
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE PEPTÍDEOS ISOLADOS
DA TEIA DA ARANHA *TRICHONEPHILA CLAVIPES***

GABRIELA MENDONÇA PAULA

**Rio Claro – SP
2025**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE PEPTÍDEOS ISOLADOS
DA TEIA DA ARANHA *TRICHONEPHILA CLAVIPES***

GABRIELA MENDONÇA PAULA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular, Molecular e
Microbiologia).

Orientador: Dr. Mario Sergio Palma
Coorientador: Dr. Geovanny Soares
Pauferro Barroso.

**Rio Claro – SP
2025**

P324c	Paula, Gabriela Mendonça Caracterização estrutural e funcional de peptídeos isolados da teia da aranha <i>Trichonephila clavipes</i> / Gabriela Mendonça Paula. -- Rio Claro, 2025 100 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Mario Sergio Palma Coorientador: Geovanny Soares Pauferro Barroso 1. Teia. 2. Paralisia. 3. Peptídeo. 4. Comportamento. 5. Toxicidade. I. Título.
-------	---

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA TEIA DA ARANHA TRICHONEPHILA CLAVIPES

AUTORA: GABRIELA MENDONÇA PAULA

ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA

COORIENTADOR: GEOVANNY SOARES PAUFERRO BARROSO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MARIO SERGIO PALMA**
Data: 02/10/2025 12:10:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP Instituto de Biociências de Rio Claro SP



Paulo Cesar
Gomes:66383579649
2025.10.01 17:23:38
-03'00'

Prof. Dr. PAULO CÉSAR GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara / SP

Documento assinado digitalmente
 **MILENE FERRO**
Data: 02/10/2025 11:36:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MILENE FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 01 de outubro de 2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus pela oportunidade de me proporcionar esta caminhada e de me permitir seguir, todos os dias, naquilo que me faz feliz, cercada por aqueles que amo.

Aos meus pais — minha mãe, Tania, que está comigo todos os dias, apoiando-me, incentivando-me, sendo meu ombro mais acolhedor e a pessoa mais importante da minha vida —, obrigada por tudo e por sempre acreditar em mim. Ao meu pai, Carmelo, a estrela mais brilhante da minha vida, que, onde quer que esteja, me guia em todas as minhas decisões e todos os meus dias — meu anjo, meu eterno amor —, sou grata por cada dia e por tudo que faço, sempre com vocês em pensamento.

Aos meus irmãos, Isa e Cadu, meus pequenos, nem tão pequenos assim, meus amores, obrigada por serem quem são e por estarem comigo em tudo. Que sorte a minha ter vocês.

Ao meu namorado, Eduardo, que me apoiou nesta jornada, entendendo mais sobre esse mundo tão intenso que é a vida de mestrandia e apoiando esse meu lado cientista, obrigada por estar comigo diariamente, por ser meu parceiro de vida e por me apoiar nas decisões mais ousadas desse mundo acadêmico.

Aos meus familiares e amigos, que acompanharam esta trajetória, me apoiaram e sempre estiveram comigo, mesmo à distância, mas presentes em palavras, obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Mario Palma, que apoiou meu retorno à vida acadêmica, que me ensina todos os dias, com paciência, compartilhando um pouco do seu vasto conhecimento comigo. Obrigada por me proporcionar essa experiência que jamais esquecerei.

Aos meus salvadores de laboratório, Bibi, e meu coorientador, Ge, obrigada por não desistirem de mim e por me ajudarem em todos os desafios: pelas contas e análises estatísticas, pelas risadas, pelos cafés, pela gentileza e pelo carinho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e suporte financeiro concedido durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas de laboratório e a todos aqueles que me ensinaram e me ajudaram em cada etapa do meu aprendizado nesta caminhada, muito obrigada!

RESUMO

As aranhas da espécie *Trichonephila clavipes* são reconhecidas pela construção de teias orbitais complexas, compostas por fios com propriedades físico-químicas específicas para a captura de presas. Essas teias contêm vesículas que armazenam toxinas peptídicas e compostos orgânicos, fundamentais para paralisar ou provocar a morte dos insetos capturados. Este estudo teve como objetivo isolar, caracterizar estruturalmente e avaliar os níveis de toxicidade dos peptídeos presentes nas teias dessa espécie. O extrato das teias foi fracionado por cromatografia líquida (RP-HPLC), e as sequências dos peptídeos foram determinadas por espectrometria de massas (HPLC-QToF-MS e MS/MS). Após a identificação, os peptídeos foram sintetizados em fase sólida, sendo selecionados três compostos para análises detalhadas: Trichonephiline-1, Trichonephiline-2 e Trichonephiline-3. Esses peptídeos apresentaram caráter ácido e polianiónico, diferenciando-se de toxinas catiónicas comumente descritas em aranhas. A toxicidade foi avaliada em abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, utilizadas como modelo biológico. Ensaio de dose-resposta indicaram paralisia transitória com efeitos imediatos após a inoculação. A análise comportamental revelou variações temporais, com efeitos paralisantes intermitentes para Trichonephiline-1 e Trichonephiline-3, enquanto Trichonephiline-2 provocou uma fase excitatória antes da paralisação. As análises enzimáticas, realizadas após 24 horas de exposição, envolveram GST, AChE e CaE-3 na cabeça e GST, CaE-3 e G6PDH no abdômen. Foram observadas poucas diferenças significativas, exceto pela redução da CaE-3 no abdômen, sugerindo resposta de detoxificação. Além disso, a análise proteômica do cérebro de abelhas expostas ao Trichonephiline-1 identificou 695 proteínas distribuídas em processos biológicos, com destaque para alterações em metabolismo mitocondrial, defesa celular e citoesqueleto, refletindo estratégias adaptativas de sobrevivência. Em conjunto, os resultados indicam que os peptídeos isolados apresentam efeitos tóxicos específicos, contribuindo para a compreensão do papel ecológico das toxinas presentes nas teias de *T. clavipes*.

Palavras-chave: teia; paralisia; peptídeos; comportamento; toxicidade.

ABSTRACT

Spiders of the species *Trichonephila clavipes* are recognized for their ability to construct orb webs, composed of threads with specific physicochemical properties for prey capture. The webs contain vesicles that harbor peptidic toxins and organic compounds, essential for prey paralysis or death. This study aimed to isolate, determine the chemical structure, and evaluate the toxicity levels of the peptides present in the webs. The extract was fractionated by liquid chromatography (RP-HPLC), and the peptide sequences were determined by mass spectrometry (HPLC-QToF-MS and MS/MS). After sequence determination, the peptides were synthesized in solid phase. Three peptides, named Trichonephiline-1, Trichonephiline-2, and Trichonephiline-3, were selected for structural and functional characterization, being identified as acidic and poly-anionic, which distinguishes them from other spider toxins. Peptide toxicity was tested using the stingless bee *Melipona scutellaris* as a biological model. Dose-response assays revealed that the peptides caused transient paralysis in the insects, with immediate effects after inoculation. Behavioral analysis, conducted with the aid of cameras and specialized software, indicated temporal variations in the behaviors of bees exposed to the peptides, highlighting the intermittent paralyzing effect of Trichonephiline-1 and Trichonephiline-3, and an excitatory phase observed with Trichonephiline-2. Enzymatic analysis, performed after 24 hours of exposure using GST, AChE, and CaE-3 for the head, and GST, CaE-3, and G6PDH for the abdomen of the bees, showed few significant differences among treatments, except for GST in the abdomen, suggesting a detoxification response related to peptide degradation. Additionally, a proteomic analysis with Trichonephiline-1 was conducted to investigate the insect proteome after exposure. A total of 695 proteins were identified across five treatments, grouped into biological processes. Mitochondrial metabolism, cellular defense, and cytoskeleton processes stood out after 24 hours of exposure, reflecting the animal's attempt to survive the observed paralysis in behavioral assays, evidenced by a decrease in cytoskeleton proteins and an increase in proteins associated with metabolism and cellular defense. The results suggest that these peptides have specific toxic actions that contribute to understanding the ecological role of toxins in spider webs.

Keywords: web; paralysis; peptides; behavior; toxicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 (A)** - Aranha *Trichonephila clavipes* segurando uma presa *Melipona scutellaris*, coletada no campus da UNESP de Rio Claro/SP. **(B)** Teia orbital, produzida pela *T. clavipes*, com fios de coloração amarelada. Imagens: Geovanny Barroso..... 14
- Figura 2.** Esquema de glândulas abdominais presentes na parte posterior do abdômen das *T. clavipes*. Ampliação em destaque para as sete glândulas responsáveis pela fiação das sedas da teia: ampulada maior, flageliforme, ampulada menor, piriforme, agregada, tubuliforme e aciniforme (RÖMER et al., 2008) 15
- Figura 3** Estruturas das gotículas presentes no fio da teia da *Trichonephila clavipes* **(A)** Eletromicrografia de varredura das gotículas mostrando suas camadas, para base de formação da gotícula, verificação de fio axial duplo devido a síntese de gotícula viscosa. **(B)** Camada externa da gotícula através da eletromicrografia de varredura. Em preto representa a camada interna contendo lipídeos. **(C)** Gotículas presentes nos fios de seda da *T. clavipes* dadas através de microscopia de varredura (MEV). **(D)** Detalhe do formato ovoide da gotícula. 17
- Figura 4. A)** Cromatograma dos íons totais (TIC) gerado a partir da fração de massa molecular menor que 3 kDa do extrato da teia de *T. clavipes*. **B)** ampliação da área de eluição dos picos de interesse utilizados neste estudo. 30
- Figura 5.** Espectros CID dos íons moleculares selecionados, que resultaram na interpretação das sequências mencionadas: **(A)** peptídeo Trichonephiline-1, cuja sequência MVDDALGAADAEMV-OH, foi obtida selecionando-se o íon de m/z 704.3569 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; evidenciando os íons- fragmentos do tipo $-b$ e $-y$; **(B)** peptídeo Trichonephiline-2, cuja sequência EGVDDALGAADNLDT- OH foi obtida selecionando-se o íon de m/z 738.3660 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; evidenciando os íons- fragmentos do tipo $-b$ e $-y$. e **(C)** peptídeo Trichonephiline-3, cuja sequência MVSVDLGAACMDPV- OH foi obtida, selecionando-se o íon de m/z 704.3449 na forma de $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo $-b$ e $-y$ 31
- Figura 6.** Modelos moleculares dos peptídeos Trichonephiline foram elaborados para representar o potencial eletrostático de suas superfícies, com base em estruturas preditas pelo software PEPFOLD 4.0. A: Trichonephiline-1 (MVDDALGAADAEMV-OH); B: Trichonephiline-2 (EGVDDALGAADNLDT-OH); C: Trichonephiline-3 (MVSVDLGAASMDPV-OH). As áreas de superfície com potencial eletrostático positivo estão indicadas em azul, enquanto as regiões de potencial negativo são destacadas em vermelho. As imagens à esquerda correspondem à visualização frontal (0°), e aquelas à direita representam a rotação de 180° , exibindo a face posterior dos peptídeos.....32
- Figura 7.** Curva dose-efeito para a injeção do peptídeo Trichonephiline-1 na hemocela das abelhas *M. scutellaris*. Foram injetadas seis concentrações do peptídeo, além do controle (solução salina) e foram observados o comportamento das abelhas após 24 horas de injeção. Após término do bioensaio foi obtida a $ED_{20} = 2,3$ ng/mg..... 33
- Figura 8.** Curva dose-efeito para a injeção do peptídeo Trichonephiline-2 na hemocela das abelhas *M. scutellaris*. Foram injetadas seis concentrações do peptídeo, além do controle (solução salina) e foi observado o comportamento das abelhas após 24 horas de injeção. Após o término do bioensaio foi obtida a $ED_{20} = 2,4$ ng/mg. 34
- Figura 9.** Curva dose-efeito para a injeção do peptídeo Trichonephiline-3 na hemocela das abelhas *M. scutellaris*. Foram injetadas seis concentrações do peptídeo, além do controle (solução salina) e foi observado o comportamento das abelhas após 24 horas de injeção. Após término do bioensaio foi obtida a $ED_{20} = 2,0$ ng/mg. 35

Figura 10. Parâmetros comportamentais de forrageiras de <i>M. scutellaris</i> três horas após a exposição aos peptídeos de teia de <i>T. clavipes</i> . Legenda: (a) Distância percorrida em centímetros; (b) Velocidade média em cm. s ⁻¹ ; (c) Tempo de pausa. (*) Significativo pelo teste de múltiplas comparações de Dunn com correção de Bonferroni ($p < 0,001$). T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente.	36
Figura 11. Parâmetros comportamentais de forrageira de <i>M. scutellaris</i> 24 horas após a exposição aos peptídeos de teia de <i>T. clavipes</i> . Legenda: (a) Distância percorrida em centímetros; (b) Velocidade média em cm. s ⁻¹ ; (c) Tempo de pausa. (*) Significativo pelo teste de múltiplas comparações de Dunn com correção de Bonferroni ($p < 0,001$). T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente.	37
Figura 12. Padrões de movimento médio (azul), movimento instantâneo (verde) e pausa (vermelho) para forrageiras de <i>M. scutellaris</i> , três horas após a exposição injetável de cada peptídeo isoladamente, na concentração correspondente ao valor de ED20. T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente.	38
Figura 13. Padrões de movimento médio (azul), movimento instantâneo (verde) e pausa (vermelho) para forrageiras de <i>M. scutellaris</i> , 24 horas após a exposição injetável de cada peptídeo isoladamente, na concentração correspondente ao valor de ED20. T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente	38
Figura 14. Atividade das enzimas AChE, CaE-3 e GST, respectivamente, na cabeça de <i>M. scutellaris</i> após 3 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).	40
Figura 15. Atividade das enzimas GST, CaE-3 e G6PDH no abdômen de <i>M. scutellaris</i> após 3 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).	41
Figura 16. Atividade das enzimas AChE, CaE-3 e GST, respectivamente, no abdômen de <i>Melipona scutellaris</i> após 24 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratados.	42
Figura 17. Atividade das enzimas G6PDH, CaE-3 e GST, respectivamente, no abdômen de <i>M. scutellaris</i> após 24 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).	43
Figura 18. Diagrama de Venn apresentando a divisão dos grupos sendo eles: CS (controle com salina), C S/I (controle sem injeção), e Tratamento do peptídeo T1, e a quantidade de proteínas encontradas em cada grupo, bem como as proteínas compartilhadas por eles.....	45
Figura 19. Distribuição dos processos biológicos entre os grupos analisados — controle sem injeção, controle salina (3 horas e 24 horas) e tratamento T1 (3 horas e 24 horas) — organizada de acordo com cada processo biológico identificado..	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência peptídicas sintetizadas e selecionadas. Nome: nome dado a sequência peptídica; sequência dos peptídeos; #AA: número de aminoácidos; Mm: massa molecular; TR: tempo de retenção dos picos; (*): troca do resíduo de C por S.	23
Tabela 2. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de <i>M. Scutellaris</i> resultante do ensaio referente ao controle sem injeção.	46
Tabela 3. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de <i>M. Scutellaris</i> resultante do ensaio referente ao controle salina no período de 3 horas de exposição.....	47
Tabela 4. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de <i>M. Scutellaris</i> resultante do ensaio referente ao controle salina no período de 24 horas de exposição.....	48
Tabela 5. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de <i>M. Scutellaris</i> resultante do ensaio referente ao peptídeo Trichonephiline-1 (T1) no período de 3 horas de exposição.	49
Tabela 6. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de <i>M. Scutellaris</i> resultante do ensaio referente ao peptídeo Trichonephiline- 1 (T1) no período de 24 horas de exposição.	50
Tabela 7. Grupos funcionais e respectivos tratamentos. A categorização dos grupos funcionais foi realizada com base no número de proteínas identificadas por grupo funcional, sob ação do peptídeos T1, em cada grupo funcional.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Por cento

ACN – Acetonitrila

AChE - Acetilcolinesterase

CID - Dissociação induzida por colisão

C4 - Colônia 4

C5 - Colônia 5

C15 - Colônia 15

CAE3 – Carboxilesterase 3

cm - Centímetro

°C - Graus Celsius

Da - Dalton

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ED20-Dose Efeito para paralisar 20 indivíduos

ESI - Ionização por eletrospray

FDR – *False discovery rate*

fps – frames por segundo

g – Gravidade

GST- Glutathione S-transferase

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

HPLC-Cromatografia líquida de alta pressão

kHz - kilohertz

kDa - Kilodalton

kPa - quilopascal

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

LCA - Ligamento cruzado anterior

LD50 - Dose Letal para matar 50 indivíduos

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

M - Molar

mL - Mililitros

mM - Milimolar

mg - Miligrama

mm - milímetro

min - minutos

MS - Espectrometria de massas

MS/MS-Espectrometria de massas sequencial

MW - Molecular Weight (peso molecular)

Nav-Canais de sódio dependentes de voltagem

ng - Nanograma

ng/mg - Nanograma por miligrama

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PMFS - p-metilsulfonil fluoreto

p - padrão de variância

Q-TOF - Quadrupole Time-of-Flight

RP-HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa

S/I – Controle sem injeção

TIC - Cromatograma de íons totais

T1 - Trichonephiline - 1

T2 - Trichonephiline - 2

T3 - Trichonephiline - 3

u.m.a - Unidade de massa atômica

μL - Microlitro

μm - micrômetro

v/v - volume por volume

m/z - Massa por carga

m/v - massa por volume

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 A aranha <i>Trichonephila clavipes</i>	12
1.2 As teias e as vesículas lipídicas de <i>T. clavipes</i>	13
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Extração da fração de peptídeos solúveis da seda da teia	21
3.2 Fracionamento das amostras até 3 kDa.....	21
3.3 Quantificação das amostras.....	21
3.4 Análises de espectrometria de massas do extrato da seda da teia	22
3.5 Determinação da sequência primária peptídeos detectados nas teias de <i>T. clavipes</i>	22
3.6 Síntese dos peptídeos identificados na aranha <i>T. clavipes</i>	23
3.7 Coleta das abelhas	23
3.8 Determinação da toxicidade dos peptídeos isolados das teias de <i>T. clavipes</i>	23
3.9 Análise de comportamento coletivo de cada colônia, sob efeito de ED20.....	24
3.10 Análise de dados.....	25
3.10.1 Níveis de toxicidade	25
3.10.2 Análise de comportamento	25
3.10.3 Pepfold 4.0	26
3.11 Ensaios enzimáticos	26
3.11.1 Enzimas biomarcadoras.....	26
3.12 Obtenção do cérebro e preparação do extrato de proteínas solúveis	27
3.13 Análise proteômica “shotgun” em espectrômetro de massas Ion Trap (Bruker amaZon SL) ..	28
3.14 Identificação de proteínas e interpretação dos dados da espectrometria de massas	28
3.15 Atribuição funcional utilizando Uniprot e GO (Gene Ontology).....	29
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Estudo do comportamento dos insetos modelos, sob ação dos peptídeos tóxicos, utilizando os parâmetros do programa Ethoflow	35
4.2 Ensaios enzimáticos	39
4.3 Análise proteômica.....	44
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 A aranha *Trichonephila clavipes*

As aranhas são artrópodes que apresentam alta dispersão pelo mundo (Selden et al., 2008), sendo um dos grupos mais diversificados do planeta (Nascimento, 2016). A ordem Aranea possui cerca de 42.000 espécies, sendo a sétima ordem mais diversa entre os organismos do planeta (Humenik; Scheibe; Smith, 2011). A família das aranhas tecedoras de teias orbitais, à família Nephilidae, é uma das mais numerosas da ordem Araneae, com mais de 3100 espécies já descritas, em 175 gêneros, fazendo parte da superfamília Araneoidea (Kallal et al., 2020). Dentre as várias espécies de aranhas tecedoras de orbes, a *Trichonephila clavipes*, é um exemplo de organismo “modelo” no estudo da biologia molecular das aranhas (Babb et al. 2017; Kono et al. 2021), devido sua forma de vida, alimentação e distribuição geográfica, sendo bem distribuída nas regiões subtropicais, como na Mata Atlântica brasileira (Brescovit et al., 2004; De Souza, 2021), e ao longo das três Américas (Kuntner et al., 2013; Esteves, 2017).

Para garantir a sobrevivência e a perpetuação da espécie, as aranhas do gênero *Trichonephila* (Kuntner et al., 2019) apresentam estratégias bem desenvolvidas relacionadas à alimentação e à seleção de presas para predação. Elas constroem suas teias em locais elevados, como entre galhos de árvores ou em áreas externas próximas a residências humanas (Comstock, 1975; Humenik et al., 2011). Esses locais são escolhidos por coincidirem com as rotas de voo de suas presas (De Souza, 2021), que, ao colidirem com a teia, ficam presas devido às propriedades adesivas da seda. Ainda que sejam consideradas peçonhentas e frequentemente encontradas em ambientes de convivência humana, essas aranhas não representam risco letal para as pessoas. O efeito de seu veneno em humanos limita-se a provocar dor e vermelhidão no local da picada (Allmeling et al., 2006; De Souza, 2021).

Embora seu veneno não possua relevância médica, essas aranhas têm sido amplamente estudadas devido à presença de toxinas, como as acilpoliaminas, cujas estruturas foram detalhadamente caracterizadas (Aramaki et al., 1986; Aramaki et al., 1987; Toki et al., 1988; Chiba et al., 1994; Palma; Nakajima, 2005). Essas estruturas químicas oferecem subsídios para compreender o modo de ação do veneno sobre as presas, bem como esclarecer as causas de reações observadas, como a paralisia, quando estas entram em contato com as teias.

O veneno das aranhas é uma conquista evolutiva significativa, composto por uma diversidade de toxinas, incluindo substâncias de baixo peso molecular, proteínas e peptídeos, que são classificadas conforme suas estruturas químicas (Windley et al., 2012). Além de atuarem como bioinseticidas (Vassilevski et al., 2009; Windley et al., 2012; Esteves, 2021),

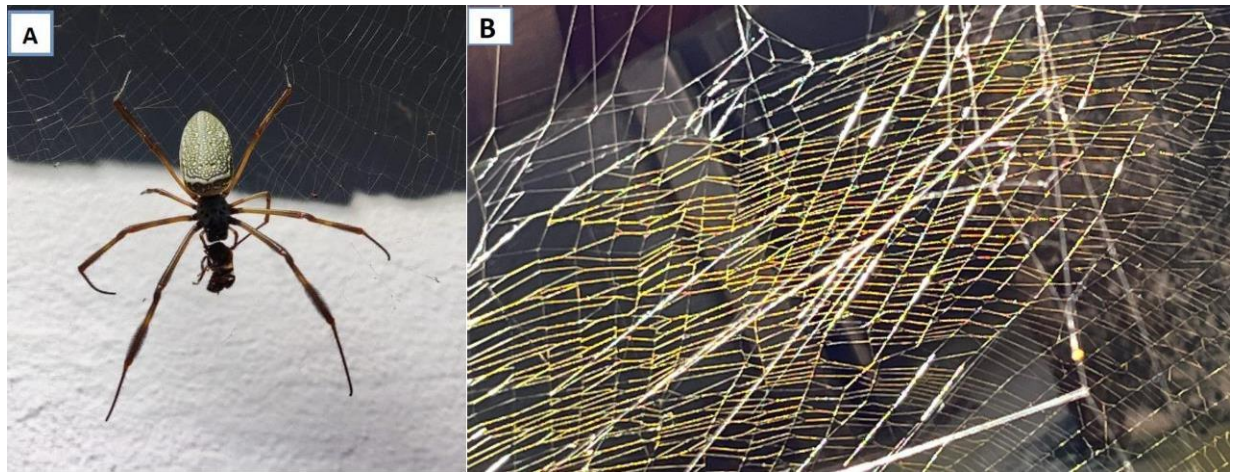
essas toxinas possuem a capacidade de modular canais iônicos (Vassilevski et al., 2009; Nascimento, 2016), como os canais de íons sódio, Nav (Herzig et al., 2011). Um outro exemplo importante são as acilpoliaminas, que agem sobre os canais de glutamato (Palma; Nakajima, 2005), influenciando as junções neuromusculares e provocando paralisia em insetos (Adams et al., 1989; Esteves, 2017). Muitas das toxinas produzidas pelas aranhas são neurotóxicas, atuando sobre receptores neurais de maneira pré-sináptica, pós-sináptica ou diretamente nas membranas, interferindo na liberação de neurotransmissores (Escoubas 2000; Esteves, 2017). O objetivo do veneno é induzir a paralisia ou a morte das presas (Milton, 1974; Esteves, 2017).

Além do veneno ser uma característica marcante nas aranhas como forma de predação e defesa, elas também utilizam suas teias como estratégia de predação para capturar suas presas. Estudos como os de Salles (2006) e Esteves (2021) analisaram as teias desses aracnídeos e observaram que a composição dos fios adesivos inclui gotículas oleosas, que contêm vesículas lipídicas em suspensão no seu interior. Essas vesículas armazenam soluções de proteínas, e compostos orgânicos de baixo peso molecular. Esses estudos também sugerem que as vesículas lipídicas desempenham uma função estratégica, similar à dos venenos das aranhas, que contêm substâncias que afetam o organismo das presas. Assim, as teias também apresentam componentes com funções bioativas, destacando a complexidade dos mecanismos utilizados por essas aranhas para capturar suas presas. Além disso, essas estruturas químicas atuam na proteção dos aracnídeos, evidenciando sua importância para a sobrevivência e eficiência predatória dessas criaturas.

1.2 As teias e as vesículas lipídicas de *T. clavipes*

As teias produzidas por *T. clavipes* (Figura 1) são reconhecidas por suas particularidades que as diferenciam de outras espécies, como a criação de grandes teias orbitais de coloração amarelada (Figura 1). Essas teias possuem propriedades de alta resistência e notável extensibilidade (Doblhofer; Heidebrecht; Scheibel, 2015), além de uma mecânica estrutural altamente estável e uma diversidade significativa em suas estruturas e funções (Santos-Pinto, 2014).

Figura 1 (A) - Aranha *Trichonephila clavipes* segurando uma presa *Melipona scutellaris*, coletada no campus da UNESP de Rio Claro/SP. **(B)** Teia orbital, produzida pela *T. clavipes*, com fios de coloração amarelada. Imagens: Geovanny Barroso.

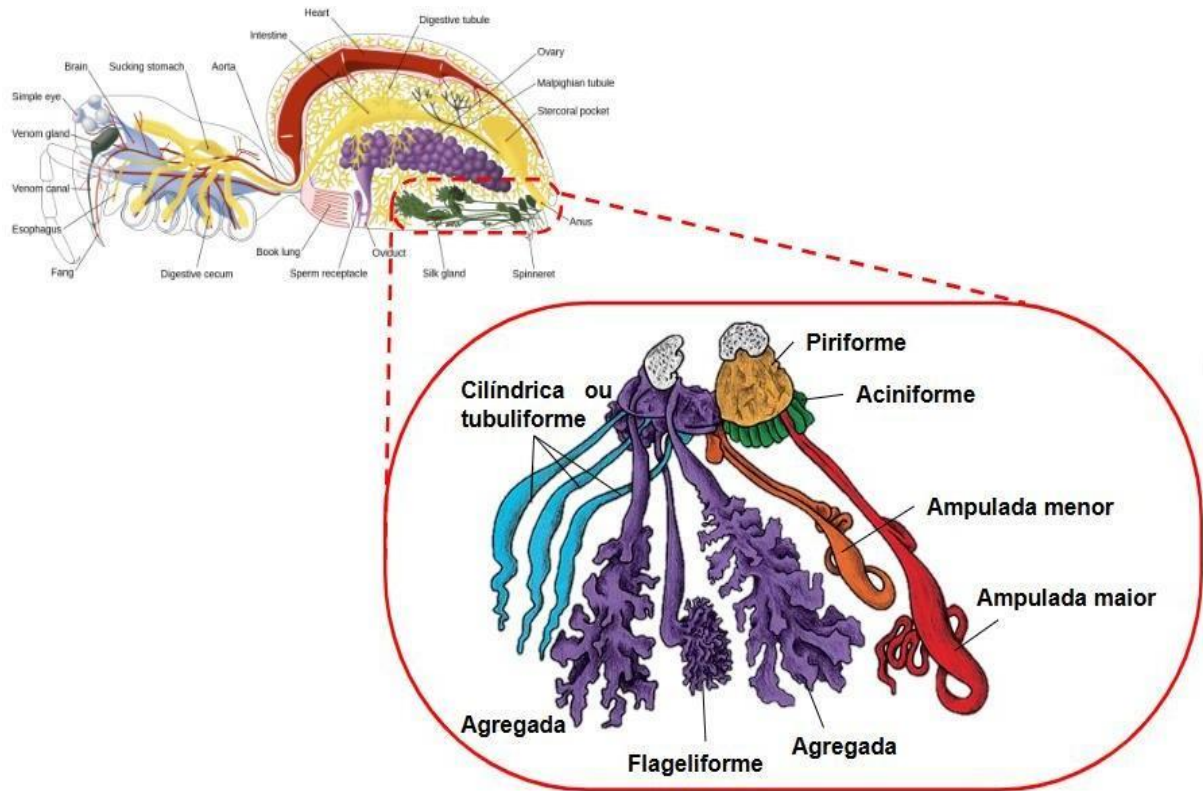


Fonte: Elaborada pela autora.

As teias representam uma notável conquista evolutiva desses animais ao longo de milhões de anos de existência, conferindo-lhes variação de forma e tamanho, além de eficiência e resistência na captura de presas. O interesse em compreender essa complexa engenharia natural tem motivado estudos que buscam elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nas glândulas responsáveis pela produção da seda (Wang et al., 2025).

As aranhas da espécie *T. clavipes* possuem sete glândulas especializadas na produção da teia, localizadas na região posterior do abdômen. Essas glândulas são essenciais para a criação de todas as estruturas da teia, com detalhes minuciosos em sua composição. As glândulas são: ampulada maior, ampulada menor, flageliforme, cilíndrica (ou tubuliforme), aciniforme, piriforme e agregada (Rousseau et al., 2009; De Souza, 2021). Cada uma dessas glândulas é composta por três partes: a porção caudal, a porção medial dilatada (responsável pela secreção) e um ducto que se estende até as fiandeiras (Ruppert & Barnes, 1995). A figura 2 ilustra a localização e o formato dessas glândulas.

Figura 2. Esquema de glândulas abdominais presentes na parte posterior do abdômen das *T. clavipes*. Ampliação em destaque para as sete glândulas responsáveis pela fiação das sedas da teia: ampulada maior, flageliforme, ampulada menor, piriforme, agregada, tubuliforme e aciniforme (RÖMER et al., 2008)



Fonte: Esteves, 2017.

Cada uma dessas glândulas desempenha um papel importante na formação da teia final da aranha, representando uma conquista evolutiva para a espécie. Comparada às aranhas ancestrais, que produziam fios de seda mais secos e desorganizados, as *T. clavipes* produzem fios mais viscosos, adesivos e organizados (Esteves, 2021). Essas características aprimoraram a capacidade de construção das teias, ampliando o número de aranhas capazes de construir estruturas complexas e contribuindo para a eficiência e elegância do estilo de vida dessas criaturas.

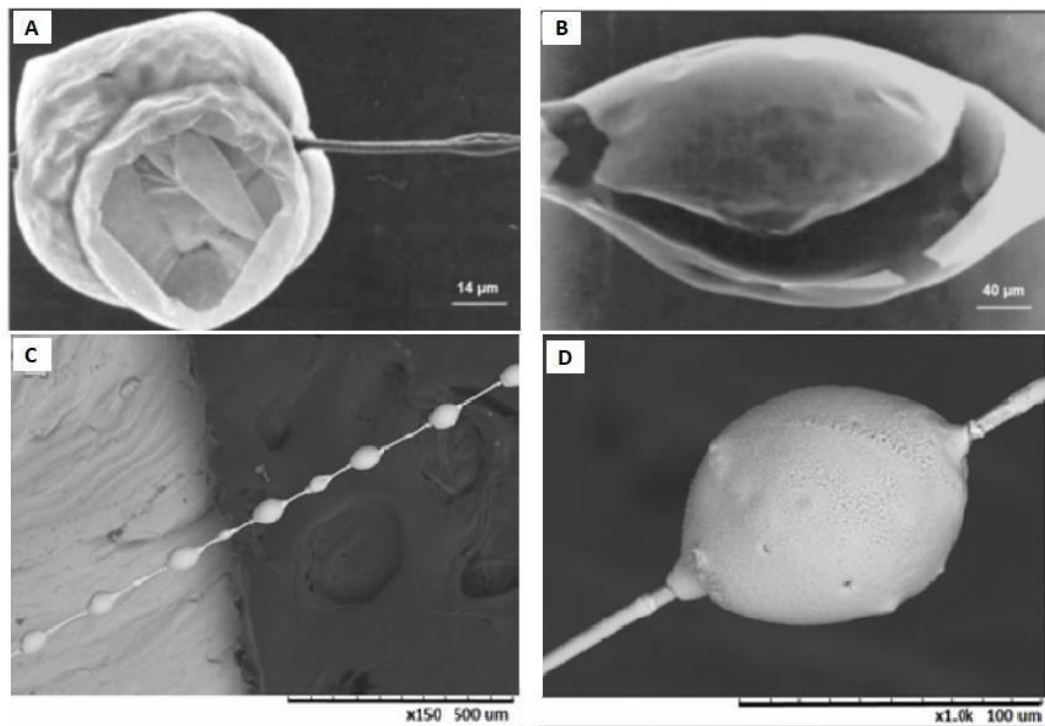
As aranhas desenvolveram uma arquitetura de teias altamente sofisticada para capturar suas presas, tornando suas armadilhas vantajosas para seu estilo de vida. A arquitetura da teia é caracterizada por fios viscosos e fibrosos, resultantes da produção de fios mais rígidos e pegajosos. Essas teias são formadas por proteínas específicas, sintetizadas nas glândulas, com base nas fibroínas, também conhecidas como espidroínas (Rat, Heindl, Neuweiler, 2023). A glândula ampulada maior é responsável pela síntese

dessas espidroínas, incluindo a espidroína 1 (MaSp1) e a espidroína 2 (MaSp2), que são essenciais para a formação e as propriedades mecânicas da teia (Hinman & Lewis, 1992; Xing et al., 2014). A espidroína 1, uma macromolécula com uma sequência conservada de aminoácidos como alanina e glicina, e a espidroína 2, contribuem para a resistência e a força das teias (Tong et al., 2024; Yazawa et al., 2011; Hayashi et al., 1999). Essa glândula, produz os fios fortes e rígidos, conhecidos como *frames* (Vollrath, 2000) e raios orbitais, enquanto a glândula flageliforme é responsável pela produção da espiral de captura, com uma proteína específica para essa função. A glândula ampulada menor auxilia a ampulada maior na construção da teia, sintetizando fios mais elásticos e menos resistentes. A fixação da teia em locais estratégicos é realizada por proteínas produzidas pela glândula piriforme. A glândula agregada sintetiza o revestimento adesivo aquoso, enquanto os ovos da aranha são protegidos por uma bolsa de seda produzida pela glândula tubuliforme, com proteção adicional fornecida pela glândula aciniforme (Gosline, 1986; Römer et al., 2008; De Souza, 2021).

Como a variedade e a complexidade das teias, são atribuídas as glândulas secretoras e em grande parte às espidroínas nelas produzidas, estudos recentes de Wang e colaboradores (2025) demonstraram a contribuição de componentes moleculares para o entendimento da performance dessas fibras. Um peptídeo denominado Spice-DS8, que foi originado a partir de regiões intergênicas de genes ancestrais, sendo exclusivos da subfamília Nephilinae, esse peptídeo está diretamente ligado a espidroína MaSP1b, aprimorando as propriedades mecânicas da seda.

A formação da teia das *T. clavipes* exibe seu comportamento predatório sedentário, caracterizado pela ausência de caça ativa (Esteves, 2017). Esse padrão de comportamento passivo envolve a espera pela presa, sendo as aranhas pacientes, aguardando o momento do aprisionamento (Salles et al., 2006) e economizando energia para a predação. Elas utilizam suas teias complexas (Humenik et al., 2011) como uma ferramenta eficaz para predação, podendo variar desde insetos voadores até pequenos vertebrados, como os beija-flores (Esteves, 2021).

Figura 3. Estruturas das gotículas presentes no fio da teia da *Trichonephila clavipes* (A) Eletromicrografia de varredura das gotículas mostrando suas camadas, para base de formação da gotícula, verificação de fio axial duplo devido a síntese de gotícula viscosa. (B) Camada externa da gotícula através da eletromicrografia de varredura. Em preto representa a camada interna contendo lipídeos. (C) Gotículas presentes nos fios de seda da *T. clavipes* dadas através de microscopia de varredura (MEV). (D) Detalhe do formato ovoide da gotícula.



Fonte: Adaptado de Salles 2006 e Esteves 2017.

Como mencionado, as glândulas agregadas são fundamentais na formação de um revestimento viscoso nas teias, que resulta na formação de gotículas contendo vesículas lipídicas em suspensão. Essas gotículas apresentam uma composição química complexa, incluindo proteínas, peptídeos, compostos de baixa massa molecular, lipídeos, entre outros. Estudos de Salles et al. (2006) utilizaram microscopia eletrônica para demonstrar a formação das camadas e rachaduras presentes na ultra-estrutura das teias, evidenciando a complexidade dessas estruturas (Figura 3). Além de caracterizar a estrutura das teias, eles usaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV), e de transmissão (MET), figura 3, que permitiu a observação detalhada das gotículas e das vesículas lipídicas (Salles et al., 2006). Em estudos subsequentes, o Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Departamento de Biologia Geral e Aplicada/IBRC- UNESP identificou proteínas de ação tóxica e acilpoliaminas, nas teias, além de compostos de baixo peso molecular com atividade neuroativa, típicos de venenos de aranhas (Esteves, 2021). Esses compostos estão

associados à ação nas junções neuromusculares, induzindo paralisia em insetos. Além disso, foram identificados ácidos orgânicos e agentes tensoativos, que contribuem para a desestabilização da cutícula dos artrópodes. Os ácidos orgânicos encontrados nas teias de *T. clavipes* são semelhantes aos encontrados em outros artrópodes, como o escorpião vinagre (Schmidt, et al., 2000; Esteves, 2021).

Quando o inseto entra em contato com a gotícula da teia, ocorrem as primeiras reações sobre a sua cutícula. Nesse processo a cera que compõe estrutura tegumentar do inseto e, que apresenta em sua maioria a presença de hidrocarbonetos e ácidos graxos de cadeia longa, interagem quimicamente com as gotículas da teia, formando micelas, promovendo a dissolução/desestabilização da camada de cera, e aumentando a permeabilidade da cutícula, fazendo com que as vesículas lipídicas adentrem para o interior do corpo do inseto (Esteves, 2021). Após entrar pela cutícula as vesículas lipídicas fundem-se com as membranas de tecidos moles, liberando as toxinas necessárias para a paralisação das presas (Marques et al., 2005; Salles et al., 2006; Volsi et al., 2006; dos Santos-Pinto et al., 2016). Uma vez que as toxinas entram em contato com a hemolinfa, os insetos podem sofrer diversas consequências metabólicas, pois essas toxinas têm a capacidade de acessar diversos receptores-alvos distribuídos por todo o corpo do inseto-presa (Herzing, 2019).

A presença de compostos nas gotículas das teias de *T. clavipes* tem sido amplamente estudada pelo conjunto químico que apresenta, dentre elas já foram identificadas substâncias como alcaloides, aminoácidos e poliaminas. No entanto, abordagens ômicas recentes revelaram a presença de proteínas e peptídeos que ajudam a entender melhor a estratégia de captura da aranha. Dentre as proteínas identificadas, destacam-se as metaloproteinases e a proteinase cálcio-ativada, além de mais 200 proteínas semelhantes a toxinas (Esteves, 2021) como as agatoxinas, terafotoxinas, zodatoxinas, presentes nos venenos de outras espécies de aranhas (Santos-Pinto, 2016). A presença de peptídeos nas teias vem sendo descoberta ao longo dos anos, mostrando-se como sendo compostos de grande relevância no aparato químico-ativo da teia. Os primeiros peptídeos identificados na literatura como componentes da teia pertencem à família das bradicininas, sendo os principais representantes a nephilacinina I, II e III (Volsi et al., 2006). Esses peptídeos foram identificados por técnicas de espectrometria de massas (ESI- MS/MS) e considerados componentes-chave na síntese da teia, devido ao seu envolvimento na paralisia das presas (Esteves, 2021).

Com todo o aparato químico importante para o desenvolvimento e sobrevivência

biológica das aranhas, as propriedades que as teias apresentam podem ser exploradas além do natural, possuindo um valor significativo no âmbito biotecnológico. Suas propriedades de alta resistência, elasticidade e biodegradabilidade (Li et al. 2024) incentivam a ampliação das investigações sobre o tema. Tradicionalmente, o bicho-da-seda, *Bombyx mori*, foi amplamente explorado para a produção de seda (Bitar et al., 2024); no entanto, com os avanços tecnológicos e a evolução das pesquisas sobre as qualidades das teias aracnídeas, novas aplicações estão sendo exploradas e implementadas, como na aplicação em dispositivos biomédicos (Naghilou et al. 2023), pois as teias das aranhas demonstram uma resistência superior à do bicho-da-seda, apresentando variações em suas propriedades apenas com alterações na temperatura, umidade e grau de deformação (Cunniff et al., 1994).

As teias estão sendo utilizadas em diversos setores, desde a produção de itens farmacológicos até a redução de peso de coletes à prova de balas (Saravanan et al., 2006). Nesse contexto, empresas estão se especializando no desenvolvimento em larga escala de produtos que exploram as propriedades dessas teias. Um exemplo disso é a empresa AMSilk®, que possui uma tecnologia patenteada para aplicar as propriedades mecânicas e físico-químicas da seda das teias de aranhas na fabricação de fibras, atendendo a diferentes setores industriais (De Souza, 2021). Além dessa empresa, várias outras já estão investindo em tecnologias inovadoras para suprir as demandas de diversos mercados. Na área médica, por exemplo, estudos demonstram a alta eficiência das estruturas e propriedades das teias, com destaque para a engenharia de tecidos, como a formulação de ligamentos cruzados anteriores (LCA). Esse avanço é possível graças à tecnologia de DNA recombinante aplicado às proteínas da seda, como a da fibroína, que favorece a adesão e o crescimento celular de maneira superior (Hahn; Gogele; Schulze-Tanzil; 2023).

Para aprofundar o conhecimento sobre a ação dos compostos químicos presentes nas teias das aranhas *Trichonephila clavipes* e investigar seu comportamento frente a uma presa natural, o presente estudo utilizou as abelhas *Melipona scutellaris* como modelo biológico para a análise toxicológica de peptídeos extraídos da teia dessa aranha.

A abelha *M. scutellaris* é um importante organismo modelo nos estudos sobre o desenvolvimento de inseticidas, especialmente aqueles inspirados na natureza. Esta espécie é autóctone da região neotropical, apresentando uma função essencial como polinizadora em ecossistemas naturais e agrícolas (Klein et al., 2020). Ao empregar este modelo de abelhas nos ensaios, é possível realizar comparações com *Apis mellifera*, outra espécie de presa amplamente utilizada como modelo biológico em estudos

comportamentais, neuronais e toxicológicos, particularmente no que se refere à avaliação de inseticidas (Miotelo et al., 2021).

Os peptídeos utilizados nesta pesquisa foram descobertos em investigações anteriores do grupo do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do IBRC-UNESP, porém não foram caracterizados estrutural e funcionalmente. Dentre os muitos peptídeos detectados e não estudados, destacam-se Trichonephiline-1, Trichonephiline-2 e Trichonephiline-3, que foram selecionados para o presente estudo, baseado em suas estruturas químicas, caracterizando-os como peptídeos ácidos, de natureza poli-aniônica, que apresentam superfície molecular eletronegativa, devido à elevada ocorrência de vários resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico. Isso os distingue da maioria das toxinas peptídicas de aranhas, cujas estruturas são tipicamente poli-catiônicas, em razão da abundância de grupos de resíduos básicos em suas sequências primárias.

Com base nas evidências referentes ao efeito tóxico dos peptídeos Trichonephiline-1, Trichonephiline-2 e Trichonephiline-3, que se encontram na teia, e levando em consideração diversas hipóteses e conhecimentos sobre a química vinculada à teia de *T. clavipes*, este estudo visa compreender as ações dos compostos presentes na teia, particularmente dos peptídeos, isolando-os, determinando suas estruturas químicas, e caracterizando suas toxicidades em sistema biológico – modelo.

2 OBJETIVOS

Considerando os temas abordados anteriormente e a necessidade de compreensão e caracterização da ação tóxica dos peptídeos presentes nas teias das aranhas *Trichonephila clavipes*, este estudo tem como objetivos específicos:

- Isolar peptídeos da teia da aranha *Trichonephila clavipes*;
- Caracterizar a estrutura molecular das toxinas peptídicas isoladas da teia;
- Caracterizar a ação tóxica dos peptídeos isolados da teia: determinação da toxicidade frente a utilização de protocolos padrões da OECD, utilizando abelhas sem ferrão *Mellipona scutellaris* como modelo biológico.
- Análise dos marcadores enzimáticos de processos biológicos na cabeça e abdômen sob ação de peptídeos tóxicos.
- Análise do proteoma do cérebro de abelhas sob ação dos peptídeos tóxicos da teia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração da fração de peptídeos solúveis da seda da teia

As teias foram coletadas no campo, e limpas com o auxílio de pinças para a retirada de partículas, restos de insetos, folhas e galhos aderidos à seda; evitando dessa forma uma contaminação da amostra. Após a limpeza, os fios de seda foram pesados e tratados para a extração dos peptídeos presentes nas fibras e nas gotículas presentes sobre os fios. Dessa forma, o material limpo foi lavado com acetonitrila 50% (v/v) em água, contendo inibidor de proteases (p-metilsulfonil fluoreto - PMSF) 10 mM à 25°C e sob agitação contínua por aproximadamente 4 horas (75 mg de teia/1 mL de acetonitrila 50% (v/v), em triplicata). Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 15 minutos, com o sobrenadante sendo coletado e filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45 µm (Millipore) e em seguida, liofilizado; os extratos secos resultantes foram armazenados à -20°C, até o momento de serem utilizados.

3.2 Fracionamento das amostras até 3 kDa

As amostras contendo os extratos de teias foram fracionadas através de centrifugação a 12000 x g por 90 minutos em filtros microconcentradores Amicon 3000, para separar os peptídeos que apresentam massas moleculares menores que 3 kDa. Nesta técnica, os peptídeos com massas moleculares menores que 3 kDa se encontram no filtrado, enquanto que aqueles apresentando massas moleculares maiores que 3 kDa ficam retidos na parte superior dos filtros. As amostras foram então quantificadas, liofilizadas e os extratos secos resultantes foram armazenados à -20°C, até o momento de serem utilizados.

3.3 Quantificação das amostras

A quantificação dos peptídeos dos extratos da seda e quantificação das amostras do cérebro das abelhas foram determinadas pelo kit Qubit® Protein Assay (Life Technologies - Qubit® 3.0 fluorometer), conforme instruções do fabricante.

3.4 Análises de espectrometria de massas do extrato da seda da teia

O extrato da teia (fração constituída de peptídeos com massas moleculares menores que 3 kDa) foi analisado por espectrometria de massas utilizando-se um instrumento do tipo μ LC- ESI-microTOF-Q-III (Bruker Daltonics), para a detecção e sequenciamento de peptídeos. Um sistema HPLC (Shimadzu) contendo duas bombas LC-20AD, amostrador automático SIL- 20AHT e um forno para coluna CTO-20A, foi acoplado diretamente (on-line) ao espectrômetro de massas. As análises cromatográficas foram realizadas sob um gradiente de 5 a 95% (v/v) ACN, contendo 0.05% (v/v) de ácido fórmico por 120 minutos, em uma coluna C-18 (3 mm id x 100 mm, 2.2 μ m) (Shim-pack XR-ODS, Shimadzu) com a eluição dos peptídeos sendo monitorada à 214nm, sob um fluxo de 0.2 mL / min. O software HyStar v3.2 (Bruker Daltonics) foi utilizado para o controle de aquisição e análise dos dados. Os dados de MS e MS/MS foram adquiridos em uma faixa de m/z entre 50-1800, em um espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ionização “electrospray” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas quadrupolo e Time-of-Flight (Q-TOF) (Bruker Daltonics). As análises foram realizadas no modo positivo e contínuo, utilizando o princípio de dissociação induzida por colisão CID (dissociação induzida por colisão) e o hélio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa, energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz. Antes das análises, o espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução calibrante Tune-Mix Electrospray 80 Calibrant (Agilent). Os espectros de massas foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada utilizando o software DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics).

3.5 Determinação da sequência primária peptídeos detectados nas teias de *T. clavipes*

Os dados de espectrometria de massas foram analisados, avaliados e interpretados com auxílio dos softwares DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) e Peaks 7 (Complete software for proteomics), conforme método de interpretação e sequenciamento de peptídeos descrito por Cantú et al. (2008). Os espectros contendo íons multiprotonados foram deconvoluídos para espectros contendo apenas íons monoprotonados, com o objetivo de simplificar a interpretação de tais espectros; possibilitando dessa forma, o assinalamento das sequências primárias dos peptídeos. Foi considerada uma tolerância de massa de 0,1 u.m.a para a realização dos cálculos para a obtenção das sequências.

3.6 Síntese dos peptídeos identificados na aranha *T. clavipes*

Treze peptídeos foram inequivocamente sequenciados, e três deles foram escolhidos para síntese em fase sólida, pela empresa Life PROtein (New Jersey, Estados Unidos) com grau de pureza acima de 95%. A tabela abaixo apresenta as informações referentes aos três peptídeos sintetizados.

Tabela 1. Sequência peptídicas sintetizadas e selecionadas. Nome: nome dado a sequência peptídica; sequência dos peptídeos; #AA: número de aminoácidos; Mm: massa molecular; TR: tempo de retenção dos picos; (*): troca do resíduo de C por S.

Nome	Sequências dos Peptídeos	Mm (Da)	#AA	TR (min)
Trichonephiline-1	MVDDALGAADAEMV-OH	1406,606	14	24,96
Trichonephiline-2	EGVDDALGAADNLDL-OH	1474,6423	15	24,68
Trichonephiline-3	MVSVDLGAACMDPV-OH*	1406,624	14	23,31

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Coleta das abelhas

Abelhas forrageiras de *M. scutellaris* foram coletadas na entrada de três colônias de genéticas diferentes, no meliponário do Departamento de Biologia Geral e Aplicada/IBRC- UNESP. As abelhas coletadas foram mantidas em câmaras plásticas descartáveis de 250 mL por todo o tempo de ensaio. As colônias escolhidas apresentaram condições fisiológicas normais, livre de doenças e uma rainha em franca postura. A coleta das abelhas foi feita em dias ensolarados com temperaturas acima de 18°C. Após a coleta, as abelhas foram transportadas para o laboratório (temperatura de 28 °C ± 2 °C, umidade relativa de 80% ± 5% e escotofase de 24h).

3.8 Determinação da toxicidade dos peptídeos isolados das teias de *T. clavipes*

A toxicidade de cada peptídeo foi determinada a partir de diluições gradativas da solução estoque, que foram testadas na abelha sem ferrão *M. scutellaris*, como inseto presa modelo das aranhas *T. clavipes*. As concentrações foram elaboradas com base na média do peso de 30 abelhas forrageiras adultas, levando em conta experimentos que envolveram o inseticida dimetoato como padrão para comparação. As concentrações foram padronizadas seguindo modelos de experimentação para inseticidas em espécies, como a *M. scutellaris*. As concentrações estabelecidas de peptídeos foram as seguintes: 14 ng/mg, 28 ng/mg, 56

ng/mg, 112 ng/mg, 224 ng/mg e 449 ng/mg. Cada uma das doses padronizadas em microgramas de peptídeo / miligrama de abelha foi injetada sob o segundo terço dos insetos (1 µL), utilizando uma microseringa de Hamilton (10 µL).

Foram utilizadas dez abelhas forrageiras, acondicionadas em câmaras plásticas de 250 mL, conforme os procedimentos descritos no item 3.7. Para cada peptídeo, empregaram-se três colônias geneticamente distintas, identificadas como C4, C5 e C15. As concentrações previamente calculadas de cada peptídeo foram administradas nas três colônias, constituindo uma triplicata experimental para cada concentração. O número de abelhas vivas e mortas foi registrado após 24 horas de exposição, e a análise comportamental frente à toxicidade peptídica foi realizada tanto após três horas quanto após 24 horas. A solução salina (0,9% m/v) foi utilizada como controle, enquanto as abelhas inoculadas com os peptídeos seguiram o padrão de referência estabelecido para estudos de toxicologia em abelhas (OECD, 1998). Os experimentos foram conduzidos de forma randomizada, e as unidades experimentais foram mantidas em câmaras climatizadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $80 \pm 5\%$, em ambiente escuro. Como os peptídeos não apresentaram efeito letal, induzindo apenas paralisia, o valor de ED₂₀ foi determinado com base na concentração do extrato peptídico, expressa em “ng de extrato seco/mg de inseto”, necessária para paralisar 20% da população testada.

3.9 Análise de comportamento coletivo de cada colônia, sob efeito de ED₂₀

Os ensaios cenográficos seguiram os protocolos similares ao trabalho de Bernardes et al. (2021). Neste caso, as abelhas foram filmadas numa unidade experimental confeccionada por uma placa de Petri (15 cm de diâmetro × 2 cm de altura) durante 10 minutos, com uma câmera de vídeo digital (modelo Cyber-Shot DSC-W800, Sony Corporation) a 30 fps e alta definição. O fundo e as paredes das unidades experimentais foram cobertos com papel de filtro branco não transparente (teor de cinzas < 0,1%, diâmetro 18 cm, espessura 0,13- 0,17 mm). Durante o período de registro cenográfico, foi oferecida uma solução de sacarose em um Eppendorf®. As gravações foram feitas numa sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 10\%$ de umidade relativa e ausência de luz fotostática. Para isto foram instaladas três luzes de LEDs brancas (6W) colocadas 50 cm acima das unidades experimentais. Um grupo de cinco abelhas da mesma colônia foi utilizado em cada unidade experimental. A resposta média do grupo foi considerada na repetição, para evitar pseudo-replicação, devido a não independência de erros entre indivíduos da mesma colônia (Hendriksema et al., 2011). Cada tratamento foi repetido 6 vezes. Os vídeos

registrados foram analisados usando o software de análise automática de comportamento Ethoflow ® (Bernardes et al., 2021), que utiliza algoritmos de Inteligência Artificial (IA) para estimar as respostas de comportamento. Os recursos comportamentais do conjunto de dados inicial completo foram estimados através de algoritmos de Machine Learning, extraídos numa planilha e analisados de forma univariada por meio de uma análise de variância (ANOVA) e um teste para comparações múltiplas entre os tratamentos utilizados. Os parâmetros analisados conforme os dados proporcionados mediante ao comportamento das abelhas nas placas foram: (I) Distância percorrida; (II) velocidade média e (III) tempo de parada.

3.10 Análise de dados

3.10.1 Níveis de toxicidade

Os dados dos ensaios "dose-resposta" em *M. scutellaris*, nas diferentes doses dos peptídeos injetados, foram analisados com um modelo linear generalizado, com distribuição binomial. Uma regressão log-logística com o pacote "drfit" (Ranke, 2006) para dose-resposta (Ritz et al. 2015) foi utilizado para estimar a ED₂₀, utilizando o software estatístico RStudio 4.3.2 (R Development Core Team, 2024). Para a análise da relação entre dose e mortalidade, foi utilizado um modelo de ajuste sigmoide para descrever a curva de mortalidade em função da dose administrada. O ajuste foi realizado no ambiente Google Colab, utilizando o Python e as bibliotecas NumPy, Matplotlib e SciPy, que são amplamente utilizadas para análise de dados, visualização e ajuste de curvas.

3.10. 2 Análise de comportamento

Os dados extraídos de cada vídeo foram categorizados por tratamento, e analisados conforme os pressupostos da normalidade e homocedasticidade por meio dos testes de Shapiro- Wilk e Bartlett (1965), respectivamente. Posteriormente, os dados que não foram analisados por meio de uma ANOVA não paramétrica unidirecional de Kruskal-Wallis tiveram suas médias comparadas entre os tratamentos pelo teste de Dunn, com correção de Bonferroni ($p < 0,001$), utilizando os pacotes 'agricolae' (Mendiburu et al., 2013), 'easyanova' (Roudier; Merle, 2021) e 'dunn.test' (Dinno, 2024).

3.10.3 Pepfold 4.0

Para a modelagem estrutural dos peptídeos, empregou-se a plataforma PEP-FOLD, na versão 4.0, disponível em ambiente on-line, a qual permite a predição *de novo* de estruturas tridimensionais de peptídeos com base em suas sequências primárias (Thevenet et al., 2014). As conformações geradas foram analisadas para caracterização das estruturas poliânionicas e determinação de suas propriedades de polaridade.

3.11 Ensaios enzimáticos

3.11.1 Enzimas biomarcadoras

Foram utilizadas abelhas forrageiras de *Melipona scutellaris*, provenientes de três colônias saudáveis (C4, C5 e C15), coletadas no mesmo local anteriormente mencionado. As abelhas foram expostas aos peptídeos conforme descrito no bioensaio de sobrevivência (item 3.8). No entanto, o período de aclimação foi de uma hora, em câmaras BOD climatizadas a 28 ± 1 °C, com umidade relativa de $80 \pm 5\%$, mantidas em escotofase. Durante essa fase, foi fornecida uma solução de sacarose a 50% como alimentação. Após o período de adaptação, os eppendorfs® contendo as concentrações residuais de cada peptídeo e o controle (solução salina 0,9%) foram administrados aos respectivos grupos. As unidades experimentais foram observadas após três e 24 horas da injeção, sendo removidos os indivíduos mortos. As abelhas sobreviventes, posteriormente à exposição a cada tratamento (peptídeos e controle), foram coletadas e armazenadas a -80 °C. Cada recipiente com 10 abelhas foi considerado uma réplica experimental, e cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando nove subamostras por tratamento. Cada subamostra foi composta pela dissecação de três cabeças e três abdômens, resultando em um total de 15 abelhas por tratamento.

Para a obtenção das proteínas, os órgãos (três cabeças e abdômens) foram dissecados após anestesia por congelamento, e em seguida foram transferidos para um tubo de microcentrífuga (2 mL). As amostras foram pesadas e a elas adicionadas um tampão de extração, 10 mM cloreto de sódio, 1% (w/v), Triton X-100, 40 mM fosfato de sódio pH 7,4 e inibidores de protease (2 µg/mL pepstatina A, leupitina e aprotina, 0,1 mg/mL inibidor de tripsina de soja e 25 unidades/mL de antidor, para fazer 10% (w/v). A homogeneização das amostras foi realizada com o auxílio L-Beater 6 Loccus® em 2 ciclos. Cada ciclo de homogeneização de amostras automático a agitação foi numa velocidade de 2500 rpm com intervalos de 10 s. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4° C durante 20 min a

15,000 x g e o sobrenadante coletado. As amostras foram depositadas em microplacas para a realização das leituras através de espectrofotômetro. A atividade da AChE foi avaliada a 412 nm num meio contendo extrato de tecido, DTNB 1,5 mM, AcSCh 0,3 mM como substrato e fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Belzunces et al. 1988) como solução tampão. A CaE-3 foi avaliada a 410 nm em um meio contendo o extrato de tecido, 10 μ M de BW284C51 (inibidor da acetilcolinesterase), 0,1 mM de p-NPA como substrato e 100 mM de fosfato de sódio pH 7,0 (Badiou-Bénéteau et al. 2012; Renzi et al. 2016) como tampão. A atividade da GST foi determinada medindo a conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm. Para a GST, o meio reacional foi preparado com 1 mM de EDTA, 2,5 mM de CDBN e 100 mM de Na/K fosfato pH 7,4 (Carvalho et al. 2013). A atividade da G6PDH foi medida a 340 nm através da formação de NADPH em um meio contendo o extrato, 1 mM de G6P como substrato, 0,5 mM de NADP⁺ como coenzima, 10 mM de MgCl₂ e 100 mM de Tris-HCl pH 7,4 (Renzi et al., 2016). Após as leituras, os valores obtidos e as curvas foram analisados e as médias obtidas para cada grupo a partir das cinco triplicatas das 7 amostras/tratamentos. Os dados de atividade de cada enzima nos órgãos investigados (expressos em mUA. min⁻¹. mg de tecido), foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente.

3.12 Obtenção do cérebro e preparação do extrato de proteínas solúveis

Para a análise do proteoma solúvel do cérebro das abelhas utilizadas nos ensaios comportamentais previamente descritos, as cabeças de cada indivíduo foram removidas. Os cérebros foram macerados na presença de um coquetel de inibidores de protease e água Milli-Q. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, em duas etapas consecutivas. Os sobrenadantes obtidos foram então submetidos ao procedimento de precipitação proteica com acetona (Duong; Lee, 2023), utilizando-se um volume de 10,5 mL, calculado com base na quantidade de amostra. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 900 rpm, por 5 minutos, a 4 °C, em centrífuga refrigerada Eppendorf® com tubos Falcon. Após a coleta dos pellets, as amostras foram separadas e preparadas para a etapa de digestão trípica.

Para realização da digestão trípica as amostras foram solubilizadas em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, ureia 7.5 M, pH 7,8 e ficaram em estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, foi adicionado 10 μ L de DTT (10 mM) e as amostras foram armazenadas em estufa a 37°C pelo período de uma hora. A solução de IAA (25 mM) foi adicionada e a solução foi mantida no escuro à temperatura ambiente por mais uma hora. As amostras foram então diluídas

em tampão bicarbonato de amônio 100 mM com pH 7.8 contendo cloreto de cálcio 1M . Por fim, foi adicionada enzima tripsina (Promega) (50 ng/ μ L) e as amostras ficaram em estufa a 37°C por 18 horas. Após paralisação da reação com ácido fórmico 96% (v/v) as amostras foram submetidas a coluna Sep-Pack C18 (Waters) para concentração das amostras e então foram analisadas sistema μ LC ESI-micrOToF-QIII (Bruker Daltonics).

3.13 Análise proteômica “shotgun” em espectrômetro de massas Ion Trap (Bruker amaZon Speed)

Após o preparo da amostra, mencionadas no item 3.12, uma alíquota de 10 μ g foi analisada por espectrometria de massas utilizando-se um sistema nanoLC acoplado (on-line) a um espectrômetro de massas amaZon Speed Ion Trap (Bruker Daltonics), equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna C18 (nano) a 40 °C, utilizando gradiente linear de 5 a 90% de solvente B (MeCN contendo 0,1% de ácido fórmico) ao longo de 125 min, com fluxo de 0,12 mL/h. O espectrômetro operou no modo positivo (ESI+), com capilar a 4500 V, offset de 500 V e nebulizador a 2,0 psi. O gás de secagem (dry gas) foi mantido a 2,0 L/min, com temperatura de 150 °C. O intervalo de varredura foi de m/z 50 a m/z 3000, com aquisição simultânea dos modos de espectro de íons e de perfis MS/MS. As análises de fragmentação (CID) foram conduzidas com gás de colisão hélio, energia de colisão ajustada automaticamente conforme o alvo de intensidade (ICC) de 200.000 e tempo máximo de acumulação de 20 ms.

Durante todo o experimento e aquisição de dados o software HyStar v3.2 (Bruker Daltonics) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados.

3.14 Identificação de proteínas e interpretação dos dados da espectrometria de massas

Para a análise das proteínas solúveis, os softwares HyStar e oToF (Bruker Daltonics) foram empregados na aquisição dos dados de espectrometria de massas. Os espectros obtidos foram inicialmente submetidos ao pré-processamento no software BioTools (Bruker Daltonics), o qual gerou os arquivos compatíveis e otimizados para subsequente análise no Mascot Distiller. Em seguida, os dados de MS1 e MS2 foram tratados e submetidos às buscas no Mascot v2.3, com restrição dos bancos de dados do NCBI referentes aos gêneros Apis, Hymenoptera e Melipona. Os parâmetros definidos para a pesquisa foram: ausência de restrição quanto à massa molecular da proteína, tolerância de uma falha de clivagem triptica, oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação como modificação fixa. As tolerâncias de

massa aplicadas foram de 0,5 Da para MS1 e 0,8 Da para MS2.

Além disso, as proteínas identificadas foram submetidas à validação no Scaffold 4.3.2 (Proteome Software Inc., Portland, OR), a fim de verificar os cálculos de FDR. Os critérios de probabilidade de identificação adotados pelo algoritmo foram estabelecidos em no mínimo 95% para proteínas e 90% para peptídeos.

Por fim, para a interpretação complementar dos dados de espectrometria de massas, utilizou-se o PEAKS Studio 10 (Bioinformatics Solutions Inc.), com buscas realizadas nos bancos do NCBI: Hymenoptera, Apis e Melipona.

3.15 Atribuição funcional utilizando Uniprot e GO (Gene Ontology)

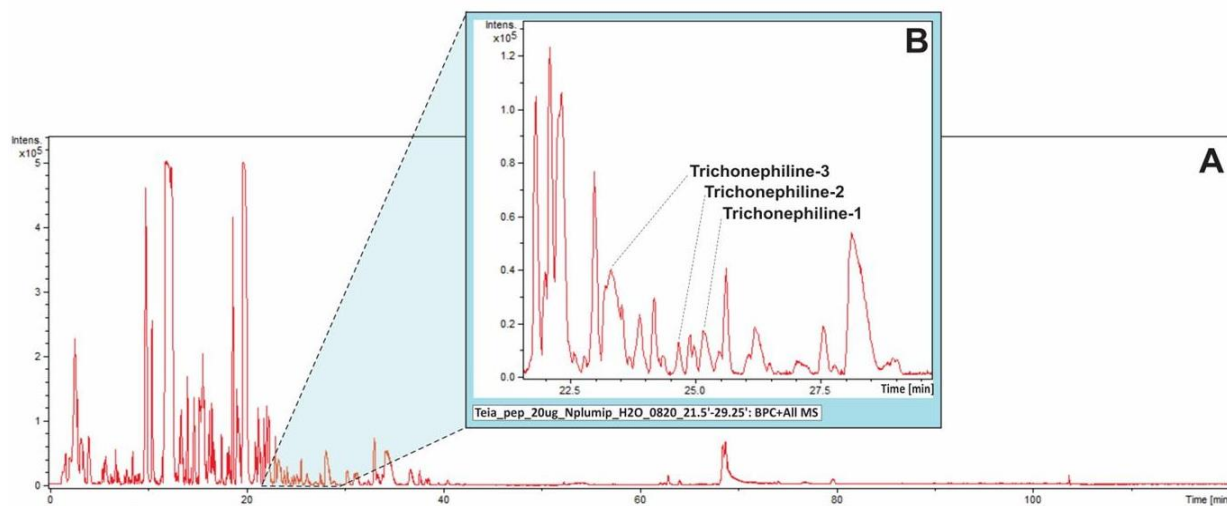
Para a validação das proteínas hipotéticas identificadas, bem como para a determinação de suas funções e processos biológicos, foram utilizadas as bases de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>), associadas as classificações seguindo os termos GO - *Gene Ontology* (<https://geneontology.org/>).

4 RESULTADOS

Considerando a importância ecológica das aranhas *T. clavipes* e o potencial biotecnológico presentes em suas teias, os resultados obtidos destacam as propriedades tóxicas dos peptídeos, demonstrando como esses compostos podem afetar o metabolismo das presas da aranha em diferentes concentrações e períodos de exposição.

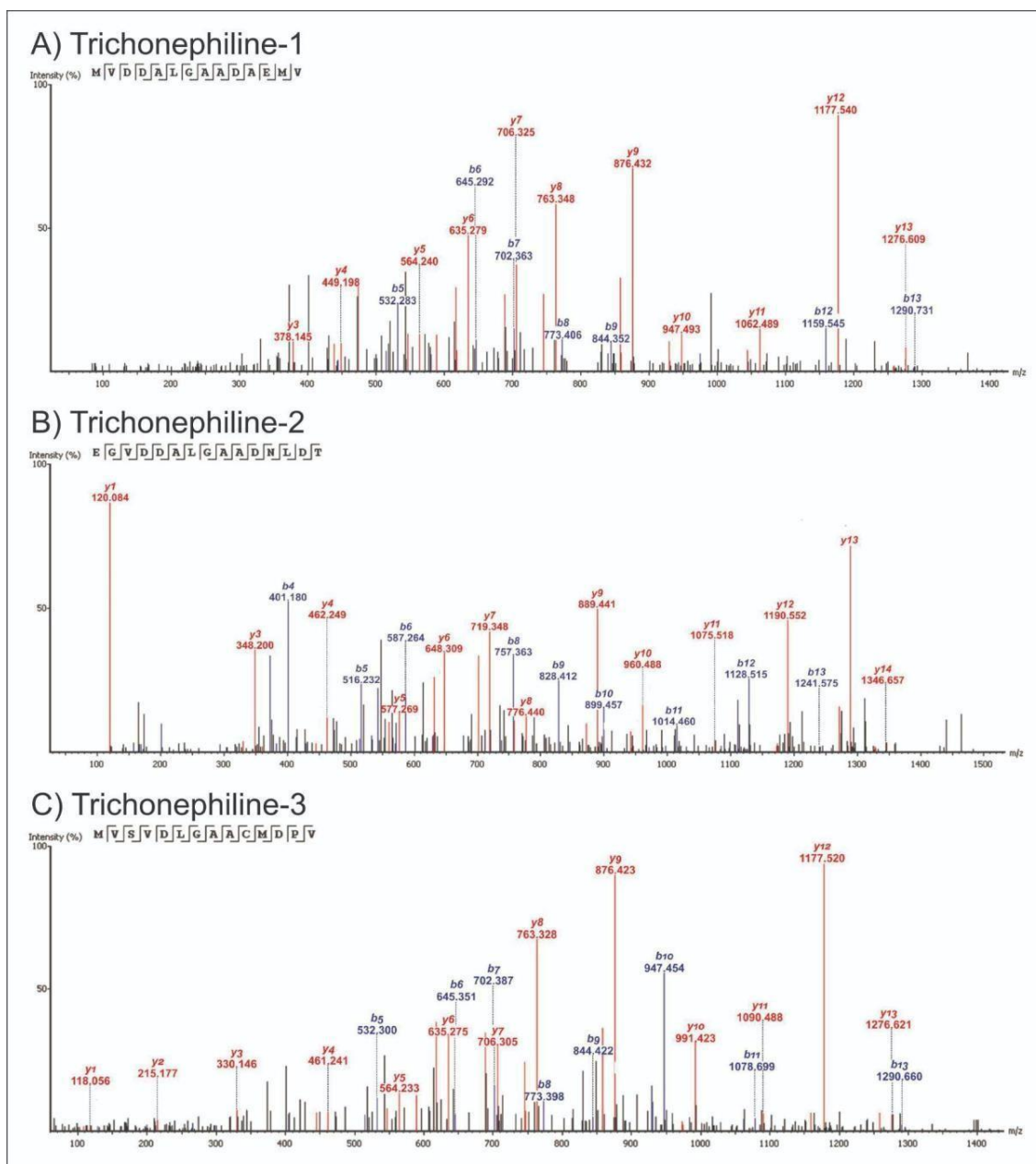
O extrato de teia foi fracionado em cromatografia de fase reversa para peptídeos, e o resultado está mostrado na Figura 4. Neste cromatograma observam-se muitos picos diferentes, correspondentes a outros peptídeos. Nesta figura é possível observar os picos destacados para os peptídeos Trichonephiline-1, Trichonephiline-2 e Trichonephiline-3. É importante destacar que simultaneamente com a aquisição do cromatograma de íons totais (TIC), também foram adquiridos os espectros MS/MS, que após tratamento dos dados com o algoritmo PEAKS, resultou em espectros interpretados em relação à sequência primária de cada peptídeo detectado, conforme mostrado na Figura 5.

Figura 4. A) Cromatograma dos íons totais (TIC) gerado a partir da fração de massa molecular menor que 3 kDa do extrato da teia de *T. clavipes*. **B)** ampliação da área de eluição dos picos de interesse utilizados neste estudo.



Fonte: Acervo da pesquisadora.

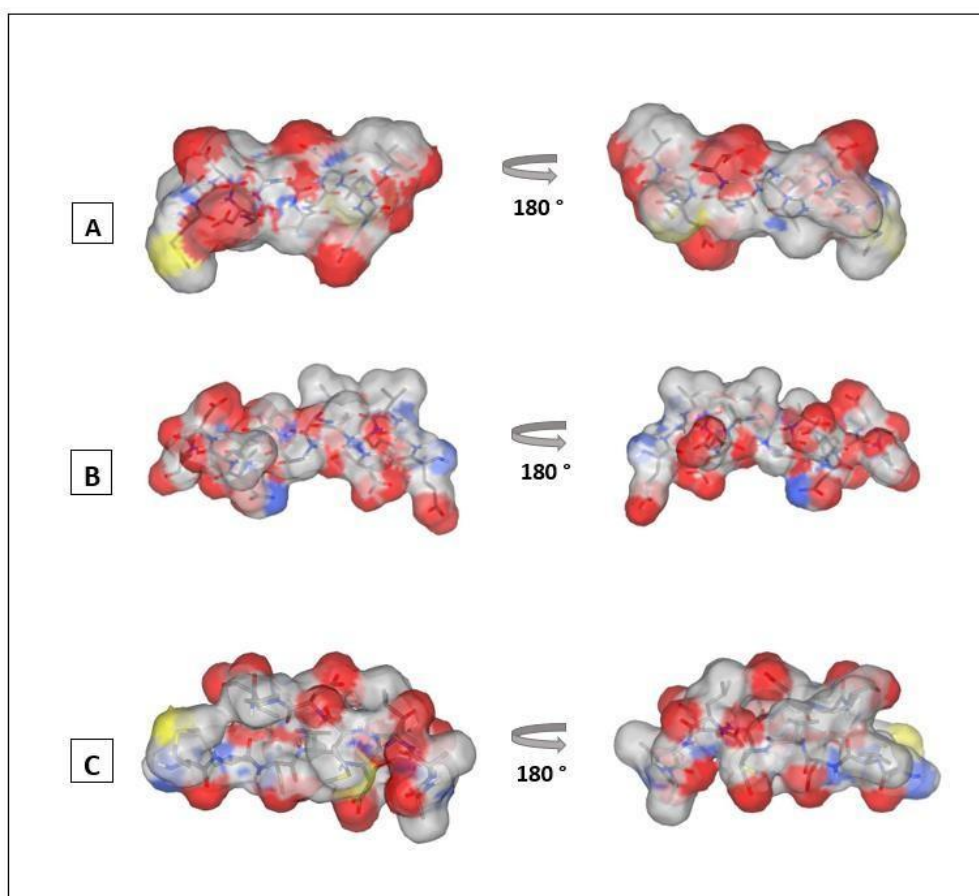
Figura 5. Espectros CID dos íons moleculares selecionados, que resultaram na interpretação das sequências mencionadas: **(A)** peptídeo Trichonephiline-1, cuja sequência MVDDALGAADAEMV-OH, foi obtida selecionando-se o íon de m/z 704.3569 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; evidenciando os íons- fragmentos do tipo $-b$ e $-y$; **(B)** peptídeo Trichonephiline-2, cuja sequência EGVDDALGAADNLDL-OH foi obtida selecionando-se o íon de m/z 738.3660 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; evidenciando os íons- fragmentos do tipo $-b$ e $-y$. e **(C)** peptídeo Trichonephiline-3, cuja sequência MVSVDLGAACMDPV-OH foi obtida, selecionando-se o íon de m/z 704.3449 na forma de $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo $-b$ e $-y$.



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Os peptídeos escolhidos foram sintetizados em fase sólida e purificados, para serem utilizados nos ensaios de toxicidade. É importante esclarecer que o peptídeo Trichonephiline- 3 possui um resíduo de cisteína na posição 10; entretanto, o mesmo foi sintetizado com um resíduo de serina nesta posição (que tem várias características físico-químicas semelhantes à cisteína), porque a presença do grupo tiol da cisteína proporciona a formação de dímeros do peptídeo, influenciando bastante as propriedades funcionais do peptídeo. Os três peptídeos polianiônicos tiveram suas estruturas tridimensionais modeladas com o uso do algoritmo PEPFOLD 4.0, e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 6.

Figura 6. Modelos moleculares dos peptídeos Trichonephiline foram elaborados para representar o potencial eletrostático de suas superfícies, com base em estruturas previstas pelo software PEPFOLD 4.0. A: Trichonephiline-1 (MVDDALGAADAEMV-OH); B: Trichonephiline-2 (EGVDDALGAADNLDT-OH); C: Trichonephiline-3 (MVSVDLGAASMDPV-OH). As áreas de superfície com potencial eletrostático positivo estão indicadas em azul, enquanto as regiões de potencial negativo são destacadas em vermelho. As imagens à esquerda correspondem à visualização frontal (0°), e aquelas à direita representam a rotação de 180° , exibindo a face posterior dos peptídeos.

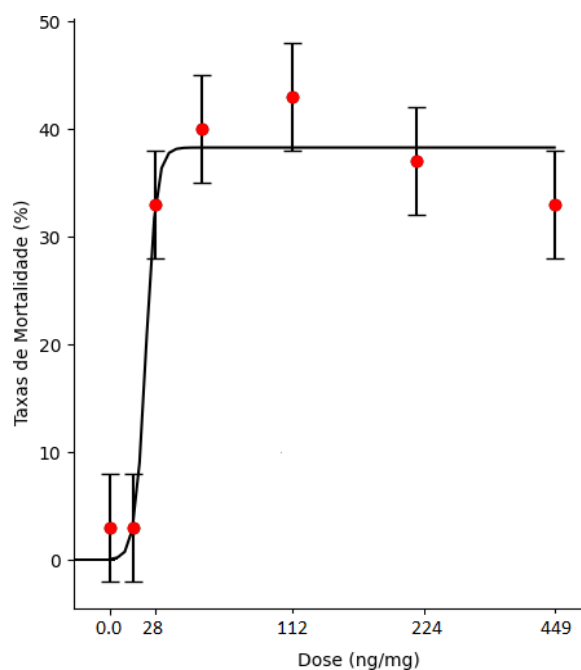


Fonte: Elaborado pela autora.

Os ensaios de toxicidade realizados nas abelhas sem ferrão se deram através de injeção de cada peptídeo isoladamente. As dosagens de injeção ocorreram com base em experimentos pilotos e foram calculados através de bioensaios usando o inseticida dimetoato como referência comparativa ($DL_{50}=12$ ng/mg). As concentrações das doses aplicadas para cada peptídeo foram de 14 ng/mg, 28 ng/mg, 56 ng/mg, 112 ng/mg, 224 ng/mg e 449 ng/mg.

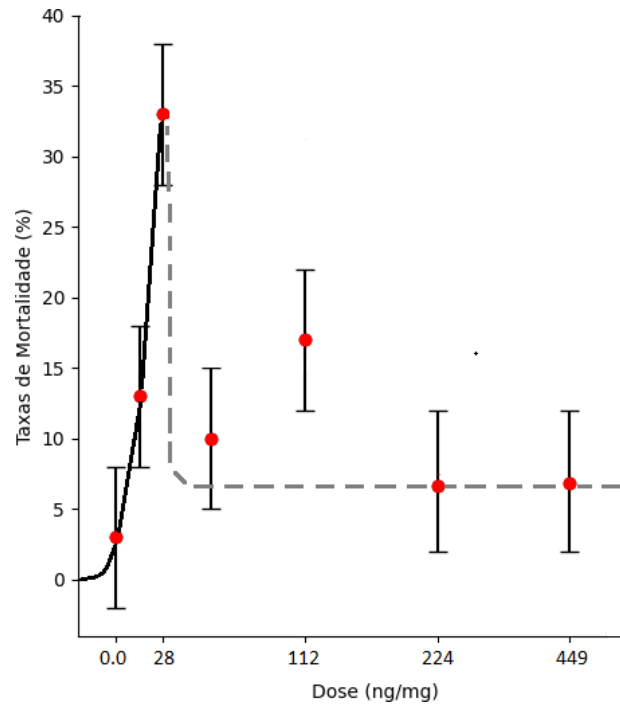
A taxa de mortalidade das abelhas registrada durante os bioensaios ficou abaixo de 50%; entretanto, os ensaios revelaram ação paralisante dos peptídeos. Por esta razão, foi determinado o valor de ED_{20} , conforme mostrado nas figuras 7, 8, e 9.

Figura 7. Curva dose-efeito para a injeção do peptídeo Trichonephiline-1 na hemocele das abelhas *M. scutellaris*. Foram injetadas seis concentrações do peptídeo, além do controle (solução salina) e foram observados o comportamento das abelhas após 24 horas de injeção. Após término do bioensaio foi obtida a $ED_{20}=2,3$ ng/mg.



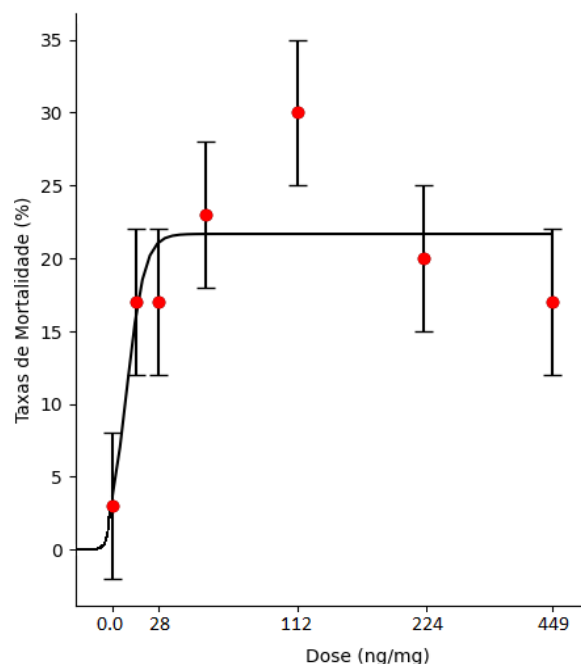
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8. Curva dose-efeito para a injeção do peptídeo Trichonephiline-2 na hemocele das abelhas *M. scutellaris*. Foram injetadas seis concentrações do peptídeo, além do controle (solução salina) e foi observado o comportamento das abelhas após 24 horas de injeção. Após o término do bioensaio foi obtido a $ED_{20} = 2,4$ ng/mg.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9. Curva dose-efeito para a injeção do peptídeo Trichonephiline-3 na hemocele das abelhas *M. scutellaris*. Foram injetadas seis concentrações do peptídeo, além do controle (solução salina) e foi observado o comportamento das abelhas após 24 horas de injeção. Após término do bioensaio foi obtida a ED₂₀ = 2,0 ng/mg.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1 Estudo do comportamento dos insetos modelos, sob ação dos peptídeos tóxicos, utilizando os parâmetros do programa Ethoflow

Para se entender melhor os efeitos paralíticos de cada peptídeo sobre o inseto-modelo, foi realizada uma nova série de bioensaios, utilizando-se o software Ethoflow.

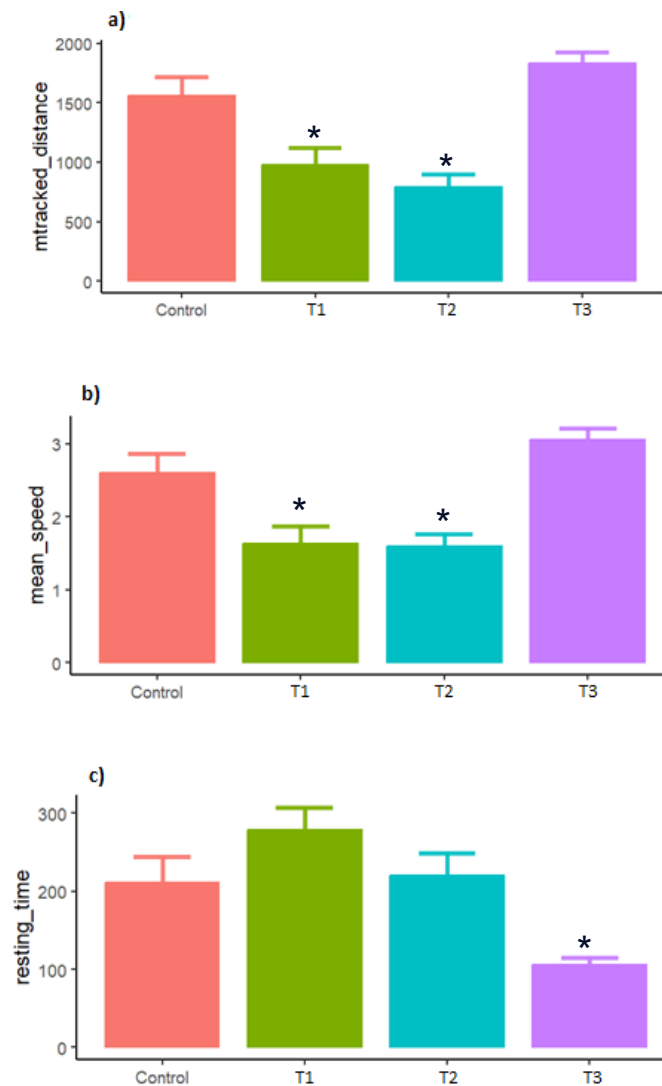
A nova rodada de bioensaios partiu da análise somente das concentrações ED₂₀ de cada peptídeo, sendo Trichonephiline-1= 2,3 ng/mg; Trichonephiline-2= 2,4 ng/mg, e Trichonephiline-3= 2,0 ng/mg. Essas novas dosagens experimentais serviram de padrão para as análises seguintes, através da ferramenta “machine learning”, do software Ethoflow, com base no comportamento das abelhas após exposição nos tempos de três horas e 24 horas.

O software apresenta os resultados na forma de planilhas, que fornecem informações estatísticas sobre alguns parâmetros, calculados com base na quantidade de frames analisados, utilizando Inteligência Artificial. Os parâmetros selecionados para a avaliação dos resultados desse trabalho, tanto para o período de três horas quanto para 24

horas, foram: (I) distância percorrida; (II) velocidade média e (III) tempo de parada. O tempo necessário, de acordo com padrões de experimentação, foi de 10 minutos de gravação totalizando 18 mil frames analisados.

As figuras 10 e 11 ilustram as reações comportamentais nas arenas de observação das abelhas após o tempo programado. A figura 10 apresenta uma amostra gráfica na forma de barras dos padrões escolhidos para discussão, considerando o tempo de três horas após a injeção dos peptídeos.

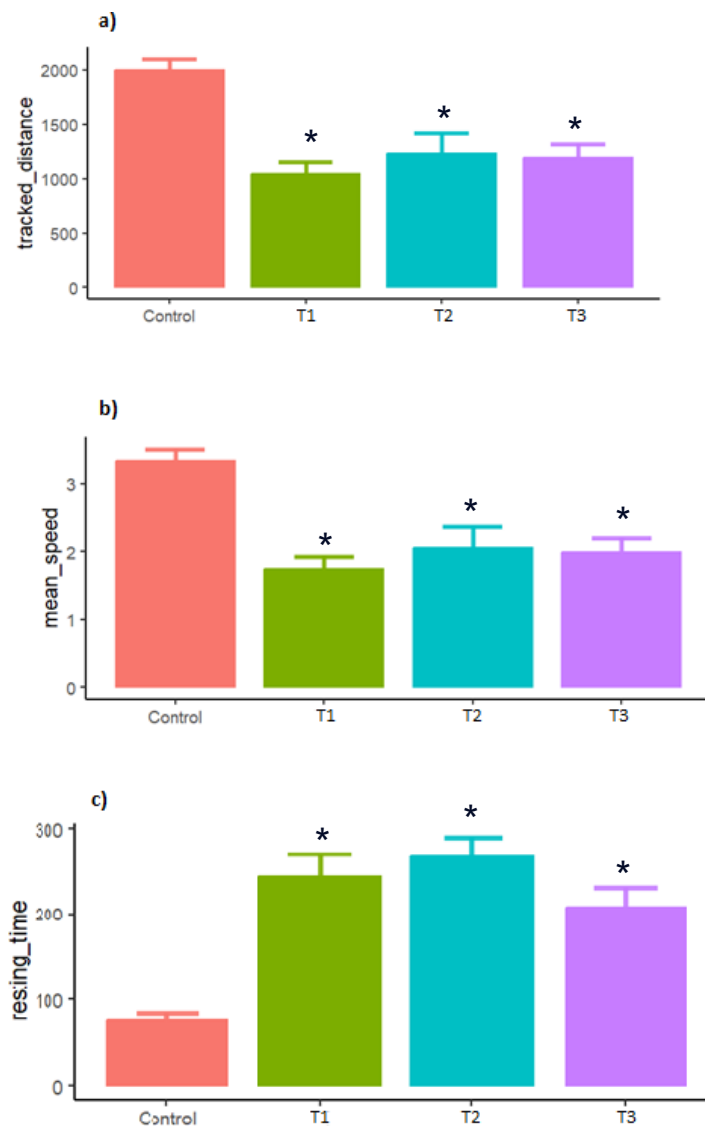
Figura 10. Parâmetros comportamentais de forrageiras de *M. scutellaris* três horas após a exposição aos peptídeos de teia de *T. clavipes*. Legenda: (a) Distância percorrida em centímetros; (b) Velocidade média em $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$; (c) Tempo de pausa. (*) Significativo pelo teste de múltiplas comparações de Dunn com correção de Bonferroni ($p < 0,001$). T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Depois disso, as mesmas observações também foram realizadas após 24 horas de ação de cada peptídeo, como mostrado na figura 11. Todos os valores significativos foram calculados utilizando o teste de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni ($p < 0,001$).

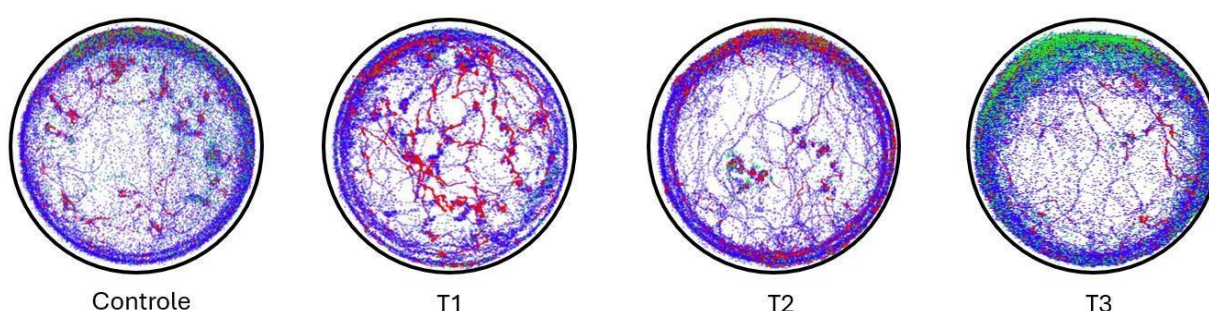
Figura 11. Parâmetros comportamentais de forrageira de *M. scutellaris* 24 horas após a exposição aos peptídeos de teia de *T. clavipes*. Legenda: (a) Distância percorrida em centímetros; (b) Velocidade média em $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$; (c) Tempo de pausa. (*) Significativo pelo teste de múltiplas comparações de Dunn com correção de Bonferroni ($p < 0,001$). T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

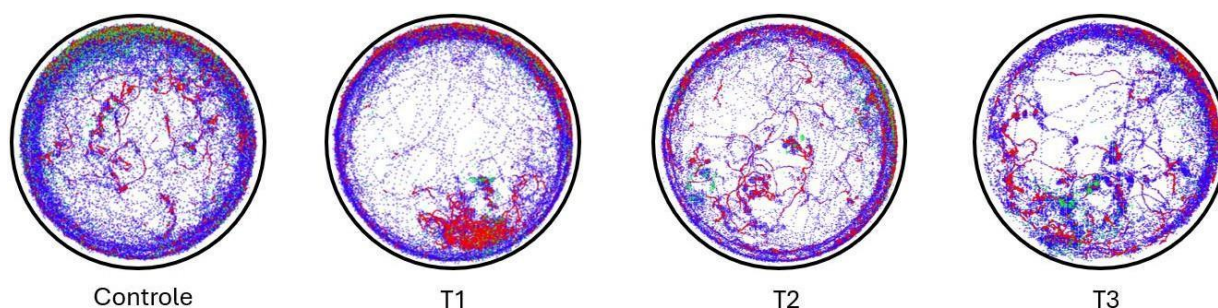
Os dados obtidos nos ensaios acima também foram representados na forma de trajetórias realizadas até o tempo de parada, tanto para as observações realizadas após três horas de ação dos peptídeos (Figura 12), como também após 24 horas de ação (Figura 13).

Figura 12. Padrões de movimento médio (azul), movimento instantâneo (verde) e pausa (vermelho) para forrageiras de *M. scutellaris*, três horas após a exposição injetável de cada peptídeo isoladamente, na concentração correspondente ao valor de ED20. T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13. Padrões de movimento médio (azul), movimento instantâneo (verde) e pausa (vermelho) para forrageiras de *M. scutellaris*, 24 horas após a exposição injetável de cada peptídeo isoladamente, na concentração correspondente ao valor de ED20. T1, T2, e T3 representam os peptídeos Triconephiline-1, -2, e -3, respectivamente



Fonte: Elaborado pela autora.

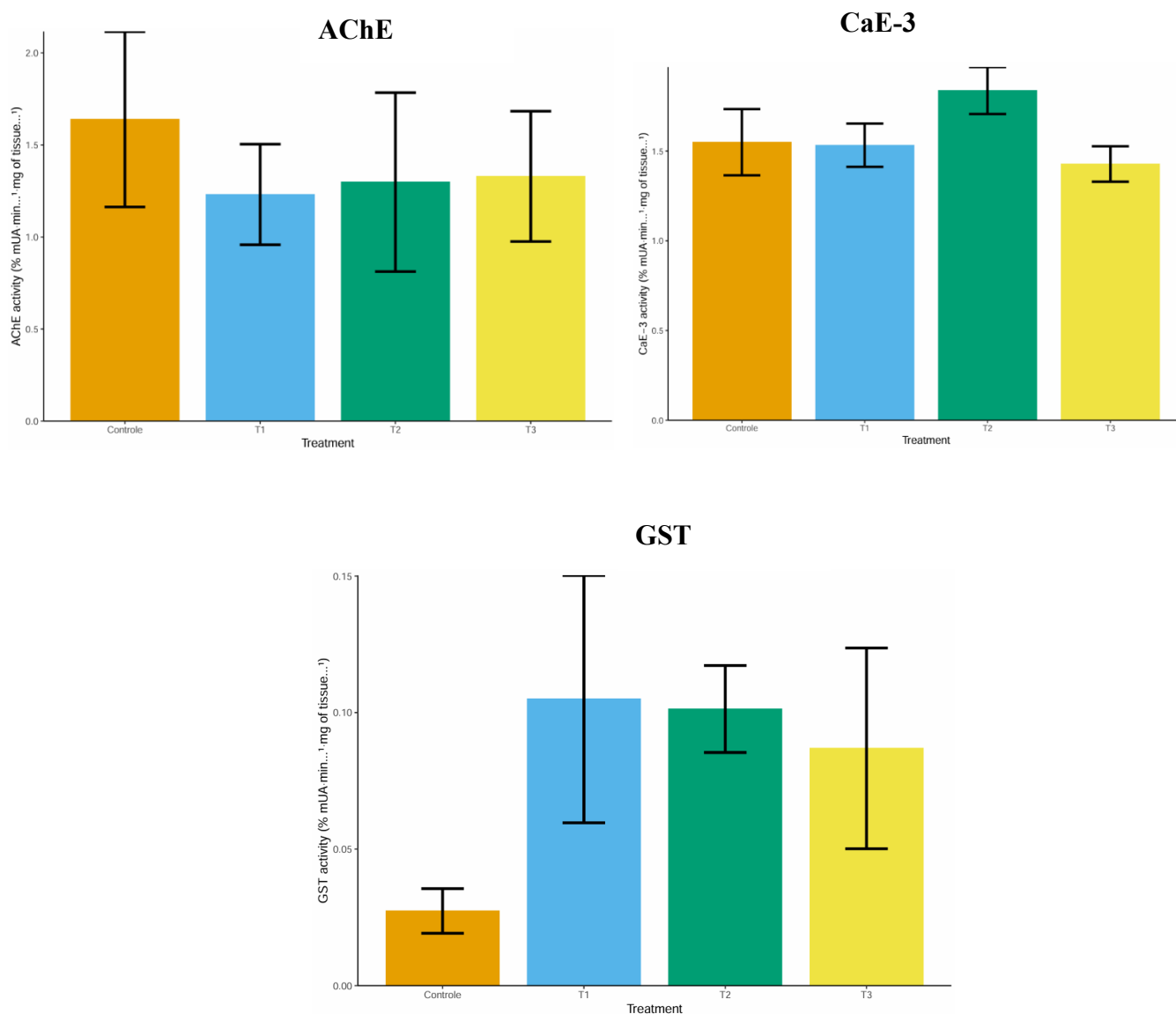
4.2 Ensaio enzimáticos

Com o intuito de obter pistas sobre os mecanismos gerais de ação dos peptídeos tóxicos das teias sobre os efeitos paralíticos, as abelhas foram dissecadas em cabeça e abdômen, e então cada parte obtida foi macerada e os extratos delas foram submetidos a ensaios de atividades com algumas enzimas marcadoras de mecanismos de ação: acetilcolinesterase (AChE), Carboxilesterase-3 (CaE3), glutathione S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

Com base nos efeitos paralisantes e de excitação apresentados pelas abelhas nos experimentos comportamentais e de toxicidade, um ensaio de cinética enzimática foi proposto para compreender os efeitos metabólicos e a saúde fisiológica do animal após a injeção dos peptídeos Trichonephiline. A indicação de mudança na atividade enzimática das abelhas, tanto o aumento como a diminuição, ajudam a entender o funcionamento do organismo, sob efeito de substâncias xenobióticas (Carvalho et al. 2013).

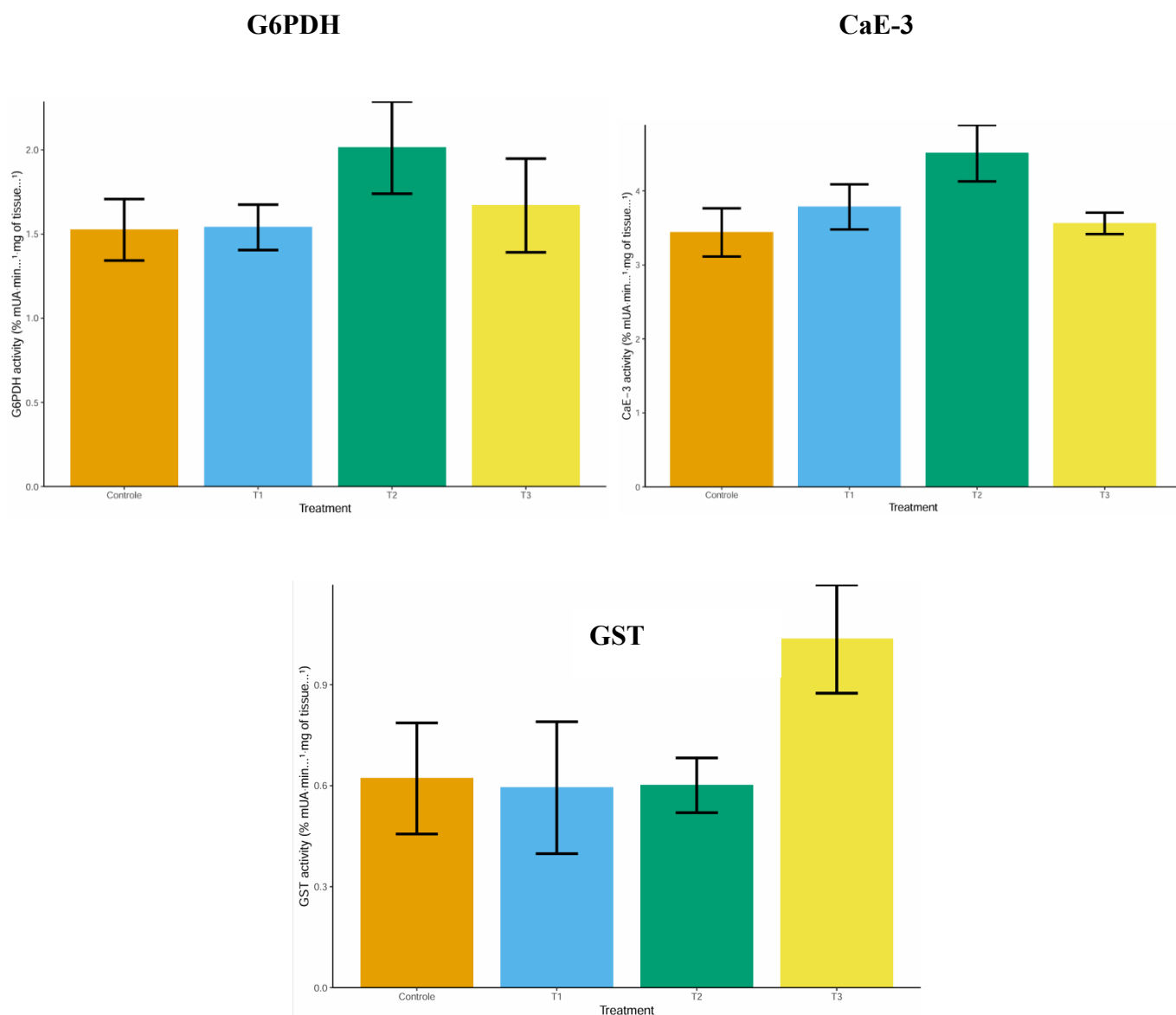
Para analisar os efeitos enzimáticos para cada tratamento, controle salina e os três peptídeos, foram feitas análises em duas regiões das abelhas: a cabeça e o abdômen. Para análise da cabeça foram selecionadas três enzimas: GST (Glutathione S-transferase), CaE3 (Carboxilesterase 3) e AChE (Acetilcolinesterase). E para o abdômen foram analisadas as enzimas: GST (Glutathione S-transferase), CaE3 (Carboxilesterase 3) e G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase). As figuras 14 e 15 demonstram os resultados dos ensaios com as enzimas analisadas, com exposição de três horas, nas regiões da cabeça e abdômen, respectivamente.

Figura 14. Atividade das enzimas AChE, CaE-3 e GST, respectivamente, na cabeça de *M. scutellaris* após 3 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

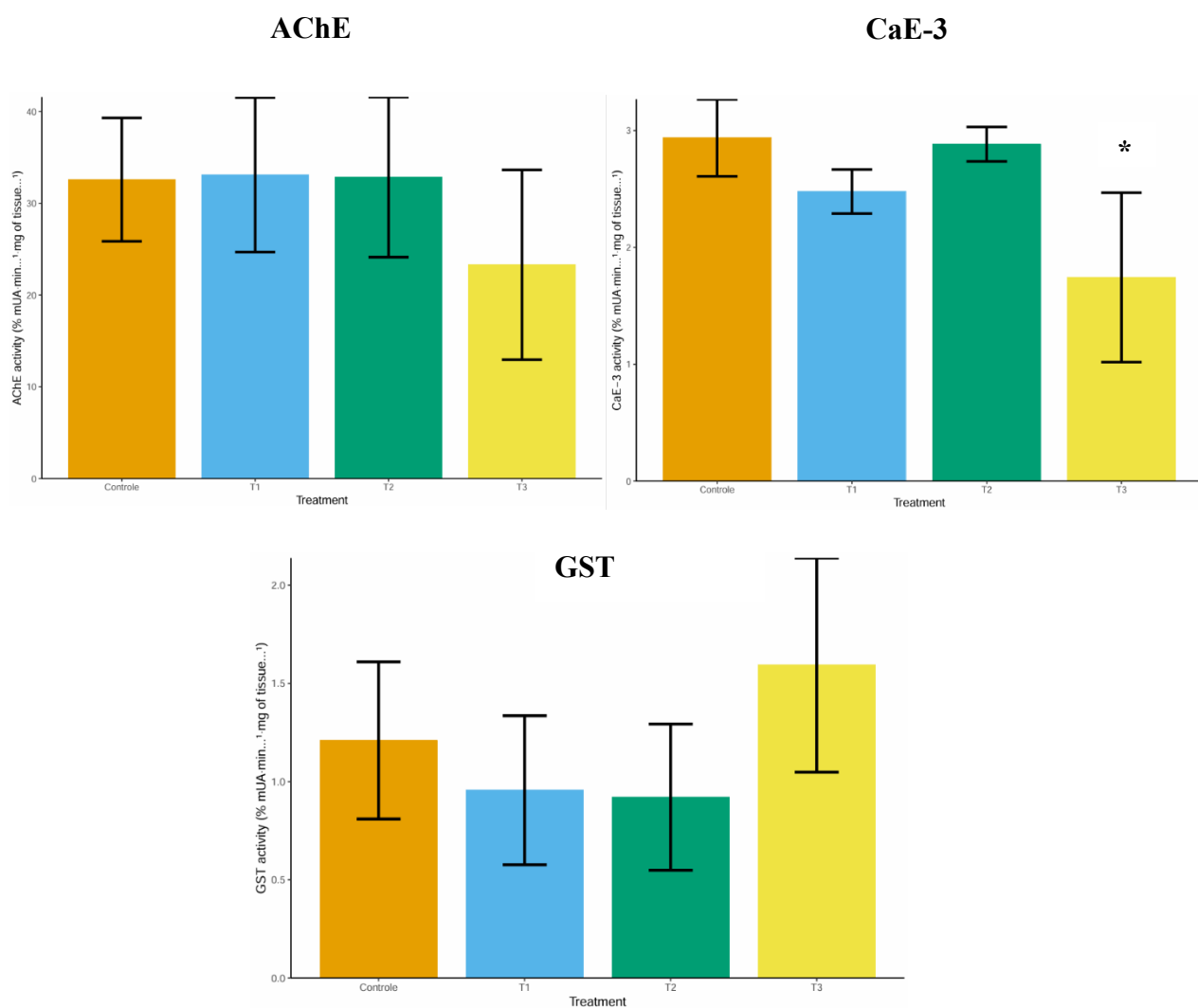
Figura 15. Atividade das enzimas GST, CaE-3 e G6PDH no abdômen de *M. scutellaris* após 3 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED₂₀ de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

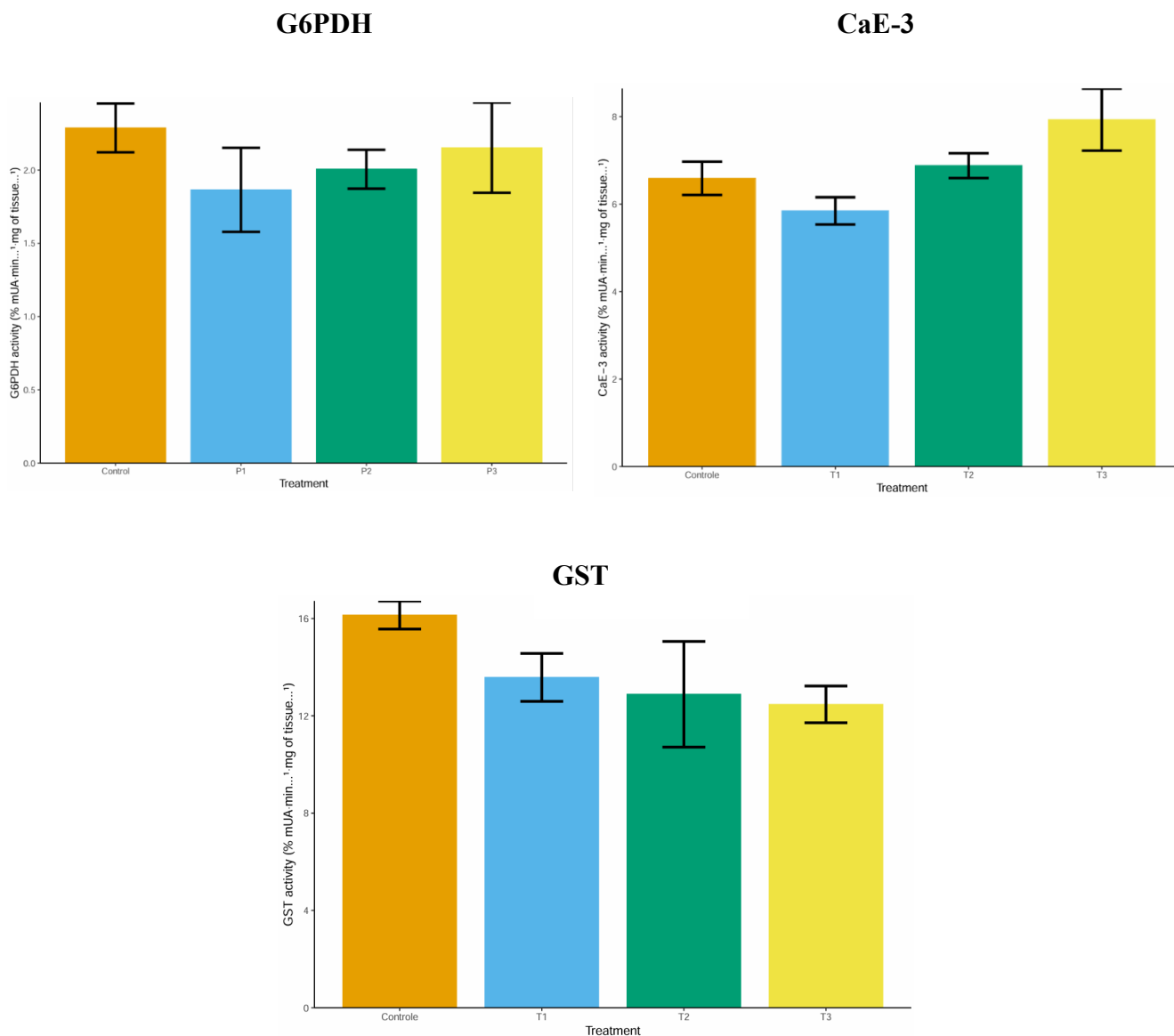
Como verificação de evidências e complemento na avaliação das análises, além do período de três horas foram realizadas novos experimentos com as mesmas enzimas citadas anteriormente, na cabeça e abdomen das abelhas, como meio de entender o funcionamento do organismo delas em 24 horas de exposição. Os resultados dessa análise enzimática estão disponíveis nas imagens 16 e 17.

Figura 16. Atividade das enzimas AChE, CaE-3 e GST, respectivamente, no abdômen de *M. scutellaris* após 24 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratados.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17. Atividade das enzimas G6PDH, CaE-3 e GST, respectivamente, no abdômen de *M. scutellaris* após 24 horas de exposição aos peptídeos T1, T2 e T3, injetados na concentração correspondente ao ED20 de cada peptídeo. As análises foram realizadas com 5 réplicas, contendo 3 abelhas cada, em triplicata. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

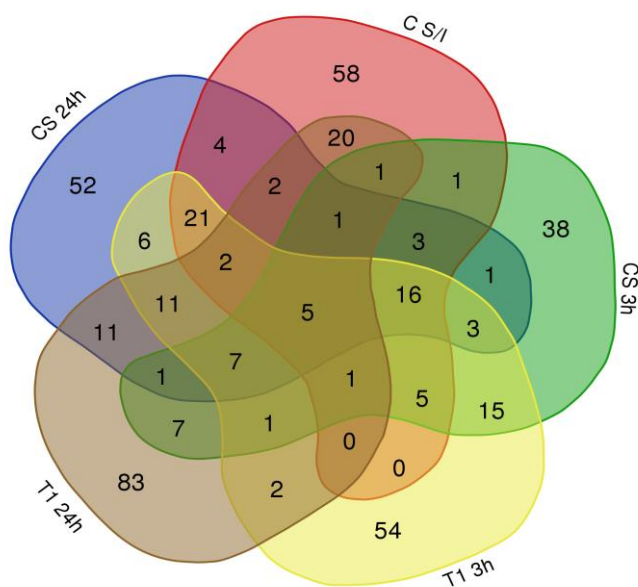
4.3 Análise proteômica

Com o objetivo de conhecer e compreender os efeitos tóxicos dos peptídeos Trichonephilina sobre o sistema nervoso dos insetos-modelo, foi realizada uma análise proteômica dos cérebros de *M. scutellaris* sob ação do peptídeo Trichonephilina-1 (T1).

Para que a realização do bioensaio de injeção fosse feita de forma coerente e que as abelhas utilizadas estivessem em condições saudáveis, a coleta foi realizada no verão, em fevereiro, onde as temperaturas foram consideradas um fator fundamental para a experimentação da análise proteômica. Após a injeção nos períodos de estudo, três e 24 horas, oito cabeças de cada grupo (controle sem injeção, controle salina e T1) foram maceradas e realizados os protocolos para extração de proteínas, de acordo com o método *shotgun* (Paula, 2020).

A partir da identificação das proteínas com o uso do algoritmo PEAKS 10, e posterior análise no software Scaffold, as amostras foram classificadas em grupos biológicos consultando-se a base de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>), que disponibiliza informações sobre funções biológicas e moleculares de diversas proteínas e GO (gene Ontology - <https://geneontology.org/>). No total, foram identificadas 695 proteínas entre todos os grupos (descritas de forma global nas tabelas A1 a A5 do anexo deste trabalho). Entre elas, 58 proteínas foram exclusivas do grupo controle sem injeção; 90 proteínas foram exclusivas dos controles submetidos à injeção de solução salina (3 e 24 horas); e 137 proteínas foram exclusivas do grupo com o peptídeo Trichonephilinae (T1) nos tempos de 3 e 24 horas. Considerando os cinco grupos analisados, apenas cinco proteínas foram comuns a todos eles. A Figura 18 apresenta o diagrama de Venn, que ilustra a distribuição entre os grupos de análises, evidenciando os conjuntos de proteínas únicas e compartilhadas.

Figura 18. Diagrama de Venn apresentando a divisão dos grupos sendo eles: CS (controle com salina), C S/I (controle sem injeção), e Tratamento do peptídeo T1, e a quantidade de proteínas encontradas em cada grupo, bem como as proteínas compartilhadas por eles.



Fonte: Elaborado pela autora.

Entre as proteínas identificadas, foram observadas proteoformas com a mesma nomenclatura. Em razão disso, as tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 apresentam, de forma resumida, as identificações proteômicas do cérebro de *M. scutellaris*, organizadas de acordo com a função biológica atribuída em cada grupo analisado, como forma de exemplificação do conjunto total de identificações obtidas.

Tabela 2. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de *M. Scutellaris* resultante do ensaio referente ao controle sem injeção.

Código de acesso	Nome da proteína	mass avarage	log10P	#peptides	Processo biológico
KAK11322015.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona bicolor]	35633	105.33	9	metabolismo energético
KAK1125752.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	101.06	10	Metabolismo citoplasmático
XP_017796215.1	enolase isoform X1 [Habropoda laboriosa]	50451	94.07	6	metabolismo energético
XP_02147266.1	actin. muscle [Megachile rotundata]	41758	81.88	7	Citoesqueleto
XP_011498397.1	Alpha-crystallin A chain isoform X2 [Ceratosolen solmsi machali]	18919	49.09	1	Processo visual
KOX76398.1	Heat shock protein beta-1 [Melipona quadrifasciata]	29480	49.09	1	Defesa celular
XP_003703256.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Megachile rotundata]	25725	49.09	1	Processo visual
AEY59375.1	Tubulin alpha- 1C chain [Apis cerana]	49967	47.20	2	Citoesqueleto
XP_012138543.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Megachile rotundata]	32871	41.54	4	Transporte
XP_036143115.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial isoform X4 [Monomorium pharaonis]	120462	33.44	1	Metabolismo mitocondrial
KOX67354.1	Aryphorin subunit alpha [Melipona quadrifasciata]	81002	28.08	1	Proteína de reserva de hemolinfa
KOC69159.1	Hexamerin [habropoda laboriosa]	80924	28.08	1	Proteína de reserva de hemolinfa
KOX76362.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	26.75	1	metabolismo energético
KOC66608.1	Putative zinc metalloproteinase YIL08W, partial [Habropoda laboriosa]	58601	25.49	1	Adesão celular
CAB0029200.1	Reverse transcriptase domain-containing protein [Trichogramma brasicae]	137411	25.16	1	housekeeping

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de *M. Scutellaris* resultante do ensaio referente ao controle salina no período de 3 horas de exposição.

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KOX72508.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona quadrifasciata]	45132	141.72	10	metabolismo energético
KAK1137411.1	Enolase [Melipona bicolor]	47105	128.14	10	metabolismo energético
AEY59375.1	Tubulin alpha-1C chain [Apis cerana]	49967	126.18	8	Citoesqueleto
KAK1125752.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	121.09	11	Metabolismo citoplasmático
KOX76362.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	86.92	4	metabolismo energético
XP_043522985.1	Pyruvate kinase isoform X1 [Frieseomelitta varia]	56328	78.10	4	metabolismo energético
XP_012342781.1	muscle-specific protein 20 [Apis florea]	20392	78.10	3	Citoesqueleto
KAL0134904.1	Transgelin [Cardiocondyla obscurior]	20532	67.69	2	Citoesqueleto
KAK9294241.1	Triosephosphate isomerase [Tetragonisca angustula]	28568	59.16	3	Metabolismo energético
KAK1126226.1	Anaphase-promoting complex subunit 11 [Melipona bicolor]	43573	59.16	4	Housekeeping
KYN30107.1	Tubulin beta-1 chain, partial [Trachymyrmex cornetzi]	48140	59.16	4	Citoesqueleto
AAR24350.1	SOD1, partial [Apis mellifera lingutica]	9745	39.98	1	defesa celular
XP_011503991.1	superoxide dismutase [Cu-Zn]-like, partial [Ceratosolen solmsi marchali]	14260	39.98	1	defesa celular
XP_015437469.1	Profilin [Dufourea novaeangliae]	13743	29.92	1	Citoesqueleto
EFN60578.1	Actin-5, muscle-specific [Camponotus floridanus]	11974	29.92	1	Citoesqueleto
KAF3425712.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Frieseomelitta varia]	96165	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_011867213.1	heat shock protein beta-1 isoform X2 [Vollenhovia emeryi]	21691	29.43	1	Defesa celular

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de *M. Scutellaris* resultante do ensaio referente ao controle salina no período de 24 horas de exposição.

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KAK1125753.1	arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	119.22	10	Metabolismo citoplasmático
QGV13630.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Melipona quadrifasciata]	45132	108.64	4	metabolismo energético
KOX81104.1	Enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	91.03	6	metabolismo energético
KOX74974.1	pyruvate kinase [melipona quadrifasciata]	70159	87.26	4	metabolismo energético
AEY593751	Tubulin alpha-1C chain [Apis cerana]	49967	75.10	4	Citoesqueleto
KOX76362.1	fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	54.85	4	metabolismo energético
ADU53533.1	14-3-3 zeta, partial [Apis cerana]	11108	46.02	1	Neuroodulação
KOX70865.1	cofilin/actin-depolymerizing factor like protein [Melipona quadrifasciata]	21107	39.31	1	Citoesqueleto
XP_011707142.1	tubulin beta chain, partial [Wasmannia auropunctata]	13226	38.68	1	Citoesqueleto
KOX80990.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Melipona quadrifasciata]	18580	38.50	2	Defesa celular
KAF3420827.1	Phosphoglycerate mutase [Frieseomelitta varia]	28627	38.33	2	Metabolismo energético

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de *M. Scutellaris* resultante do ensaio referente ao peptídeo Trichonephiline-1 (T1) no período de 3 horas de exposição.

Código de acesso	Nome da proteína	mass avarage	log10P	#peptides	Processo biológico
KAK1137412.1	Enolase [Melipona bicolor]	50785	124.60	8	metabolismo energético
KAK1132015.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona bicolor]	35633	118.26	8	metabolismo energético
KAK1125753.1	arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	114.82	10	Metabolismo citoplasmático
KOX74974.1	Pyruvate kinase [Melipona quadrifasciata]	70159	92.72	4	metabolismo energético
KAF3424496.1	Citrate synthase [Frieseomelitta varia]	51533	78.45	2	Metabolismo energético
KOX80990.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Melipona qudrisfaciata]	18580	65.49	2	Defesa celular
AEY56867.1	Tubulin alpha-C1 chain [Apis cerana]	49965	65.49	4	Citoesqueleto
KOX79199.1	Glutamate dehydrogenase, mithocondrial [Melipona quadrifasciata]	61603	44.35	1	Metabolismo mitocondrial
XP_011867691.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Vollenhovia emeryl]	39877	44.35	1	metabolismo energético
XP_011499491.1	Muscle-specific protein 20 [Ceratosolen solmsi marchali]	20650	40.97	1	Citoesqueleto
AEY60683	aconitate hydratase [Apis cerana]	86049	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
AEY60906.1	Tubulin beta-4 chain [Apis cerana]	50175	38.15	4	Citoesqueleto
XP_015109887.1	Transferrin [Wasmannia auropunctata]	77392	32.21	2	Transporte e regulação de ferro
AGB06352.1	actin, partial [Apis cerana]	31193	31.77	1	Citoesqueleto
AEY58901.1	acin-42A [Apis cerana]	41806	31.77	1	Citoesqueleto

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6. Identificação dos principais componentes proteicos no cérebro de *M. Scutellaris* resultante do ensaio referente ao peptídeo Trichonephiline- 1 (T1) no período de 24 horas de exposição.

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KOX81104.1	Enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	107.29	9	Metabolismo energético
KAK1125753.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	103.06	6	Metabolismo citoplasmático
OGV13630.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Melipona quadrifasciata]	45132	106.46	9	metabolismo energético
KOC62374.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Habropoda laboriosa]	39572	82.57	4	metabolismo energético
XP_003706099.1	actin, muscle [Megachile rotundata]	41758	79.61	5	Citoesqueleto
KOX74974.1	pyruvate kinase [Melipona quadrifasciata]	70159	73.99	6	metabolismo energético
XP_017798406.1	Triosephosphate isomerase [Habropoda laboriosa]	26671	36.27	1	Metabolismo energético
EZA60165.1	Muscle-specific protein [Ooceraea biroii]	62098	35.41	1	Citoesqueleto
XP_071562738.1	tubulin alpha-1 chain [Temnothorax nylanderi]	50110	33.80	1	Citoesqueleto
KOX76389.1	Heat shock protein beta-1 [Melipona quadrifasciata]	29480	33.29	3	Defesa celular
XP_003703256.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [Megachile rotundata]	25725	33.29	3	Processo visual
XP_011498397.1	alpha-crystallin A chain isoform X2 [Ceratosolen solmsi marchalii]	18919	33.29	2	Processo visual
XP_006617028.1	superoxide dismutase [C-Zn] [Apis dorsata]	15675	32.64	1	Defesa celular
KOX75460.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase NAD(+), cytoplasmic [Melipona quadrifasciata]	38422	32.54	1	Metabolismo energético
KAF3423009.1	Apolipophorins [Frieseomelitta varia]	363291	32.07	2	Transporte celular
KOX80996.1	Apolipophorins [Melipona quadrifasciata]	373785	32.07	2	Transporte celular
KOC59155.1	Transferrin [Habropoda laboriosa]	72473	32.00	2	Transporte e regulação de ferro
KOX73085.1	Phosphoglycerate mutase 2 [Melipona quadrifasciata]	32834	31.60	1	Metabolismo citoplasmático
KZC07868.1	Cuticle protein 18.7 [Dufourea novaeangliae]	27480	31.07	2	Proteção do exoesqueleto

Fonte: Elaborado pela autora.

Os processos biológicos e a quantidade de proteínas identificadas em cada grupo estão apresentados na Tabela 7. Foram categorizados 12 processos, com base nas funções biológicas desempenhadas pelas proteínas detectadas, são eles: adesão celular, citoesqueleto, defesa celular, *housekeeping*, metabolismo citoplasmático, metabolismo energético, metabolismo mitocondrial, neuromodulação, processo visual, transporte, proteção do exoesqueleto e proteção da reserva de hemolinfa.

Tabela 7. Processos biológicos e os respectivos grupos. A categorização dos processos funcionais foi realizada com base no número de proteínas identificadas por grupo funcional, sob ação do peptídeos T1, em cada grupo funcional.

Processos biológicos	Grupos				
	Controle sem injeção	controle salina 3h	controle salina 24h	Injeção T1 3h	Injeção T1 24h
Adesão celular	1	0	0	0	0
Citoesqueleto	42	49	58	60	8
Defesa celular	18	13	11	8	25
Housekeeping	1	1	0	0	1
Metabolismo citoplasmático	3	6	3	6	9
Metabolismo energético	41	22	70	46	72
Metabolismo mitocondrial	4	16	0	20	44
Neuromodulação	0	0	26	0	12
Processo visual	11	0	0	0	17
Transporte	12	8	0	5	5
Proteção de exoesqueleto	0	0	0	0	6
Proteína reserva de hemolinfa	2	0	0	0	0

Fonte: Elaborado pela autora.

Na tabela acima (Tabela 7) destacam-se os processos funcionais relacionados ao citoesqueleto, ao metabolismo energético e ao metabolismo mitocondrial, os quais apresentaram as maiores diferenças na comparação entre o grupo controle e os tratamentos com o peptídeo T1.

Com base na classificação dos processos segundo o Gene Ontology (GO - <http://www.geneontology.org>), a definição para cada processo biológico é dada a seguir de acordo com as proteínas encontradas:

- Adesão celular: é a forma de classificar as proteínas que apresentam regiões de

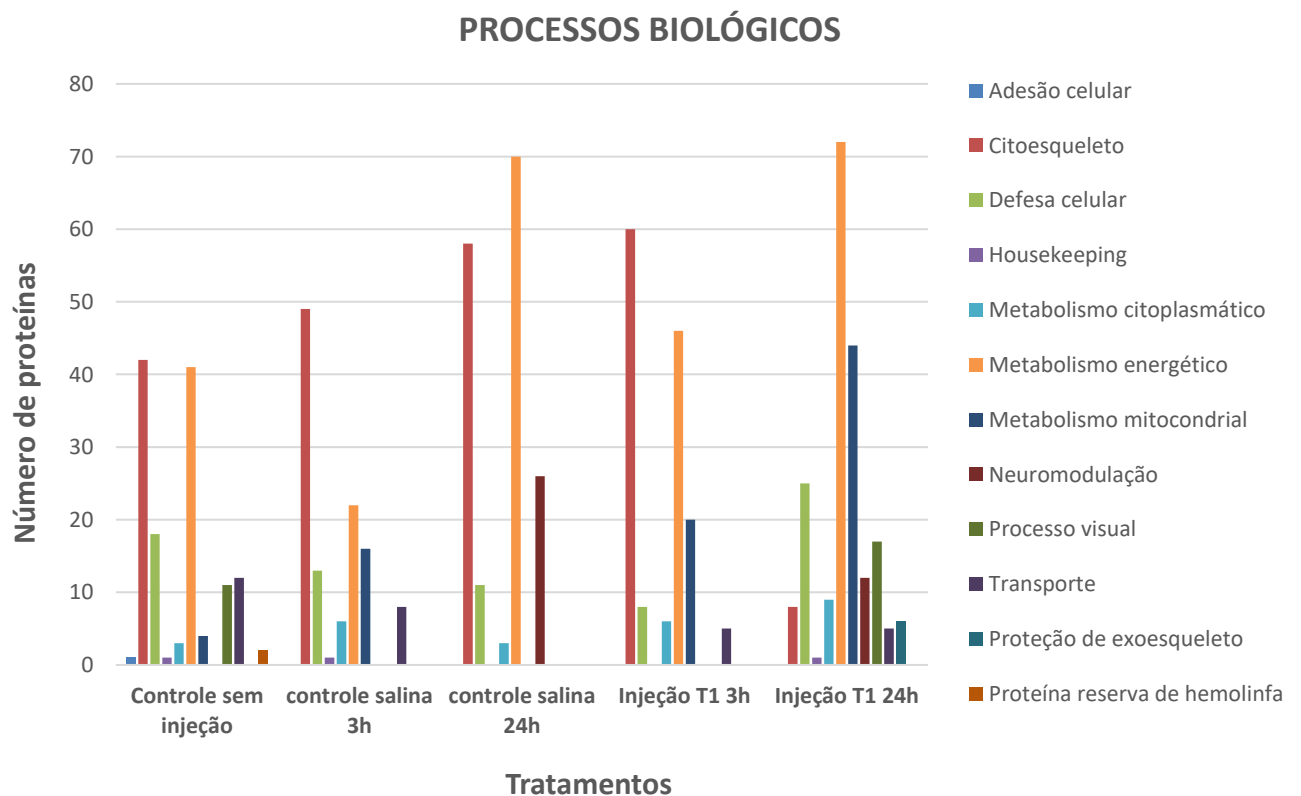
comunicação entre células ou entre componentes celulares extracelular.

- Citoesqueleto: são as proteínas caracterizadas por atuarem no formato celular, suporte estrutural, movimentação de organelas e, também, estando envolvido na divisão celular.
- Defesa celular: um conjunto de células possuem proteínas específicas a protegerem o ambiente químico celular contra modificações conformacionais que podem proporcionar um ambiente desfavorável às atividades biológicas (Paula, 2020).
- *Housekeeping*: são proteínas ligadas à manutenção celular, não relacionadas ao objetivo da pesquisa.
- .Metabolismo citoplasmático, energético e mitocondrial: O metabolismo celular pode ser organizado em três perspectivas principais. O metabolismo mitocondrial, de natureza não energética, envolve funções além da produção de energia, como participação no metabolismo intermediário, regulação da morte celular e detoxificação de metabólitos. O metabolismo energético está diretamente relacionado à geração, manutenção e recomposição de energia, integrando vias citoplasmáticas e mitocondriais para suprir as demandas fisiológicas do organismo. E o metabolismo citoplasmático abrange processos fundamentais realizados no citoplasma, incluindo nutrição, transporte intracelular e reações anabólicas e catabólicas, vinculadas tanto ao metabolismo primário quanto ao secundário.
- Neuromodulação: proteínas especializadas na decodificação de sinais elétricos entre os neurônios e o cérebro, e a manutenção dos processos neurofisiológicos.
- Processo visual: proteínas responsável pelos estímulos e respostas dos olhos compostos do animal.
- Transporte: componentes responsáveis pelo transporte de diferentes moléculas no interior da célula.
- Proteção de exoesqueleto: proteínas estruturais que contribuem para a integridade e resistência da cutícula do inseto. Estas proteínas desempenham funções na manutenção da rigidez mecânica, na interação com a quitina e na proteção contra danos físicos e químicos.
- Proteína reserva de hemolinfa: proteínas que atuam como reservatórios de nutrientes essenciais, incluindo aminoácidos e lipídios, que podendo atender às demandas metabólicas, de crescimento ou em resposta a estresses fisiológicos.

A Figura 19 apresenta os processos biológicos, em forma de histograma, indicando a

quantidade de proteínas identificadas por grupo tratado. Entre os processos de maior relevância destacaram-se o citoesqueleto, a defesa celular e o metabolismo mitocondrial, os quais se mostraram importantes para as diferenças observadas entre os grupos controle salina e com peptídeo T1.

Figura 19. Distribuição dos processos biológicos entre os grupos analisados — controle sem injeção, controle salina (3 horas e 24 horas) e tratamento T1 (3 horas e 24 horas) — organizada de acordo com cada processo biológico identificado.



Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, as teias são “ferramentas” utilizadas pelas aranhas como parte do mecanismo de captura de presas. Os fios de seda produzidos pelas glândulas presentes nesses aracnídeos apresentam propriedades como resistência a elevadas forças, à dureza e grande elasticidade (HU, et al., 2024), o que facilita a estratégia de captura, além de desempenharem papel químico-ativo no processo de pré-digestão de suas presas (Esteves, 2021), ajudando no processo de alimentação. A teia de *T. clavipes* apresenta vários compostos de baixas massas moleculares em sua composição, tais como acipoliaminas (Palma; Nakajima, 2005), toxinas derivadas dos alcaloides tetrahidrobeta-carbolínicos (Palma; Nakajima, 2005) e peptídeos (Esteves, 2021). Estes componentes são utilizados como parte do arsenal químico destas aranhas para atuar em sua predação. Os peptídeos Trichonephiline são parte deste arsenal, utilizado pelas aranhas, estrategicamente, para facilitar sua forma de predação.

Essa teia é rica em toxinas de diferentes naturezas químicas, principalmente quando se trata de componentes de baixas massas moleculares; por isso, optou-se pela estratégia de RP-HPLC-MS e MS/MS para fracionar o extrato da teia e identificar/caracterizar os componentes deste extrato. A Figura 4 mostra o TIC da fração de baixas massas do “lavado-de-teias”, onde pode-se visualizar inúmeros picos de diferentes compostos. A escolha dos três peptídeos analisados se deu a partir de suas características diferenciadas enquanto toxinas. Normalmente, as toxinas peptídicas são moléculas que apresentam caráter policatiônico, ou seja, possuindo em sua composição aminoácidos básicos, que geralmente se ionizam em pH fisiológico, formando cargas positivas. Em contrapartida, os peptídeos identificados no presente trabalho possuem características aniônicas, apresentando resíduos de aminoácidos ácidos como prevalência na sua composição, que quando se ionizam, formando cargas negativas. Tal característica aniônica sugere que esses peptídeos têm baixa afinidade pela membrana plasmática das células dos insetos, pois as membranas também apresentam a mesma natureza química, devido à presença de fosfolipídeos em sua estrutura, fazendo com que a interação do peptídeo com o organismo das presas possa ocorrer através de receptores presentes nas células localizadas imediatamente abaixo da cutícula, facilitando, assim, sua entrada para o meio intracelular. Por isso, estes peptídeos foram escolhidos como alvo do presente estudo.

A característica polianiónica destes peptídeos pode ser facilmente observada nos

modelos estruturais de cada peptídeo, mostrados na Figura 6. Estas características estruturais sugerem que a interação destes peptídeos com o organismo modelo-presa (*M. scutellaris*), deve ocorrer através da ligação dos mesmos a receptores específicos (ainda não identificados).

Os resultados deste estudo revelaram o poder químico que as teias da aranha *T. clavipes* têm sobre suas presas. Se comparados os valores de ED₂₀ obtidos para *M. scutellaris* (Trichonephiline-1= 2,4 ng/mg; Trichonephiline-2= 2,3 ng/mg, e Trichonephiline-3= 2,0 ng/mg) com os valores de LD₅₀ determinados para *Apis mellifera* (Esteves, 2021), Trichonephiline-1= 1,06 ng/mg; Trichonephiline-2= 0,846 ng/mg, e Trichonephiline-3= 1,01 ng/mg), observa-se que esses valores são semelhantes para ambos os modelos biológicos; entretanto os três peptídeos causaram paralisia em *M. scutellaris*, porém foram letais para *Apis mellifera*. Embora seja uma observação inédita na literatura, pode-se especular que a tolerância das melíponas aos peptídeos que causam paralisia seja uma consequência evolutiva. Ao longo de milhões de anos, esses insetos evoluíram de forma distinta em relação às *Apis mellifera* (Cerqueira et al., 2024). Assim por exemplo a perda do ferrão nas melíponas pode ter exigido uma adaptação metabólica dos meliponídeos, funcionando como um mecanismo de defesa (Roubik, 2023). Além disso, a maior exposição a uma diversidade de toxinas durante sua evolução, devido à presença de diversos predadores, pode ter levado as melíponas a desenvolver defesas que atuam tanto no sistema imunológico, quanto em outras vias de proteção, como o desenvolvimento de substâncias antimicrobianas. A interação desses fenômenos pode ter tornado as melíponas mais resistentes às toxinas presentes nas teias de *T. clavipes* (Cerqueira et al., 2024).

Os resultados de caracterização funcional dos peptídeos Trichonephiline revelaram que eles são pouco letais para os insetos-modelo, causando lentidão e paralisia. Para melhor compreender estas ações foram realizados ensaios de dose-resposta com *M. scutellaris*, que foram acompanhados de estudos do padrão de movimentação dos insetos após três e 24 horas de ação dos peptídeos.

Após três horas de ação dos peptídeos, observou-se que Trichonephiline-1 e -2 causaram diminuição da distância percorrida na arena de observação, e movimentos mais lentos, enquanto que Trichonephiline-3 causou alguma excitação, com tempos de parada mais curtos. (Figura 10). Após 24 horas de ação, observou-se que os três peptídeos causaram significativa diminuição da distância percorrida, com maior lentidão e aumento de tempo de pausa, entre os períodos de movimentação (Figura 11). Observando-se os padrões de movimentação global (Figuras 12 e 13) e verificou-se que Trichonephiline-1

causou movimentação lenta, seguido de várias pausas curtas nas primeiras três horas de ação. No período de observação de 24 horas os tempos de pausa foram se elevando, até a paralisia se tornar muito longa. Trichonephiline-2 causou movimentos muito lentos desde o início (três horas de ação), nas bordas da arena, sendo que em períodos mais longos observou-se grandes pausas, que levaram à paralisia permanente. Trichonephiline-3 induziu movimentos muito rápidos no início da observação, sendo que estes movimentos foram se reduzindo com o tempo, até que os movimentos se cessaram, resultando em longos períodos de pausa, que se transformaram em paralisia.

Com esses resultados pode-se observar o arsenal químico que as aranhas depositam nas teias e podem promover paralisia e/ou morte de suas presas, prevenindo o embate físico com as mesmas, economizando energia, com aumento de eficiência do forrageamento. Para os animais peçonhentos a economia de veneno é uma estratégia essencial para sobrevivência (Nisani, Zia; Hayes, William K, 2011), em que os custos energéticos para defesa ou predação podem ocasionar perdas de metabólicas cruciais (Boeve et al., 1995, Malli et al., 1999, Hayes et al., 2002, Stewart e Gilly, 2005, Hayes, 2008; Nisani, Zia; Hayes, William K, 2011).

O sistema imune nos invertebrados se baseia no sistema inato, que engloba síntese de peptídeos, proteinases inibidoras e moléculas de adesão celular (Luo et al. 2006; Jiang 2008). Tão logo, o sistema imune dos insetos consiste em duas reações, a reação humoral e a reação celular, sendo que a primeira consiste, por exemplo, na coagulação da hemolinfa, o que envolve, principalmente, ação de proteínas (Jiang, 2008). Já a resposta celular se refere à atividade de hemócitos, células de defesa suspensas na hemolinfa (Armstrong 1996; Gillespie et al 1997; Nappi; Ottaviani, 2000). Neste caso, as respostas enzimáticas podem ser alteradas quando as abelhas são expostas a substâncias, um exemplo comum é o uso de agrotóxicos, o que se torna uma forma de analisar os efeitos dos mesmos sobre elas. Desta forma, algumas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores fisiológicos. Diante do observado nos ensaios comportamentais e de toxicidade, foi proposto um ensaio para tentar entender o funcionamento metabólico dos peptídeos estudados no corpo das abelhas *M. scutellaris*. Uma análise enzimática com as cabeças e abdômens, foi realizada com intuito de compreender como o organismo fisiológico e metabólico desses animais reagem em contato com esses peptídeos. As abelhas foram expostas ao peptídeo T1, T2 e T3 em doses equivalentes ao valor de ED₂₀, como nos experimentos anteriores e submetida a uma exposição de três e 24 horas. Subsequentemente, foi avaliado a expressão das seguintes enzimas para o cérebro: acetilcolinesterase (AChE) (envolvida na transmissão nervosa, atuando como enzima neural);

carboxilesterase (CaE-3) (geralmente envolvidas na defesa contra agrotóxicos, na detoxificação no controle endócrino), e glutathione-S-transferase (GST) - envolvida na defesa contra o estresse oxidativo e desintoxicação (Efferth et al., 2006; Badiou-Bénéteau et al., 2012; Qin et al., 2013; Yan et al., 2013; Berenbaum e Johnson, 2015; Gong e Diao, 2017). Para análises do abdômen foram utilizadas as enzimas e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) – responsável pela geração de NADPH, importante em processos como na defesa de antioxidantes e detoxificação-, carboxilesterase (CaE-3) e glutathione-S-transferase (GST) (Berenbaum and Johnson, 2015; Gong and Diao, 2017)

Conforme apresentado na Figura 18, entre os resultados obtidos, apenas a enzima CaE-3, avaliada no abdômen, demonstrou alteração significativa frente aos tratamentos, com destaque para o peptídeo T3. Essa redução na atividade enzimática em comparação aos demais peptídeos, especialmente em relação ao T1, pode refletir um indicativo da fisiologia do organismo quando exposto a essa substância xenobiótica. A diminuição da atividade da CaE-3 sugere uma possível resposta de inibição enzimática, o que pode ter levado à ativação de outras vias metabólicas associadas à detoxificação (Almasri et al., 2020; Delcio et al., 2021). Em contrapartida, as demais enzimas analisadas, tanto na cabeça quanto no abdômen, não apresentaram diferenças significativas. A ausência de variações em suas atividades nos dois períodos de análise pode estar relacionada à concentração do peptídeo ou ao tempo de exposição, possivelmente insuficientes para promover uma modulação detectável nos tecidos avaliados (Delcio et al., 2021).

Com o objetivo de compreender os mecanismos associados à paralisia e à excitação observados nas abelhas, recorreu-se à análise proteômica do cérebro dos inseto-presa, buscando identificar as proteínas envolvidas no metabolismo após a injeção do peptídeo e em diferentes tempos de exposição. Para essa abordagem, foi selecionado exclusivamente o peptídeo T1, em razão de sua capacidade de induzir paralisia nos ensaios comportamentais. Foram avaliados cinco grupos, nos tempos de 3 e 24 horas: controle S/I (sem injeção), CS (controle salina) e T1 (Trichonephiline-1). A análise resultou na identificação de 695 proteínas (anexo). Dentro desse conjunto, diversas correspondências de uma mesma proteína apareceram sob diferentes códigos de acesso e valores de peso molecular, caracterizando distintas proteoformas com funções semelhantes.

É importante ressaltar que a estrutura anatômica do cérebro das abelhas apresenta 16 neurópilos distintos, cada um associado a proteoformas específicas. Essa organização de proteoformas nos diferentes neuropilos tem sido descrita principalmente em abelhas sociais, como *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata* (Hernandez et al., 2023). No

entanto, considerando que espécies sociais compartilham mecanismos cerebrais conservados, tais achados podem ser aplicados também a *Melipona scutellaris*, reforçando a importância das abordagens proteômicas comparativas (Hernandez et al., 2023). A elevada diversidade de proteoformas reflete a complexidade regulatória dos neuropilos, possibilitando-lhes desempenhar múltiplas funções específicas e adaptativas, como, por exemplo, a resposta modulada por influência peptídica no organismo.

A partir das proteínas identificadas, uma categorização funcional permitiu evidenciar diferentes processos biológicos, das quais se destacaram três deles quando comparados os cinco grupos, tais como o citoesqueleto, metabolismo mitocondrial e defesa celular.

Nos processos de defesa celular e metabolismo mitocondrial, nota-se, nos grupos com o peptídeo em 24 horas de exposição, um aumento expressivo na expressão das proteínas associadas a esses processos. Esse resultado pode estar relacionado à forma como o animal utiliza mecanismos energéticos, regulatórios e de defesa em exposições mais prolongadas, funcionando como ferramentas do mecanismo de sobrevivência. No caso do metabolismo mitocondrial, verifica-se que o peptídeo afeta diretamente a homeostasia do inseto. Considerando que na mitocôndria ocorrem diversos processos, como a obtenção de energia, a sinalização apoptótica e o controle e a oxidação de moléculas metabólicas (Alberts, 2020), é possível que essa resposta esteja associada à plasticidade que os insetos sociais apresentam diante da exposição a substâncias exógenas. Essa alteração soma-se à resposta de defesa celular, que pode estar diretamente ligada aos mecanismos de proteção, mediados pelas reações químicas do metabolismo mitocondrial. Em 24 horas, com a injeção do T1, observou-se que as proteínas relacionadas à defesa celular aumentaram em relação aos outros tratamentos.

No caso do citoesqueleto, o padrão se inverte. Ao se analisar o histograma, observa-se que, no tratamento de 24 horas com T1, há uma diminuição notável, com as proteínas do citoesqueleto apresentando níveis muito inferiores em comparação aos demais tratamentos. Esse resultado pode estar relacionado à priorização do organismo em direcionar energia para outros processos, como o metabolismo mitocondrial, o que reflete a versatilidade do animal em ajustar suas estratégias químicas corporais, evidenciando sua plasticidade.

Como forma de compreender como as proteínas identificadas interagem entre si, uma análise de interação proteína-proteína foi realizada utilizando a plataforma STRING (<https://string-db.org/>). Contudo, a disponibilidade de dados de interação criados foi extremamente limitada, e isso pode ser respondido pela insuficiência de dados genômicos e proteômicos na plataforma para organismos não-modelo, como a *M. scutellaris* (Von Mering

et al., 2007).

Diante dos resultados apresentados, observa-se que a análise proteômica corroborou os demais experimentos realizados neste estudo, confirmando que a paralisia do animal ocorre de forma progressiva com o tempo de exposição ao peptídeo, como evidenciado na análise com o peptídeo T1, bem como nas alterações do sistema metabólico refletidas no proteoma do inseto. No entanto, essa abordagem não revelou os mecanismos específicos possivelmente envolvidos na paralisia, como a participação de receptores. A hipótese de que receptores atuem na membrana celular permanece em aberto, uma vez que não houve tempo para analisar a fração membrana dos extratos de cérebro de *M. scutellaris*, o que está planejado para ser realizado brevemente, após a defesa da dissertação.

A análise proteômica do cérebro de *M. scutellaris*, com o intuito de investigar o processo metabólico associado ao peptídeo T1, evidenciou a complexidade de trabalhar com organismos não modelo, e como a escassez de informações genômicas e proteômicas pode comprometer significativamente a obtenção de identificações mais robustas. Shah et al. (2025) explicam em seus estudos que, embora organismos não modelo apresentem barreiras nas análises proteômicas, os dados obtidos ainda são valiosos, o que reforça a necessidade de expandir a cobertura proteômica de outras espécies eucarióticas. A utilização de bancos de dados como Hymenoptera, Apis e Melipona, por serem os mais próximos da espécie analisada, possibilitou a identificação de 695 proteínas nos cinco tratamentos. No entanto, esse número ainda é inferior ao que seria observado em organismos modelo, como *Apis mellifera* (Paula, 2020). Esse aspecto também foi evidenciado na tentativa de análises de interação pela ferramenta STRING, que refletiram a limitada informação funcional disponível para organismos não modelo, como é o caso de *M. scutellaris*.

Entender o funcionamento químico e os mecanismos de ação das toxinas presentes nessas moléculas, promovem questionamentos referentes à ativação no metabolismo das presas das aranhas, considerando-se os caminhos metabólicos que essas toxinas podem percorrer, diante do contato com os insetos-presa, e qual o comportamento gerado nesses insetos diante dessa predação.

Uma questão ainda a ser considerada é se os três peptídeos analisados possuem receptores específicos no organismo dos insetos-presa. Os peptídeos Trichonephiline-1 e Trichonephiline-3 parecem induzir uma paralisia mais duradoura, enquanto Trichonephiline-2 provoca uma paralisia de curta duração em concentrações reduzidas; em contrapartida, quando administrado em alta concentração, ele gera um efeito de excitação, tornando os insetos mais agitados ao invés de paralisados, o que o diferencia dos outros dois peptídeos. Essa

distinção pode ser evidenciada analisando as figuras dos ensaios dose-resposta (Figuras 7, 8 e 9).

É pertinente debater a possibilidade de um efeito transitório na atividade dos peptídeos, principalmente na ação desenvolvida com os testes do peptídeo Trichonephiline-2, onde há maior oscilação de paralisia e excitação, comparando-se as baixas e altas concentrações, indicando uma resposta dose-dependente.

É importante ressaltar que os peptídeos dentro das vesículas na teia, agem de maneira sinérgica, ou seja, a organização química e a funcionalidade dos compostos em geral agem de maneira somatória para a paralisia do inseto-presa na teia.

Embora os resultados tenham fornecido informações valiosas sobre o comportamento de captura de presas de *T. clavipes* por suas teias e uma análise proteômica do peptídeo T1, ainda persistem diversas questões sobre os efeitos farmacológicos dos peptídeos; dentre as principais dúvidas estão a identificação dos receptores envolvidos e os mecanismos pelos quais esses peptídeos podem interagir com o organismo das presas. É necessário entender quais vias bioquímicas são ativadas para induzir os estados de paralisia e/ou excitação quando o arsenal químico das teias interage com o metabolismo das presas.

6 CONCLUSÃO

Com o objetivo de reduzir o gasto metabólico (Nisani, Z; Hayes, W. 2011) na captura de presas, as aranhas *T. clavipes* desenvolveram estratégias químicas em suas teias, otimizando a captura e utilização das presas conforme a necessidade alimentar. Contudo, os mecanismos bioquímicos envolvidos na captura, assim como a resposta comportamental dos insetos ao contato com os compostos químicos liberados e sintetizados pela aranha, permanecem um desafio para a compreensão.

Com base nos resultados obtidos, foi possível identificar três toxinas peptídicas nas teias orbitais da aranha *T. clavipes*, denominadas Trichonephiline-1, -2, e -3. Estes peptídeos foram purificados, sequenciados, sintetizados em fase sólida, e purificados, para uso em ensaios funcionais. Estes peptídeos foram de natureza poli-aniônicas (ricos em resíduos de ácido aspártico e glutâmico), e quando submetidos a ensaios de dose-resposta revelaram apresentar ação paralisante nos insetos-presa (abelha sem ferrão *M. scutellaris*). Estas toxinas contribuem para a captura de presas pela teia, sem a necessidade de uso do veneno das aranhas.

Para corroborar os ensaios de toxicidade e comportamento, novos experimentos foram realizados com o objetivo de investigar respostas metabólicas. A análise enzimática demonstrou que apenas uma enzima apresentou ativação significativa no abdômen, a CaE-3. As demais enzimas analisadas, tanto na cabeça quanto no abdômen, não exibiram diferenças significativas em função dos tempos de exposição, o que pode estar relacionado à baixa quantidade de peptídeo detectada no organismo do inseto. A análise proteômica do cérebro do inseto modelo de ensaio tóxico, foi empregada para tentar compreender como as proteínas de *M. scutellaris* responderiam à exposição ao peptídeo T1 por três e 24 horas. Os resultados revelaram forte ativação e regulação metabólica, com aumento do metabolismo mitocondrial e da defesa celular, além de uma acentuada diminuição das proteínas relacionadas ao citoesqueleto após 24 horas.

Apesar das 695 proteínas identificadas e das respostas obtidas, constatou-se a dificuldade em alcançar resultados mais robustos em organismos não modelo. Ainda assim, esses achados se mostram valiosos para ampliar o conhecimento sobre tais espécies. As atividades realizadas no presente trabalho evidenciam a relevância da compreensão e expansão dos estudos voltados a organismos não modelo.

Assim, os resultados deste estudo contribuem significativamente para o entendimento do papel ecológico das toxinas peptídicas presentes nas teias de *T. clavipes*, revelando como esses compostos podem ser estratégicos tanto para a captura das presas quanto para a adaptação ao comportamento alimentar da aranha. Os resultados discutidos acima revelam que a teia de *T. clavipes* não se trata de um simples instrumento mecânico de captura passiva de presas, mas sim de uma elaborada estrutura física, associada a um complexo grupo de toxinas, tornando as teias ferramentas muito elaboradas, com um papel ativo na captura de presas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. E. et al. Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. **J. Comp. Physiol.** v. 164, n.3, 1989.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; et al. Fundamentos de biologia celular. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2020.
- ALLMELING, C. et al. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. 770–777, 2006.
- ALMASRI, Hanine et al. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 203, p. 111013, 2020.
- ARAMAKI, Y. et al. Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. **Proc. Japan. Acad. Sci.**, v. 62B, p. 359-362, 1986.
- ARAMAKI, Y. et al. Chemical characterization of spider toxin, NSTX. **Biomed. Res.**, v. 8, p. 167-172, 1987.
- BABB, Paul L. et al. The *Nephila clavipes* genome highlights the diversity of spider silk genes and their complex expression. **Nature Genetics**, v. 49, n. 6, p. 895-903, 2017.
- BERNARDES, Rodrigo Cupertino et al. Ethoflow : computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. **Sensors**, v. 21, n. 9, p. 3237, 2021.
- BITAR, Lara et al. Sustainable *Bombyx mori*'s silk fibroin for biomedical applications as a molecular biotechnology challenge: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 130374, 2024.
- BITTENCOURT, D. et al. Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk. 2012.
- BOEVE, J.-L.; KUHN-NENTWIG, L.; KELLER, S.; NENTWIG, W. Quantity and quality of venom released by a spider (*Cupiennius salei*, Ctenidae). **Toxicon**, v. 33, p. 1347-1357, 1995.
- BRESCOVIT, A. D. et al. Aracnídeos da Estação Ecológica Juréia-Itatins: in preliminar e história natural. **Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna**, p.198-221, 2004.
- CANTÚ, D. M. et al. Seqüenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria De Massas: Um Guia Prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.
- CARVALHO, Stephan M. et al. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 32, n. 9, p. 2117-2124, 2013.
- CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva et al. *Melipona* stingless bees and honey microbiota reveal the diversity, composition, and modes of symbionts transmission. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 100, n. 7, p. fiae063, 2024.

COMSTOCK, J. H. The spider book. 4a ed., London, Cornell University Press, 1975.

CUNNIFF, Philip M. et al. Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*. **Polymers for advanced technologies**, v. 5, n. 8, p. 401-410, 1994.

CHIBA, T. et al. Finding of primitive polyamine toxins in the venom of a Joro spider, *Nephila clavata*. **Chem. Pharm. Bull.** 42:1864–1869. 1994.

DECIO, Pâmela et al. Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 223, p. 112581, 2021.

DE-SOUZA, Caroline Lacerra. Perfilagem fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da aranha *Trichonephila clavipes*. 2021.

DINNO, A. dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>, acesso em: 20 set 2024.

DOBLHOFER, Elena; HEIDEBRECHT, Aniela; SCHEIBEL, Thomas. To spin or not to spin: spider silk fibers and more. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 9361-9380, 2015.

DOS SANTOS-PINTO, J. R. A. Análise Estrutural das Proteínas da Seda da Teia da Aranha *Nephila clavipes* por uma Abordagem Proteômica. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

DOS SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. Silkomics: Insight into the Silk Spinning Process of Spiders. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 4, p. 1179–1193, 2016.

DOS SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. A proteotranscriptomic study of silk producing glands from the orb-weaving spiders. **Molecular Omics**, v. 15, n. 4, p. 256–270, 2019.

DUONG, Van-An; LEE, Hookeun. Bottom-up proteomics: advancements in sample preparation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5350, 2023.

ELMESKOV, Jørgen; MARTIN, John P.; SCARPETTA, Stefano. Key lessons for labour market reforms: Evidence from OECD countries' experience. **Swedish economic policy review**, v. 5, n. 2, 1998.

ESTEVEZ, F. G. Caracterização proteometabolômica dos componentes da teia da aranha *Nephila clavipes* utilizados na estratégia de captura de presas. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

ESTEVEZ, F. G. Desvendando a química ecológica de captura de presas pela teia de aranhas *Trichonephila clavipes* e *Trichonephila plumipes* através de abordagens ômicas. Tese (Doutorado em Biologia Molecular, Celular e Microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2021.

GOSLINE, J. M.; DEMONT, M. E.; DENNY, M. W. The structure and properties of spider silk. **Endeavour**, v. 10, n. 1, p. 37–43, 1986

HAHN, Judith; GÖGELE, Clemens; SCHULZE-TANZIL, Gundula. Could an Anterior Cruciate Ligament Be Tissue-Engineered from Silk. **Cells**, v. 12, n. 19, p. 2350, 2023.

HAYASHI, Cheryl Y.; SHIPLEY, Nichola H.; LEWIS, Randolph V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. **International journal of biological macromolecules**, v. 24, n. 2-3, p. 271-275, 1999.

HAYES, W. K. The snake venom-metering controversy: levels of analysis, assumptions, and evidence. In: HAYES, W. K.; BEAMAN, K. R.; CARDWELL, M. D.; BUSH, S. P. (Ed.). **The Biology of Rattlesnakes**. Loma Linda, California: Loma Linda University Press, 2008. p. 191-220.

HAYES, W. K.; HERBERT, S. S.; REHLING, G. C.; GENNARO, J. Factors that influence venom expenditure in viperids and other snake species during predatory and defensive contexts. In: SCHUETT, G. W.; HÖGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Ed.). **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain, Utah: Eagle Mountain, 2002. p. 207-233.

HENDRIKSMA, Harmen P.; HÄRTEL, Stephan; STEFFAN-DEWENTER, Ingolf. Honey bee risk assessment: new approaches for in vitro larvae rearing and data analyses. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 5, p. 509-517, 2011.

HERZIG, Volker et al. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_1, p. D653-D657, 2010.

HERNANDEZ, Liudy G. et al. Study of *Melipona quadrifasciata* brain under operant learning using proteomic and phosphoproteomic analysis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, n. suppl 1, p. e20201317, 2023.

HINMAN, Michael B.; LEWIS, Randolph V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 19320-19324, 1992.

HU, X.; LI, N.; GUO, S.; ZHU, M.; ZHANG, X.; WANG, C.; GONG, C. Rapid production of chimeric silkworm/spider silk with improved mechanical properties by infection of nonpermissive *Bombyx mori* with recombinant AcMNPV harboring native-size of spidroin genes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 256, p. 128466, 2024.

HUMENIK, M.; SCHEIBEL T.; SMITH, A. Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 103, p. 131 – 185, 2011.

KALLAL, R. J. et al. Monophyly, Taxon Sampling, and the Nature of Ranks in the Classification of Orb-Weaving Spiders (Araneae: Araneoidea). **Systematic Biology**, v. 69, n. 2, p. 401–411, 2020.

KONO, Nobuaki et al. Multicomponent nature underlies the extraordinary mechanical properties of spider dragline silk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 31, p. e2107065118, 2021.

KLEIN, Alexandra-Maria. Insect pollination of crops in Brazil: a guide for farmers, gardeners, politicians and conservationists. 2020.

LI, Jiaxin et al. Nanoassembly of spider silk protein mediated by intrinsically disordered regions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 271, p. 132438, 2024.

MALLI, H. et al. Effects of size, motility and paralysation time of prey on the quantity of venom injected by the hunting spider *Cupiennius salei*. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 2083-2089, 1999.

MARQUES, M. R. et al. Structure determination of a tetrahydro- β -carboline of arthropod origin: A novel alkaloid-toxin subclass from the web of spider *Nephila clavipes*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 525–534, 2005.

MILTON, S. A. **Venom diseases**. Illinois: Charles C. Thomas Publishing, 1974.

MIOTELO, Lucas et al. *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115770, 2021.

NAGHILOU, Aida et al. Insights into the material properties of dragline spider silk affecting Schwann cell migration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 244, p. 125398, 2023.

NASCIMENTO, S. M. Moléculas bioativas do veneno de aranha migalomorfa *Avicularia juruensis*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

NISANI, Zia; HAYES, William K. Defensive stinging by *Parabuthus transvaalicus* scorpions: risk assessment and venom metering. **Animal Behaviour**, v. 81, n. 3, p. 627-633, 2011.

PALMA, Mario Sergio; NAKAJIMA, Terumi. A natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamine toxins from nephilinae orb-web spiders. **Toxin Reviews**, v. 24, n. 2, p. 209-234, 2005.

PAULA, Gabriela Mendonça. Análise neuroproteômica do comportamento agressivo de *Apis mellifera*. 2020.

RANKE, J. Fitting dose-response curves from bioassays and toxicity testing. **R News**, v. 6, p. 7-12, 2006.

RAT, Charlotte; HEINDL, Cedric; NEUWEILER, Hannes. Domain swap facilitates structural transitions of spider silk protein C-terminal domains. **Protein Science**, v. 32, n. 11, p. e4783, 2023.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLoS ONE**, v. 10, e0146021, 2015.

ROUBIK, David W. Stingless bee (Apidae: Apinae: Meliponini) ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 68, n. 1, p. 231-256, 2023.

ROUDIER, P.; MERLE, O. *easyanova: Analysis of Variance and Other Important Complementary Analyses*. R package version 5.0.2, 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=easyanova>. Acesso em: 5 out. 2024.

RÖMER, L.; SCHEIBEL, T. The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high-performance fiber. **Prion**, v. 2, n. 4, p. 154–161, 2008.

SHAH, Tarsh; FITZPATRICK, Jackson A.; ORSBURN, Benjamin C. Backyard proteomics: A case study with the black widow spider. **Journal of Proteome Research**, 2025.

SALLES, Heliana C. et al. The venomous secrets of the web droplets from the viscid spiral of the orb-weaver spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae). **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 7, p. 727-741, 2006.

SARAVANAN, D. et al. Spider silk-structure, properties and spinning. **Journal of textile and apparel, technology and management**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2006.

SELDEN, Paul A.; SHEAR, William A.; SUTTON, Mark D. Fossil evidence for the origin of spider spinnerets, and a proposed arachnid order. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20781-20785, 2008.

SCHMIDT, Justin O. et al. Chemistry, ontogeny, and role of pygidial gland secretions of the vinegarron *Mastigoproctus giganteus* (Arachnida: Uropygi). **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 4, p. 443-450, 2000.

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

STEWART, J. & GILLY, W. F. Piscivorous behavior of a temperate cone snail, *Conus californicus*. **Biological Bulletin**, 209, 146 e 153. 2005.

THÉVENET, Pierre et al. De novo peptide structure prediction: an overview. **Computational Peptidology**, p. 1-13, 2014.

TOKI, T. et al. Isolation and chemical characterization of a series of new spider toxin (Nephilatoxins) in the venom of Joro spider, *Nephila clavata*. **Biomed. Res.** 9:421–428. 1988.

TONG, Xinyu et al. The mechanical properties of chimeric silk are improved by expressing the full-length *Trichonephila clavipes* major ampullate spidroin gene in the silkworm *Bombyx mori* via recombinant AcMNPV. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 160, p. 106742, 2024.

VASSILEVSKI, A. A. et al. Molecular diversity of spider venom. **Biochemistry**, v. 74, p. 1505 – 1534, 2009.

VOLLRATH, F. Strength and structure of spiders' silks. **J. Biotechnol.**, v. 74, p. 67, 2000.

VOLSI, E.C.F.R., et al. Multiple bradykinin-related peptides from the capture web of the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae). **Peptides**, v. 27, p. 690 697, 2006.

VON MERING, Christian et al. STRING 7—recent developments in the integration and prediction of protein interactions. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_1, p. D358-D362, 2007.

XING, Changhu et al. Thermophysical properties of the dragline silk of *Nephila clavipes* spider. **Polymer**, v. 55, n. 16, p. 4226-4231, 2014.

XU, Ming; LEWIS, Randolph V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 87, n. 18, p. 7120-7124, 1990.

YAZAWA, Koji et al. ^{13}C solid-state NMR study of the ^{13}C -labeled peptide, (E) 8GGLGGQGAG (A) 6GGAGQGGYGG as a model for the local structure of Nephila clavipes dragline silk (MaSp1) before and after spinning. **Biopolymers**, v. 97, n. 6, p. 347-354, 2012.

WANG, Yi et al. A Newly Evolved Small Secretory Peptide Enhances Mechanical Properties of Spider Silk. 2025.

WINDLEY, M.J. et al. Spider venom peptides as bioinsectides. **Toxins**, v. 4, p. 191-227, 2012.

ZIA; HAYES, WILLIAM K. Defensive stinging by Parabuthus transvaalicus scorpions: risk assessment and venom metering. **Animal Behaviour**, v. 81, n. 3, p. 627-633, 2011

ANEXO

Tabelas A1, A2, A3, A4 e A5

Tabela A1. Resultados da identificação proteômica global obtidos por espectrometria de massas e processados no software PEAKS 10, referentes ao grupo controle sem injeção. A tabela inclui os processos biológicos atribuídos conforme anotações do UniProt e Gene Ontology (GO).

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KAK11322015.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona bicolor]	35633	105.33	9	metabolismo energético
KAK9310616.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Tetragonisca angutula]	35701	105.33	9	metabolismo energético
XP_043516005.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Frieseomelitta varia]	35645	105.33	9	metabolismo energético
KOX72508.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona quadrifasciata]	45132	105.33	8	metabolismo energético
QEK21858.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Frieseomelitta varia]	43315	105.33	8	metabolismo energético
KAK1125752.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	101.06	10	Metabolismo citoplasmático
KAK1125753.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	101.06	10	Metabolismo citoplasmático
JAG80261.1	Arginine kinase [Fopius arisanus]	39776	99.06	8	Metabolismo citoplasmático
XP_017796215.1	enolase isoform X1 [Habropoda laboriosa]	50451	94.07	6	metabolismo energético
XP_017796216.1	enolase isoform X2 [Habropoda laboriosa]	46940	94.07	6	metabolismo energético
KOC59564.1	enolase [Habropoda laboriosa]	46676	94.07	6	metabolismo energético
KOX81104.1	enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	87.14	6	metabolismo energético
XP_031836241.1	enolase isoform X2 [Nomia melanderi]	46987	84.46	5	metabolismo energético
XP_031836240.1	enolase isoform X1 [Nomia melanderi]	50512	84.46	5	metabolismo energético
XP_015180779.1	enolase [Polistes dominula]	46983	78.21	3	metabolismo energético
XP_011874560.1	Actin-5, muscle-specific [Vollenhovia emeryi]	41783	81.88	7	Citoesqueleto
XP_012147263.1	actin. clone 205 [Megachile rotundata]	41772	81.88	7	Citoesqueleto
XP_02147266.1	actin. muscle [Megachile rotundata]	41758	81.88	7	Citoesqueleto

EFN60576.1	actin. muscle [Camponotus floridanus]	41756	81.88	7	Citoesqueleto
EZA62927.1	actin. clone [Ooceraea biroii]	41770	81.88	7	Citoesqueleto
AEY59511.1	Actin, indirect flight muscle [Apis cerana]	41785	81.88	7	Citoesqueleto
XP_01155426.1	Actin-5, muscle-specific [Acromyrmex echinatio]	41684	81.88	6	Citoesqueleto
XP_011055428.1	Actin-5, muscle-specific-like [Acromyrmex echinatio]	41745	81.88	6	Citoesqueleto
XP_012053960.1	Enolase [Atta cephalotes]	47012	63.29	3	Metabolismo energético
XP_011498397.1	Alpha-crystallin A chain isoform X2 [Ceratosolen solmsi machali]	18919	49.09	1	Processo visual
KMQ93235.1	heat shock protein beta-1-like isoform 1 protein, partial [Lasius niger]	7370	49.09	1	Defesa celular
KYN22832.1	Heat shock protein beta-1 [Trachymyrmex cornetzi]	38258	49.09	1	Defesa celular
KYM87178.1	Heat shock protein beta-1 [Atta colombica]	29895	49.09	1	Defesa celular
KOX76398.1	Heat shock protein beta-1 [Melipona quadrifasciata]	29480	49.09	1	Defesa celular
KYM96026.1	Heat shock protein beta-1 [Cyphomyrmex costatus]	28326	49.09	1	Defesa celular
KOC66339.1	Heat shock protein beta-1 [Habropoda laboriosa]	26281	49.09	1	Defesa celular
XP_015437215.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Dufourea novaeangliae]	25761	49.09	1	Processo visual
XP_014483649.1	Alpha-crystallin B chain isoform X2 [Dinoponera quadricaps]	26032	49.09	1	Processo visual
XP_011867212.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Vollenhovia emeryi]	26031	49.09	1	Processo visual
XP_011696442.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Wasmannia auropunctata]	25915	49.09	1	Processo visual
XP_012061833.1	Alpha-crystallin B chain [Atta cephalotes]	25920	49.09	1	Processo visual
XP_011055348.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Acromyrmex echinatio]	25942	49.09	1	Processo visual
XP_029163085.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Nylanderia fulva]	26020	49.09	1	Processo visual
XP_003703256.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Megachile rotundata]	25725	49.09	1	Processo visual
XP_015186656.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Polistes domiula]	25593	49.09	1	Processo visual
XP_014612917.1	Alpha-crystallin B chain isoform X1 [Polistes canadensis]	25589	49.09	1	Processo visual
AEY58150.1	Heat shock protein beta-1 [Apis cerana]	25565	49.09	1	Defesa celular
EZA56819.1	Heat shock protein beta-1 [Ooceraea biroii]	25315	49.09	1	Defesa celular
XP_01462918	Alpha-crystallin A chain isoform X2 [Polistes canadensis]	24884	49.09	1	Processo visual

XP_011498396.1	Heat shock protein beta-1 isoform X1 [Ceratosolen solmsi machali]	23610	49.09	1	Defesa celular
XP_011867213.1	Heat shock protein beta-1 isoform X2 [Vollenhovia emeryi]	21691	49.09	1	Defesa celular
XP_014483640.1	Alpha-crystallin A chain isoform X1 [Dinoponera quadriceps]	21678	49.09	1	Processo visual
XP_011055349.1	Alpha-crystallin A chain isoform X2 [Acromyrmex echinator]	21590	49.09	1	Processo visual
XP_011696443.1	Heat shock protein beta-1 isoform X2 [Wasmannia auropunctata]	21604	47.20	1	Defesa celular
XP_003703255.1	Heat shock protein beta-1 isoform X2 [Megachile rotundata]	21371	47.20	1	Defesa celular
XP_015437216.1	Heat shock protein beta-1 isoform X2 [Dufourea novaeangliae]	21388	47.20	1	Defesa celular
AEY58151.1	Heat shock protein beta-1 [Apis cerana]	21253	47.20	1	Defesa celular
XP_014612919.1	Heat shock protein beta-1 isoform X3 [Polistes canadensis]	21328	47.20	1	Defesa celular
XP_015186657.1	Heat shock protein beta-1 isoform X2 [Polistes dominula]	21314	47.20	1	Defesa celular
XP_012054888.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Atta cephalotes]	46271	47.20	2	Citoesqueleto
KOC66256.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoda laboriosa]	49835	47.20	2	Citoesqueleto
XP_006614828.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Apis dorsata]	49967	47.20	2	Citoesqueleto
JAG83507.1	Tubulin alpha- chain [Fopius arisanus]	49963	47.20	2	Citoesqueleto
AEY59375.1	Tubulin alpha- 1C chain [Apis cerana]	49967	47.20	2	Citoesqueleto
AEY56866.1	Tubulin alpha- 1C chain [Apis cerana]	49965	47.20	2	Citoesqueleto
XP_003703285.1	Tubulin alpha- chain-like [Megachile rotundata]	50009	47.20	2	Citoesqueleto
XP_011496739.1	Tubulin alpha-1 chain [Ceratosolen solmsi machali]	50014	47.20	2	Citoesqueleto
XP_012136030.1	Tubulin alpha-1 chain [Megachile rotundata]	49979	47.20	2	Citoesqueleto
XP_011860761.1	Tubulin alpha-1 chain [Vollenhovia emeryi]	50110	47.20	2	Citoesqueleto
KOX75277.1	Tubulin alpha-1 chain [Melipona quadrifasciata]	83206	47.20	2	Citoesqueleto
KOC60743.1	Tubulin alpha-1 chain partial [Habropoda laboriosa]	240053	47.20	2	Citoesqueleto
XP_012138543.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Megachile rotundata]	32871	41.54	4	Transporte
XP_020285709.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Pseudomyrmex gracilis]	32995	41.54	3	Transporte
XP_01830183.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Trachymyrmex septentrionalis]	33128	41.54	2	Transporte
KYD52137.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Mycetomoellerius zeteki]	33113	41.54	2	Transporte

XP_018368622.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Trachymyrmex cornetizi]	33079	41.54	2	Transporte
XP_018392635.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Cyphomyrmex costatus]	32982	41.54	2	Transporte
KYN40778.1	ADP,ATP carrier protein 2, partial [Trachymyrmex septentrionalis]	35983	41.54	2	Transporte
KYN15754.1	ADP,ATP carrier protein 2, partial [Trachymyrmex cornetizi]	37546	41.54	2	Transporte
KYN05456.1	ADP,ATP carrier protein 2 [Cyphomyrmex costatus]	43017	41.54	2	Transporte
XP_012063798.1	heat shock 40kDa protein cognate 4 isoform X1 [Atta cephalotes]	71185	34.20	1	Defesa celular
XP_046822438.1	heat shock 40kDa protein cognate 4-like [Vespa crabro]	70661	34.20	1	Defesa celular
KAF7407924.1	Heat shock 70 kDa protein cognate 4 [Vespula vulgaris]	70446	34.20	1	Defesa celular
CAD1478034.1	Transferrin-like domain-containing protein [Heterotrigona itama]	62437	33.89	2	Transporte e regulação de ferro
KAK1122579.1	Transferrin [Melipona bicolor]	77578	33.89	2	Transporte e regulação de ferro
KOX79720.1	Transferrin [Melipona quadrifasciata]	77756	33.89	2	Transporte e regulação de ferro
XP_012274883.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial isoform X5 [Orussus abietinus]	115746	33.44	1	Metabolismo mitocondrial
XP_0115603911.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial isoform X5 [Cephus cictus]	117643	33.44	1	Metabolismo mitocondrial
XP_036143115.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial isoform X4 [Monomorium pharaonis]	120462	33.44	1	Metabolismo mitocondrial
XP_045421042.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1 [Neodiprion fabricii]	122926	33.44	1	Metabolismo mitocondrial
XP_015437871.1	pyruvate kinase-like isoform X1 [Dufourea novaeangliae]	69487	32.93	1	metabolismo energético
XP_012225399.1	pyruvate kinase isoform X2 [Linepithema humile]	56076	32.93	1	metabolismo energético
XP_011707142.1	tubulin beta chain, partial [Wasmannia auropunctata]	13226	31.24	1	Citoesqueleto
XP_011705685.1	tubulin beta chain-like, partial [Wasmannia auropunctata]	23772	31.24	1	Citoesqueleto
AGM53312.1	beta-tubulin, partial [Leptocybe invasa]	26133	31.24	1	Citoesqueleto
JAG70475.1	Tubulin beta-1 chain, partial [Fopius arisanus]	33756	31.24	1	Citoesqueleto

JAG81568.1	Tubulin beta-2 chain, partial [<i>Fopius arisanus</i>]	39382	31.24	1	Citoesqueleto
XP_011878916.1	tubulin beta chain-like, partial [<i>Vollenhovia emeryi</i>]	49229	31.24	1	Citoesqueleto
KOC68980.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Habropoda laboriosa</i>]	49775	31.24	1	Citoesqueleto
KYM78152.1	Tubulin beta chain [<i>Atta colombica</i>]	49767	31.24	1	Citoesqueleto
XP_011052052.1	tubulin beta chain-like [<i>Acromyrmex echinator</i>]	49753	31.24	1	Citoesqueleto
XP_015118753.1	Tubulin beta chain [<i>Diashasma alloeum</i>]	49280	31.24	1	Citoesqueleto
EZA57337.1	Tubulin beta chain [<i>Ooceraea biroii</i>]	49749	31.24	1	Citoesqueleto
KYN04916.1	Tubulin beta chain [<i>Cyphomyrmex costatus</i>]	49826	31.24	1	Citoesqueleto
XP_011698235.1	tubulin beta chain-like [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	49790	31.24	1	Citoesqueleto
KOX72164.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	49958	31.24	1	Citoesqueleto
XP_0445004393.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Ceratosolen solmsi machali</i>]	50134	31.24	1	Citoesqueleto
AEY60906.1	Tubulin beta-4 chain [<i>Apis cerana</i>]	50175	31.24	1	Citoesqueleto
XP_011878920.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Vollenhovia emeryi</i>]	50118	31.24	1	Citoesqueleto
XP_003706217.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Megachile rotundata</i>]	50188	31.24	1	Citoesqueleto
XP_011707200.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	50180	31.24	1	Citoesqueleto
JAG79951.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Fopius arisanus</i>]	50334	31.24	1	Citoesqueleto
KOX72161.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	57056	31.24	1	Citoesqueleto
KMQ98061.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Lasius niger</i>]	88812	31.24	1	Citoesqueleto
KOX67354.1	Aryphorin subunit alpha [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	81002	28.08	1	Proteína de reserva de hemolinfa
KOC69159.1	Hexamerin [<i>habropoda laboriosa</i>]	80924	28.08	1	Proteína de reserva de hemolinfa
XP_032686055.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [<i>Odontomachus brunneus</i>]	39799	26.75	1	metabolismo energético
XP_032686053.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [<i>Odontomachus brunneus</i>]	39577	26.75	1	metabolismo energético
KOX76362.1	Fructose-bisphosphate aldolase [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	54863	26.75	1	metabolismo energético
XP_011139291.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [<i>Harpegnathos saltator</i>]	39753	26.75	1	metabolismo energético

XP_011139293.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Harpegnathos saltator]	39488	26.75	1	metabolismo energético
XP_012147476.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Megachile rotundata]	39875	26.75	1	metabolismo energético
KMQ94630.1	Fructose-bisphosphate aldolase [lasius niger]	39914	26.75	1	metabolismo energético
KYN02428.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Cyphomyrmex costatus]	40301	26.75	1	metabolismo energético
XP_011867690.1	Fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Vollenhovia emeryi]	39877	26.75	1	metabolismo energético
EZA60106.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Ooceraea biroii]	39744	26.75	1	metabolismo energético
EFN84597.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Harpegnathos saltator]	39753	26.75	1	metabolismo energético
XP_014472012.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Dinoponera quadricaps]	39745	26.75	1	metabolismo energético
KYQ049141.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Mycetomoellerius zeteki]	40170	26.75	1	metabolismo energético
XP_012147475.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Megachile rotundata]	39875	26.75	1	metabolismo energético
XP_011498335.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Ceratosolen solmsi machali]	39648	26.75	1	metabolismo energético
XP_011867692.1	Fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Vollenhovia emeryi]	39625	26.75	1	metabolismo energético
XP_014472011.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Dinoponera quadricaps]	39510	26.75	1	metabolismo energético
EFN70147.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Camponotus floridanus]	39712	26.75	1	metabolismo energético
XP_017766300.1	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Eufriesea mexicana]	39565	26.75	1	metabolismo energético
KZC13969.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Dufourea mexicana]	39729	26.75	1	metabolismo energético
XP_003706230.1	Fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Megachile rotundata]	39634	26.75	1	metabolismo energético
XP_015184463.1	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Polistes dominula]	39587	26.75	1	metabolismo energético
XP_014601886.1	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Polistes canadensis]	39604	26.75	1	metabolismo energético
AEY59287.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Apis cerana]	39632	26.75	1	metabolismo energético
KOC62374.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Habropoda laboriosa]	39572	26.75	1	metabolismo energético
OAD61299.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Eufriesea mexicana]	45677	26.75	1	metabolismo energético
KOC66608.1	Putative zinc metalloproteinase YIL08W, partial [Habropoda laboriosa]	58601	25.49	1	Adesão celular
CAB0029200.1	Reverse transcriptase domain-containing protein [Trichogramma brassicae]	137411	25.16	1	housekeeping

Tabela A2. Resultados da identificação proteômica global obtidos por espectrometria de massas e processados no software PEAKS 10, referentes ao grupo controle salina, com período de exposição de 3 horas. A tabela inclui os processos biológicos atribuídos conforme anotações do UniProt e Gene Ontology (GO).

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KAK1132015.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona bicolor]	35633	141.72	11	metabolismo energético
KAK9310616.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Tetragonisca angustula]	35701	141.72	11	metabolismo energético
XP_043516005	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Frieseomelitta varia]	35645	141.72	11	metabolismo energético
QEK21858.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Frieseomelitta varia]	43315	141.72	10	metabolismo energético
KOX72508.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona quadrifasciata]	45132	141.72	10	metabolismo energético
KOX81104.1	Enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	128.14	10	metabolismo energético
KAK1137412.1	Enolase [Melipona bicolor]	50785	128.14	10	metabolismo energético
KAK1137411.1	Enolase [Melipona bicolor]	47105	128.14	10	metabolismo energético
XP_012054888.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Atta cephalotes]	46271	128.14	8	Citoesqueleto
XP_014486807.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Dinoponera quadriceps]	50096	126.18	8	Citoesqueleto
XP_011860761.1	Tubulin alpha-1 chain [Vollenhovia emeryi]	50110	126.18	8	Citoesqueleto
JAG83507.1	Tubulin alpha-1 chain [Fopius arisanus]	49963	126.18	8	Citoesqueleto
AEY59375.1	Tubulin alpha-1C chain [Apis cerana]	49967	126.18	8	Citoesqueleto
XP_003703285.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Megachile rotundata]	50009	126.18	8	Citoesqueleto

XP_011496739.1	Tubulin alpha-1 chain [Ceratosolen solmsi marchali]	50014	126.18	8	Citoesqueleto
XP_012136030.1	Tubulin alpha-1 chain [Megachile rotundata]	49979	126.18	8	Citoesqueleto
AEY56867.1	Tubulin alpha-1C chain [Apis cerana]	49965	126.18	8	Citoesqueleto
KOC66256.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoda laboriosa]	49835	126.18	8	Citoesqueleto
KOX75272.1	Tubulin alpha-1 chain [Melipona quadrifasciata]	83206	126.18	8	Citoesqueleto
KOC60743.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoda laboriosa]	240053	126.18	8	Citoesqueleto
XP_060823472.1	enolase [Bombus pascuorum]	47109	125.20	9	Metabolismo energético
KAK1125752.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	121.09	11	Metabolismo citoplasmático
KAK1125753.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	121.09	11	Metabolismo citoplasmático
JAG80261.1	Arginine kinase [Fopius arisanus]	39776	118.47	8	Metabolismo citoplasmático
XP_015188027.1	Arginine kinase [Polistes dominula]	39751	114.43	8	Metabolismo citoplasmático
AE051760.1	Argk [Bombus hypocrita]	39690	108.34	7	Metabolismo citoplasmático
XP_0177753866.1	arginine kinase [Eufriesea mexicana]	39712	103.53	7	Metabolismo citoplasmático
ABJ90418.1	enolase, partial [Platygaster sp. CD032]	39914	90.16	4	metabolismo energético
KOX76362.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	86.92	4	metabolismo energético
KAF3422142.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Frieseomelitta varia]	40854	86.92	3	metabolismo energético
KMR04485.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Lasius niger]	35595	86.92	5	metabolismo energético
KAF3422353.1	Pyruvate kinase [Frieseomelitta varia]	74820	82.22	4	metabolismo energético
KOX74974.1	Pyruvate kinase [Melipona quadifasciata]	70159	78.10	4	metabolismo energético
XP_043522986.1	Pyruvate kinase isoform X2 [Frieseomelitta varia]	57438	78.10	4	metabolismo energético
XP_043522985.1	Pyruvate kinase isoform X1 [Frieseomelitta varia]	56328	78.10	4	metabolismo energético
XP_012342781.1	muscle-specific protein 20 [Apis florea]	20392	78.10	3	Citoesqueleto
KAK1123621.1	muscle-specific protein 20 [Melipona bicolor]	20422	67.69	2	Citoesqueleto
KAL0134904.1	Transgelin [Cardiocondyla obscurior]	20532	67.69	2	Citoesqueleto
XP_071644381.1	muscle-specific protein 20 [Temnothorax longispinosus]	20404	67.69	2	Citoesqueleto
XP_006610349.1	muscle-specific protein 20 [Apis dorsata]	20406	67.69	2	Citoesqueleto

XP_018400615.1	muscle-specific protein 20 [Cyphomyrmex costatus]	20469	67.69	2	Citoesqueleto
XP_024892393.1	muscle-specific protein 20 [Temnothorax longispinosus]	20415	67.69	2	Citoesqueleto
KAL0134903.1	Transgelin [Cardiocondyla obscurior]	21357	67.69	2	Citoesqueleto
TGZ50774.1	Transgelin [Temnothorax longispinosus]	30090	67.69	2	Citoesqueleto
PBC26993.1	muscle-specific protein 20 [Apis cerana cerana]	38830	67.69	2	Citoesqueleto
KYM97922.1	muscle-specific protein 20 [Cyphomyrmex costatus]	71867	67.69	2	Citoesqueleto
KOX67171.1	Triosephosphate isomerase [Melipona quadrifasciata]	23362	61.78	3	Metabolismo energético
KAK1127692.1	Triosephosphate isomerase [Melipona bicolor]	26704	61.78	3	Metabolismo energética
KAK9294240.1	Triosephosphate isomerase [Tetragonisca angustula]	26774	61.78	3	Metabolismo energético
KAK9294241.1	Triosephosphate isomerase [Tetragonisca angustula]	28568	59.16	3	Metabolismo energético
KAK1126226.1	Anaphase-promoting complex subunit 11 [Melipona bicolor]	43573	59.16	4	Housekeeping
KYN30107.1	Tubulin beta-1 chain, partial [Trachymyrmex cornetzi]	48140	59.16	4	Citoesqueleto
KOC68980.1	Tubulin beta-1 chain [Habropoda laboriosa]	49775	59.16	4	Citoesqueleto
KOX72164.1	Tubulin beta-1 chain [Melipona quadrifasciata]	49958	59.16	4	Citoesqueleto
XP_011504393.1	Tubulin beta-1 chain [Ceratosolen solmsi marchali]	50134	59.16	4	Citoesqueleto
AEY60906.1	Tubulin beta-1 chain [Apis cerana]	50175	59.16	4	Citoesqueleto
XP_011878920.1	Tubulin beta-1 chain [Vollenhovia emeryi]	50118	59.16	4	Citoesqueleto
XP_003706217.1	Tubulin beta-1 chain [Megachile rotundata]	50188	59.16	4	Citoesqueleto
JAG79951.1	Tubulin beta-1 chain [Fopius arisanus]	50334	59.16	4	Citoesqueleto
KOX72161.1	Tubulin beta-1 chain [Melipona quadrifasciata]	57056	59.16	3	Citoesqueleto
KMQ98061.1	Tubulin beta-1 chain [Lasius niger]	88812	59.16	3	Citoesqueleto
XP_011878916.1	Tubulin beta-1 chain-like [Vollenhovia emeryi]	49229	59.16	3	Citoesqueleto
KYN04916.1	Tubulin beta-1 chain [Cyphomyrmex costatus]	49826	59.16	3	Citoesqueleto
XP_011707200.1	Tubulin beta-1 chain [Wasmannia auropunctata]	50180	59.16	3	Citoesqueleto
KOX80990.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Melipona quadrifasciata]	18580	39.98	2	defesa celular
AKH48894.1	superoxide dismutase 1, partial [Osmia bicornis]	7133	39.98	1	defesa celular

AAR24350.1	SOD1, partial [Apis mellifera lingutica]	9745	39.98	1	defesa celular
XP_011503991.1	superoxide dismutase [Cu-Zn]-like, partial [Ceratosolen solmsi marchali]	14260	39.98	1	defesa celular
XP_011503107.1	superoxide dismutase [Cu-Zn][Ceratosolen solmsi marchali]	15781	39.98	1	defesa celular
XP_015429294.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Dufourea novaeangliae]	15551	39.98	1	defesa celular
XP_017790587.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Habropoda laboriosa]	15589	39.98	1	defesa celular
XP_017760279.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Eufriesea mexicana]	15526	39.98	1	defesa celular
AEY61198.1	superoxide dismutase [Apis cerana]	15648	39.98	1	defesa celular
AAP93581.1	CuZn superoxide dismutase [Apis mellifera lingutica]	15634	39.98	1	defesa celular
AAZ79896.1	Cu,Zn superoxide dismutase [Bombus ignitus]	15538	39.98	1	defesa celular
AAX59897.1	sod [Bombus ignitus]	15555	35.61	1	defesa celular
KOX74561.1	Profilin [Melipona quadifasciata]	39630	35.61	1	Citoesqueleto
XP_015437469.1	Profilin [Dufourea novaeangliae]	13743	29.92	1	Citoesqueleto
EFN60578.1	Actin-5, muscle-specific [Camponotus floridanus]	11974	29.92	1	Citoesqueleto
CAA62806.1	actin, partial [Diadromus pulchellus]	12251	29.92	1	Citoesqueleto
CAD29192.1	putative actin, partial [Chelonus inanitus]	30397	29.92	1	Citoesqueleto
XP_011698158.1	actin [Wasmannia auropunctata]	34444	29.92	1	Citoesqueleto
XP_011055426.1	Actin-5, muscle-specific [Acromyrmex echinator]	41684	29.92	1	Citoesqueleto
XP_011055428.1	Actin-5, muscle-specific-like [Acromyrmex echinator]	41745	29.92	1	Citoesqueleto
XP_011698151.1	Actin-5, muscle-specific [Wasmannia auropunctata]	41783	29.92	1	Citoesqueleto
EFN60576.1	actin, muscle [Camponotus floridanus]	41756	29.92	1	Citoesqueleto
EZA62927.1	Actin, clone [Ooceraea biroii]	41770	29.92	1	Citoesqueleto
XP_011496266.1	actin, muscle [Ceratosolen solmsi marchali]	41758	29.92	1	Citoesqueleto
AEY59511.1	Actin, indirect flight muscle [Apis cerana]	41785	29.46	1	Citoesqueleto
XP_031837839.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X3 [Nomia melander]	81673	29.46	1	Metabolismo mitocondrial

XP_006560252.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]	85514	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_031368058.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [<i>Apis dorsata</i>]	85512	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_012343856.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [<i>Apis florea</i>]	85580	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_014481832.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like [<i>Dinoponera quadricaps</i>]	85745	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
AEY60680.1	aconitate hydratase [<i>Apis cerana</i>]	86049	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043514302.1	aconitate hydratase, mitochondrial [<i>Frieseomelitta varia</i>]	85979	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043251465.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X1 [<i>Colletes gigas</i>]	85326	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_006619238.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [<i>Apis dorsata</i>]	85993	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_0391994.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]	85995	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_003695046.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [<i>Apis florea</i>]	86061	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043251466.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X2 [<i>Colletes gigas</i>]	85889	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
KAG9429654.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [<i>Apis mellifera carnica</i>]	86712	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_031837829.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [<i>Nomia melanderi</i>]	87003	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
KOX71536.1	aconitate hydratase, mitochondrial [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	90608	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
KAF3425712.1	aconitate hydratase, mitochondrial [<i>Frieseomelitta varia</i>]	96165	29.46	1	Metabolismo mitocondrial
XP_011867213.1	heat shock prontein beta-1 isoform X2 [<i>Vollenhovia emeryi</i>]	21691	29.43	1	Defesa celular

Tabela A3. Resultados da identificação proteômica global obtidos por espectrometria de massas e processados no software PEAKS 10, referentes ao grupo controle salina, com período de exposição de 24 horas. A tabela inclui os processos biológicos atribuídos conforme anotações do UniProt e Gene Ontology (GO).

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KAK1125752.1	arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	119.22	10	Metabolismo citoplasmático
KAK1125753.1	arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	119.22	10	Metabolismo citoplasmático
BAF62631.1	arginine kinase-like protein [Cyphononyx dorsalis]	39772	119.22	9	Metabolismo citoplasmático
QEK21868.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase , partial [Scaptotrigona bipunctata]	27136	108.64	4	metabolismo energético
XP_043516005.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial 2 [Frieseomelitta varia]	35645	108.64	4	metabolismo energético
KAK9310616.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Tetragonisca angustula]	35701	108.64	4	metabolismo energético
KAK1132015.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial 2 [Melipona bicolor]	35633	108.64	4	metabolismo energético
QEK21858.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Frieseomelitta varia]	43315	108.64	4	metabolismo energético
QGV13630.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Melipona quadrifasciata]	45132	108.64	4	metabolismo energético
KOX81104.1	Enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	91.03	6	metabolismo energético
KOC59564.1	Enolase [Habropoda laboriosa]	46676	91.03	4	metabolismo energético
XP_017754360.1	Enolase [Eufriesea mexicana]	47034	91.03	4	metabolismo energético
XP_017796216.1	Enolase isoform X2 [Habropoda laboriosa]	46940	91.03	4	metabolismo energético

XP_017796215.1	Enolase isoform X1 [Habropoda laboriosa]	50451	91.03	4	metabolismo energético
XP_043522985.1	pyruvate kinase-like X1 [Frieseomelitta varia]	56328	87.26	4	metabolismo energético
XP_043522986.1	pyruvate kinase-like X2 [Frieseomelitta varia]	57438	87.26	4	metabolismo energético
KOX74974.1	pyruvate kinase [melipona quadrifasciata]	70159	87.26	4	metabolismo energético
KAF3422353.1	pyruvate kinase [Frieseomelitta varia]	74820	87.26	4	metabolismo energético
XP_017796846.1	pyruvate kinase-like isoform X3 [Habropoda laboriosa]	57211	87.26	2	metabolismo energético
EZA53406.1	pyruvate kinase [Ooceraea biroii]	57179	87.26	2	metabolismo energético
XP_032680391.1	pyruvate kinase isoform X4 [Odontomachus brunneus]	57400	87.26	2	metabolismo energético
XP_032680390.1	pyruvate kinase isoform X3 [Odontomachus brunneus]	59017	87.26	2	metabolismo energético
XP_026825352.1	pyruvate kinase isoform X3 [Ooceraea biroii]	58798	87.26	2	metabolismo energético
KOC58948.1	pyruvate kinase [Habropoda laboriosa]	58748	87.26	2	metabolismo energético
XP_032680389.1	pyruvate kinase isoform X2 [Odontomachus brunneus]	60077	87.26	2	metabolismo energético
XP_026825351.1	pyruvate kinase isoform X2 [Ooceraea biroii]	59886	87.26	2	metabolismo energético
XP_017796842.1	pyruvate kinase-like isoform X1 [Habropoda laboriosa]	59858	87.26	2	metabolismo energético
RLU23178.1	pyruvate kinase [Ooceraea biroii]	66334	87.26	2	metabolismo energético
XP_032680388.1	pyruvate kinase isoform X1 [Odontomachus brunneus]	67171	87.26	2	metabolismo energético
XP_026825350.1	pyruvate kinase isoform X1 [Ooceraea biroii]	73869	87.26	2	metabolismo energético
XP_012054888.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Atta cephalotes]	46271	75.10	4	Citoesqueleto
KOC66256.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoda laboriosa]	49835	75.10	4	Citoesqueleto
AEY56867.1	Tubulin alpha-1C chain [Apis cerana]	49965	75.10	4	Citoesqueleto
XP_012136030.1	Tubulin alpha-1 chain [Megachile rotundata]	49979	75.10	4	Citoesqueleto
XP_011496739.1	Tubulin alpha-1 chain [Ceratosolen solmsi marchali]	50014	75.10	4	Citoesqueleto
XP_003703285.1	Tubulin alpha-1 chain-like [Megachile rotundata]	50009	75.10	4	Citoesqueleto
AEY593751	Tubulin alpha-1C chain [Apis cerana]	49967	75.10	4	Citoesqueleto
JAG83507.1	Tubulin alpha-1 chain [Fopius arisanus]	49963	75.10	4	Citoesqueleto
XP_011860761.1	Tubulin alpha-1 chain [Vollenhovia emeryi]	50110	75.10	4	Citoesqueleto

KOX75272.1	Tubulin alpha-1 chain [Melipona quadrifasciata]	83206	75.10	4	Citoesqueleto
KOC60743.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoa laboriosa]	240053	75.10	4	Citoesqueleto
XP_043523533.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Frieseomelitta varia]	39622	54.85	4	metabolismo energético
XP_043523531.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Frieseomelitta varia]	39856	54.85	4	metabolismo energético
KAF3422142.1	fructose-bisphosphate aldolase [Frieseomelitta varia]	40854	54.85	4	metabolismo energético
KOX76362.1	fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	54.85	4	metabolismo energético
XP_017885422.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Ceratina calcarata]	24914	54.85	3	metabolismo energético
XP_012287987.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X3 [Orussus abietinus]	39472	54.85	3	metabolismo energético
XP_043265227.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Colletes gigas]	39677	54.85	3	metabolismo energético
XP_026674674.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Ceratina calcarata]	39508	54.85	3	metabolismo energético
XP_017890951.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Ceratina calcarata]	39814	54.85	3	metabolismo energético
XP_043265225.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Colletes gigas]	40006	54.85	3	metabolismo energético
XP_012287968.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Orussus abietinus]	41523	54.85	3	metabolismo energético
XP_023288479.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Orussus abietinus]	41875	54.85	3	metabolismo energético
XP_017793284.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Habropoda laboriosa]	39234	54.85	2	metabolismo energético
KOC62374.1	fructose-bisphosphate aldolase [Habropoda laboriosa]	39572	54.85	2	metabolismo energético
AEY59288.1	fructose-bisphosphate aldolase [Apis cerana]	39632	54.85	2	metabolismo energético
XP_031835247.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Nomia melanderi]	39721	54.85	2	metabolismo energético

XP_032686053.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Odontomachus brunneus]	39577	54.85	2	metabolismo energético
XP_032686054.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Odontomachus brunneus]	39799	54.85	2	metabolismo energético
XP_031835245.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Nomia melanderi]	39897	54.85	2	metabolismo energético
XP_014601886.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Polistes canadensis]	39604	54.85	1	metabolismo energético
XP_015184463.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Polistes dominula]	39587	54.85	1	metabolismo energético
XP_015436757.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Dufourea novaeangliae]	39729	54.85	1	metabolismo energético
XP_003706230.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Megachile rotundata]	39634	54.85	1	metabolismo energético
XP_017766300.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Eufriesea mexicana]	39565	54.85	1	metabolismo energético
EFN70147.1	fructose-bisphosphate aldolase [Camponotus floridanus]	39712	54.85	1	metabolismo energético
XP_014472011.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Dinoponera quadricaps]	39510	54.85	1	metabolismo energético
XP_011867692.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Vollenhovia emeryi]	39625	54.85	1	metabolismo energético
XP_011498335.1	fructose-bisphosphate aldolase [Ceratosolen solmsi marchali]	39648	54.85	1	metabolismo energético
XP_011867691.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Vollenhovia emeryi]	39877	54.85	1	metabolismo energético
XP_012147475.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X1 [Megachile rotundata]	39875	54.85	1	metabolismo energético
KYO49141.1	fructose-bisphosphate aldolase [Mycetomoellerius zeteki]	40170	54.85	1	metabolismo energético
XP_014472012.1	fructose-bisphosphate aldolase isoform X2 [Dinoponera quadricaps]	39745	54.85	1	metabolismo energético
EFN84597.1	fructose-bisphosphate aldolase [Harpegnathus saltator]	39753	54.85	1	metabolismo energético
EZA60106.1	fructose-bisphosphate aldolase [Ooceraea biroii]	39744	54.85	1	metabolismo energético
XP_011867690.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Vollenhovia emeryi]	39877	54.85	1	metabolismo energético

KYN02482.1	fructose-bisphosphate aldolase [<i>Cyphomyrmex costatus</i>]	40301	54.85	1	metabolismo energético
KMO94630.1	fructose-bisphosphate aldolase [<i>Lasius niger</i>]	39914	54.85	1	metabolismo energético
OAD61299.1	fructose-bisphosphate aldolase [<i>Eufriesea mexicana</i>]	45677	54.85	1	metabolismo energético
ADU53593.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Vespa mandarinia</i>]	10249	46.02	1	Neuroodulação
ADU53519.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Bombus ignitus</i>]	10240	46.02	1	Neuroodulação
ADU53594.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Vespa mandarinia</i>]	10210	46.02	1	Neuroodulação
ADU53517.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Bombus ignitus</i>]	10277	46.02	1	Neuroodulação
ADU53518.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Bombus ignitus</i>]	10275	46.02	1	Neuroodulação
ADU53532.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Apis cerana</i>]	11115	46.02	1	Neuroodulação
ADU53531.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Apis cerana</i>]	11117	46.02	1	Neuroodulação
ADU53533.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Apis cerana</i>]	11108	46.02	1	Neuroodulação
ADU53543.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Cotesia vestalis</i>]	11894	46.02	1	Neuroodulação
ADU53581.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Pteromalus puparum</i>]	11901	46.02	1	Neuroodulação
ADU53542.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Cotesia vestalis</i>]	11960	46.02	1	Neuroodulação
ADU53582.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Pteromalus puparum</i>]	11878	46.02	1	Neuroodulação
ADU53587.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Nasonia longicornis</i>]	16544	46.02	1	Neuroodulação
AEW70343.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Solenopsis invicta</i>]	16552	46.02	1	Neuroodulação
ADU53588.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Nasonia longicornis</i>]	16521	46.02	1	Neuroodulação
AEW70344.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Solenopsis invicta</i>]	16527	46.02	1	Neuroodulação
AEW70335.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Bombus impatiens</i>]	28104	46.02	1	Neuroodulação
AEW70330.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Camponotus floridanus</i>]	28134	46.02	1	Neuroodulação
AEW70347.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Megachile rotundata</i>]	28092	46.02	1	Neuroodulação
AEW70341.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Acromyrmex echinator</i>]	28066	46.02	1	Neuroodulação
AEW70333.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Bombus terrestris</i>]	28074	46.02	1	Neuroodulação
AEW70331.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Camponotus floridanus</i>]	28110	46.02	1	Neuroodulação
AEW70338.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Apis florea</i>]	28076	46.02	1	Neuroodulação

AEW70334.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Bombus terrestris</i>]	28067	46.02	1	Neuroodulação
AEW70339.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Apis florea</i>]	28044	46.02	1	Neuroodulação
AEW70342.1	14-3-3 zeta, partial [<i>Acromyrmex echinator</i>]	28041	46.02	1	Neuroodulação
XP_011690296.1	cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	16860	39.31	1	Citoesqueleto
XP_015110084.1	cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [<i>Diachasma alloeum</i>]	16931	39.31	1	Citoesqueleto
XP_003701502.1	cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [<i>Megachile rotundata</i>]	16848	39.31	1	Citoesqueleto
XP_011502920.1	cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [<i>Ceratosolen solmsi machali</i>]	16908	39.31	1	Citoesqueleto
AEY60342.1	cofilin/actin-depolymerizing factor [<i>Apis cerana</i>]	16832	39.31	1	Citoesqueleto
KMO96964.1	cofilin/actin-depolymerizing factor-like protein [<i>Lasius niger</i>]	16974	39.31	1	Citoesqueleto
XP_012055075.1	cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [<i>Atta cephalotes</i>]	20394	39.31	1	Citoesqueleto
KOX70865.1	cofilin/actin-depolymerizing factor like protein [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	21107	39.31	1	Citoesqueleto
XP_011707142.1	tubulin beta chain, partial [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	13226	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011705685.1	tubulin beta chain-like, partial [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	23776	38.68	1	Citoesqueleto
AGM53312.1	beta-tubulin, partial [<i>Leptocycle invasa</i>]	26133	38.68	1	Citoesqueleto
JAG70475.1	Tubulin beta-1 chain, partial [<i>Fopius arisanus</i>]	33756	38.68	1	Citoesqueleto
JAG81568.1	Tubulin beta-2 chain, partial [<i>Fopius arisanus</i>]	39382	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011878916.1	tubulin beta chain-like [<i>Vollenhovia emeryi</i>]	49229	38.68	1	Citoesqueleto
KOC68980.1	Tubulin beta-1 chain [<i>Habropoda laboriosa</i>]	49775	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011052052.1	tubulin beta chain-like [<i>Acromyrmex echinator</i>]	49753	38.68	1	Citoesqueleto
KYM78152.1	Tubulin beta chain [<i>Atta colombica</i>]	49767	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011698235.1	tubulin beta chain-like [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	49790	38.68	1	Citoesqueleto
KYN04916.1	Tubulin beta chain [<i>Cyphomyrmex costatus</i>]	49826	38.68	1	Citoesqueleto

EZA57337.1	Tubulin beta chain [Ooceraea biroí]	49749	38.68	1	Citoesqueleto
KOX72164.1	Tubulin beta-1 chain [Melipona quadrifasciata]	49958	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011707200.1	tubulin beta-1 chain [Wasmannia auropunctata]	50180	38.68	1	Citoesqueleto
XP_003706217.1	tubulin beta-1 chain [Megachile rotundata]	50188	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011878920.1	tubulin beta-1 chain [Vollenhovia emeryi]	50118	38.68	1	Citoesqueleto
AEY60906.1	Tubulin beta-4 chain [Apis cerana]	50175	38.68	1	Citoesqueleto
XP_011504393.1	Tubulin beta-1 chain [Ceratosolen solmsi marchali]	50134	38.68	1	Citoesqueleto
JAG79951.1	Tubulin beta-1 chain [Fopius arisanus]	50334	38.68	1	Citoesqueleto
KOX72161.1	Tubulin beta-1 chain [Melipona quadrifasciata]	57056	38.68	3	Citoesqueleto
KMQ98061.1	Tubulin beta-1 chain [Lasius niger]	88812	38.68	2	Citoesqueleto
KOX80990.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Melipona quadrifasciata]	18580	38.50	2	Defesa celular
XP_033319695.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Bombus bifarius]	15538	38.50	2	Defesa celular
AAX59897.1	sod [Bombus ignitus]	15555	38.50	2	Defesa celular
KAF3428197.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Frieseomelitta varia]	15549	38.50	2	Defesa celular
AIU41504.1	superoxide dismutase [Apis cerana]	15648	38.50	2	Defesa celular
XP_033329580.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Megalopta genalis]	15536	38.50	2	Defesa celular
AAP93581.1	CuZn superoxide dismutase [Apis mellifera linguistica]	15634	38.50	2	Defesa celular
XP_006617028.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Apis dorsata]	15675	38.50	2	Defesa celular
XP_031771303.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Apis florea]	7620	38.50	1	Defesa celular
AET83768.1	cytoplasmic superoxide dismutase 1 [Leptopilina boulardi]	15511	38.50	1	Defesa celular
AET83770.1	cytoplasmic superoxide dismutase 1 [Leptopilina heterotoma]	15477	38.50	1	Defesa celular
KAF3420827.1	Phospoglycerate mutase [Frieseomelitta varia]	28627	38.33	2	Metabolismo energético

Tabela A4. Resultados da identificação proteômica global obtidos por espectrometria de massas e processados no software PEAKS 10, referentes ao grupo T1, com período de exposição de 3 horas. A tabela inclui os processos biológicos atribuídos conforme anotações do UniProt e Gene Ontology (GO).

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KOX81104.1	Enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	124.60	8	metabolismo energético
KAK1137410.1	Enolase [Melipona bicolor]	47105	124.60	8	metabolismo energético
KAK1137412.1	Enolase [Melipona bicolor]	50785	124.60	8	metabolismo energético
XP_043516005.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Frieseomelitta varia]	35645	118.26	8	metabolismo energético
KAK9310616.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Tetragonisca angustula]	35701	118.26	8	metabolismo energético
KAK1132015.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona bicolor]	35633	118.26	8	metabolismo energético
KAK1125752.1	arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	114.82	10	Metabolismo citoplasmático
KAK1125753.1	arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	114.82	10	Metabolismo citoplasmático
BAF62631.1	arginine kinase-like protein [Cyphononyx dorsalis]	39772	111.08	9	Metabolismo citoplasmático
JAG80261.1	arginine kina [Fopius arisanus]	39776	113.36	7	Metabolismo citoplasmático
XP_0432660461	arginine kinase [Colletes gigas]	39851	103.77	6	Metabolismo citoplasmático
KAF3422353.1	Pyruvate kinase [Frieseomelitta varia]	74820	92.72	4	metabolismo energético
KOX74974.1	Pyruvate kinase [Melipona quadrifasciata]	70159	92.72	4	metabolismo energético
XP_043522986.1	Pyruvate kinase-like isoform X2 [Frieseomelitta varia]	57438	92.72	4	metabolismo energético
XP_04352295.1	Pyruvate kinase-like isoform X1 [Frieseomelitta varia]	56328	92.72	4	metabolismo energético
XP_032680388.1	Pyruvate kinase-like isoform X1 [Odontomachus brunneus]	67171	92.72	3	metabolismo energético

XP_032680389.1	Pyruvate kinase-like isoform X2 [Odontomachus brunneus]	60077	92.72	3	metabolismo energético
XP_032680390.1	Pyruvate kinase-like isoform X3 [Odontomachus brunneus]	59017	92.72	3	metabolismo energético
XP_032680391.1	Pyruvate kinase-like isoform X4 [Odontomachus brunneus]	57400	92.72	3	metabolismo energético
KOX72987.1	putative citrate synthase, mitochondrial [Melipona quadrifasciata]	44116	78.45	3	Metabolismo energético
KAK1119616.1	Citrate synthase [Melipona bicolor]	49769	78.45	2	Metabolismo energético
XP_043517506.1	probable putative citrate synthase 2, mitochondrial isoform X3 [Frieseomelitta varia]	51404	78.45	2	Metabolismo energético
KAF3424496.1	Citrate synthase [Frieseomelitta varia]	51533	78.45	2	Metabolismo energético
KAK9301367.1	Citrate synthase [Tetragonisca angustula]	51469	78.45	2	Metabolismo energético
XP_043517505.1	probable putative citrate synthase 2, mitochondrial isoform X2 [Frieseomelitta varia]	51533	78.45	2	Metabolismo energético
XP_043517503.1	probable putative citrate synthase 2, mitochondrial isoform X1 [Frieseomelitta varia]	60013	78.45	2	Metabolismo energético
XP_012259599.1	arginine kinase isoform X2 [Athalia rosae]	39874	74.09	5	Metabolismo citoplasmático
XP_033319695.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Bombus bifarius]	15538	68.12	2	Defesa celular
AAX59897.1	sod [Bombus ignitus]	15555	68.12	2	Defesa celular
KAF3428197.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Frieseomelitta varia]	15549	68.12	2	Defesa celular
AIU41504.1	superoxide dismutase [Melipona cerana]	15648	68.12	2	Defesa celular
XP_033329580.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Megalopta genalis]	15536	68.12	2	Defesa celular
AAP93581.1	CuZn superoxide dismutase [Apis mellifera lingustica]	15634	68.12	2	Defesa celular
XP_006617028.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Apis dorsata]	15675	68.12	2	Defesa celular
KOX80990.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Melipona qudrisfaciata]	18580	65.49	2	Defesa celular
XP_012054888.1	tubulin alpha-1 chain-like [Atta cephalotes]	46271	65.49	4	Citoesqueleto
AEY56867.1	Tubulin alpha-C1 chain [Apis cerana]	49965	65.49	4	Citoesqueleto
XP_012136030.1	tubulin alpha-1 chain [Megachile rotundata]	49979	65.49	4	Citoesqueleto
XP_011496739.1	tubulin alpha-1 chain [Ceratosolen solmsi marchali]	50014	65.49	4	Citoesqueleto

XP_003703285.1	tubulin alpha-1 chain-like [Megachile rotundata]	50009	65.49	4	Citoesqueleto
AEY59375.1	Tubulin alpha-C1 chain [Apis cerana]	49967	65.49	4	Citoesqueleto
JAG83507.1	Tubulin alpha-1 chain [Fopius arisanus]	49963	65.49	4	Citoesqueleto
KOC66256.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoda laboriosa]	49835	65.49	4	Citoesqueleto
EZA50232.1	Tubulin alpha-1 chain [Ooceraea biroii]	50110	65.49	4	Citoesqueleto
KOX75272.1	Tubulin alpha-1 chain [Melipona quadrifasciata]	83206	65.49	4	Citoesqueleto
KOC60743.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Habropoda laboriosa]	240053	65.49	4	Citoesqueleto
JAG82244.1	Tubulin alpha-1 chain, partial [Fopius arisanus]	45311	65.49	3	Citoesqueleto
XP_011705756.1	tubulin alpha-1 chain-like [Wasmannia auropunctata]	46255	65.49	3	Citoesqueleto
EFN69754.1	tubulin alpha-1 chain [Camponotus floridanus]	46140	65.49	3	Citoesqueleto
XP_011497193.1	tubulin alpha-1 chain-like [Ceratosolen solmsi marchali]	50009	65.49	3	Citoesqueleto
XP_011880552.1	tubulin alpha-1 chain-like [Vollenhovia emeryi]	49951	65.49	3	Citoesqueleto
XP_011050824.1	tubulin alpha-1 chain [Acromyrmex echinator]	49937	65.49	3	Citoesqueleto
KMO94301.1	tubulin alpha-1 chain [Lasius niger]	49992	65.49	3	Citoesqueleto
XP_011699063.1	tubulin alpha-1 chain-like [Wasmannia auropunctata]	49937	65.49	3	Citoesqueleto
XP_012057479.1	tubulin alpha-1 chain [Atta cephalotes]	52472	65.49	3	Citoesqueleto
XP_014481934.1	tubulin alpha-1 chain-like [Dinoponera quadricaps]	56755	45.79	3	Citoesqueleto
KOX79199.1	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial [Melipona quadrifasciata]	61603	44.35	1	Metabolismo mitocondrial
XP_011867691.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Vollenhovia emeryi]	39877	44.35	1	metabolismo energético
XP_012147475.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Megachile rotundata]	39875	44.35	1	metabolismo energético
KYO49141.1	fructose-bisphosphate aldolase [Mycetomoellerius zeteki]	40170	44.35	1	metabolismo energético
XP_014472012.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Dinoponera quadricaps]	39745	44.35	1	metabolismo energético
EFN84597.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Harpegnathos saltator]	39753	44.35	1	metabolismo energético

KOC62374.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Habropoda laboriosa]	39572	44.35	1	metabolismo energético
EZA60106.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Ooceraea biroii]	39744	44.35	1	metabolismo energético
KYN02482.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Cyphomyrmex costatus]	40301	44.35	1	metabolismo energético
KMO94630.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Laasius niger]	39914	44.35	1	metabolismo energético
XP_015436757.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Dufourea novaeangliae]	39729	44.35	1	metabolismo energético
AEY59288.1	fructose-bisphosphate aldolase [Apis cerana]	39632	44.35	1	metabolismo energético
XP_003706230.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Megachile rotundata]	39634	44.35	1	metabolismo energético
XP_017793284.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Habropoda laboriosa]	39234	44.35	1	metabolismo energético
XP_017766300.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Eufriesea mexicana]	39565	44.35	1	metabolismo energético
EFN70147.1	fructose-bisphosphate aldolase [Camponotus floridanus]	39712	44.35	1	metabolismo energético
XP_014601886.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Polistes canadensis]	39604	44.35	1	metabolismo energético
XP_014472011.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X1 [Dinoponera quadricaps]	39510	44.35	1	metabolismo energético
XP_011867692.1	fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Vollenhovia emeryi]	39625	44.35	1	metabolismo energético
XP_015184463.1	fructose-bisphosphate aldolase-like [Polistes dominula]	39587	44.35	1	metabolismo energético
XP_011498335.1	fructose-bisphosphate aldolase [Ceratosolen solmsi marchali]	39648	44.35	1	metabolismo energético
OAD61299.1	fructose-bisphosphate aldolase [Eufriesea mexicana]	45677	44.35	1	metabolismo energético
KOX76362.1	fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	44.35	1	metabolismo energético
KYM92922.1	Muscle-specific protein 20 [Cyphomyrmex costatus]	71867	40.97	1	Citoesqueleto
XP_011499491.1	Muscle-specific protein 20 [Ceratosolen solmsi marchali]	20650	40.97	1	Citoesqueleto
XP_031837848.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X3 [Nomia melanderi]	81673	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
CAD1472834.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Heterotrigona itama]	84888	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_012343856.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [Apis florea]	85580	39.98	1	Metabolismo mitocondrial

XP_031368058.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [Apis dorsata]	85512	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_006560252.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [Apis mellifera]	85514	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_014481832.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like [Dinoponera quadricaps]	85745	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
KAG6794786.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [Apis mellifera caucasica]	85995	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_003695046.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [Apis florea]	86061	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_031837821.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [Nomia melander]	85749	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043801158.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Apis laboriosa]	85956	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_006619238.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [Apis dorsata]	85993	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043251465.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X1 [Colletes gigas]	85362	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043514302.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Frieseomelitta varia]	85979	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_003400851.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Bombus terrestris]	85975	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
AEY60683	aconitate hydratase [Apis cerana]	86049	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_043251466.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X2 [Colletes gigas]	85889	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
KAG9429654.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [Apis mellifera camica]	86712	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
XP_031837829.1	aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [Nomia melander]	87003	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
KOX71536.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Melipona quadrifasciata]	90608	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
KAF3425712.1	aconitate hydratase, mitochondrial [Frieseomelitta varia]	96165	39.98	1	Metabolismo mitocondrial
AGM53315.1	beta-tubulin, partial [Ileptocyle invasa]	26133	38.15	4	Citoesqueleto
KOC68980.1	Tubulin-beta chain [Habropoa laboriosa]	49775	38.15	4	Citoesqueleto
XP_011707200.1	Tubulin-beta chain [Wasmannia auropunctata]	50180	38.15	4	Citoesqueleto
XP_003706217.1	Tubulin-beta chain [Megachile rotundata]	50188	38.15	4	Citoesqueleto

XP_011878920	Tubulin-beta chain [Vollenhovia emeryi]	50118	38.15	4	Citoesqueleto
AEY60906.1	Tubulin beta-4 chain [Apis cerana]	50175	38.15	4	Citoesqueleto
KOX72161.1	Tubulin beta-1 chain [Melipona quadrifasciata]	57056	38.15	4	Citoesqueleto
KMO98061.1	Tubulin beta-1 chain [Lasius niger]	88812	38.15	4	Citoesqueleto
XP_011504393.1	Tubulin beta-1 chain [Ceratosolen solmsi machali]	50134	38.15	3	Citoesqueleto
JAG79951.1	Tubulin beta-1 chain [Fopius arisanus]	50334	38.15	3	Citoesqueleto
XP_011707142.1	Tubulin beta chain, partial [Wasmannia auropunctata]	13226	38.15	3	Citoesqueleto
JAG70475.1	Tubulin beta-1 chain, partial [Fopius arisanus]	33756	38.15	3	Citoesqueleto
XP_011878916.1	Tubulin beta chain-like [Vollenhovia emeryi]	49229	38.15	3	Citoesqueleto
XP_011698235.1	Tubulin beta chain-like [Wasmannia auropunctata]	49790	38.15	3	Citoesqueleto
KYN04916.1	Tubulian beta chain [Cyphomyrmx costatus]	49826	38.15	3	Citoesqueleto
EZA57337.1	Tubulian beta chain [Ooceraea biroii]	49749	38.15	3	Citoesqueleto
KOX72164.1	Tubulian beta-1 chain [Melipona quadrifasciata]	49958	38.15	3	Citoesqueleto
XP_011705685.1	Tubulian beta chain-like, partial [Wasmannia auropunctata]	23772	38.15	2	Citoesqueleto
XP_011052052.1	Tubulian beta chain-like [Acromyrmex echinator]	49753	38.15	2	Citoesqueleto
KYM78152.1	Tubulian beta chain [Atta colombica]	49767	38.15	2	Citoesqueleto
JAG81568.1	Tubulian beta-2 chain, partial [Fopius arisanus]	39382	38.15	1	Citoesqueleto
XP_011301277.1	Transferrin [Fopius arisanus]	65292	32.21	3	Transporte e regulação de ferro
JAG79462.1	Transferrin [Fopius arisanus]	67653	32.21	3	Transporte e regulação de ferro
JAG79463.1	Transferrin [Fopius arisanus]	77287	32.21	3	Transporte e regulação de ferro
XP_015109887.1	Transferrin [Wasmannia auropunctata]	77392	32.21	2	Transporte e regulação de ferro
XP_063981343.1	Transferrin [Diachasmimorpha longicudata]	77228	32.21	2	Transporte e regulação de ferro
XP_011698158.1	actin [Wasmannia auropunctata]	34444	31.77	2	Citoesqueleto
CAD29192.1	Putative actin, partial [Chelonius inanimatus]	30397	31.77	2	Citoesqueleto
XP_003706097.1	actin, clone 205 [Megachilhe rotundata]	41772	31.77	2	Citoesqueleto
AEY59511.1	Actin, indirect flight muscle [Apis cerana]	41785	31.77	2	Citoesqueleto

XP_011874563.1	actin, muscle [Vollenhovia emeryi]	41758	31.77	2	Citoesqueleto
XP_011698152.1	actin-5, muscle-specific [Wasmannia auropunctata]	41783	31.77	2	Citoesqueleto
XP_011055428.1	actin-5, muscle-specific-like [Acromyrmex echinator]	41745	31.77	2	Citoesqueleto
EZA62927.1	actin, clone [Ooceraea biroii]	41770	31.77	2	Citoesqueleto
EFN60576.1	Actin, muscle [Camponotus floridanus]	41756	31.77	2	Citoesqueleto
XP_011060669.1	actin-5, muscle-specific-like, partial [Acromyrmex echinator]	21366	31.77	1	Citoesqueleto
AGB06352.1	actin, partial [Apis cerana]	31193	31.77	1	Citoesqueleto
JAG77996.1	Actin, partial, muscle [Fopius arisanus]	32341	31.77	1	Citoesqueleto
JAG74865.1	Actin, clone 403, partial [Fopius arisanus]	35099	31.77	1	Citoesqueleto
AGM39426.1	B-actin, partial [Diadegma insulare]	40661	31.77	1	Citoesqueleto
JAG70209.1	Actin-5C, partial [Fopius arisanus]	40972	31.77	1	Citoesqueleto
AEO51758.1	actin [Bombus hypocrita]	41822	31.77	1	Citoesqueleto
EZA62930.1	Actin, muscle [Ooceraea biroii]	41774	31.77	1	Citoesqueleto
ADK66839	actin related protein 1 [Apis cerana cerana]	41832	31.77	1	Citoesqueleto
XP_011494054.1	actin-5C [Ceratosolen solmsi machali]	41808	31.77	1	Citoesqueleto
AEY58901.1	actin-42A [Apis cerana]	41806	31.77	1	Citoesqueleto
XP_003691164.1	Actin, clone 403-like [Apis florea]	41797	31.77	1	Citoesqueleto
EZA62929.1	Actin, muscle [Ooceraea biroii]	43729	31.77	1	Citoesqueleto

Tabela A5. Resultados da identificação proteômica global obtidos por espectrometria de massas e processados no software PEAKS 10, referentes ao grupo T1, com período de exposição de 24 horas. A tabela inclui os processos biológicos atribuídos conforme anotações do UniProt e Gene Ontology (GO).

Código de acesso	Nome da proteína	mass average	log10P	#peptides	Processo biológico
KOX81104.1	Enolase, partial [Melipona quadrifasciata]	44952	107.29	9	Metabolismo energético
KAK1137410.1	Enolase [Melipona bicolor]	47105	107.29	9	Metabolismo energético
KAK1137412.1	Enolase [Melipona bicolor]	50785	107.29	9	Metabolismo energético
KAK1125752.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	43331	103.06	7	Metabolismo citoplasmático
KAK1125753.1	Arginine kinase [Melipona bicolor]	45113	103.06	6	Metabolismo citoplasmático
XP_043516005.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Freeseomelitta varia]	35645	106.45	10	metabolismo energético
KAK9310616.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Tetragonisca angustula]	35701	106.45	10	metabolismo energético
KAK1132015.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Melipona bicolor]	35633	106.45	10	metabolismo energético
QEK21858.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Freeseomelitta varia]	43315	106.45	9	metabolismo energético
OGV13630.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Melipona quadrifasciata]	45132	106.46	9	metabolismo energético
BAF62631.1	arginine kinase-like protein [Cyphononyx dorsalis]	39772	103.06	6	Metabolismo citoplasmático
XP_060823472.1	enolase [Bombus pascuorum]	41079	102.41	8	metabolismo energético
KOC59564.1	enolase [Habropoda laboriosa]	46676	99.35	7	metabolismo energético
XP_017796216.1	enolase isoform X2 [Habropoda laboriosa]	46940	99.35	7	metabolismo energético
XP_017796215.2	enolase isoform X [Habropoda laboriosa]	50451	99.35	7	metabolismo energético
XP_050483499	arginine kinase isoform X2 [Bombus huntii]	39456	98.96	5	Metabolismo citoplasmático
JAG80261.1	Arginine kinase [Fopius arisanus]	39776	97.20	5	Metabolismo

					citoplasmático
XP_0122270298.1	enolase [Orussus abietinus]	46772	87.95	5	metabolismo energético
XP_015188027.1	arginine kinase [Polistes dominula]	39751	86.83	5	Metabolismo citoplasmático
CBE65825.1	putative enolase, partial [Aphidius ervi]	46956	84.54	5	metabolismo energético
KOX76362.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Melipona quadrifasciata]	54863	82.57	4	metabolismo energético
XP_017793284.1	Fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Habropoda laboriosa]	39234	82.57	4	metabolismo energético
KOC62374.1	Fructose-bisphosphate aldolase [Habropoda laboriosa]	39572	82.57	4	metabolismo energético
XP_003706097.1	actin, clone 205 [Megachile rotundata]	41772	79.61	5	metabolismo energético
XP_011874562.1	actin-5 muscle-specific [Vollenhovia emeryi]	41783	79.61	5	metabolismo energético
XP_012062350.1	actin muscle [Atta cephalote]	41758	79.61	5	metabolismo energético
XP_003706099.1	actin, muscle [Megachile rotundata]	41758	79.61	5	metabolismo energético
XP_011698151.1	actin-5, muscle-specific [Wasmannia auropuctata]	41783	79.61	5	metabolismo energético
XP_043522986.1	pyruvate kinase-like isoform X2 [Frieseomelitta varia]	57438	73.99	6	metabolismo energético
XP_043522985.1	pyruvate kinase-like isoform X1 [Frieseomelitta varia]	56328	73.99	6	metabolismo energético
KAF3422353.1	pyruvate kinase [Frieseomelitta varia]	74820	73.99	6	metabolismo energético
KOX74974.1	pyruvate kinase [Melipona quadrifasciata]	70159	73.99	6	metabolismo energético
XP_017796846.1	pyruvate kinase-like isoform X3 [Habropoda laboriosa]	57211	73.99	5	metabolismo energético
EZA53406.1	Pyruvate kinase [Ooceraea biroii]	57179	73.99	5	metabolismo energético
XP_032680391.1	pyruvate kinase-like isoform X4 [Odontomachus brunneus]	57400	73.99	5	metabolismo energético
XP_026825350.1	pyruvate kinase isoform X1 [Ooceraea biroii]	73869	73.99	5	metabolismo energético
XP_032680388.1	pyruvate kinase-like isoform X1 [Odontomachus brunneus]	67171	73.99	5	metabolismo energético
RLU23178.1	hypotetical protein DMN91_005456 [Ooceraea biroii]	66334	73.99	5	metabolismo energético
XP_017796842.1	pyruvate kinase-like isoform X1 [Habropoda laboriosa]	59858	73.99	3	metabolismo energético
XP_032680389.1	pyruvate kinase-like isoform X2 [Odontomachus brennus]	60077	73.99	3	metabolismo energético
XP_026825351.1	pyruvate kinase isoform X2 [Ooceraea biroii]	59886	73.99	3	metabolismo energético

XP_032680390.1	pyruvate kinase-like isoform X3 [Odontomachus brennisi]	59017	73.99	3	metabolismo energético
KOC58948.1	pyruvate kinase [Habropoda laboriosa]	58748	73.99	3	metabolismo energético
XP_026825352.1	pyruvate kinase isoform X3 [Ooceraea biroii]	58798	73.99	3	metabolismo energético
KOX67171.1	Triosephosphate isomerase [Melipona quarifasciata]	23362	36.97	1	Metabolismo energético
CAK9831994.1	Triosephosphate isomerase [Anthophora relusa]	26787	36.27	1	Metabolismo energético
XP_071875948.1	Triosephosphate isomerase [Bombus fervidus]	26885	36.27	1	Metabolismo energético
XP_050588237.1	Triosephosphate isomerase [Bombus affinis]	26813	36.27	1	Metabolismo energético
XP_043529868.1	Triosephosphate isomerase [Friesomelitta varia]	26804	36.27	1	Metabolismo energético
KAK9294240.1	Triosephosphate isomerase [Tetragonisca angustula]	26774	36.27	1	Metabolismo energético
XP_017798406.1	Triosephosphate isomerase [Habropoda laboriosa]	26671	36.27	1	Metabolismo energético
XP_043249950.1	Triosephosphate isomerase [Colletes gigas]	26834	36.27	1	Metabolismo energético
XP_033201943.1	Triosephosphate isomerase [Bombus vancouverensis nearcticus]	26826	36.27	1	Metabolismo energético
XP_012170151.1	Triosephosphate isomerase [Bombus terrestris]	26813	36.27	1	Metabolismo energético
XP_043595850.1	Triosephosphate isomerase [Bombus pyrosoma]	26827	36.27	1	Metabolismo energético
XP_054002235.1	Triosephosphate isomerase [Hylaeus anthracinus]	26848	36.27	1	Metabolismo energético
XP_050485791.1	Triosephosphate isomerase [Bombus huntii]	26840	36.27	1	Metabolismo energético
KOC68827.1	Triosephosphate isomerase [Habropoda laboriosa]	26671	36.27	1	Metabolismo energético
XP_017890664.1	Triosephosphate isomerase [Ceractina calcarata]	26750	36.27	1	Metabolismo energético
XP_053994298.1	Triosephosphate isomerase [Hylaeus volcanicus]	26876	36.27	1	Metabolismo energético
XP_017764425.1	Triosephosphate isomerase [Eufriesea mexicana]	26878	36.27	1	Metabolismo energético
XP_060823352.1	Triosephosphate isomerase [Bombus pascuorum]	26899	36.27	1	Metabolismo energético
KAF3428882.1	Triosephosphate isomerase [Frieseomelitta varia]	26804	36.27	1	Metabolismo energético
CAK98215198.1	Triosephosphate isomerase [Anthophora quadrimaculata]	26831	36.27	1	Metabolismo energético
KAK1127692.1	Triosephosphate isomerase [Melipona bicolor]	26704	36.27	1	Metabolismo energético
KAK9294241.1	Triosephosphate isomerase [Tetragonisca angustula]	28568	36.27	1	Metabolismo energético
CAD1476011.1	Triosephosphate isomerase [Heterotrigona itama]	36728	36.27	1	Metabolismo energético

EZA60165.1	Muscle-specific protein [<i>Ooceraea biroii</i>]	62098	35.41	1	Citoesqueleto
XP_071562738.1	tubulin alpha-1 chain [<i>Temnothorax nylanderi</i>]	50110	33.80	1	Citoesqueleto
KOX76389.1	Heat shock protein beta-1 [<i>Melipona quadrifasciata</i>]	29480	33.29	3	Defesa celular
XP_003703256.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Megachile rotundata</i>]	25725	33.29	3	Processo visual
AEY58150.1	Heat shock protein beta-1 [<i>Apis cerana</i>]	25565	33.29	3	Defesa celular
XP_003703255.1	Heat shock protein beta-1 Isoform X2 [<i>Megachile rotundata</i>]	21371	33.29	3	Defesa celular
AEY58151.1	Heat shock protein beta-1 [<i>Apis cerana</i>]	21253	33.29	3	Defesa celular
KOC66339.1	Heat shock protein beta-1 [<i>Habropoda laboriosa</i>]	26281	33.29	2	Defesa celular
XP_011867212.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Vollenhovia emeryi</i>]	26031	33.29	2	Processo visual
XP_014483649.1	alpha-crystallin B chain isoform X2 [<i>Dinoponera quadricaps</i>]	26032	33.29	2	Processo visual
XP_015437215.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Dufourea ovaengliae</i>]	25761	33.29	2	Processo visual
XP_011055348.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Acromyrmex echinatior</i>]	25942	33.29	2	Processo visual
XP_012061833.1	alpha-crystallin B chain [<i>Atta cephalotes</i>]	25920	33.29	2	Processo visual
XP_011696442.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	25915	33.29	2	Processo visual
XP_014612917.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Polistes canadensis</i>]	25589	33.29	2	Processo visual
XP_0151886656.1	alpha-crystallin B chain isoform X1 [<i>Polistes dominula</i>]	25593	33.29	2	Processo visual
EZA56819.1	Heat shock protein beta-1 [<i>Ooceraea biroii</i>]	25315	33.29	2	Defesa celular
XP_014612918.1	alpha-crystallin B chain X2 [<i>Polistes canadensis</i>]	24884	33.29	2	Processo visual
XP_011498396.1	heat shock protein beta-1 Isoform X1 [<i>Ceratosolen solmsi marshalli</i>]	23610	33.29	2	Defesa celular
XP_014483640	alpha-crystallin A chain isoform X1 [<i>Dinoponera quadricaps</i>]	21678	33.29	2	Processo visual
XP_011867213.1	heat shock protein beta-1 Isoform X2 [<i>Vollenhovia emeryi</i>]	21691	33.29	2	Defesa celular
XP_011696443.1	heat shock protein beta-1 Isoform X [<i>Wasmannia auropunctata</i>]	21604	33.29	2	Defesa celular
XP_011055349.1	alpha-crystallin A chain isoform X2 [<i>Acromyrmex echinatior</i>]	21590	33.29	2	Processo visual
XP_0154372216.1	heat shock protein beta-1 Isoform X2 [<i>Dufourea novaengliae</i>]	21388	33.29	2	Defesa celular
XP_015186657.1	heat shock protein beta-1 Isoform X2 [<i>Polistes dominula</i>]	21314	33.29	2	Defesa celular
XP_014612919.1	heat shock protein beta-1 Isoform X3 [<i>Polistes canadensis</i>]	21328	33.29	2	Defesa celular

XP_011498397.1	alpha-crystallin A chain isoform X2 [Ceratosolen solmsi marchaii]	18919	33.29	2	Processo visual
KYMB7178.1	Heat shock protein beta-1 [Atta colombica]	29895	33.29	2	Defesa celular
XP_054015442.1	alpha-crystallin B chain isoform X2 [Hylaeus anthracinus]	21489	33.29	1	Processo visual
KMO93235.1	heat shock protein beta-1-like Isoform 1 protein, partial [Lasius niger]	7370	33.29	1	Defesa celular
KOX80990.1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] [Melipona quadrifasciata]	18580	32.64	2	Defesa celular
XP_031771303.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Apis florea]	7620	32.64	1	Defesa celular
XP_033319695.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Bombus bifarius]	15538	32.64	1	Defesa celular
AAX59897.1	sod [Bombus ignitus]	15555	32.64	1	Defesa celular
KAF3428197.1	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Frieseomelitta varia]	15549	32.64	1	Defesa celular
AET83768	cytoplasmic superoxide dismutase 1 [Leptopilina boulandi]	15511	32.64	1	Defesa celular
AET83770.1	cytoplasmic superoxide dismutase 1 [Leptopilina heterotoma]	15477	32.64	1	Defesa celular
AIU41504.1	superoxide dismutase [Apis cerana]	15648	32.64	1	Defesa celular
XP_033329580.1	superoxide dismutase [C-Zn] [Megalopta genalis]	15636	32.64	1	Defesa celular
AAP93581.1	CuZn superoxide dismutase [Apis meliifera lingutica]	15634	32.64	1	Defesa celular
XP_006617028.1	superoxide dismutase [C-Zn] [Apis dorsata]	15675	32.64	1	Defesa celular
KOX75460.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase NAD(+), cytoplasmic [Melipona quadrifasciata]	38422	32.54	1	Metabolismo energético
JAG77200.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic [Fopius arisanus]	18636	32.54	1	Metabolismo energético
XP_015433232.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like, partial [Dufourea ovaangliae]	22058	32.54	1	Metabolismo energético
OAD55813.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic, partial [Eufriesea mexicana]	29809	32.54	1	Metabolismo energético
KYN11930.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], cytoplasmic [Trachymyrmex cornetzi]	34419	32.54	1	Metabolismo energético
XP_014477148.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X2 [Dinoponera quadricolor]	36073	32.54	1	Metabolismo energético
EGI64429.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], cytoplasmic, partial	36748	32.54	1	Metabolismo energético

	[Acromyrmex echinator]				
XP_011875108.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X2 [Vollenhovia emeryi]	38050	32.54	1	Metabolismo energético
XP_011498812.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic [Ceratosolen solmsi marchaii]	38341	32.54	1	Metabolismo energético
XP_017759186.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X2 [Eufriesea mexicana]	38247	32.54	1	Metabolismo energético
XP_014477147.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X1 [Dinoponera quadricaps]	38878	32.54	1	Metabolismo energético
XP_014477149.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X3 [Dinoponera quadricaps]	39621	32.54	1	Metabolismo energético
XP_020300218.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like [Pseudomyrmex gracilis]	39722	32.54	1	Metabolismo energético
XP_011875107.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X1 [Vollenhovia emeryi]	39926	32.54	1	Metabolismo energético
XP_018403709.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X1 [Cyphomyrmex costatus]	39932	32.54	1	Metabolismo energético
XP_018463710.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X2 [Cyphomyrmex costatus]	40097	32.54	1	Metabolismo energético
XP_017759184.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X1 [Eufriesea mexicana]	40191	32.54	1	Metabolismo energético
JAG7568.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase NAD(+), cytoplasmic, partial [Fopius arisaus]	40549	32.54	1	Metabolismo energético
XP_018355214.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X2 [Trachymyrmex septentrionalis]	46466	32.54	1	Metabolismo energético
XP_011056105.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X3 [Acromyrmex echinator]	46763	32.54	1	Metabolismo energético
XP_018355205.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X1 [Trachymyrmex septentrionalis]	46847	32.54	1	Metabolismo energético
XP_011056104.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X1	48720	32.54	1	Metabolismo energético

	[Trachymyrmex septentrionalis]				
XP_018373306.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like [Trachymyrmex cornetzi]	48490	32.54	1	Metabolismo energético
XP_011056103.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase NAD(+), cytoplasmic [Harpegathos saltator]	49807	32.54	1	Metabolismo energético
EFN89159.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X3 [Acromymex echinator]	53650	32.54	1	Metabolismo energético
XP_011699436.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like [Wasmannia auropunctata]	52930	32.54	1	Metabolismo energético
KCZ11181.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic [Dufourea novaeangliae]	59464	32.54	1	Metabolismo energético
KYO47632.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic, patial [Mycetomoellerius zeteki]	71909	32.54	1	Metabolismo energético
KYN44123.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic [Trachymyrmex septentrionalis]	72271	32.54	1	Metabolismo energético
KAF3423009.1	Apolipophorins [Frieseomelitta varia]	363291	32.07	2	Transporte celular
KOX80996.1	Apolipophorins [Melipona quadrifasciata]	373785	32.07	2	Transporte celular
KOC59155.1	Transferrin [Habropoda laboriosa]	72473	32.00	2	Transporte e regulação de ferro
XP_017796706.1	Transferrin [Habropoda laboriosa]	82289	32.00	2	Transporte e regulação de ferro
XP_014598924.1	Transferrin [Polistes canadensis]	79256	32.00	1	Transporte e regulação de ferro
KAF3420827.1	Phosphoglycerate mutase [Frieseomelitta varia]	28627	31.60	1	Metabolismo citoplasmático
CAD1479115.1	Phosphoglycerate mutase [Heterotrigona Itama]	32172	31.60	1	Metabolismo citoplasmático
KAK1120060.1	Phosphoglycerate mutase 2 [Melipona bicolor]	32905	31.60	1	Metabolismo citoplasmático
XP_043526712.1	Phosphoglycerate mutase 2 [Frieseomelitta varia]	32850	31.60	1	Metabolismo

					citoplasmático
KOX73085.1	Phosphoglycerate mutase 2 [Melipona quadrifasciata]	32834	31.60	1	Metabolismo citoplasmático
KZC07868.1	Cuticle protein 18.7 [Dufourea novaeangliae]	27480	31.07	2	Proteção do exoesqueleto
XP_015429393.1	cuticle protein 18.7 like [Dufourea novaeangliae]	28292	31.07	2	Proteção do exoesqueleto
XP_003702741.1	cuticle protein 18.7 like [Megachile rotundata]	27092	31.07	1	Proteção do exoesqueleto
XP_017881005.1	cuticle protein 18.7 like [Ceratina calcarata]	28576	31.07	1	Proteção do exoesqueleto
XP_006568331.1	cuticle protein 18.7 [Apis mellifera]	28901	31.07	1	Proteção do exoesqueleto
KOX68137.1	cuticle protein 6 [Melipona quadrifasciata]	65950	31.07	1	Proteção do exoesqueleto
KOX79720.1	Trasferrin [Melipona quadrifasciata]	77756	28.21	2	Transporte de ferro
AYO45358.1	elongation factor 1-alpha, partial [Clavaspis perseae]	19646	26.74	1	housekeepig