. Silva, R.B. Leal, K.S. Nascimento, One century of ConA and 40 years of ConE research: a structural review, *Int. J. Biol. Macromol.* 134 (2019) 901–911, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.105>.

CAPÍTULO 2

Manuscrito em preparação a ser submetido na revista *Chemosphere*

Evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure of *Drosophila melanogaster* to the AgIn₅Se₈@ZnS-GSH nanoparticle

CAPÍTULO 3

Manuscrito em preparação para ser submetido na revista
International Journal of Biological Macromolecules

**AgIn₅Se₈@ZnS quantum dots conjugated with *Myracrodruon urundeuva*
(MuHL) lectins as a potential fluorescent nano-tool for glycobiological
studies in *Drosophila melanogaster***

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo resultou na obtenção de um nanossistema fluorescente, alcançado por meio da bioconjugação por adsorção da lectina MuHL com os pontos quânticos de calcopirita $\text{AgIn}_5\text{Se}_8@ZnS\text{-GSH}$ ($\text{AISe}@ZnS$). Os resultados indicam que o sistema $\text{AgIn}_5\text{Se}_8@ZnS\text{-MuHL}$ foi conjugado por adsorção após a reação, evidenciado pelo aumento do tamanho de partícula e maior homogeneidade em comparação com os pontos quânticos não conjugados. Além disso, ao longo de um período de até 30 dias, as propriedades ópticas e funcionais do sistema $\text{AgIn}_5\text{Se}_8@ZnS\text{-MuHL}$ foram mantidas, demonstrando alta estabilidade coloidal e funcional.

Na avaliação de toxicidade utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo, foi observado que as lectinas ConA e MuHL apresentaram toxicidade e genotoxicidade, com ausência desses efeitos nas formas inibidas por D-manose e desnaturadas, sugerindo que essa atividade depende do DRC das lectinas. Acredita-se que a interação do DRC das lectinas com N-glicanos complexos e quitina na matriz peritrófica do inseto interfira nos processos de digestão e absorção de nutrientes, levando ao estresse oxidativo e danos ao DNA. Por outro lado, os pontos quânticos $\text{AISe}@ZnS$ não demonstraram toxicidade, estresse oxidativo ou danos ao DNA, destacando sua biocompatibilidade e potencial biotecnológico como uma ferramenta não tóxica para estudos em *D. melanogaster*. No entanto, o bioconjugado $\text{AgIn}_5\text{Se}_8@ZnS\text{-MuHL}$ mostrou-se tóxico e genotóxico, provavelmente devido à interação entre o DRC da MuHL e os resíduos de carboidratos na superfície celular.

Os resultados sugerem que os pontos quânticos $\text{AISe}@ZnS$ são uma ferramenta segura para estudos em *D. melanogaster* e que sua bioconjugação com lectinas MuHL pode elucidar os alvos moleculares e os mecanismos envolvidos nos efeitos tóxicos, com vistas à aplicação futura dessa lectina na área clínica.