

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA

Murilo de Araújo Lellis

Métodos biofísicos utilizados para isolamento de toxinas botrópicas com potencial antitumoral

Uberlândia

2025

Murilo de Araújo Lellis

Métodos biofísicos utilizados para isolamento de toxinas botrópicas com potencial antitumoral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Física Médica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristine Neves Mamede

Uberlândia

2025

Murilo de Araújo Lellis

Métodos biofísicos utilizados para isolamento de toxinas ofídicas com potencial antitumoral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Física da Universidade Federal
de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Física
Médica.

Uberlândia, 23 de setembro de 2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Carla Cristine Neves Mamede - UFU
Orientadora

Profa. Dra. Carine Firmino Carvalho-Roel - UFU

Me. Leonardo Levy Dos Santos – Fundação Pio XII

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido eu continuar mesmo nos momentos mais complicados.

Aos meus pais João Camilo de Lellis e Keila Aparecida de Araújo Lellis que me incentivaram e não me deixaram desistir, ao meu irmão Danilo e minha irmã Kamila que sempre me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui e aos meus sobrinhos quais eu sempre pensei nos momentos mais difíceis.

À minha namorada Ana Laura Vian, a qual me apoiou e foi minha família em Uberlândia, sem você tudo teria sido muito mais difícil.

À Prof.^a Carla Cristine Neves Mamede que me deu a oportunidade de produzir e que apesar das dificuldades nunca desistiu de mim e sempre me apoiou.

Aos meus amigos da graduação e do cheerleading, em especial ao Leonardo Levy e ao Enzo Della, que fizeram parte de quase toda a minha graduação e que me proporcionaram experiências incríveis durante este processo.

**“É justo que muito custe o que muito
vale”**

(Santa Teresa D'Ávila)

RESUMO

Introdução: As toxinas ofídicas, compostos proteicos secretados em glândulas de veneno de serpentes peçonhentas, apresentam alto potencial de aplicação farmacológica e são extensamente purificadas e caracterizadas em laboratório através de técnicas físico-químicas.

Objetivos: Identificar na literatura científica proteínas isoladas da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* que apresentem efeito antitumoral e caracterizar os métodos biofísicos utilizados para purificação de toxinas ofídicas com potencial antitumoral. **Metodologia:** Para a

identificação das proteínas de peçonhas de serpentes botrópicas com potencial antitumoral foi feita uma pesquisa bibliográfica, seguindo o método PRISMA. A pesquisa foi baseada nos seguintes termos de busca, em português e inglês: “*Bothrops* AND (antitumoral OR anticancer OR tumor)”. **Resultados e Discussão:** A pesquisa bibliográfica resultou na análise detalhada de 43 artigos. Foram encontradas 25 proteínas com potencial antitumoral isoladas de peçonhas botrópicas. Em todos os trabalhos analisados, as proteínas foram isoladas através da técnica de cromatografia líquida em coluna, utilizando diferentes modos de separação. Cromatografias de exclusão iônica foram predominantes no isolamento de toxinas ofídicas, sendo utilizadas em 19 das 25 proteínas analisadas. As cromatografias de exclusão molecular foram utilizadas nas etapas de fracionamento inicial de 12 toxinas diferentes e na etapa de refinamento de 1 proteína, enquanto cromatografias interação hidrofóbica em fase normal foi utilizada em 8 proteínas e a interação hidrofóbica em fase reversa foram utilizadas para análise de pureza das proteínas em 10 diferentes proteínas. Já as cromatografias de afinidade foram aplicadas para isolar 9 toxinas. Além de cromatografia, a espectrofotometria e eletroforese também foram usadas para caracterização de toxinas ofídicas com potencial antitumoral. **Conclusão:** As técnicas cromatográficas mostraram-se eficazes na purificação das toxinas, e os resultados desta pesquisa podem orientar futuros estudos na escolha dos métodos mais adequados para o isolamento de proteínas de interesse biomédico.

Palavras-chaves: Cromatografia, *Bothrops*, Eletroforese, Purificação.

ABSTRACT

Introduction: Snake venom toxins, protein compounds secreted by the venom glands of poisonous snakes, have high potential for pharmacological applications and are extensively purified and characterized in laboratories through physicochemical techniques. **Objectives:** To

identify, in the scientific literature, proteins isolated from the venom of *Bothrops* species that exhibit antitumor effects and to characterize the biophysical methods used for the purification of snake venom toxins with antitumor potential.

Methodology: To identify proteins from *Bothrops* snake venoms with antitumor potential, a bibliographic search was conducted following the PRISMA method. The search was based on the following terms, in Portuguese and English: “Bothrops AND (antitumoral OR anticancer OR tumor)”.

Results and Discussion: The literature review resulted in a detailed analysis of 43 articles. Twenty-five proteins with antitumor potential were identified from *Bothrops* venoms. In all analyzed studies, proteins were isolated using liquid column chromatography with different separation modes. Ion-exchange chromatographies were predominant in the isolation of snake venom toxins, being used in 19 of the 25 analyzed proteins. Size-exclusion chromatography was used in the initial fractionation steps of 12 different toxins and in the refinement stage of 1 protein, while normal-phase hydrophobic interaction chromatography was used for 8 proteins, and reverse-phase hydrophobic interaction chromatography was used for purity analysis in 10 different proteins. Affinity chromatography was applied to isolate 9 toxins. In addition to chromatography, spectrophotometry and electrophoresis were also used for the characterization of snake venom toxins with antitumor potential.

Conclusion: Chromatographic techniques proved to be effective in the purification of toxins, and the results of this research may guide future studies in selecting the most appropriate methods for the isolation of proteins of biomedical interest.

Keywords: Chromatography, *Bothrops*, Electrophoresis, Purification.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 OBJETIVOS | 11 |
| 3 METODOLOGIA | 11 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 11 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 17 |
| 6 REFERÊNCIAS | 19 |

1 INTRODUÇÃO

A biofísica é uma ciência que aplica princípios e métodos da física para a resolução de problemas biológicos. Apesar de relativamente recente, tendo surgido no século XIX, as técnicas biofísicas foram fundamentais para o sucesso de estudos em biologia celular e molecular. Para desvendar a estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA), o material hereditário fundamental, foram aplicadas técnicas como a difração de raios-x, modelagem molecular e análise química (Watson et al., 1953). Para estabelecer a estrutura detalhadamente precisa de proteínas, como a hemoglobina, e a posição de cada átomo, foram usados métodos de cristalografia de raios-x (Perutz, et al., 1960) e mais recentemente a criomicroscopia eletrônica (Kühlbrandt et al., 2014).

A biofísica e a biologia molecular, um campo intimamente relacionado, estão agora firmemente estabelecidas como pilares da biologia moderna. A biologia molecular fornece os pilares para se compreender mecanismos genéticos e bioquímicos, relacionados a processos biológicos que envolvem as moléculas de DNA e proteínas, por exemplo. Já a biofísica fornece técnicas para identificar, isolar e quantificar essas biomoléculas, como: cromatografia, espectrofotometria e eletroforese (Drigo Filho et al, 2013).

A cromatografia é uma técnica que permite isolar compostos de uma mistura com base nas características físico-químicas dos seus componentes. Ela é comumente utilizada para purificação de biomoléculas em processos bioquímicos e biotecnológicos, permitindo a separação seletiva de proteínas e outras substâncias. A cromatografia de afinidade, por exemplo, pode ser utilizada para purificar enzimas devido sua interação específica entre molécula-alvo e um ligante na fase estacionária. (Kilikian e Pessoa Jr., 2020).

A espectrofotometria utiliza as propriedades específicas de absorção ou transmissão de luz pelas moléculas para identificar e determinar a concentração da substância na solução. As proteínas, por exemplo, absorvem luz no espectro ultravioleta, especificamente em 280 nm, devido a presença de aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina, na cadeia polipeptídica (Kilikian e Pessoa Jr., 2020).

A eletroforese utiliza de campos elétricos para separação de moléculas eletricamente carregadas, permitindo analisar proteínas e ácidos nucleicos com base em sua mobilidade no gel, sendo eficaz para identificação, isolamento e caracterização de compostos biológicos. A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), permite separar proteínas de acordo com seu peso molecular (Kilikian e Pessoa Jr., 2020).

Essas técnicas são particularmente valiosas no estudo de produtos naturais de origem microbiológica, vegetal e animal, fontes abundantes de biomoléculas de interesse biotecnológico, industrial e médico, como enzimas e ácidos orgânicos (Oliveira, 2015). As toxinas ofídicas, por exemplo, são compostos proteicos secretados em glândulas de veneno de serpentes peçonhentas que apresentam alto potencial de aplicação farmacológica. Mais de 90% da composição da peçonha é de proteínas e peptídeos, que possuem inúmeras ações biológicas e potencial biotecnológico. Dentre os compostos proteicos presentes nas peçonhas de serpentes podemos citar as metaloprotease (SVMPs), com ação proteolítica capaz de degradar componentes plasmáticos e as fosfolipases A₂ (PLA₂s) com ação enzimática que afeta membranas celulares, podendo assim causar citotoxicidade (Tasoulis e Isbister, 2017).

A análise da estrutura e do funcionamento de proteínas isoladas de peçonhas ofídicas contribui para o desenvolvimento de ferramentas moleculares e biofármacos que podem ser empregados em diversos ramos da ciência e medicina, colaborando para que novas estratégias terapêuticas possam ser formuladas (Gutiérrez e Lomonte, 2013). Alguns tipos de proteínas possuem mecanismo de ação antitumoral, SVMPs e PLA₂s, por exemplo, podem causar sinais intracelulares que levam as células tumorais a morte (Pérez-Peinado et al., 2020). Já toxinas ofídicas do tipo desintegrinas inibem a adesão celular e o crescimento dos vasos sanguíneos ao redor do tumor (Chan et al., 2016).

Essa perspectiva é especialmente relevante diante do cenário atual do câncer, uma das doenças que mais acomete pessoas no mundo, sendo ele responsável por quase 10 milhões de mortes no ano de 2020 (Organização Mundial da Saúde, 2025). Os tratamentos convencionais como radioterapia e quimioterapia são as principais opções no combate ao câncer, sendo a radioterapia utilizada em 50% a 60% dos casos (Observatório de Oncologia, 2019). A radioterapia é um tipo de tratamento que utiliza radiação ionizante para destruir as células tumorais. Durante o tratamento, a quantidade de radiação incidente, gerada em aceleradores lineares, é limitada pelos riscos contra os tecidos saudáveis (Inca, 2000). Por outro lado, a quimioterapia utiliza de medicamentos para o combate ao câncer. Os medicamentos se misturam ao sangue e são espalhados destruindo as células tumorais e impedindo metástase (Inca, 2023).

Nesse contexto, novas alternativas para o tratamento do câncer vêm sendo estudadas. As toxinas ofídicas, por exemplo, devido a ação tóxica e especificidade desses compostos sobre células tumorais, são isoladas para investigação e aplicação como agentes antitumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar na literatura científica métodos biofísicos usados para purificação de toxinas ofídicas derivadas de serpentes de botrópicas com potencial antitumoral.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar na literatura científica proteínas isoladas da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* que apresentem efeito antitumoral.
2. Caracterizar os métodos biofísicos utilizados para purificação e identificação de toxinas ofídicas com potencial antitumoral.

3 METODOLOGIA

Para a identificação das proteínas de peçonhas de serpentes botrópicas com potencial antitumoral foi feita uma pesquisa bibliográfica em bases de dados das áreas de Ciências Biológicas e Médicas no Portal de Periódicos da CAPES, seguindo o método Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Page et.al., 2021). A pesquisa foi baseada no seguinte termo de busca: “*Bothrops* AND (antitumoral OR anticancer OR tumor)”. Foram considerados artigos publicados em português e inglês e revisados por pares, no período de 2000 a 2024, foram excluídos das análises os artigos que não possuíam acesso aberto 33 por não se tratarem da utilização de proteínas botrópicas e incluídos artigos identificados nas referências. Os dados foram detalhados em tabelas com a descrição das etapas de purificação e características das proteínas isoladas, bem como o potencial terapêutico relacionado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa bibliográfica resultou, inicialmente, em 90 artigos. Desses, 30 foram excluídos por não serem de acesso aberto e 33 por não se tratar da utilização de proteínas botrópicas. Além disso, foram incluídos 16 artigos complementares, identificados nas

referências dos trabalhos analisados. Dessa forma, totalizou-se 43 artigos analisados detalhadamente (Figura 1).

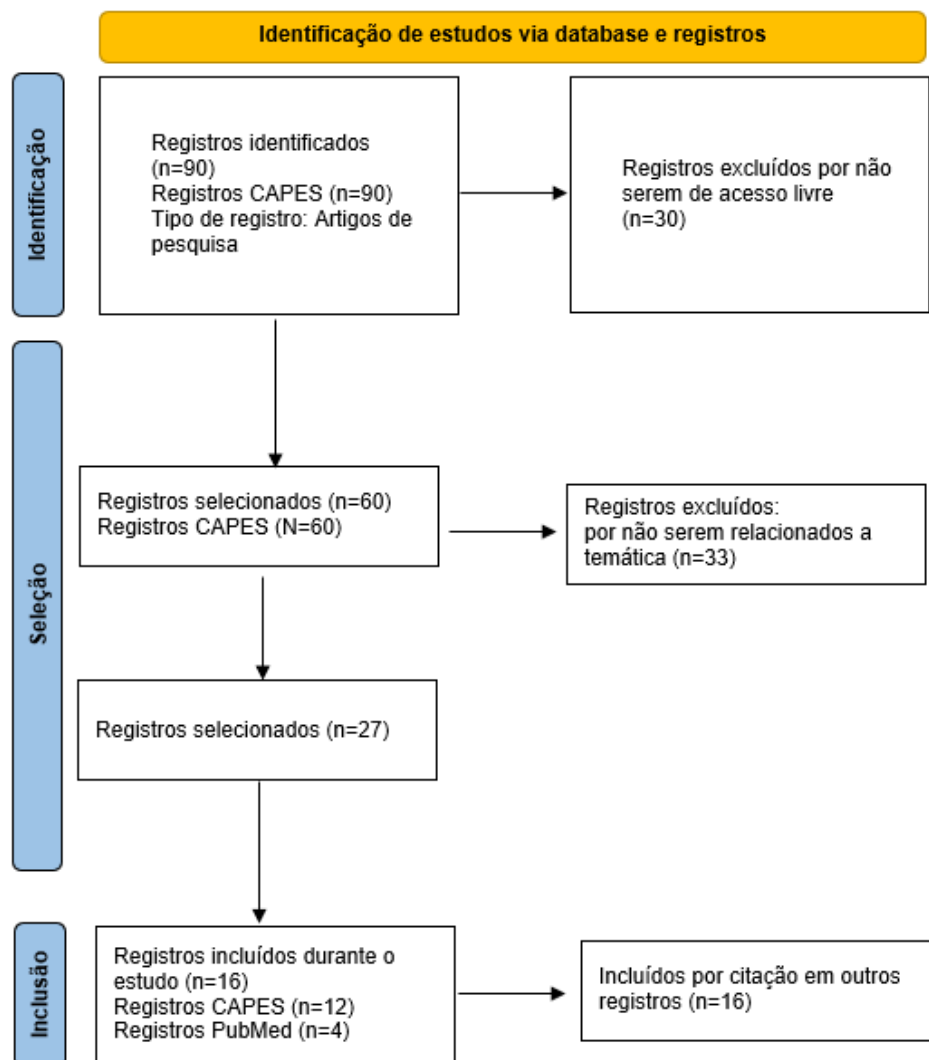


Figura 1: Fluxograma PRISMA de pesquisa em base de dados sobre as toxinas de proteínas botrópicas com potencial antitumoral entre 2000 e 2024.

As toxinas com potencial antitumoral foram identificadas em peçonhas de diferentes espécies do gênero *Bothrops*, totalizando 25 proteínas isoladas a partir dos estudos analisados. As informações completas sobre essas proteínas, incluindo espécie de origem, método de purificação e principais resultados descritos, estão organizadas no Apêndice A, que reúne os dados obtidos a partir da pesquisa bibliográfica. Em todos os trabalhos analisados, as proteínas

foram isoladas através da técnica de cromatografia líquida em coluna, utilizando diferentes modos de separação, tais como: afinidade, exclusão molecular ou iônica e interação hidrofóbica (Tabela 1).

Tabela 1: Técnicas cromatográficas utilizadas na purificação de toxinas de peçonhas botrópicas com potencial antitumoral

| Cromatografia | Modo de separação | Toxinas isoladas |
|--|--|---|
| Cromatografia de afinidade | Interação molécula-ligante | BIL, BaltLAAO-I, BjussuLAAO-II, BthTX-I, DisBa-01, MjTX-I, BmooMP-Alpha-I, BaP1, BJcuL |
| Cromatografia de interação hidrofóbica | Afinidade de proteínas por grupos hidrofóbicos | Altenargin-C, BaltLAAO-I, Batroxase, BJ-PLA2-I, BjussuLAAO-II, BmatTX-I, BmatTX-II, BmatTX-III, BmooLAAO-I, BmPLA2, BIL, BthTX-I, Jararhagin, Jararhagin-C |
| Cromatografia de exclusão iônica | Interação entre os analitos carregados e grupos funcionais de carga oposta | Altenargin-C, Batroxase, BJ-PLA2-I, Bl-LAAO, BmooMP-Alpha-I, Jararhagin, Jararhagin-C, Leucurogin, Leucurolysin-B, BjussuMP-II, BmatTX-I, BmatTX-II, BmatTX-III, BmooLAAO-I, BthTX-I, MjTX-I, MjTX-II, MT-III, BaP1 |
| Cromatografia de exclusão molecular | Diferença de tamanho e forma das moléculas presentes em uma mistura | Altenargin-C, BaltLAAO-I, Batroxase, BJ-PLA2-I, BjussuLAAO-II, Bl-LAAO, BmooMP-Alpha-I, BmPLA2, BIL, BthTX-I, leuc-B, BaP1 |

Em relação ao número de etapas cromatográficas, observou-se que algumas toxinas ofídicas puderam ser isoladas em apenas uma etapa de purificação, como: BJcuL (Elifio-Esposito et al. 2007), BjussuMP-II (Lisita et al. 2023), Leucurogin (Higuchi et al. 2011), MjTX-II (Soares et al. 1998), MT-III (Rucavado et al. 2002). Outras nove toxinas foram obtidas por meio de duas etapas cromatográficas, entre elas *Bl*-LAAO (Naumann et al. 2011), BmatTX-I, BmatTX-II, BmatTX-III (Moura et al. 2014), BmPLA2 (Aranda-souza et al. 2014), DisBa-01 (Ramos et al. 2007), Jararhagin (Paine et al. 1992), leuc-B (LM Gabriel et al. 2012), MjTX-I (Lomonte et al. 1990). Já as proteínas que exigiram três ou mais etapas de purificação incluem: Altenargin-C (Souza et al. (2000), BaltLAAO-I (Stábéli et al. 2004), Batroxase (Menaldo et al. 2015), BJ-PLA₂-I (Cedro et al. 2018), BjussuLAAO-II (Carone et al. 2017), BmooLAAO-I (Stábéli et al. 2007), BmooMP-Alpha-I (Bernardes et al. 2008), BIL (Nunes et al. 2011), BthTX-I (Carone et al. 2017), Jararhagin-C (Moura et al. 2003), BaP1 (Rucavado et al. 2002).

Dentre as 25 proteínas analisadas, 20 foram purificadas utilizando cromatografia de exclusão iônica. Essa técnica foi a mais utilizada nas etapas cromatográficas de purificação de toxinas botrópicas. A cromatografia de exclusão iônica é uma técnica utilizada para separar e purificar moléculas com base em suas cargas elétricas (Araújo, 2021). Essa técnica se baseia na interação entre os analitos carregados e grupos funcionais de carga oposta fixados na fase estacionária. Nessas condições, as moléculas de carga oposta se ligam à resina, enquanto as moléculas sem carga ou de mesma carga passam diretamente e são eluídas primeiro. A força iônica ou o pH da fase móvel é alterado para liberar as moléculas ligadas à resina, de acordo com suas cargas e forças de interação.

A cromatografia de exclusão iônica pode ser classificada em dois tipos: exclusão catiônica, na qual a fase estacionária contém um grupo com carga negativa ligado à matriz e separa íons positivos e; exclusão aniônica, que possui um grupo com carga positiva, servindo assim para separar íons negativos. (Hage; Carr, 2012). As proteínas Altenargin-C, Batroxase, BJ-PLA₂-I, *Bl*-LAAO, BmooMP-Alpha-I, DisBa-01, Jararhagin, Jararhagin-C, Leucurogin, Leucurolysin-B foram isoladas em cromatografias de exclusão aniônica, pois apresentam características ácidas e carga líquida negativa. Enquanto as proteínas BjussuMP-II, BmatTX-I, BmatTX-II, BmatTX-III, BmooLAAO-I, BthTX-I, MjTX-I, MjTX-II, MT-III, BaP1, com propriedades básicas, foram purificadas com o auxílio de cromatografias de exclusão catiônica.

Por outro lado, a cromatografia de exclusão molecular é uma técnica de separação baseada na diferença de tamanho e forma das moléculas presentes em uma mistura. Após a

aplicação da amostra na coluna, as moléculas menores migram lentamente entrando pelos poros da matriz enquanto as maiores passam pelo espaço interparticular, assim, eluindo primeiro, esse método não envolve interações químicas entre a amostra e a fase estacionária, sendo uma técnica de baixa resolução, mais utilizada em etapas de refinamento da purificação (Araújo, 2021). A cromatografia de exclusão molecular foi utilizada para fracionamento inicial da peçonha botrópica em 12 trabalhos diferentes (Moritz et al. 2022 e 2018, Amorim et al. 2018, Cedro et al. 2018, Carone et al. 2017, Naumann et al. 2011, Bernardes et al. 2008, Frihling et al. 2022, Nunes et al. 2011, Bezerra et al. 2019, Sanchez *et al.* 2007, Rucavado et al. 2002).

Já a cromatografia de afinidade é uma técnica baseada na interação entre uma molécula-alvo e um ligante imobilizado em uma matriz sólida (fase estacionária). A amostra é aplicada na coluna e eluída por um solvente adequado (fase móvel), sendo que apenas as moléculas que possuem afinidade com o ligante ficarão fixadas na matriz. Após isso, as partes que não são de interesse e não interagem com o ligante são eliminados através de uma solução tampão de lavagem, garantindo assim a remoção de impurezas. A molécula-alvo é então removida da matriz por meio de mudança nas condições de eluição, como por exemplo com a alteração do pH da solução tampão (Compri-Nardy, Stella e Oliveira, 2009). A cromatografia de afinidade foi utilizada nas etapas de purificação de 9 proteínas: *Bothrops leucurus* lectin (BIL) (Aranda-Souza et al. 2014), BaltLAAO-I, (Ribeiro et al. 2016), BjussuLAAO-II (Machado et al. 2019), BthTX-I (Bezerra et al. 2019), DisBa-01 (Montenegro et al. 2012), MjTX-I (Benati et al. 2018), BmooMP-Alpha-I (Bernardes et al. 2008), BaP1 (Rucavado et al. 2002) e BJcuL (Elifio-Esposito et al. 2007). A proteína BJcuL, uma lectina tipo C de *Bothrops jararacuçu*, foi purificada em uma única etapa através de uma cromatografia de afinidade, em resina de agarose-D-galactose.

A cromatografia de interação hidrofóbica tem como princípio de separação a afinidade de proteínas por grupos hidrofóbicos (fenil, octil, butil) ligados ao suporte de agarose (Sephacrose ou Superose). Essa técnica foi utilizada para isolar quatorze toxinas: Altenargin-C, BaltLAAO-I, Batroxase, BJ-PLA2-I, BjussuLAAO-II, BmatTX-I, BmatTX-II, BmatTX-III, BmooLAAO-I, BmPLA2, BIL, BthTX-I, Jararhagin, Jararhagin-C. Nesse sistema, moléculas mais hidrofóbicas apresentam maior afinidade com a fase estacionária, sendo retidas por mais tempo, enquanto as menos hidrofóbicas eluem mais rapidamente com a fase móvel (Hage; Carr, 2012). Em soluções com alta concentração de sais, regiões hidrofóbicas das proteínas ficam mais expostas e interagem com os grupos hidrofóbicos, fenômeno chamado de “salting out”. Quando a concentração de sal é reduzida ou removida, as moléculas hidrofóbicas perdem a

interação com a fase estacionária e são eluídas em ordem crescente de hidrofobicidade (Queiroz et al., 2001).

Ainda no contexto das cromatografias baseadas em interações hidrofóbicas, destaca-se a cromatografia em fase reversa, amplamente utilizada para separação e purificação de biomoléculas de acordo com suas propriedades de hidrofobicidade. Diferentemente da cromatografia em fase normal, na qual a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar, na fase reversa ocorre o inverso: a fase estacionária é apolar, enquanto a fase móvel é polar (Araújo, 2021). Nos trabalhos analisados, algumas cromatografias em fase reversa foram realizadas utilizando sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou do inglês *high-performance liquid chromatography* - *HPLC*), que permitem explorar interações diferenciais dos analitos com uma fase estacionária e uma fase móvel líquida, utilizando alta pressão para forçar o solvente através da coluna cromatográfica (Araújo, 2021). Dentre as toxinas isoladas, podemos destacar o uso do sistema de CLAE em fase reversa, utilizando resina de sílica ligada às cadeias hidrocarbônicas C4 ou C18, como última etapa cromatográfica para confirmação do grau de pureza da amostra em quatro das 25 proteínas: BaltLAAO-I (Ribeiro et al. 2016), Batroxase (Amorim et al. 2018), BJ-PLA2-I (Cedro et al. 2018), BmooLAAO-I (Stábeli et al. 2007).

Sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência utilizam colunas metálicas empacotadas com partículas de pequena dimensão associadas a bombas de alta pressão, o que garante maior eficiência na separação e menor tempo de análise em comparação com métodos convencionais. Além disso, possibilita o acoplamento com detectores modernos, como espectrofotômetros e espectrômetros de massa, ampliando sua aplicação na caracterização estrutural, quantificação e avaliação da pureza de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas de interesse bioquímico e farmacológico (Calvete et al., 2023).

Além das técnicas cromatográficas, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi utilizada para direcionamento dos processos de purificação, análise da composição proteica e estimativa da massa molecular de quase todas as toxinas isoladas (22) (Nunes et al. 2011; Aranda-Souza et al. 2014; Gabriel et al. 2012; Ribeiro et al. 2016; Moura et al. 2014; Souza et al. 2000; Soares et al. 1998; Maria et al. 2014; Bezerra et al. 2019; Elifio-Esposito et al. 2007; Amorim et al. 2018; Machado et al. 2019; Paine et al. 1992; Burin et al. 2020; Montenegro et al. 2012; Benati et al. 2018; Bernardes et al. 2008; Naumann et al. 2011; Cedro et al. 2018; Rucavado et al. 2002; Rucavado et al. 2002; Lisita et al. 2023).

Em 13 proteínas diferentes, técnicas de detecção por espectrofotometria em ultravioleta (UV) e/ou espectrometria de massa (EM) também foram combinadas aos processos cromatográficos para quantificação e avaliação da pureza das toxinas ofídicas (Aranda-Souza et al. 2014, Moura et al. 2014, Souza et al. 2000, Soares et al. 1998, Maria et al. 2014, Machado et al. 2019, Elifio-Esposito et al. 2007, Amorim et al. 2018, Burin et al. 2020, Montenegro et al. 2012, Bernardes et al. 2008, Naumann et al. 2011, Cedro et al. 2018).

O monitoramento da cromatografia por espectrofotometria permite acompanhar a eluição de frações proteicas em tempo real, identificar picos correspondentes a cada toxina e estimar a concentração relativa de proteínas, facilitando a coleta das frações mais puras. A espectrofotometria UV, especialmente em 214 e 280 nm, que detecta a absorção característica da ligação peptídica e dos resíduos aromáticos (triptófano, tirosina e fenilalanina), respectivamente, é amplamente utilizada para monitorar a presença de proteínas em frações eluídas (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, 2016). Essa técnica permite não apenas identificar a presença das proteínas durante o processo cromatográfico, mas também estimar sua concentração de forma rápida e não destrutiva.

Complementarmente, a EM fornece informações detalhadas sobre a massa molecular, sequência de aminoácidos, modificações pós-traducionais e pureza das proteínas, sendo frequentemente associada a sistemas de CLAE. A EM é uma técnica que detecta moléculas por meio de sua massa e sua estrutura química, consistindo em criar íons e separar de acordo com sua razão de carga/massa, sendo bastante utilizada na indústria da biotecnologia para examinar e sequenciar diversos tipos de proteínas (Pavia., 2010). A combinação de CLAE com espectrômetros de massa permite, portanto, uma caracterização completa das proteínas, assegurando a confiabilidade dos resultados em estudos bioquímicos e toxicológicos, como os realizados com toxinas ofídicas (Calvete et al., 2009; Oliveira et al., 2023).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem em sua peçonha compostos com potencial farmacológico a ser explorado. A partir da análise de dados da pesquisa bibliográfica foi possível identificar que 25 proteínas diferentes, derivadas das peçonhas botrópicas, foram estudadas nos últimos 24 anos para investigação da ação antitumoral. Diversas técnicas de cromatografia líquida em coluna foram utilizadas na purificação dessas proteínas. Cromatografias de exclusão iônica foram predominantes no isolamento de toxinas ofídicas,

sendo utilizadas em 20 das 25 proteínas analisadas. As cromatografias de exclusão molecular foram utilizadas nas etapas de fracionamento inicial de 12 toxinas diferentes e na etapa de refinamento de 1 proteína, enquanto cromatografias interação hidrofóbica em fase normal foi utilizada em 8 proteínas e a cromatografia interação hidrofóbica em fase reversa foram utilizadas para análise de pureza das proteínas em 10 diferentes proteínas. Já as cromatografias de afinidade foram aplicadas para isolar 9 toxinas, sendo que a proteína BJcuL de *Bothrops jararacuçu* foi purificada em uma única etapa com esse tipo de técnica. Além de cromatografia, a espectrofotometria e eletroforese também foram usadas para caracterização de toxinas ofídicas com potencial antitumoral, reforçando a aplicabilidade desses métodos biofísicos no estudo de biomoléculas e prospecção de biofármacos.

6 REFERÊNCIAS

- AMORIM, F. G. et al. New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Toxins*, v. 10, p. 500, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10120500>.
- ANELISE, K. et al. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. *Toxicon*, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.001>
- ARANDA-SOUZA, M. A. et al. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. *Toxicon*, v. 82, p. 97-103, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.018>
- ARAÚJO, I. *Análise instrumental: uma abordagem prática*. Grupo GEN, 2021. E-book. Disponível em: <Livros digitais - SISBI-UFU>. Acesso em: 15 fev. 2025.
- BENATI, R. B. et al. Cytotoxic and pro-apoptotic action of MjTX-I, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, towards leukemic cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 24, p. 40, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0180-9>.
- BERNARDES, C. P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 51, n. 4, p. 574-584, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.017>
- BEZERRA, P. H. A. et al. BthTX-I from *Bothrops jararacussu* induces apoptosis in human breast cancer cell lines and decreases cancer stem cell subpopulation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 25, e20190010, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0010>
- BURIN, S. M. et al. *Bothrops moojeni* L-amino acid oxidase induces apoptosis and epigenetic modulation on Bcr-Abl+ cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 26, e20200123, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0123>.
- CARNEIRO-GOETTEN, J. O. L. et al. Neutrophils activated by BJcuL, a C-type lectin isolated from *Bothrops jararacussu* venom, decrease the invasion potential of neuroblastoma SK-N-SH cells in vitro. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 26, e20190073, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0073>.
- CALVETE, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 42(11), 1405–1414. <https://doi.org/10.1002/jms.1242>

CARONE, S. E. I. et al. A new L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 103, p. 25-35, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.025>.

CEDRO, R. C. A. et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from *Bothrops jararaca* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 24, p. 33, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0170-y>.

CHAN, Yau Sang et al. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 100, n. 14, p. 6165–6181, 2016. DOI: [10.1007/s00253-016-7610-9](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9).

COMPRI-NARDY, M. B.; STELLA, M. B.; OLIVEIRA, C. *Práticas de laboratório de bioquímica e biofísica*. São Paulo: Grupo GEN, 2009. E-book. Disponível em: <Livros digitais - SISBI-UFU>. Acesso em: 9 fev. 2025.

DRIGO FILHO, E. A física no contexto da biologia molecular. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 35, n. 1, p. 1-4, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-11172013000100002>.

ELÍFIO-ESPOSITO, S. L. et al. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 13, n. 4, p. 782-799, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992007000400008>.

FRIHLING, B. E. F. et al. Purification, characterization and evaluation of the antitumoral activity of a phospholipase A2 from the snake *Bothrops moojeni*. *Pharmaceuticals*, v. 15, p. 724, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15060724>.

GABRIEL, L. M. et al. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 18, n. 1, p. 24-33, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000100004>.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*, v. 62, p. 27-39, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. *Química analítica e análise quantitativa*. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012.

HIGUCHI, D. A. et al. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. *Toxicon*, v. 58, n. 1, p. 123-129, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.013>.

KILIKIAN, A. M.; PESSOA JUNIOR, A. *Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial*. São Paulo: Blucher, 2020. E-book. Disponível em: <Livros digitais - SISBI-UFU>. Acesso em: 21 mar. 2025.

LISITA, K. et al. Action of BjussuMP-II, a snake venom metalloproteinase isolated from *Bothrops jararacussu* venom, on human neutrophils. *Toxicon*, v. 222, 106992, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.106992>.

LOMONTE, B. et al. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*, v. 28, n. 10, p. 1137-1146, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90114-M](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90114-M)

MACHADO, A. R. T. et al. BjussuLAAO-II induces cytotoxicity and alters DNA methylation of cell-cycle genes in monocultured/co-cultured HepG2 cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 25, e147618, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-1476-18>.

MARIA, D. A. et al. Antiproliferative effect of the jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, p. 446, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-446>

MENALDO, D. L. et al. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 21, p. 28, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0027-6>.

MENALDO, D. L. et al. Immunomodulatory actions and epigenetic alterations induced by proteases from *Bothrops* snake venoms in human immune cells. *Toxicology in Vitro*, v. 61, 104586, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.020>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Manual para técnicos em radioterapia (Programa de Qualidade em Radioterapia)*. Rio de Janeiro: INCA, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Quimioterapia. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia>.

MONTENEGRO, C. F.; SALLA-PONTES, C. L.; RIBEIRO, J. U.; MACHADO, A. Z.; RAMOS, R. F.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*, v. 94, n. 8, p. 1812–1820, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.020>.

MOURA, A. A. de et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom. *Biomed Research International*, v. 2014, p. 195356, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/195356>.

MOURA-DA-SILVA, A. M. S. et al. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 409, n. 2, p. 395–401, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00598-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00598-2).

MORITZ, M. N. O. et al. Alternagin-C, an $\alpha 2\beta 1$ integrin ligand, attenuates collagen-based adhesion. *Toxicon*, v. 210, p. 1–10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.001>.

MORITZ, M. N. O. et al. Alternagin-C binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin controls matrix metalloprotease-9 and matrix metalloprotease-2. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 24, p. 13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0150-2>.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1810, n. 7, p. 683–694, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.003>.

NUNES, E. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 159, n. 1, p. 57–63, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.001>.

OBSERVATÓRIO DE ONCOLOGIA. Proporção da utilização de radioterapia no tratamento oncológico dos pacientes atendidos no SUS. 2019. Disponível em: <https://observatoriodeoncologia.com.br/estudos/tratamento-em-oncologia/2019/2369-2/>.

OLIVEIRA, I. S. et al. Advances in peptidomics of animal venoms by LC-MS/MS: unraveling bioactive peptides. *Toxins*, v. 15, n. 2, p. 145, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins15020145>.

OLIVEIRA, V. G. *Processos biotecnológicos industriais: produção de bens de consumo com o uso de fungos e bactérias*. Rio de Janeiro: Érica, 2015. E-book.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Relatório sobre o câncer. 2025. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=tc.

PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, v. 372, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.

PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 32, p. 22869–22876, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50027-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50027-2).

PAVIA, D. L. et al. *Introdução à espectroscopia*. 4. ed. 2010.

PERUTZ, M.; ROSSMANN, M.; CULLIS, A. et al. Structure of hæmoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, v. 185, p. 416–422, 1960. DOI: <https://doi.org/10.1038/185416a0>.

Pérez-Peinado, C.; Defaus, S.; Andreu, D. Hitchhiking with Nature: Snake Venom Peptides to Fight Cancer and Superbugs. *Toxins* **2020**, *12*, 255. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12040255>

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, v. 87, n. 2, p. 143–159, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00237-1).

RAMOS, O. H. P. et al. A novel $\alpha\beta$ 3-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, v. 25, p. 53–64, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9101-y>.

RIBEIRO, P. H. et al. Mechanism of the cytotoxic effect of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 92, p. 329–337, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.022>.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 137109, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1080/09629350220131980>.

SANCHEZ, E. F. et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 468, n. 2, p. 193–204, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.10.002>.

SANTOS, P. K. dos et al. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein, attenuates α 2 β 1 integrin and VEGF receptor 2 signaling. *Biochimie*, v. 174, p. 144–158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.04.023>.

SILVA, M. C. et al. Interaction between TNF and BmooMP-Alpha-I, a zinc metalloprotease derived from *Bothrops moojeni* snake venom, promotes direct proteolysis of this cytokine: molecular modeling and docking at a glance. *Toxins*, v. 8, p. 223, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins8070223>.

SILVA, M. C. S. et al. Anti-metalloprotease P-I single-domain antibodies: tools for next-generation snakebite antivenoms. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 2748962, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/2748962>.

SOUZA, D. H. F. et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits α 2 β 1 integrin-mediated cell adhesion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 384, n. 2, p. 341–350, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2120>.

SOARES, A. M. et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni*. *Toxicon*, v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00133-5).

STÁBELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049>.

STÁBELI, R. G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 142, n. 3–4, p. 371–381, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.020>.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, v. 9, n. 9, p. 290, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. *Fundamentos da espectrofotometria*. 2016. Disponível em: <https://www2.ufjf.br/quimica/files/2016/08/Espectrometria-UV-vis.pdf>. Acesso em: 4 set. 2025.

WATSON, J.; CRICK, F. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, v. 171, p. 737–738, 1953. DOI: <https://doi.org/10.1038/171737a0>.

KÜHLBRANDT, W. The resolution revolution. *Science*, v. 343, p. 1443–1444, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1251652>.

APÊNDICE – RESULTADOS DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Proteínas com potencial antitumoral isoladas de peçonhas botrópicas nos últimos 24 anos (2000-2024), suas características e etapas utilizadas para a purificação.

| Toxinas | Características gerais | Etapas de purificação (cromatografias) | Potencial antitumoral | Referência |
|-------------------------|--|---|--|--|
| 1. Altenargin-C (ALT-C) | Desintegrina; 29 kDa; <i>Bothrops alternatus</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Exclusão molecular (Superdex-200); 2. Interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose CL-4B) 3. Exclusão iônica (Mono Q HR). | Agente antimetastático em câncer de mama triplo-negativo e redução de angiogênese. | Moritz et al. (2022 e 2018) Santos et al. (2020) Souza et al. (2000) |
| 2. BaltLAAO-I | L-amino-ácido oxidase; 123 kDa, <i>Bothrops alternatus</i> . | <ol style="list-style-type: none"> 1. Afinidade (Shepharose-IDA); 2. Interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose); 3. Exclusão molecular (Sephadex G100) 4. Fase reversa (C-4 HPLC) | Ação citotóxica em linhagem de leucemia tipo T, via apoptose gerada por produção de espécies reativas de oxigênio | Ribeiro et al. (2016) Stabéli et al.(2004) |
| 3. Batroxase | Metaloprotease P-I; 22.9 kDa; <i>Bothrops atrox</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Exclusão molecular (Sephacryl S-200); 2. Exclusão iônica (DEAE Sepharose); 3. Fase reversa (RP-HPLC C-18) | Aumenta a ação citotóxica de células NK(Natural Killers) contra células K562(modelo de leucemia mieloide crônica) além de induzir secreção citocinas | Amorim et al. (2018) Menaldo et al. (2015) Menaldo et al . (2019) |

| | | | | |
|---------------------------|---|---|--|---|
| | | | imunomoduladoras nas quais favorecem a resposta imune antitumoral | |
| 4. BJcuL | Lectina do tipo C; 30 kDa; <i>Bothrops jararacussu</i> | 1. Afinidade (agarose-D-galactose) | Redução da viabilidade de células tumorais, redução da capacidade invasiva do neuroblastoma | Carneiro-goetten et al.(2020) Elifio-Esposito et al.(2007) |
| 5. BJ-PLA ₂ -I | Fosfolipase A2; 14.2 kDa; <i>Bothrops jararaca</i> | 1. Exclusão molecular (Sephacryl S-200); 2. Exclusão iônica (Source 15Q e Mono Q 5/50 GL); 3. Fase reversa (CLC-ODS C18, HPLC) | Reduz a viabilidade de células de leucemia mieloide aguda (HL-60). | Cedro et al. (2018) |
| 6. BjussuLAAO-II | L-aminoácido, 60.36kDa, <i>Bothrops jararacussu</i> | 1. Exclusão molecular (Shephacryl S-100); 2. Interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose 6); 3. Afinidade (Benzamidine Sepharose 4) | Apresenta efeitos citotóxicos pró-apoptóticos e epigenéticos contra células de carcinoma hepatocelular | Bezerra et al. (2019) Carone et al.(2017) Machado et al. (2019) |
| 7. BjussuMP-II | Metaloprotease de classe P–I; 24 kDa; <i>Bothrops jararacussu</i> | 1. Exclusão Iônica (CM-Sepharose FF) | Pode contribuir para efeitos antitumorais indiretos, modulando a resposta inflamatória e ativando | Lisita K et al. (2023) Silva et al.(2022) |

| | | | | |
|--|---|--|--|---|
| | | | mecanismos contra células tumorais | |
| 8. <i>Bl</i> -LAAO | L-amino-acido oxidase; 60 kDa; <i>Bothrops leucurus</i> | 1.Exclusão molecular (Sephacryl S-200 e S-300); 2. Exclusão iônica(DEAE Sepharose CL-6B) | Demonstrou indução de apoptose em Células de carcinoma gástrico (MKN-45), Células tumorais do cólon (RKO), Células tumorais duodenais (HUTU), Fibroblastos | Naumann et al.(2011) |
| 9. BmatTX-I 10. BmatTX-II 11. BmatTX-III | Fosfolipase A2; 13kDa; <i>Bothrops mattogrossensis</i> | 1. Exclusão iônica (CM-sepharose); 2. Fase reversa (Discovery C18) | Mostraram Citotoxicidade induzindo morte celular em células de linhagem leucêmicas T | Moura et al. (2014) |
| 12. BmooLAAO-I | L-amino-acido oxidase; 66 kDa; <i>Bothrops moojeni</i> | 1. Exclusão iônica (CM-Sepharose); 2. Interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose CL-4B); 3. Fase reversa (HPLC em coluna C4) | Tem potencial contra leucemia mieloide crônica, induz apoptose. | Burin et al. (2020) Stábeli et al.(2007) |
| 13. BmooMP-Alpha-I | Metaloprotease de classe P-I; 24.5 kDa; <i>Bothrops moojeni</i> | 1. Exclusão iônica (DEAE-Sephacel); 2. Exclusão molecular (Sephadex G-75); 3. Afinidade (Benzamidine-Sepharose) | Não menciona atividade antitumoral, mas sua interação com o fator de | Bernardes et al. (2008) Silva et al.(2016) |

| | | | | |
|---|--|--|---|---|
| | | | necrose tumoral (TNF) pode induzir apoptose | |
| 14. BmPLA2 | Fosfolipase A2; 13kDa; <i>Bothrops moojeni</i> | 1. Exclusão molecular (Sephacryl S-100); 2. Fase reversa (coluna C18 - Xterra MS 5 μm —4,6 \times 250 mm) | Contra células de rabdomiosarcoma e adenocarcinoma colorretal humano, atuando com a liberação de ácido araquidônico | Aranda-souza et al. (2014) Friedling et al. (2022) |
| 15. <i>Bothrops leucurus</i> lectin (BIL) | Lectina tipo C; 15kDa; <i>Bothrops leucurus</i> | 1. Afinidade (gel de guar); 2. Exclusão molecular (Superdex 75 HR 10/300 GL), 3. Fase reversa (HPCL em coluna C-4) | A BIL induz a morte celular de células do melanoma murino (B16-F10) sem afetar células normais. | Nunes et al. (2011) |
| 16. BthTX-I | Fosfolipase A2; 13,6 kDa; <i>Bothrops jararacussu</i> | 1. Exclusão molecular (Sephacryl S-100); 2. Interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose 6); 3. Afinidade (Benzamidine Sepharose 4); 4. Exclusão iônica (CM Sepharose) | Demonstrou ação citotóxica sobre diferentes tipos de câncer de mama induzindo apoptose, autofagia, redução da viabilidade celular e diminuição da subpopulação de células-tronco cancerígenas | Bezerra et al. (2019) Carone et al. (2017) |
| 17. DisBa-01 | RGD-desintegrina; 12kDa; <i>Bothrops alternatus</i> | 1. Afinidade (Ni-NTA Sepharose, Qiagen); 2. Exclusão Iônica (Mono Q, GE Healthcare) | Inibe adesão de células tumorais de câncer de mama | Montenegro et al. (2012) |

| | | | | |
|------------------|---|---|--|--|
| | | | (MDA-MB-231) ao colágeno-I, reduz a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e receptores (VEGFRs) em células endoteliais, inibe adesão de quinase (FAK) e da matriz extracelular (MMP-2) em fibroblastos. | Ramos et al.(2007) |
| 18. Jararhagin | Metaloproteinase hemorrágica; 52 kDa; <i>Bothrops jararaca</i> | 1. Interação hidrofóbica (Phenyl-superoxe); 2. Exclusão iônica (Mono-Q). | Reduz viabilidade celular de linhagens do melanoma humano, induz apoptose, reduz adesão celular | Anelise et al. (2011) Paine et al. (1992) |
| 19. Jararhagin-C | Metaloproteinase do tipo P-III; 28kDa; <i>Bothrops jararaca</i> | 1. Interação hidrofóbica (Phenyl-superoxe); 2. Exclusão iônica (Mono-Q); 3. Fase reversa (C-18) | Possui atividade citotóxica contra a linhagem tumoral B16F10 de melanoma murino induzindo apoptose ou necrose celular além de efeitos antimetastáticos e antiproliferativos | Maria et al.(2014) Moura et al.(2003) |

| | | | | |
|-----------------------------|---|---|--|---|
| 20. Leucurogin | Metaloproteinase do tipo P-III; 10.4kDa; <i>Bothrops leucurus</i> | 1. Exclusão iônica (DEAE-CELLULOSE) | Inibe crescimento tumoral, inibição da angiogênese, inibição da adesão celular | Higuchi et al. (2011) |
| 21. Leucurolysin-B (leuc-B) | Metaloproteinase da classe P-III; 55kDa; <i>Bothrops leucurus</i> | 1. Exclusão molecular (Sephacryl S-200 e Sephacryl S-300); 2. Exclusão iônica (DEAE Sepharose CL-6B) | Apresentou efeito citotóxico em varinhas linhages de câncer, como glioblastoma, câncer de mama, carcinoma ascítico de Ehrlich e melanoma, utilizando como mecanismo de ação alterações morfológicas características da apoptose. | LM Gabriel et al. (2012) Sanchez et al. (2007) |
| 22. MjTX-I | Fosfolipases A2 ; 14 kDa; <i>Bothrops moojeni</i> | 1. Exclusão iônica (CM-Sephadex C-25); 2. Afinidade (MAb-4/Sepharose) | Reduz a viabilidade das células de leucemia mieloide crônica (K562-S e K562-R), Induz apoptose | Benati et al. (2018) Lomonte et al. (1990) |
| 23. MjTX-II | Fosfolipases A2 ; 14 kDa; <i>Bothrops moojeni</i> | 1. Exclusão iônica (CM-Sepharose) | Demonstrou efeitos citotóxicos contra tumor ascítico de Erlich, Adenocarcinoma mamário humano, células de leucemia T humana | Soares et al. (1998). Stabeli et al. (2006) |

| | | | | |
|------------|--|--|--|------------------------|
| 24. MT-III | Fosfolipase A2; 100 kDa; <i>Bothrops asper</i> | 1. Exclusão iônica(CM-Sephadex C-25) | Pode induzir estresse oxidativo levando a apoptose em células tumorais. | Rucavado et al. (2002) |
| 25. BaP1 | Metaloproteinase hemorrágica; 60 kDa; <i>Bothrops asper</i> | 1. Exclusão iônica(CM-Sephadex C-25); 2. Exclusão molecular (Sephacryl S-200); 3. Afinidade(Affi-Gel Blue) | Degrada proteínas da matriz extracelular e pode afetar a angiogênese tumoral | Rucavado et al. (2002) |