

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA LAURA DE MORAES SIQUEIRA

Isolamento, caracterização e avaliação do potencial antitumoral de proteínas da peçonha de
Bothrops alternatus

UBERLÂNDIA
2026

ANA LAURA DE MORAES SIQUEIRA

Isolamento, caracterização e avaliação do potencial antitumoral de proteínas da peçonha de
Bothrops alternatus

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a obtenção
do título de Licenciado em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Neves
Mamede (ICBIM)

Coorientadora: Profa. Dra. Lorena Polloni
(ICBIM)

UBERLÂNDIA

2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter aberto as portas necessárias para que eu chegasse até este momento, concedendo força, sabedoria e perseverança ao longo desta trajetória.

A minha família, deixo minha eterna gratidão por todos os esforços, renúncias e incentivos que tornaram possível a realização deste sonho. Obrigada por sempre fazerem mais do que estava ao alcance para que eu pudesse seguir o caminho que escolhi e dedicar-me ao que amo.

Ao Bruno, meu agradecimento especial pela parceria construída dentro e fora do laboratório. Obrigada por cada incentivo, por compartilhar conhecimentos, por me ajudar a enxergar soluções quando os obstáculos pareciam maiores e por estar presente em todos os momentos desta jornada. Seu apoio foi fundamental para que este trabalho se concretizasse.

À minha orientadora, agradeço pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelo acompanhamento durante sua realização.

À minha coorientadora, agradeço por ter acolhido esta pesquisa com entusiasmo, contribuindo com seu conhecimento e dedicação para o desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos que esta trajetória me proporcionou, agradeço pelo apoio, pela torcida sincera e por tornarem os desafios mais leves.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por proporcionar a estrutura e o ambiente acadêmico que tornaram possível a realização desta pesquisa e contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original.”
- Oliver Wendell Holmes Sr.*

RESUMO

O câncer representa uma das principais causas de mortalidade no mundo, impulsionando a busca por novas moléculas com potencial terapêutico. Nesse contexto, as peçonhas ofídicas constituem uma importante fonte de compostos bioativos, incluindo proteínas com diversas atividades farmacológicas. O presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar o potencial antitumoral de proteínas da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*. A amostra A5B2, previamente obtida do fracionamento da peçonha, foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica, originando as subfrações A5B2C1 e A5B2C2. Após dessalinização por cromatografia de exclusão molecular, as amostras resultantes (A5B2C1d e A5B2C2d) foram selecionadas para caracterização bioquímica e avaliação biológica. A análise da composição proteica por eletroforese revelou bandas predominantes em torno de 25 kDa em condições não redutoras e entre aproximadamente 14 e 20 kDa após redução. Os ensaios enzimáticos sob substrato lipídico e proteolítico, permitiram confirmar a atividade enzimática da peçonha bruta e da fração A5B2. O potencial citotóxico foi avaliado pelo ensaio de redução da resazurina em células normais de próstata (PNT-2) e células tumorais metastáticas de próstata (PC-3). A peçonha bruta promoveu redução significativa da viabilidade celular da linhagem PNT-2 nas maiores concentrações avaliadas, enquanto não apresentou efeito significativo sobre a linhagem PC-3. As subfrações A5B2C1d e A5B2C2d também promoveram redução significativa da viabilidade da linhagem PNT-2, sendo a A5B2C1d mais ativa que a A5B2C2d, porém nenhuma delas apresentou atividade sobre a linhagem tumoral PC-3. Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram diretamente para o aprimoramento das etapas de purificação e para a caracterização bioquímica parcial de componentes da peçonha de *Bothrops alternatus*, além de fornecerem informações relevantes para a investigação de seu potencial biotecnológico. Embora as amostras avaliadas não tenham demonstrado atividade antitumoral seletiva nas condições experimentais empregadas, esse resultado não descarta seu potencial biológico em outros modelos celulares. Além disso, as alterações de viabilidade celular observadas na linhagem PNT-2 reforçam a necessidade de estudos adicionais voltados à identificação molecular e à caracterização funcional de toxinas ofídicas com potencial aplicação biotecnológica e farmacológica.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Citotoxicidade. Fracionamento proteico. Toxinologia. Viabilidade celular.

ABSTRACT

Cancer represents one of the leading causes of mortality worldwide, driving the search for new molecules with therapeutic potential. In this context, snake venoms constitute an important source of bioactive compounds, including proteins with diverse pharmacological activities. The present study aimed to isolate, characterize, and evaluate the anti-important potential of proteins from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. The A5B2 sample, previously obtained from venom fractionation, was subjected to hydrophobic interaction chromatography, resulting in the subfractions A5B2C1 and A5B2C2. After desalting by molecular exclusion chromatography, the resulting samples (A5B2C1d and A5B2C2d) were selected for biochemical characterization and biological evaluation. Protein composition analysis by electrophoresis revealed predominant bands around 25 kDa under non-reducing conditions and between approximately 14 and 20 kDa after reduction. Enzymatic assays using lipidic and proteolytic substrates confirmed the enzymatic activity of the crude venom and the A5B2 fraction. Cytotoxic potential was evaluated by the resazurin reduction assay in normal prostate cells (PNT-2) and metastatic prostate tumor cells (PC-3). The crude venom promoted a significant reduction in PNT-2 cell viability at the highest concentrations evaluated, while no significant cytotoxic effect was observed in the PC-3 cell line. The A5B2C1d and A5B2C2d subfractions also promoted a significant reduction in PNT-2 cell viability, with A5B2C1d showing greater activity than A5B2C2d; however, neither subfraction exhibited selective cytotoxic activity against the PC-3 tumor cell line. The results contributed directly to the improvement of purification steps and to the partial biochemical characterization of components from *Bothrops alternatus* venom, providing relevant information for the investigation of their biotechnological potential. Although the evaluated samples did not demonstrate selective antitumor activity under the experimental conditions employed, this finding does not exclude their biological potential in other cellular models. Furthermore, the alterations in cell viability observed in the PNT-2 cell line highlight the need for further studies focused on molecular identification and functional characterization of snake venom toxins with potential biotechnological and pharmacological applications.

Keywords: Cytotoxicity. Prostate cancer. Protein fractionation. Toxinology. Cell viability.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
2. Objetivos	9
2.1. Objetivos gerais.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. Material e métodos	9
3.1. Origem da amostra	9
3.2. Purificação da amostra	10
3.3. Caracterização bioquímica	10
3.3.1 Análise em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	10
3.3.2 Atividade fosfolipásica.....	11
3.3.3 Atividade proteolítica (azocaseinolítica).....	11
3.4. Manutenção das linhagens celulares	12
3.5 Ensaio de viabilidade celular.....	12
3.6 Análise estatística	12
4. Resultados	13
4.1. Purificação da amostra	13
4.2. Eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	15
4.3. Atividade fosfolipásica e proteolítica (azocaseinolítica).....	16
4.4 Avaliação da viabilidade celular.....	16
5. Discussão.....	20
6. Conclusão.....	23
7. Referências	24

1. Introdução

O câncer é uma doença complexa e multifatorial, sendo responsável por mais de 9 milhões de mortes a cada ano e configurando-se como a segunda principal causa de morte no mundo. Essa patologia é caracterizada pela proliferação descontrolada de células anormais, decorrente de um processo neoplásico associado à perda dos mecanismos regulatórios associados ao crescimento, a diferenciação e a homeostase celular (OMS, 2025; HANAHAN, 2022).

As neoplasias podem ser classificadas em benignas ou malignas, de acordo com suas características biológicas e seu comportamento clínico. Enquanto os tumores benignos apresentam crescimento localizado e não invadem tecidos adjacentes, os malignos, como melanoma e linfoma, possuem capacidade de infiltração e disseminação para outros órgãos por meio da metástase. Além disso, frequentemente apresentam resistência aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia, o que favorece a progressão da doença e dificulta seu manejo clínico. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020).

Dentre os cânceres que acometem a população masculina, o câncer de próstata apresenta elevada incidência e representa uma das principais causas de mortalidade por câncer no Brasil. Entre 2000 e 2020, foram registrados 258.925 óbitos no país, evidenciando a magnitude da doença (SANTOS FILHO *et al.*, 2024). Estudos brasileiros indicam como principais fatores de risco a idade avançada, o histórico familiar e o tabagismo, reforçando a importância de estratégias eficazes de prevenção e diagnóstico precoce (SILVA; MESSIAS; WELLER, 2024).

Os produtos naturais emergem, então, como fonte de compostos bioativos na descoberta de fármacos. Cerca de 32% das pequenas moléculas aprovadas entre 1981 e 2019 derivam direta ou indiretamente de produtos naturais, incluindo fármacos como paclitaxel e vincristina, evidenciando sua relevância (NEWMAN; CRAGG, 2020). O estudo integrado por químicos sintéticos e biológicos permite identificar estruturas com potencial terapêutico, que podem ser utilizadas diretamente ou como base para modificação e otimização no desenvolvimento de novos medicamentos (ATANASOV *et al.*, 2021).

Nesse cenário, as peçonhas de serpentes são promissoras, por serem compostas por uma ampla variedade de moléculas bioativas, principalmente proteínas e peptídeos, com diferentes propriedades farmacológicas (SANTOS *et al.*, 2023; OFFOR; PIATER, 2024). Entre esses componentes, fosfolipases A₂, metaloproteinases, lectinas do tipo C e L-aminoácido oxidases destacam-se pelo potencial antitumoral descrito na literatura, por interferirem em processos celulares relacionados à proliferação, adesão, migração e invasão de células tumorais, além de

modularem vias de sinalização envolvidas na progressão do câncer (OFFOR; PIATER, 2024). A serpente *Bothrops alternatus*, conhecida no Brasil como urutu, apresenta em sua peçonha uma composição proteômica complexa e diversificada, predominando metaloproteínas (40%) e, entre os componentes minoritários, serinoproteases (8,80%), fosfolipases A₂ (6,85%), lectinas do tipo C (6,80%), proteínas ricas em cisteína (4,87%) e L-aminoácido oxidases (4,14%) (NCBI, s.d.; FUSCO *et al.*, 2025). Várias toxinas presentes em peçonhas de serpentes exercem efeitos biológicos relevantes e podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer (ALONAZI *et al.*, 2023; KOLVEKAR *et al.*, 2024; GUO *et al.*, 2024; OCHOA-MOSQUERA *et al.*, 2024).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Isolar, caracterizar e avaliar o potencial antitumoral *in vitro* de proteínas da peçonha da serpente *B. alternatus*.

2.2. Objetivos específicos

- Purificar e caracterizar parcialmente proteínas da peçonha de *B. alternatus*.
- Avaliar o potencial citotóxico dessas proteínas em células normais e tumorais de próstata humano.
- Investigar a seletividade das toxinas ofídicas quanto ao efeito citotóxico em células normais e tumorais de próstata.

3. Material e métodos

3.1. Origem da amostra

A fração A5B2 utilizada neste estudo foi previamente obtida e caracterizada em trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa. Inicialmente, a peçonha bruta cristalizada de *Bothrops alternatus* (574 mg), adquirida do serpentário de Batatais/SP (lote 2009; Cadastro SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado: A1503E6), foi diluída em tampão bicarbonato de amônia (AMBIC 0,05 M, pH 7,8), centrifugada e submetida à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel. A eluição foi realizada em gradiente crescente de AMBIC (0,05–1 M), com coleta das frações A1–A6, sendo a fração A5 selecionada por apresentar proteínas de baixo peso molecular com atividade fosfolipásica (FUNAGOSHI, 2024).

Posteriormente, a fração A5 foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 (2,0 × 100 cm), utilizando tampão AMBIC (0,05 M, pH 7,8) como fase móvel, sob fluxo de 20 mL/h e coleta de frações de 3 mL. As frações obtidas (A5B1, A5B2 e A5B3) foram monitoradas por absorvância em 280 nm e analisadas quanto à composição proteica e atividades biológicas (LIMA, 2025). A fração A5B2 foi selecionada para realização dos experimentos deste trabalho por conter proteínas de baixo peso molecular e atividade fosfolipásica relevante.

3.2. Purificação da amostra

A amostra A5B2 (45 mg) foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl HP, utilizando sistema de cromatografia líquida de rápida performance (FPLC - ÄKTA Purifier), sob fluxo de 0,5 mL/min e monitoramento da absorvância em 280 nm, conforme protocolo previamente estabelecido por Lima (2025). Foram empregados os tampões TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,5 contendo NaCl 4 M (A) e TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,5 (B). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão A e a eluição com o tampão B estabeleceu um gradiente decrescente de NaCl (4,0–0 M).

Posteriormente, as subfrações resultantes do procedimento anterior foram submetidas à cromatografia em coluna HiTrap Desalting (5 mL), utilizando sistema FPLC ÄKTA Purifier, para dessalinização. Como fase móvel, utilizou-se água destilada e a eluição ocorreu em condições constantes, sob um fluxo 0,5 mL/min e detecção em 280 nm. As frações contendo proteínas foram selecionadas para as etapas subsequentes.

3.3. Caracterização bioquímica

3.3.1 Análise em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A concentração de proteínas nas frações provenientes das etapas cromatográficas foi determinada por método ultravioleta (280 nm) no espectrofotômetro BioSpecMini (Shimadzu Biotech) (LAYNE, 1957). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro previamente estabilizado, utilizando TRIS-HCl 0,01 M como branco. Os valores de absorvância foram registrados para estimativa da concentração e cálculo da massa proteica. A massa de proteína em cada fração foi calculada pela relação entre o volume da amostra e sua respectiva concentração (massa = concentração × volume) (LAYNE, 1957).

A massa molecular das proteínas foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), na presença e ausência de agente redutor

(LAEMMLI, 1970). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com azul de coomassie para visualização das bandas proteicas. A massa molecular aparente foi determinada por comparação com marcador de massa molecular de referência.

3.3.2 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da peçonha bruta (50 µg) e da amostra A5B2 (50 µg) foi avaliada conforme o protocolo descrito por Dias *et al.* (2018), com modificações. Inicialmente, o gel foi preparado utilizando 0,75 g de agarose dissolvidos em 75 mL de PBS (pH 7,2), ao qual foram adicionados 0,75 mL de CaCl₂ (0,01 M), 500 µL de azida de sódio (0,005%) e 25 mL de gema de ovo. Em seguida, a mistura foi distribuída em placas e, após sua solidificação, foram confeccionados poços para aplicação das amostras. A atividade fosfolipásica foi determinada pela formação de halos translúcidos ao redor dos poços após 24 horas de incubação. Cada amostra foi avaliada em duplicata. A mensuração dos halos foi realizada por meio da determinação do diâmetro total da zona translúcida em centímetros, medido de uma extremidade à outra do halo, seguido pela subtração do diâmetro correspondente ao orifício de aplicação. Para isso, as imagens das placas foram analisadas no software Microsoft Paint, utilizando-se uma régua presente na imagem como referência para a conversão da escala de pixels para centímetros. Após a calibração da escala, o diâmetro dos halos foi mensurado em pixels e os valores obtidos foram convertidos para centímetros.

3.3.3 Atividade proteolítica (azocaseinolítica)

A atividade proteolítica da peçonha bruta (50 µg) e da amostra A5B2 (50 µg) foi avaliada utilizando azocaseína (1 mg/mL) preparada em tampão TRIS-NaCl (0,605 g de TRIS e 0,876 g de NaCl em 100 mL, pH 7,8). As reações, realizadas em duplicata, foram compostas por 100 µL de amostra e 800 µL de azocaseína, enquanto o controle foi preparado com 100 µL de solução salina. As amostras foram incubadas em banho-maria por 1 hora, seguidas da adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) e incubação por mais 20 minutos. Após centrifugação (10.000 × g, 10 min), a absorbância do sobrenadante foi determinada a 405 nm. A atividade proteolítica foi expressa em unidades de atividade (U), considerando que 1 U corresponde a um incremento de 0,001 unidade de absorbância a 405 nm, sendo calculada pela razão entre a absorbância obtida e 0,001, conforme descrito por Charney e Tomarelli (1947).

3.4. Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares humanas de próstata PC-3 (adenocarcinoma metastático de próstata humano, independente de andrógenos), obtida da American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1435), e PNT-2 (células epiteliais prostáticas humanas normais imortalizadas, não tumorigênicas), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (cat. 0366), foram utilizadas neste estudo. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C sob atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono. A renovação das culturas ocorreu por meio de repiques periódicos realizados quando a confluência celular atingia aproximadamente 80–90%.

3.5 Ensaio de viabilidade celular

O potencial citotóxico das amostras selecionadas foi avaliado pelo ensaio de redução da resazurina. Para isso, 1×10^4 células foram distribuídas em cada poço de placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para permitir a adesão celular. Posteriormente, o meio foi removido e substituído por soluções contendo diferentes concentrações das amostras, variando de 100 a 1,56 µg/mL. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Após 20 horas de exposição às amostras, foram adicionados 10 µL de solução de resazurina (0,4 mM) em cada poço. As placas permaneceram incubadas por mais 4 horas e, em seguida, a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific) nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada a partir das absorbâncias obtidas, conforme descrito por Bénéré *et al.* (2007), utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{Viabilidade celular} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Em que: O1 corresponde ao coeficiente de extinção molar do Alamar Blue oxidado a 570 nm (80586), O2 ao coeficiente de extinção molar do Alamar Blue oxidado a 600 nm (117216), A1 e A2 às absorbâncias das amostras a 570 e 600 nm, respectivamente, e P1 e P2 às absorbâncias do controle negativo nos mesmos comprimentos de onda.

3.6 Análise estatística

Os dados de viabilidade celular foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão das réplicas experimentais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Jamovi,

versão 2.7.37 (The jamovi project) e o software R versão 4.6.1 (R Core Team, 2026). Inicialmente, os dados foram submetidos à avaliação dos pressupostos estatísticos, incluindo os testes de normalidade de Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965) e Kolmogorov-Smirnov (Kolmogorov, 1933; Smirnov, 1948), além do teste de homogeneidade das variâncias de Levene (Levene, 1960). Considerando o objetivo de comparar cada concentração testada exclusivamente com o grupo controle e a presença de variâncias heterogêneas entre os grupos, as comparações múltiplas foram realizadas ANOVA de Welch e pós-teste de Dunnett T3, adequado para comparações com controle em situações de ausência de heterocedasticidade (Dunnett, 1980). Em todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Purificação da amostra

A amostra A5B2 foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica, resultando em duas subfrações principais, denominadas A5B2C1 e A5B2C2, conforme apresentado na **Figura 1**. A análise da concentração de proteínas nas amostras resultantes indicou o rendimento de cerca de 5,7 mg da fração A5B2C1 e 5,0 mg de A5B2C2. A dessalinização dessas frações por cromatografia de exclusão molecular resultou na obtenção das subfrações A5B2C1d e A5B2C2d, com recuperação proteica equivalente à 1,825 mg e 0,875 mg, respectivamente (**Fig. 2A e B**).

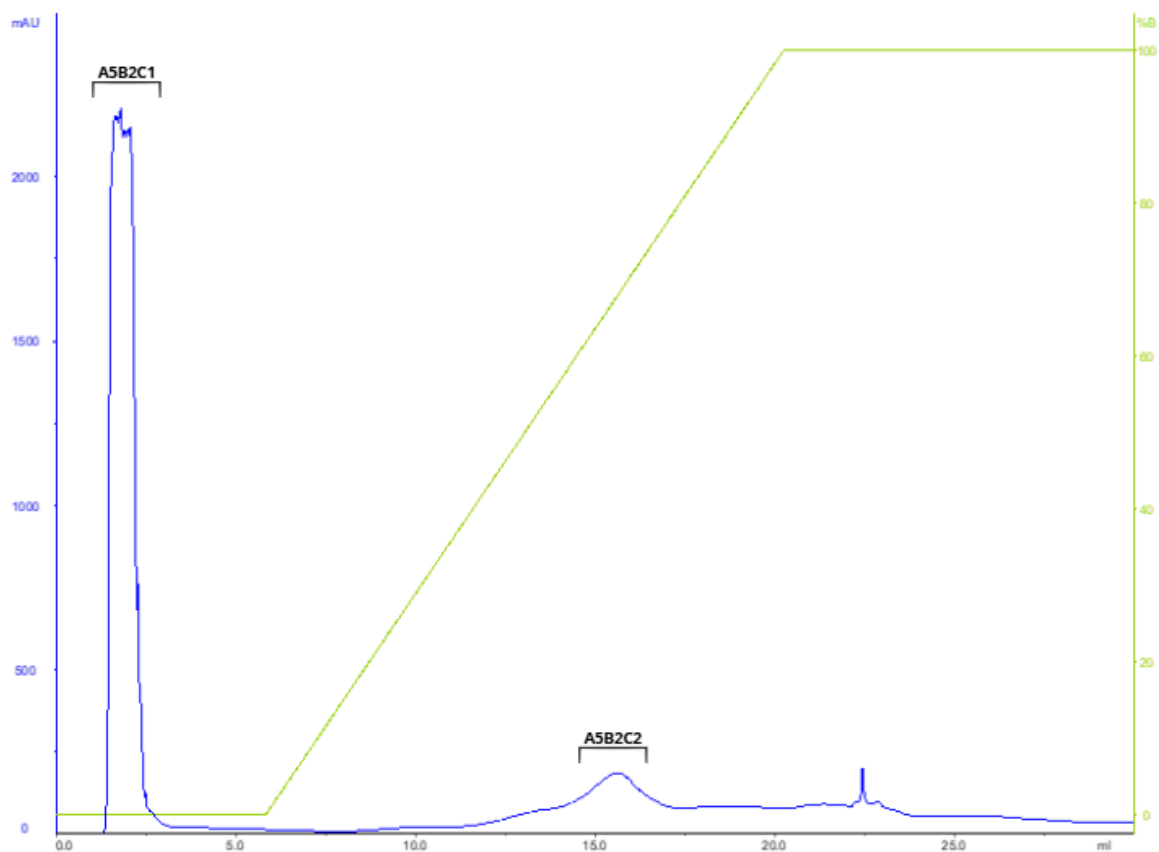
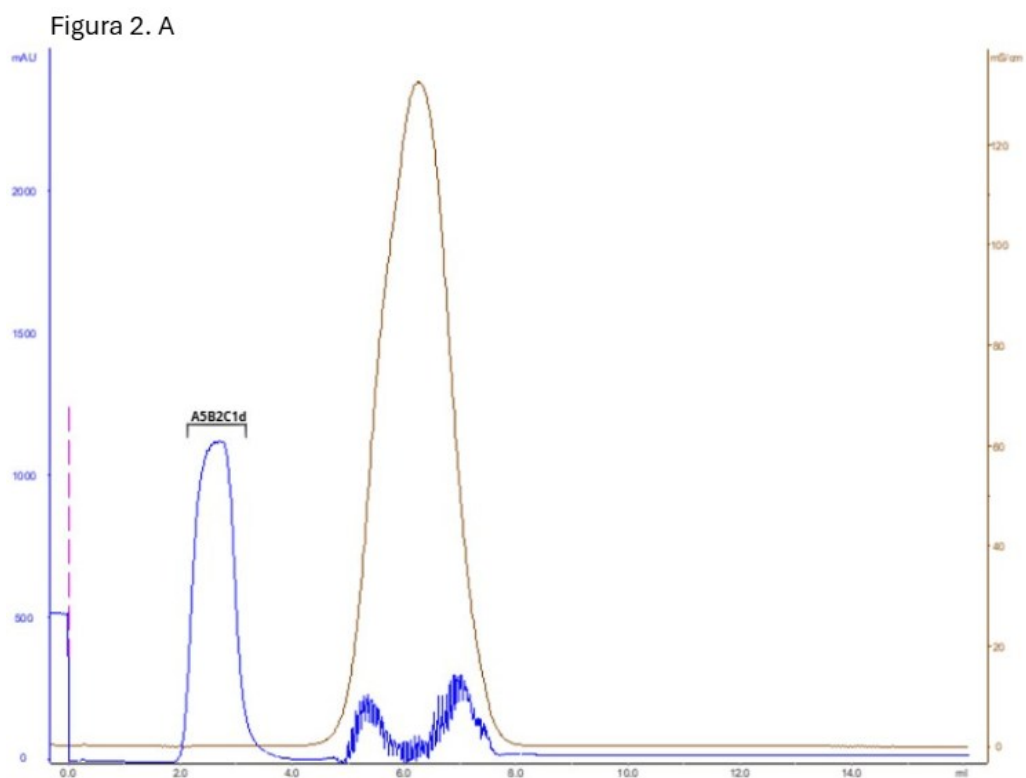


Figura 1. Cromatografia de interação hidrofóbica da amostra A5B2 em coluna Phenyl HP. A eluição foi realizada por gradiente decrescente de NaCl (0 – 100% tampão B – linha verde), sob fluxo de 0,5 mL/min, com coleta de frações de 1 mL. O perfil proteico foi monitorado por absorvância em 280 nm (linha azul), demonstrando 2 picos principais, denominados A5B2C1 e A5B2C2.



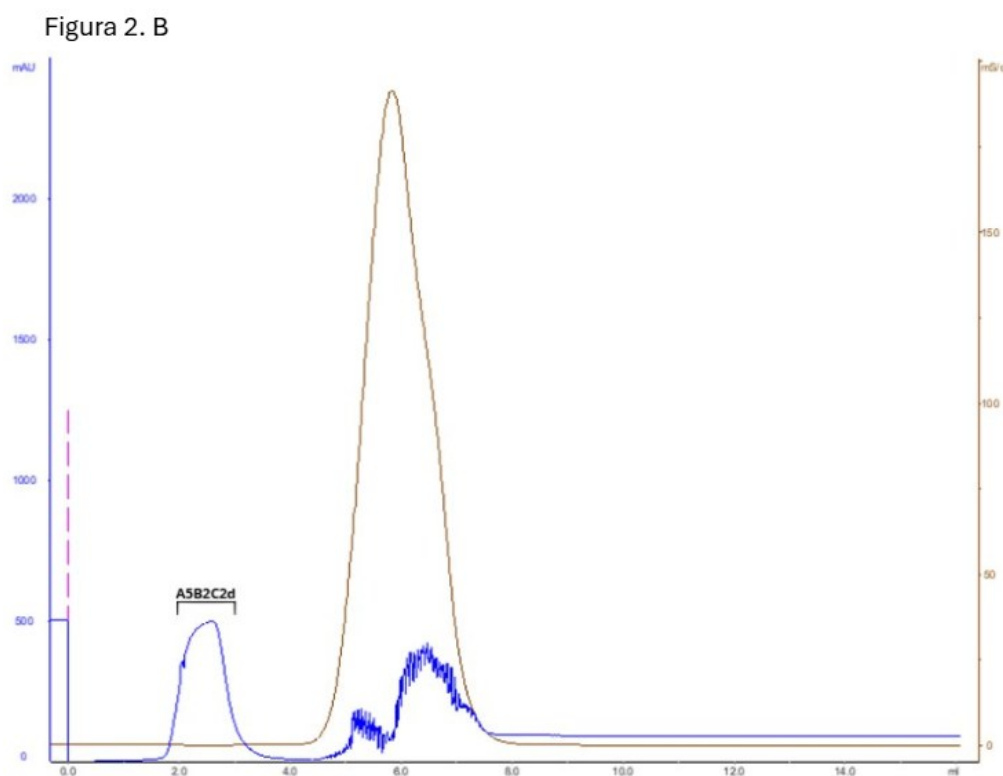


Figura 2. Cromatografia de dessalinização das frações A5B2C1 (A) e A5B2C2 (B) em coluna HiTrap Desalting (5 mL). A eluição foi realizada em condições constantes com água destilada, sob fluxo de 0,5 mL/min, com perfil cromatográfico monitorado por absorbância em 280 nm (linha azul) e condutância iônica em mS/cm (linha marrom). As subfrações resultantes foram denominadas A5B2C1d e A5B2C2d.

4.2. Eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida à 15% permitiu verificar a presença de proteínas de massa molecular entre 30 e 14 kDa nas frações A5B2, A5B2C1d e A5B2C2d (**Figura 3**). Conforme estimado por comparação com o padrão de massa molecular, todas as amostras apresentaram um perfil eletroforético semelhante: na ausência do agente redutor, observaram-se uma ou duas bandas proteicas mais intensas com massa molecular aparente entre 30 e 20 kDa. Em contraste, na presença do agente redutor, essas bandas deixaram de ser observadas, surgindo bandas com massa molecular aparente entre 14 e 20 kDa. Esse padrão indica que a redução das pontes dissulfeto alterou a mobilidade eletroforética das proteínas, resultando na migração de espécies de menor massa molecular aparente.

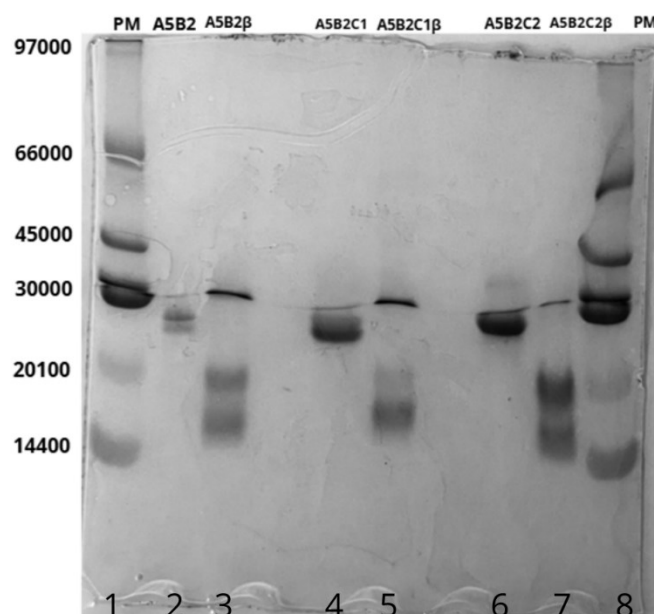


Figura 3. SDS-PAGE 15% do perfil proteico das frações obtidas a partir da fração A5B2. Linhas 1 e 8: padrão de massa molecular contendo fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). Linhas 2 e 3: fração A5B2 sem e com agente redutor (β -mercaptoetanol), respectivamente. Linhas 4 e 5: subfração A5B2C1d sem e com agente redutor, respectivamente. Linhas 6 e 7: subfração A5B2C2d sem e com agente redutor, respectivamente. Linha 8: padrão de massa molecular. As amostras foram aplicadas na quantidade de 50 μ g, enquanto o padrão de massa molecular foi aplicado em volume de 5 μ L.

4.3. Atividade fosfolipásica e proteolítica (azocaseinolítica)

Os ensaios enzimáticos foram realizados com o objetivo de confirmar a presença de enzimas ativas na peçonha bruta e na fração A5B2. Na avaliação da atividade fosfolipásica, observou-se a formação de halos translúcidos ao redor dos poços contendo a peçonha bruta e a fração A5B2, indicando atividade fosfolipásica em ambas as amostras. A fração A5B2 apresentou halo translúcido com diâmetro de 0,60 cm, enquanto a peçonha bruta apresentou halo de 0,45 cm. Em relação à atividade proteolítica, apenas a peçonha bruta apresentou atividade detectável, com absorbância média de 0,0145 a 405 nm, correspondente a 14,5 unidades de atividade. Em ambos os ensaios enzimáticos, as amostras controle (PBS) apresentaram resultados negativos.

4.4 Avaliação da viabilidade celular

Na avaliação da viabilidade celular da linhagem PNT-2 (**Figura 4**), a peçonha bruta apresentou elevada viabilidade celular nas concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5 e 25 μ g/mL, com valores superiores a 90%. Apenas as concentrações de 50 e 100 μ g/mL apresentaram

diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p = 0,0012$ e $p < 0,001$, respectivamente). Nessas concentrações, a viabilidade celular foi de 81,03% e 74,61%, respectivamente. As demais concentrações não diferiram significativamente do controle ($p > 0,05$). A fração A5B2C1d (**Figura 5**) promoveu redução da viabilidade celular da linhagem PNT-2, apresentando valores entre 81,28 e 95,62% nas concentrações avaliadas. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). A menor viabilidade celular foi observada na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (81,28%). Apenas a concentração de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ não diferiu estatisticamente do controle, enquanto todas as demais concentrações testadas apresentaram redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$). A fração A5B2C2d (**Figura 6**) apresentou valores de viabilidade celular entre 81,27% e 101,56%, sendo a menor viabilidade observada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), enquanto as concentrações de 1,56 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$ não diferiram significativamente do controle. A menor viabilidade celular foi observada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 81,27%.

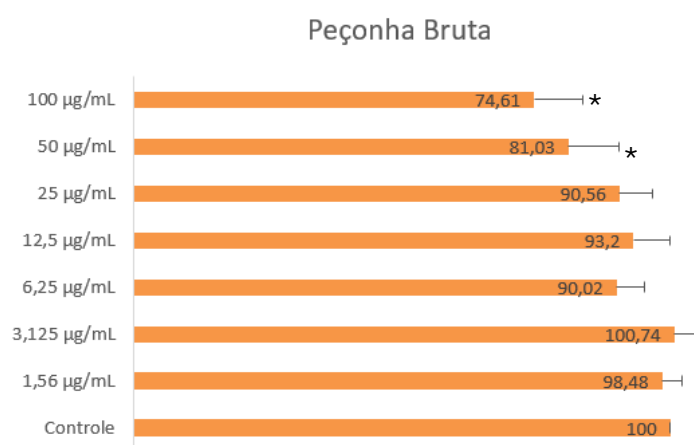


Figura 4. Avaliação da viabilidade celular da linhagem PNT-2 após tratamento com a peçonha bruta (PB) de *B. alternatus*. Os valores representam a média da viabilidade celular (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) das replicatas experimentais. As barras de erro representam o DP. Os valores de DP para as concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram, respectivamente, 3,80; 4,64; 5,30; 6,71; 6,16; 9,31 e 9,03%. * *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).*

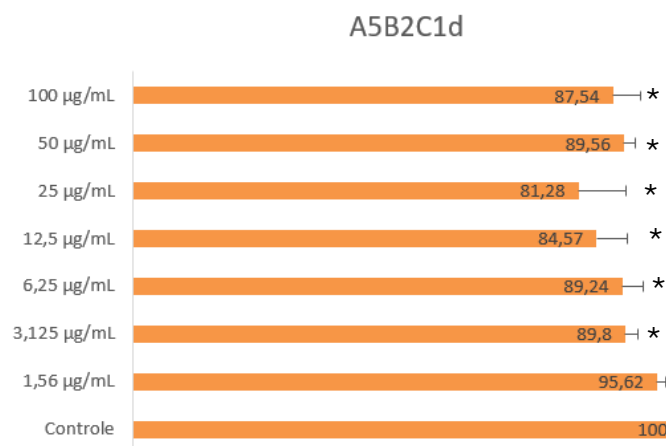


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular da linhagem PNT-2 após tratamento com a subfração A5B2C1d. Os valores representam a média da viabilidade celular (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) das replicatas experimentais. As barras de erro representam o DP. Os valores de DP para as concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL foram, respectivamente, 1,67; 2,29; 3,80; 5,68; 8,73; 2,19 e 5,14%. * *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).*

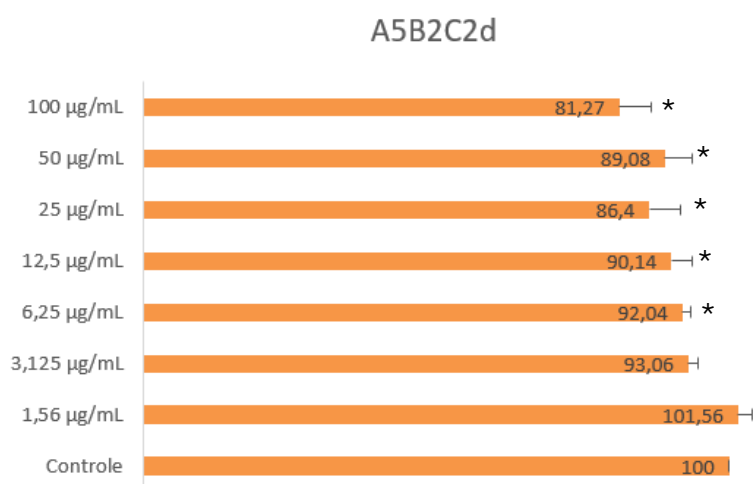


Figura 6. Avaliação da viabilidade celular da linhagem PNT-2 após tratamento com a subfração A5B2C2d. Os valores representam a média da viabilidade celular (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) das replicatas experimentais. As barras de erro representam o DP. Os valores de DP para as concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL foram, respectivamente, 2,41; 1,54; 1,54; 3,45; 5,27; 4,69 e 5,42%. * *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).*

Para a linhagem PC-3 (**Figura 7**), a avaliação da viabilidade celular da peçonha bruta apresentou valores entre 86,13 e 104,62% nas concentrações avaliadas. A menor viabilidade celular foi observada na concentração de 12,5 µg/mL, correspondendo a 86,13%. Apesar da redução observada nessa concentração, com a análise estatística, nenhuma das concentrações avaliadas apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). A fração A5B2C1d (**Figura 8**) apresentou valores de viabilidade celular entre 88,59 e 103,92% ao longo

das concentrações testadas. A menor viabilidade foi observada na concentração de 6,25 µg/mL, correspondendo a 88,59%. Entretanto, essa redução não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle ($p > 0,05$). A fração A5B2C2d (**Figura 9**) apresentou valores de viabilidade celular variando entre 96,54 e 101,14% nas concentrações avaliadas. A menor viabilidade foi observada na concentração de 100 µg/mL, correspondendo a 96,54%. De modo semelhante, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações avaliadas e o grupo controle ($p > 0,05$).

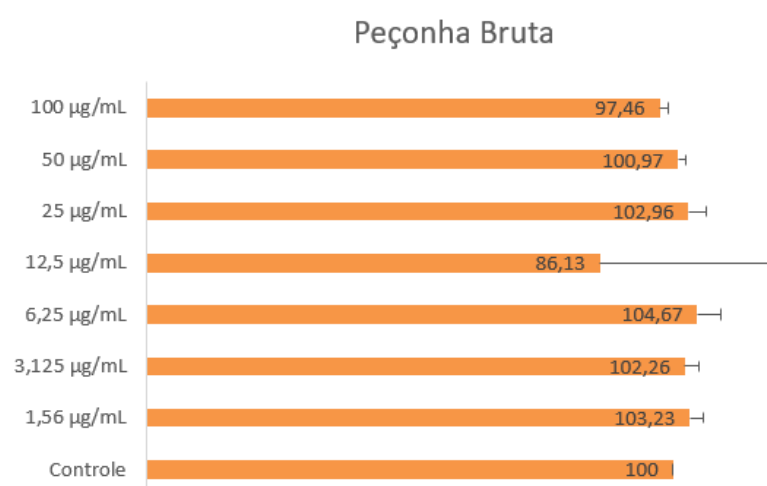


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular da linhagem PC-3 após tratamento com a peçonha bruta (PB) de *B. alternatus*. Os valores representam a média da viabilidade celular (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) das replicatas experimentais. As barras de erro representam o DP. Os valores de DP para as concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL foram, respectivamente, 2,50; 2,56; 4,44; 33,11; 3,27; 1,44 e 1,67%. Grupo controle ($p < 0,05$).

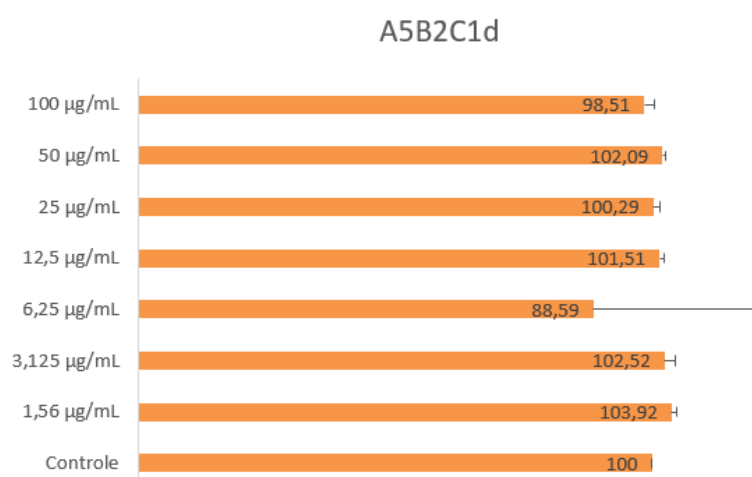


Figura 8. Avaliação da viabilidade celular da linhagem PC-3 após tratamento com a subfração A5B2C1d. Os valores representam a média da viabilidade celular (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) das replicatas experimentais. As barras de erro representam o DP. Os valores de DP para as concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL foram, respectivamente, 0,99; 2,21; 31,81; 0,88; 1,46; 0,75 e 2,04%. Grupo controle ($p < 0,05$).

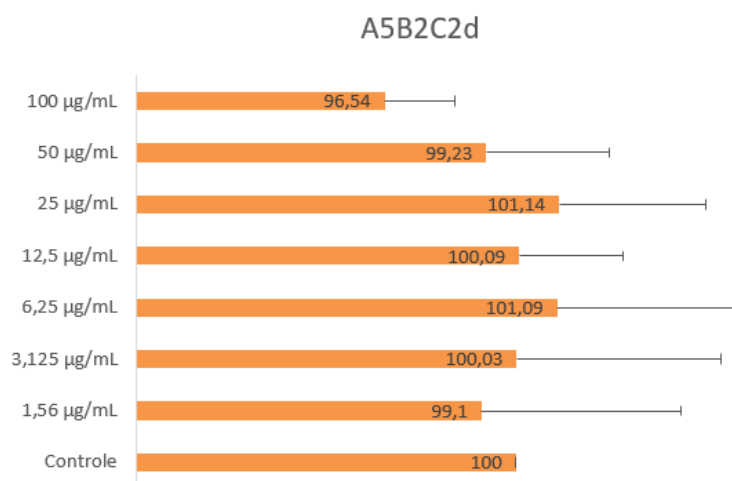


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular da linhagem PC-3 após tratamento com a subfração A5B2C2d. Os valores representam a média da viabilidade celular (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) das replicatas experimentais. As barras de erro representam o DP. Os valores de DP para as concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL foram, respectivamente, 5,24; 5,39; 4,79; 2,74; 3,89; 3,24 e 1,85%. Grupo controle ($p < 0,05$).

5. Discussão

Apesar dos avanços da quimioterapia, radioterapia e terapias-alvo, esses tratamentos de câncer ainda apresentam limitações, como baixa seletividade, toxicidade sistêmica, desenvolvimento de resistência e danos a tecidos saudáveis, o que reforça a necessidade de novas estratégias terapêuticas (ALMEIDA *et al.*, 2025). Nesse contexto, toxinas derivadas de peçonhas têm despertado interesse como fontes de moléculas bioativas com potencial antitumoral, devido à capacidade de interferir em processos associados à progressão tumoral e representar alternativas promissoras para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o câncer (OCHOA-MOSQUERA *et al.*, 2024).

O desenvolvimento de terapias-alvo tem ampliado o interesse por moléculas derivadas de venenos, devido ao seu potencial de atuar sobre alvos moleculares envolvidos na tumorigênese (URRA; ARAYA-MATURANA, 2022). Segundo Ma e Kwok (2020), proteínas e peptídeos provenientes de peçonhas podem atuar seletivamente sobre células neoplásicas, modulando mecanismos relacionados à proliferação, apoptose, angiogênese e metástase. Entre elas, destacam-se desintegrinas, fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidases, cujas atividades antitumorais têm sido amplamente investigadas. Essas características tornam as toxinas ofídicas importantes modelos para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, especialmente como alternativas para aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos associados aos tratamentos convencionais (MA; KWOK, 2020).

A escolha da peçonha da serpente de *B. alternatus* foi respaldada pelo potencial biotecnológico já descrito de seus compostos proteicos. Estudos recentes demonstraram que seus componentes apresentam atividades antimicrobianas, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e citotóxicas, evidenciando seu potencial farmacológico (PEREIRA *et al.*, 2021; ECHEVERRÍA *et al.*, 2023). Embora a composição proteica e as propriedades biológicas da peçonha de *B. alternatus* tenham sido investigadas, estudos voltados especificamente à avaliação do potencial antitumoral de proteínas isoladas dessa espécie ainda são limitados, reforçando a relevância da presente investigação (FUSCO *et al.*, 2025).

A seleção da fração A5B2 para as etapas subsequentes de purificação foi baseada em sua caracterização bioquímica prévia. Estudos desenvolvidos por Funagoshi (2024) identificaram na fração A5 proteínas de baixa massa molecular associadas à atividade fosfolipásica, enquanto Lima (2025) demonstrou que essas características foram mantidas após novo fracionamento cromatográfico, resultando na obtenção da fração A5B2. A escolha dessa fração foi reforçada pelo fato de que proteínas de baixo peso molecular presentes em peçonhas ofídicas, incluindo fosfolipases A₂ e lectinas, têm sido amplamente reconhecidas como moléculas bioativas com potencial antitumoral, atuando na modulação de processos como proliferação celular, apoptose, angiogênese, adesão e migração de células tumorais (GUO *et al.*, 2024).

A purificação da fração A5B2 por cromatografia de interação hidrofóbica resultou na obtenção de duas subfrações principais (A5B2C1 e A5B2C2), apresentando diferenças no perfil cromatográfico e no rendimento proteico em relação aos resultados obtidos por Lima (2025). A cromatografia de interação hidrofóbica separa proteínas com base na interação entre regiões hidrofóbicas expostas e a fase estacionária, sendo a retenção influenciada pelas condições de eluição, especialmente pelo gradiente de sal. Assim, variações nesse gradiente podem alterar o perfil de separação e o rendimento das frações obtidas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à dessalinização por cromatografia de exclusão molecular, técnica que promove a separação das moléculas de acordo com seu tamanho, permitindo a remoção de sais e a troca de tampão, etapas essenciais para preservar a integridade das proteínas e viabilizar sua utilização nas análises subsequentes (SCOPES, 1994).

Conforme observado na **Figura 3**, as subfrações A5B2C1d e A5B2C2d apresentaram bandas predominantes entre 30 e 20 kDa em condições não redutoras e bandas entre 20 e 14 kDa após a redução. Na técnica de SDS-PAGE, a adição de agentes redutores promove a ruptura das pontes dissulfeto, levando à dissociação de proteínas multiméricas em suas subunidades e alterando sua mobilidade eletroforética, o que permite estimar a massa molecular das cadeias

polipeptídicas individuais (LAEMMLI, 1970). O perfil observado é compatível com o descrito para lectinas do tipo C, especificamente a Baltetina isolada de *B. alternatus* (PEREIRA *et al.*, 2021; ZENG *et al.*, 2024). De forma semelhante ao perfil proteico das frações analisadas neste trabalho, a Baltetina apresenta estrutura heterodimérica estabilizada por pontes dissulfeto, migrando em torno de 25 kDa em condições não redutoras e aproximadamente 15 kDa após redução (PEREIRA *et al.*, 2021). Assim, embora o perfil eletroforético seja compatível com essa família de proteínas ele não é suficiente para confirmar sua identidade, sendo necessárias análises bioquímicas complementares, como determinação da atividade enzimática, ponto isoelétrico e espectrometria de massas, para sua caracterização definitiva.

Nos ensaios de viabilidade celular, a interpretação dos resultados considerou os critérios estabelecidos pela ISO 10993-5, segundo os quais reduções da viabilidade celular inferiores a 30% não são consideradas indicativas de citotoxicidade relevante, sendo necessária uma viabilidade celular inferior a 70% para caracterização de um efeito citotóxico significativo (RAMAKRISHNAN; DALY, 2026). Sob essa perspectiva, a peçonha bruta promoveu redução significativa da viabilidade celular da linhagem PNT-2 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, enquanto não foram observadas diferenças estatísticas na linhagem PC-3. Entretanto, embora tenha ocorrido diferença estatística em PNT-2, os valores de viabilidade celular permaneceram acima do limite estabelecido pela norma, indicando ausência de citotoxicidade relevante nas condições experimentais empregadas. Além disso, a ausência de diferenças estatísticas em PC-3 demonstra que a peçonha bruta não apresentou atividade citotóxica seletiva sobre a linhagem tumoral.

Takayasu *et al.* (2023) demonstraram que peçonhas de diferentes espécies de *Bothrops* apresentam respostas biológicas distintas entre linhagens celulares, evidenciando que a atividade citotóxica depende da composição da peçonha e das características das células-alvo. Esse resultado é particularmente interessante por evidenciar diferenças de resposta entre as linhagens PNT-2 e PC-3, reforçando que diferentes componentes presentes na peçonha podem interagir de forma distinta com cada tipo celular e destacando a necessidade de isolamento de toxinas individuais para identificação de moléculas com potencial antitumoral seletivo (GIRIBALDI *et al.*, 2021).

As subfrações A5B2C1d e A5B2C2d apresentaram comportamento semelhante quanto à ausência de atividade citotóxica significativa sobre a linhagem tumoral PC-3, porém diferiram quanto à intensidade do efeito observado na linhagem PNT-2. A subfração A5B2C1d apresentou redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 3,125 µg/mL, enquanto a A5B2C2d apresentou efeito significativo a partir de 6,25 µg/mL, indicando maior redução da

viabilidade celular promovida pela A5B2C1d sobre a linhagem não tumoral. Entretanto, assim como observado para a peçonha bruta, ambas as subfrações mantiveram a viabilidade celular acima de 70%, não caracterizando citotoxicidade relevante de acordo com os critérios da ISO 10993-5. Em PC-3, embora a concentração de 6,25 µg/mL da A5B2C1d tenha apresentado a menor viabilidade celular (88,59%), não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0,05$). Em contrapartida, a A5B2C2d não apresentou efeito citotóxico sobre essa linhagem. Esses resultados sugerem que, embora ambas as subfrações apresentem atividade biológica sobre a linhagem PNT-2, nenhuma demonstrou seletividade citotóxica para a linhagem tumoral PC-3 nas condições avaliadas. A diferença de atividade observada entre as subfrações pode estar relacionada à presença de proteínas estruturalmente semelhantes ou de diferentes isoformas, uma vez que pequenas variações estruturais podem modificar a atividade biológica e sua interação com distintos tipos celulares (HIU; YAP, 2020; DIAS *et al.*, 2023).

Pereira *et al.* (2021) caracterizaram a Baltetina, uma lectina do tipo C isolada da peçonha de *B. alternatus*, cuja principal atividade descrita foi a inibição da agregação plaquetária, sem evidências de citotoxicidade. Considerando a semelhança dos perfis eletroforéticos observados neste estudo, a presença da Baltetina ou de proteínas estruturalmente relacionadas constitui uma hipótese plausível para explicar o comportamento biológico semelhante das subfrações, embora essa hipótese dependa de análises complementares para sua confirmação. Além disso, Offor e Piater (2024) destacam que as atividades biológicas das lectinas derivadas de peçonhas variam conforme sua estrutura e o tipo celular avaliado, podendo incluir efeitos distintos da citotoxicidade. Dessa forma, a atividade limitada observada nas condições experimentais deste estudo não exclui o potencial biológico das subfrações A5B2C1d e A5B2C2d. Estudos adicionais, incluindo espectrometria de massas, ensaios *in vitro* com diferentes linhagens celulares e a dosagem de metabólitos indicadores de dano celular, são importantes para identificar as moléculas bioativas presentes na peçonha e nas frações analisadas, bem como investigar seus mecanismos de ação.

6. Conclusão

Os resultados obtidos permitiram o isolamento e a caracterização bioquímica parcial de subfrações da peçonha de *B. alternatus*, contribuindo para o conhecimento sobre sua composição e propriedades enzimáticas. As análises cromatográficas, eletroforéticas e enzimáticas forneceram informações relevantes para a caracterização dessas subfrações e para a continuidade de estudos envolvendo seus componentes bioativos.

Nas condições experimentais empregadas, a peçonha bruta e as subfrações A5B2C1d e A5B2C2d não apresentaram atividade citotóxica seletiva sobre a linhagem tumoral PC-3. Entretanto, a peçonha bruta e as subfrações reduziram significativamente a viabilidade celular da linhagem não tumoral PNT-2, sendo a A5B2C1d responsável pela maior redução observada. Embora os resultados não evidenciem potencial antitumoral seletivo para as amostras avaliadas, eles reforçam a necessidade de estudos futuros voltados à identificação das proteínas presentes nas subfrações, à elucidação de seus mecanismos de ação e à avaliação em outros modelos experimentais.

7. Referências

- ALMEIDA, J. R. *et al.* Peptídeos derivados do veneno de cobra como candidatos anticancerígenos: terapias pioneiras de próxima geração. *Toxicon*, v. 255, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189479>
- ALONAZI, M. *et al.* Functional characterization and anti-tumor effect of a novel group II secreted phospholipase A2 from snake venom of *Cerastes cerastes gasperetti*. *Molecules*, v. 28, n. 18, p. 6517, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28186517>
- ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, p. 200-216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- BÉNÉRE, E.; DA LUZ, R. A. I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *Journal of Microbiological Methods*, v. 71, n. 2, p. 101-106, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.07.014>
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41059-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41059-3)
- DIAS, E. H. V.; RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. BaltPLA2: a new phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* snake venom with antiplatelet aggregation activity. *Protein & Peptide Letters*, v. 25, n. 10, p. 943-952, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929866525666181004101622>
- DIAS, E. H. V. *et al.* Effect of BaltPLA2, a phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* snake venom, on the viability of cells infected with dengue virus. *Toxicology in Vitro*, v. 88, p. 105562, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105562>
- DUNNETT, C. W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, v. 50, n. 272, p. 1096-1121, 1955.

ECHEVERRÍA, S. M. et al. Inibidores da agregação plaquetária do veneno da serpente *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, v. 223, e107014, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.107014>

FUNAGOSHI, S. A. *Identificação e separação de fosfolipases da peçonha de Bothrops alternatus com potencial antiparasitário e antitumoral*. 2024. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2024.

FUSCO, L. S. et al. Estudos venômicos e antivenômicos de F(ab')₂ das proteínas do veneno de *Bothrops alternatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 318, pt. 2, p. 144777, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144777>

GIRIBALDI, J.; SMITH, J. J.; SCHROEDER, C. I. et al. Recent developments in animal venom peptide nanotherapeutics with improved selectivity for cancer cells. *Biotechnology Advances*, v. 54, p. 107769, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107769>

GUO, X.; FU, Y.; PENG, J.; FU, Y.; DONG, S.; DING, R.; QI, X.; BAO, J. Emerging anticancer potential and mechanisms of snake venom toxins: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 269, pt. 1, p. 131990, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131990>

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HIU, J. J.; YAP, M. K. K. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. *Biochemical Society Transactions*, v. 48, n. 2, p. 719-731, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST20200110>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. 6. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

KOLMOGOROV, A. N. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. *Giornale dell'Istituto Italiano degli Attuari*, Roma, v. 4, p. 83-91, 1933.

KOLVEKAR, N. et al. Daboialipase, a phospholipase A₂ from *Vipera russelli russelli* venom, possesses anti-platelet, anti-thrombin and anti-cancer properties. *Toxicon*, v. 239, p. 107632, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.107632>

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

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, v. 3, p. 447-454, 1957. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03413-8)

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I. et al. (ed.). *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

LIMA, B. N. *Fosfolipase de Bothrops alternatus: purificação e avaliação de potencial antimicrobiano*. 2025. 25 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2025.

MA, R.; KWOK, H. F. Novas oportunidades e desafios de moléculas derivadas de veneno e bactérias para terapia direcionada contra o câncer. *Seminars in Cancer Biology*, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.08.010>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Taxonomy Browser: Bothrops alternatus*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=64174>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

OCHOA-MOSQUERA, J.; MONTROYA-GÓMEZ, A.; JIMÉNEZ-CHARRIS, E. Snake venom toxins as potential therapeutic agents in the treatment of prostate cancer. *Molecular Biology Reports*, v. 51, n. 11, p. 1153, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09970-z>

OFFOR, B. C.; PIATER, L. A. Snake venom toxins: potential anticancer therapeutics. *Journal of Applied Toxicology*, v. 44, n. 5, p. 666-685, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.4544>

OLIVEIRA, A. L. N. *et al.* Viper venom phospholipase A₂ database: the structural and functional anatomy of a primary toxin in envenomation. *Toxins*, v. 16, n. 2, p. 71, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins16020071>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *WHO updates list of essential medicines to include key cancer, diabetes treatments*. Genebra, 5 set. 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/05-09-2025-who-updates-list-of-essential-medicines-to-include-key-cancer--diabetes-treatments>

PEREIRA, M. S.; MARCUSSI, S.; FULY, A. L. *et al.* Baltetin: a new C-type lectin-like isolated from *Bothrops alternatus* snake venom which acts as a platelet aggregation inhibitor. *Journal of Chromatography B*, v. 1180, p. 122865, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122695>

R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2026. Disponível em: <https://www.R-project.org>

RAMAKRISHNAN, Rashmi; DALY, Andrew C. Revisiting ISO 10993-5 In Vitro Cytotoxicity Standard Tests for Evaluation of Extracellular Matrix-Based Biomaterials. *International Journal of Biomaterials*, [S. l.], v. 2026, Article ID 7395612, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1155/ijbm/7395612>

SANTOS, A. A. A. *et al.* Utilização de toxinas ofídicas como mecanismos farmacológicos. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, v. 4, n. 4, 2023. DOI: <https://doi.org/10.51161/integrar/remis/3847>

SANTOS FILHO, M. A. A.; SAB, Y.; BARROS, J. M. T.; PORTO, L. A. Tendências na mortalidade por câncer de próstata no Brasil ao longo de duas décadas (2000-2020). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 24, n. 8, e16020, 2024. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e16020.2024>

SCOPES, R. K. *Protein purification: principles and practice*. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2333-5>

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, Oxford, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SILVA, I. A.; MESSIAS, M. C. A.; WELLER, M. Fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de próstata: uma revisão da literatura brasileira. *Archives of Health Investigation*, v. 13, n. 1, p. 83-91, 2024. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v13i1.6316>

SMIRNOV, N. V. Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions. *The Annals of Mathematical Statistics*, Beachwood, v. 19, n. 2, p. 279-281, 1948

TAKAYASU, B. S.; RODRIGUES, S. S.; MADUREIRA TRUFEN, C. E.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; ONUKI, J. Effects on cell cycle progression and cytoskeleton organization of five *Bothrops* spp. venoms in cell culture-based assays. *Heliyon*, v. 9, n. 7, e18317, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18317>

THE JAMOVİ PROJECT. *jamovi*. Version 2.7.37. Sydney: The jamovi Project, 2025. Disponível em: <https://www.jamovi.org>.

URRA, F. A.; ARAYA-MATURANA, R. Putting the brakes on tumorigenesis with snake venom toxins: new molecular insights for cancer drug discovery. *Seminars in Cancer Biology*, v. 80, p. 195-204, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.006>

WELCH, B. L. The generalization of "Student's" problem when several different population variances are involved. *Biometrika*, v. 34, n. 1-2, p. 28-35, 1947.

ZENG, F. Y.; JI, R. S.; YU, X. Q. *et al.* Uma nova proteína semelhante à lectina do tipo C do veneno de cobra modula a coagulação sanguínea por meio da ação no fator de von Willebrand

e no fator de coagulação IX. *Scientific Reports*, v. 14, p. 22962, 2024. DOI:
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-73508-3>