

---

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

---

**Desvendando a química ecológica de captura de presas  
pela teia das aranhas *Trichonephila clavipes* e  
*Trichonephila plumipes* através de abordagens ômicas**

**Franciele Grego Esteves**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia.

**Rio Claro  
São Paulo - Brasil  
Agosto/2021**

**FRANCIELE GREGO ESTEVES**

**DESVENDANDO A QUÍMICA ECOLÓGICA DE CAPTURA DE  
PRESAS PELA TEIA DAS ARANHAS *Trichonephila clavipes* e  
*Trichonephila plumipes* ATRAVÉS DE ABORDAGENS ÔMICAS**

**Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma**

***Co-Orientador: Dr. José Roberto Aparecido dos Santos-Pinto***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro-SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia.

**Rio Claro**

**2021**

E79d

Esteves, Franciele Grego

Desvendando a química ecológica de captura de presas pela teia das aranhas *Trichonephila clavipes* e *Trichonephila plumipes* através de abordagens ômicas / Franciele Grego Esteves. -- Rio Claro, 2021  
220 f. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Mario Sergio Palma

Coorientador: José Roberto Aparecido dos Santos-Pinto

1. Teia de aranha. 2. glândulas de seda. 3. Abordagens ômicas. 4. Toxinas. 5. Química-ecológica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

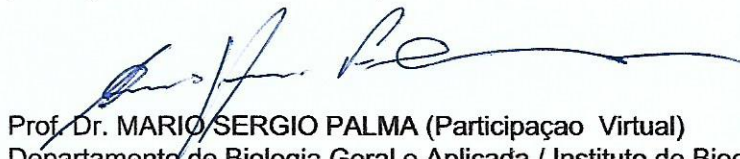
**TÍTULO DA TESE:** Desvendando a química ecológica de captura de presas pela teia das aranhas do gênero *Trichonephila clavipes* e *Trichonephila plumipes* através de abordagens ômicas

**AUTORA: FRANCIELE GREGO ESTEVES**

**ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA**

**COORIENTADOR: JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:



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

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)  
Câmpus Experimental de Registro / UNESP - Registro

Prof. Dr. MARCELO VALLE DE SOUSA (Participação Virtual)  
UnB / Universidade de Brasília

Profa. Dra. MARIA ELENA DE LIMA PEREZ GARCIA (Participação Virtual)  
Faculdade Santa Casa de Belo Horizonte

Profa. Dra. HELENA COSTA (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual de Santa Cruz

Rio Claro, 10 de setembro de 2021

Título alterado para: "Desvendando a química ecológica de captura de presas pela teia das aranhas *Trichonephila clavipes* e *Trichonephila plumipes* através de abordagens ômicas"

*Dedico esse trabalho à minha família  
e aos meus amigos.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus primeiramente por me abençoar e fortalecer no dia a dia, por me capacitar a enfrentar os obstáculos e momentos difíceis da vida. Por me encorajar e estar ao meu lado na jornada que escolhi seguir e para a nova a qual Ele me guiará. E por acreditar e confiar que de alguma maneira está “olhando por mim”, me auxiliando a fazer as melhores escolhas para alcançar meus sonhos, objetivos e conquistas.*

*Agradeço a minha mãe Adriana e o meu pai Cleber Cassiano por sempre estarem ao meu lado, pelo exemplo de pessoas de força, caráter, superação e fé. Vocês são inspiração para meu crescimento e amadurecimento pessoal, obrigada por transmitirem a mim valores tão preciosos, os quais me permitiram chegar até aqui! Obrigada pelo amor, paciência, e principalmente minha mãe por todos os conselhos e direcionamento. Ao meu irmão Lucas e também a Larissa pelo companheirismo, risadas, e momentos de distração. Ao meu namorado Julio pelo carinho, amor e amizade construída nesses seis anos! Pela paciência, apoio e por me escutar sempre! E me fazer sorrir até nos momentos em que isso seria a última coisa que eu faria. E claro ao Spock meu salsichinha leal e companheiro de todas as horas. Eu amo muito, muito todos vocês! Aos meus avós Anabela e Paschoal, Aparecida e Osvaldo pelo apoio e o incentivo aos estudos, por confiarem em mim e no meu potencial.... Agradeço a todos pelo apoio, amor e carinho, enfim, toda a atitude e pensamentos positivos de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até esta etapa da minha vida!*

*Agradeço a minha amiga Manoela (Manu), pela amizade de longos anos, pelo carinho, troca de experiências, conselhos e risadas, os nossos encontros são os melhores. Maria Julia, Letícia e Ellen pela amizade mantida até hoje, mesmo que a distância.... Obrigada por vibrarem comigo a cada conquista e sempre torcerem pelo meu melhor!*

*Agradeço o meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela oportunidade, ensinamentos, orientação, colaboração e por toda dedicação na realização deste estudo. Obrigada por nesses dez anos me ensinar o que é a ciência, para onde ela nos leva e quais são as responsabilidades quando decidimos e escolhemos seguir a carreira acadêmica - a qual representa “um universo” de conhecimento e aprendizagem, de mais perguntas do que respostas, de desafios e dificuldades, mas também de grandes oportunidades. Ter feito parte do seu Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ) e de toda a infraestrutura foi extremamente valioso para o meu crescimento e desenvolvimento acadêmico-ciêntifico. Enfim, obrigada pela oportunidade cedida, por transferir a mim o conhecimento e amor pela ciência, pela paciência, e confiança em mim depositada. Muito obrigada!*

*Ao Prof. Dr. Glenn King do Institute Molecular Biosciense da Universidade de Queensland - Austrália, pela colaboração e auxílio na realização deste estudo. Foi sensacional ter trabalhado em seu laboratório, e ter convivido com o seu grupo de pesquisa, além de ter sido divertido ser a tecladista da “King’s band” do seu laboratório. Posso dizer, sem dúvida, que a minha passagem*

*pela Austrália, além de desafiadora, foi uma experiência profissional e pessoal incrível, que me deixa saudades.*

*Agradeço também ao grupo do LBEZ, por toda ajuda direta ou indiretamente concedida e pela troca de experiências profissionais e conversas não profissionais também. Agradeço em especial ao meu co-orientador Dr. José Roberto, pela ajuda e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho! Você foi fundamental no meu amadurecimento profissional científico-acadêmico. E claro, obrigada pelas conversas, risadas, conselhos e pela super amizade construída durante esses dez anos! A Carol, pela troca de experiências profissionais, conversas e risadas! Agradeço a vocês por todo nosso empenho, esforço e trabalho em equipe, tentamos dar o nosso melhor sempre! Considero ter tido sorte por ter colegas de trabalho como vocês, e vou me lembrar sempre com carinho da nossa rotina no laboratório. Enfim, obrigada pelo apoio e pela grande ajuda. Vocês são parte deste trabalho.*

*Agradeço à Universidade pela infraestrutura e pelo apoio acadêmico. Ao Luiz, a Ivana e o Felipe da Pós-graduação, sempre atenciosos! Agradeço aos funcionários por todos os serviços prestados e ao CEIS pela infraestrutura e materiais cedidos.*

*Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2017/10373-0, pela oportunidade e suporte financeiro concedido durante o desenvolvimento deste projeto.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*Agradeço também a todas as aranhas e abelhas que foram utilizadas no presente estudo, em prol do conhecimento e desenvolvimento da ciência.*

*Por fim, agradeço a mim mesma, por ter me permitido viver essa indescritível experiência chamada de Doutorado. Desafios, conquistas, alegrias, pandemia, choro, tempo, respiro, cansaço, e enfim, o alívio de mais uma etapa da minha vida sendo finalizada. Já aguardo ansiosamente pelas surpresas, descobertas e desafios do início do novo ciclo da minha vida.*

*“Assim cada pessoa deixa sua marca em minha vida para sempre, umas porque me ajudam na construção, outras porque me apresentam projetos de sonho e outras ainda porque me desafiam a construí-los” (autor desconhecido modificado por Franciele).*

*Enfim, á todos o meu MUITO OBRIGADA!*

## RESUMO

A aranha *Trichonephila clavipes* pertence ao grupo das aranhas construtoras de teia orbital, que constroem teias grandes e circulares para capturar suas presas. Através de uma glândula produtora de seda denominada de agregada, essas aranhas depositam gotículas oleosas que recobrem os fios da espiral de captura. Essas gotículas oleosas contêm muitas vesículas lipídicas que aprisionam em seu interior soluções de proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. Dentre essas moléculas muitas são toxinas de natureza proteica e de baixas massas moleculares, as quais podem, por exemplo, paralisar as presas no momento em que as mesmas entram em contato com a teia. Especula-se que quando um inseto-presa é aprisionado pela teia, as gotículas e vesículas lipídicas desempenham um papel importante em penetrar, armazenar, transportar, e por fim, liberar as toxinas para o interior do corpo da presa. Considerando isso, utilizando análises de espectrometria de massas, foi possível identificar seis classes de lipídios que compõem as gotículas e vesículas lipídicas da teia. Dentre elas, principalmente os ácidos e ésteres graxos, além de fosfolipídios do tipo glicerofosfolipídio e esfingolipídios, e também glicérolipídios e esterolipídios. Posteriormente, através da análise quantitativa do extrato vesicular da teia, foi possível estimar que para uma única teia, o extrato vesicular apresentou em média 14.709.800 vesículas lipídicas, com um valor expresso em massa de 700µg de proteínas/peptídeos; de forma que cada vesícula possivelmente aprisiona em seu interior  $\cong$  47 pg de proteínas/peptídeos que provavelmente correspondem às toxinas que paralisam o inseto-presa no momento em que as mesmas são liberadas para o interior do corpo do inseto. Até o momento não se sabe muito sobre a composição peptídica da teia, dessa forma, através da análise do perfil de peptídeos por LC-MS/MS, foram identificados um total de 729 peptídeos presentes na seda da teia e nas glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, sendo que 13 peptídeos foram selecionados e sintetizados em fase sólida, para que posteriormente o potencial tóxico dos mesmos fossem avaliados em ensaios de inseto-toxicidade. Foi observado que tanto o extrato vesicular da teia como os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 e 13 apresentaram efeitos tóxicos quando injetados na hemocele de abelhas. O extrato vesicular da teia apresentou valor de  $DL_{50} = 0,323$  ng/mg enquanto os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3 apresentaram valor de  $DL_{50} = 1,06$  ng/mg, 0,846 ng/mg e 1,06 ng/mg, respectivamente. Além disso, quando submetidos a ensaios de *Fluorescence Imaging*

*Plate Reader* (FLIPR), os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 e 13 também apresentaram ação inibitória em canais de íons sódio (Nav) e cálcio (Cav2.2). O peptídeo Trichonephiline-8 também inibiu canais de íons cálcio (Cav1.3) e o receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (nAChR $\alpha$ 7), enquanto o peptídeo Trichonephiline-10 inibiu apenas o receptor nAChR $\alpha$ 7. Além dos peptídeos potenciais inseticidas envolvidos na captura de presas, o peptídeo Trichonephiline-6 foi identificado com ação antibiótica (MIC  $\leq$  0,25  $\mu$ g/mL) para a bactéria Gram+ *Staphylococcus aureus*. O extrato total da teia também apresentou ação antibiótica com valor de MIC  $\leq$  2  $\mu$ g/mL para a bactéria Gram- *Pseudomonas aeruginosa*. Tanto a seda da teia quanto o peptídeo Trichonephiline-6 podem estar contribuindo no mecanismo de defesa da teia para que a seda, ou até os ovos da aranha em desenvolvimento, resistam à decomposição microbiana. Finalmente, foi realizada pela primeira vez a análise de imageamento químico por espectrometria de massas (IMS-MALDI) da seda da teia da aranha *T. plumipes*, a qual evidenciou que a distribuição dos peptídeos na teia ocorre de forma heterogênea. Dessa forma, os resultados obtidos na presente tese forneceram uma melhor compreensão químico-ecológica da captura de presas pelas teias das aranhas do gênero *Trichonephila*, além de servir de inspiração para o desenvolvimento de novos inseticidas-seletivos e/ou antibióticos.

**Palavras chave:** seda de aranha, glândulas de seda, caracterização do perfil lipídico, abordagem peptidômica, imageamento químico

## ABSTRACT

*Trichonephila clavipes* spider belongs to the group of orb-web weaving spiders, which build large and circular webs to capture their prey. Through aggregate silk-producing gland, these spiders deposit oily droplets that coat the threads of the capture spiral. These oily droplets contain many lipid vesicles that trap solutions of proteins, peptides, and low molecular weight compounds. Among these molecules, many are low molecular weight toxins and toxic proteins which can, for example, paralyze prey at the moment they come in contact with the web. It is further speculated that when an insect-prey is trapped by the web, droplets and lipid vesicles play an important role in penetrating, storing, transporting, and ultimately releasing the toxins into the prey's body. Considering this, using mass spectrometry analyses, it was possible to identify six classes of lipids that constitute the web droplets and vesicles lipids. Those classes include mainly fatty acids and esters, as well as glycerophospholipids and sphingolipids, and also glycerolipids and sterolipids. Furthermore, through the quantitative analysis of the web vesicular extract, it was possible to estimate that, for a single web, the vesicular extract presented an average of 14,709,800 lipid vesicles, with a value expressed in mass of 700 $\mu$ g of protein/peptides; so that each vesicle possibly traps inside  $\cong$  47 pg of protein/peptides, probably corresponds to the toxins that paralyze the insect-prey at the time they are released into the insect body. So far, not much is known about the peptide composition of this web. Thus, through the peptide profile analysis by LC-MS/MS, a total of 729 peptides were identified in the *T. clavipes* spider web silk and in its silk-producing glands. Thirteen peptides were selected and synthesized in solid phase, and their toxic potential could be evaluated in insect-toxicity assays. It was observed that both the web vesicular extract and the peptides named Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 and 13 showed toxic effects when injected into the bee hemocoel. Web vesicular extract showed LD50 value = 0.323 ng/mg while Trichonephiline-1, -2, -3 peptides showed LD50 value = 1.06 ng/mg, 0.846 ng/mg and 1.06 ng/mg, respectively. Furthermore, when subjected to Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR) assays, Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 and 13 peptides also showed inhibitory action on sodium (Nav) and calcium (Cav2.2) ion channels. The Trichonephiline-8 peptide also inhibited calcium ion channels (Cav1.3) and the nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 (nAChR $\alpha$ 7), while the Trichonephiline-10 peptide inhibited only the nAChR $\alpha$ 7 receptor. In addition to potential insecticidal peptides involved in prey capture, the peptide Trichonephiline-6 was identified with

antibiotic action (MIC  $\leq$  0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for Gram+ *Staphylococcus aureus* bacteria. The total web extract also showed antibiotic action with MIC value  $\leq$  2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for Gram- *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Both web silk and Trichonephiline-6 peptide may be contributing to the defense mechanism of the web, or even the developing spider eggs, resist microbial decay. Finally, chemical imaging analysis by mass spectrometry (IMS-MALDI) of *T. plumipes* spider web was performed for the first time, which showed that the distribution of peptides in the web occurs heterogeneously. Thus, this chapter provides a better chemical-ecological understanding of prey capture by the webs of the genus *Trichonephila* spiders, and serves as inspiration for the development of new insecticide-selectives and/or antibiotics.

**Keywords:** spider silk, silk glands, lipid profile characterization, peptidomic approach, chemical imaging.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1. a)</b> <i>Trichonephila clavipes</i> - aranha construtora de teia aérea orbital, na cidade de Santa Gertrudes /SP. <b>b)</b> Em detalhe, os fios de coloração amarelada que formam a teia orbital (figura extraída da dissertação de mestrado de Esteves, 2017).....	30
<b>Figura 2. a)</b> Esquema representativo da anatomia de aranhas, destacando a região posterior abdominal, a qual estão localizadas as glândulas produtoras de seda. <b>b)</b> Em detalhe as sete glândulas produtoras de seda descritas para as aranhas do gênero <i>Trichonephila</i> : ampulada maior, flageliforme, ampulada menor, piriforme, agregada, tubuliforme e aciniforme (adaptado de RÖMER et al., 2008).....	31
<b>Figura 3. a)</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das gotículas dos fios de seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> . Imagem da distribuição das gotículas sobre o fio intacto da espiral de captura <b>b)</b> Microscopia de luz (ML) das vesículas lipídicas extraídas das gotículas da teia da aranha <i>T. clavipes</i> . Imagem destacando o formato globular das vesículas e o conteúdo mais denso (possivelmente proteínas e peptídeos tóxicos - apontado pelas setas pretas) armazenado no interior da vesícula. Adaptado de Esteves, 2017.....	33
<b>Figura 4.</b> Ultra secção da gotícula envolta do fio de seda pertencente à espiral de captura da teia de <i>N. clavipes</i> - técnica de citoquímica de ácido tânico e imidazol para identificação de proteínas e lipídios respectivamente através de MET. É possível observar diversas estruturas globulares (vesículas lipídicas) suspensas dentro do conteúdo aquoso da gotícula. No interior das vesículas lipídicas há conteúdo eletrodense, que correspondem às proteínas armazenadas (figura extraída da tese de Salles, 2003).....	33
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo da preparação de amostra, para a análise quantitativa por câmara de Neubauer. Coleta da teia e separação da camada oleosa extraída das gotículas presentes nos fios de seda. Essa separação ocorreu em água, sob agitação durante um período de 4 horas. Posteriormente o microtubo foi deixado em repouso para que houvesse a separação das fases pelo processo de decantação. A camada sobrenadante denominada de porção vesicular da teia, que corresponde a uma fina camada de óleo, foi coletada e inserida em câmara de Neubauer e coberta por lamínula, para ser analisada e as vesículas contadas através da observação por microscopia de luz..	38
<b>Figura 6.</b> Fórmula utilizada para a realização do cálculo do número de vesículas extracelulares por mL. Dessa forma, foi possível estimar a quantidade real dessas vesículas lipídicas extracelulares, presentes na porção vesicular da teia.....	44
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo dos diferentes métodos de quantificação da porção vesicular da teia. Inicialmente a porção vesicular foi submetida a análise em câmara de Neubauer para obter o número de vesículas lipídicas extracelulares/teia; com a mesma porção vesicular foi realizada a quantificação por peso seco e a quantificação de proteínas/peptídeos.....	45
<b>Figura 8.</b> Espectros ESI-MS nos modos negativo ( <b>a</b> ) e positivo ( <b>b</b> ) da porção lipídica da teia da aranha <i>T. clavipes</i> . Os valores de m/z detectados estão na forma $[M + H]^+$ para o modo positivo, e na forma $[M - H]^-$ para o modo negativo.....	47
<b>Figura 9.</b> Classes de lipídios presentes no extrato oleoso da teia da aranha <i>T. clavipes</i> obtidas usando o banco de dados do LIPID MAPS no modo ESI positivo.....	50
<b>Figura 10.</b> Classes de lipídios presentes no extrato oleoso da teia da aranha <i>T. clavipes</i> obtidas usando o banco de dados do LIPID MAPS no modo ESI negativo.....	51
<b>Figura 11.</b> Classes de lipídios totais (ESI positivo + ESI negativo) presentes no extrato oleoso da teia da aranha <i>T. clavipes</i> obtidas usando o banco de dados do LIPID MAPS.....	51
<b>Figura 12.</b> Microscopia de luz (ML). <b>a)</b> imagem do corte transversal da glândula agregada da aranha <i>T. clavipes</i> . <b>b)</b> imagem evidenciando o assincronismo da eliminação do	

conteúdo pela glândula, em LV é possível observar o lúmen vazio, enquanto que em LC o lúmen ainda está cheio. **c)** aumento da figura “a” destacando o tecido conjuntivo circunjacente (TCC) com o núcleo alongado (NA). **d)** aumento da figura “c” destacando fragmentos de ácido nucleico (AN) e citoplasma das células secretoras (CCS) caracterizando o mecanismo holócrino da porção secretora desta glândula..... 57

**Figura 13. Cromatograma GCxGC-2D.** Cromatograma bidimensional representativo da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando os 211 picos cromatográficos (cada “mancha” representa um pico)..... 60

**Figura 14. Cromatograma GCxGC-3D.** Cromatograma tridimensional representativo da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*..... 60

**Figura 15. Cromatograma GCxGC-2D.** Cromatograma bidimensional representativo da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando o agrupamento de cada função orgânica representado por uma cor diferente. Contorno preto - ácidos graxos, contorno vermelho - metil éster e contorno branco – hidrocarbonetos. 61

**Figura 16.** Cromatogramas GC x GC-2D. Cromatogramas bidimensionais representativos das análises de GCxGC-MS dos padrões. A - Padrões de ácidos graxos (C16:1, C18:1, C18:2, C18:3). B- Padrões de alcanos saturados (C7-C40).)..... 62

**Figura 17. Cromatograma GCxGC-2D de bolhas (“bubble-plot”).** Cromatograma bidimensional de bolhas da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando a área superficial e cada pico cromatográfico representado por uma bolha, a qual possui um valor de área proporcional ao seu tamanho em diâmetro ( $\phi$ ). A numeração acima de cada bolha corresponde aos números dos compostos indicados na tabela 2..... 62

**Figura 18.** Estrutura química da (II) toxina alcalóide (1-(2-guanidinoetil)-1,2,3,4-tetrahidro-3-(hidroximetil)- $\beta$ -carbonila) e de um (I) composto organometálico de ação inseticida ferro [1-(3-diazenilfenil) etanol] identificados na seda da teia da aranha *T. clavipes* (Marques et al., 2005)..... 70

**Figura 19. Esquema representativo do Bioensaio de Inseto-toxicidade. a)** A imagem mostra a solução controle (solução salina) e a solução com potencial tóxico (extrato vesicular da teia) que foram injetadas nas abelhas, além de evidenciar o local da inserção da seringa na região dorsal do abdômen da abelha *Apis mellifera*, e os potes representativos de cada concentração injetada. **b)** Perfil esperado do comportamento das abelhas do pote controle em que foram injetadas apenas solução controle (solução salina) - abelhas vivas. Perfil esperado do comportamento das abelhas do pote em que foram injetadas a solução com potencial tóxico (solução vesicular da teia) - abelhas mortas..... 80

**Figura 20. Esquema representativo do Bioensaio de Inseto-toxicidade.** A imagem mostra a solução controle (solução salina) e a solução com potencial tóxico (sequência peptídica similar à toxina) que foram injetadas nas abelhas. Além disso é evidenciado o local da inserção da seringa na região dorsal do abdômen da abelha *Apis mellifera* e apresentado o perfil esperado do comportamento das abelhas durante as 24 horas do bioensaio. O perfil esperado do comportamento das abelhas do pote controle em que foram injetadas apenas solução controle (solução salina) - abelhas vivas. O perfil esperado do comportamento das abelhas do pote em que foram injetadas a solução com potencial tóxico (200 ng da sequência peptídica similar à toxina) - abelhas paralisadas/mortas..... 91

**Figura 21.** Espectro CID representativo do peptídeo natural AAAGGAGQGGYGGGLGSQGAGRGGQGAGAA-OH, selecionando-se o íon de m/z 763.6979 [M + 3H]<sup>3+</sup>, como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo - b e -y. Esse peptídeo #18 está presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes*, e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína dragline silk fibroin parcial (código de acesso: AAA29380.2), nos bancos de dados Arachnidae – Tabela 5..... 92

<b>Figura 22.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural AAAGGAGQGGYGGGLGSQG-OH, selecionando-se o íon de m/z 718.3342 [M + 2H] <sup>2</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #41 está presente na glândula ampulada maior da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína Dragline silk fibroin 1 (código de acesso: sp P19837.3) nos bancos de dados Arachnidae – Tabela 5.....	93
<b>Figura 23.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural QRANAGGARGQGAGAGGGAAQ-OH, selecionando-se o íon de m/z 891.9343 [M + 2H] <sup>2</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #89 está presente na glândula ampulada maior da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína minor ampullate spidroin (código de acesso: ARA91163.1) através do sequenciamento de novo. – Tabela 5.....	95
<b>Figura 24.</b> Esquema representativo da emulsão de óleo em água, evidenciando as redes de nanofibras de fibroína da seda (NFS) de <i>Bombyx mori</i> , as quais garantem o aumento na estabilidade dessas emulsões. Figura extraída de Chen et al., 2017.....	115
<b>Figura 25. Esquema representativo das esferas funcionais de seda de aranha, utilizadas como carregadoras de drogas para terapia dirigida contra o câncer.</b> a) A imagem mostra o híbrido composto pelo peptídeo com domínio específico de ligação a Her2 (em laranja) e a seda MS1 modificada (em verde). b) A imagem evidencia o peptídeo de ligação exposto (em laranja) na superfície das esferas de seda (em verde), as esferas carregam em seu interior a droga desoxirrubicina (em vermelho). c) As esferas funcionais de seda se ligam especificamente, através do domínio de reconhecimento a Her2, a células cancerígenas da mama (células que estão supreeexpressando Her2). Figura extraída de Florczak et al., 2014.....	116
<b>Figura 26.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural MVDDALGAADAEMV-OH, selecionando-se o íon de m/z 704.3569 [M + 2H] <sup>2</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #9 está presente na seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da Serpin B6 (código de acesso: XP_015915454.1), através do sequenciamento de novo – Tabela 7.	118
<b>Figura 27.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural ASVAEPSQTPLW-OH, selecionando-se o íon de m/z 634.3249 na forma de [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #25 está presente na glândula agregada da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína venom peptide U3-SYTX-Sth1h_1 (código de acesso: AIW62674.1), através do sequenciamento de novo – Tabela 7.....	119
<b>Figura 28.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural EGVDDALGAADNLDLDT-OH, selecionando-se o íon de m/z 738.3660 [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #11 está presente na seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína venom anionic peptide-5 (código de acesso: ABR21033.1), através do sequenciamento de novo – Tabela 9.....	120
<b>Figura 29.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural MVSVDLGAACMDPV-OH, selecionando-se o íon de m/z 704.3449 na forma de [M + 2H] <sup>2</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #10 está presente na seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína TxLP4 (código de acesso: ABY26686.1), através do sequenciamento de novo – Tabela 9.....	121
<b>Figura 30.</b> Espectro CID representativo do peptídeo de digestos trípticos YVTDDALEAADNLES-OH, selecionando-se o íon de m/z 1624.7104 [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #15 está presente na seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> e foi identificado como semelhante à uma	

sequência parcial da proteína venom toxin meuTx19 (código de acesso: AMX81489.1),  
através do sequenciamento de novo – Tabela 10..... 122

**Figura 31.** Espectro CID representativo do peptídeo natural TAMKASVAAGALVSA-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 674.3691 [M + 2H]<sup>2+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #15 está presente na glândula ampulada  
maior da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da  
proteína venom peptide HtKTx2 (código de acesso: AOF40180.1), através do  
sequenciamento de novo – Tabela 10..... 123

**Figura 32.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MVDSVLGAACNNLT-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 704.3522 [M + 2H]<sup>2+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #12 está presente na seda da teia da  
aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína  
Venom metalloproteinase antarease TserMP\_A-like isoform X3 (código de acesso:  
XP\_023216482.1), através do sequenciamento de novo – Tabela 9..... 124

**Figura 33.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MVADDLGAACDPVM-OH,  
selecionando-se o íon m/z de 704.3517 [M + 2H]<sup>2+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #13 está presente na seda da teia da  
aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína  
Venom metalloproteinase antarease TserMP\_A-like isoform X3 (código de acesso:  
XP\_023216482.1), através do sequenciamento de novo – Tabela 9..... 125

**Figura 34.** Espectro CID representativo do peptídeo natural FNRLDGTGFIL-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 654.8019 [M + 2H]<sup>2+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #2 está presente na seda da teia da  
aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína  
*Conotoxin* (código de acesso: ATF27505.1), nos bancos de dados conotoxinas – Tabela 9.. 126

**Figura 35.** Espectro CID representativo do peptídeo natural TIGRASSLSK-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 1019.5385 [M + 1H]<sup>1+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #13 está presente na seda da teia da  
aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína  
*Mr\_precursor\_155* (código de acesso: BAO02229.1), nos bancos de dados conotoxinas –  
Tabela 10..... 127

**Figura 36.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MTALSGAALCGPT-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 604.7927 [M + 2H]<sup>2+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #16 está presente na seda da teia da  
aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína  
*Conotoxin Superfamily I1* (código de acesso: BAS22205.1), através do sequenciamento *de  
novo* – Tabela 10..... 128

**Figura 37.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MSVVFAALGADDVL-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 704.3585 [M + 2H]<sup>2+</sup>, como precursor; evidenciados apenas  
os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha  
*T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial de uma  
uncharacterized protein LOC111251952 isoform X1 (código de acesso: XP\_022664869.1),  
através do sequenciamento de novo – Apêndice A7..... 144

**Figura 38.** Espectro CID representativo do peptídeo natural EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL-OH,  
selecionando-se o íon de m/z 1174.1318 [M + 2H]<sup>2+</sup>,  
como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo  
está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à  
uma sequência parcial de uma hypothetical protein X975\_20520 (código de acesso:  
KFM78378.1), através do sequenciamento de novo – Apêndice A7..... 146

<b>Figura 39.</b> Distribuição do total das sequências de peptídeos identificadas nas glândulas produtoras de seda e na seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> , de acordo com os quatro grupos.....	
<b>Figura 40.</b> Distribuição das proteínas identificadas nas glândulas de seda, e na seda da teia de <i>T. clavipes</i> de acordo com os 4 grupos funcionais.....	145
<b>Figura 41. Bioensaio de inseto-toxicidade. a)</b> favo de abelhas recém emergidas. <b>b)</b> imagens de 3 abelhas exercendo alguns dos comportamentos observados durante a execução do bioensaio: inseto ativo ( <b>b1</b> ), inseto ativo realizando auto-limpeza ( <b>b2</b> ), inseto paralizado ou morto ( <b>b3</b> ). <b>c)</b> Imagem registrada de um dos bioensaios de inseto-toxicidade..	145
<b>Figura 42. Curva dose-resposta para a injeção do extrato vesicular da teia da aranha <i>T. clavipes</i>, na hemocele de abelhas <i>A. mellifera</i>.</b> Foram injetadas cinco diferentes concentrações do extrato vesicular da teia, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 72 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-toxicidade foram obtidos os valores de LD50 = 0,323 ng/mg (21 ng do extrato/65 mg da abelha) e, $r^2 = 0,95$ para a curva de dose-resposta (Esteves et al., 2020).....	146
<b>Figura 43. Imagens registradas dos bioensaios de inseto-toxicidade, após 72 horas de injeção do controle/concentrações do extrato vesicular da teia. a)</b> vista superior do grupo controle evidenciando as abelhas vivas. <b>b)</b> vista lateral do grupo controle evidenciando que além de vivas as abelhas demonstraram movimentação normal dentro do pote. <b>c)</b> vista lateral do grupo que foi injetado a maior concentração do extrato vesicular da teia (250 ng/ $\mu$ L), evidenciando que além da morte da maioria das abelhas houve a ausência da movimentação normal das mesmas dentro do pote, de forma que as abelhas que não morreram apresentaram paralisia. <b>d)</b> vista superior do grupo que foi injetado a maior concentração do extrato vesicular da teia (250 ng/ $\mu$ L), evidenciando a morte da maioria das abelhas.....	147
<b>Figura 44. Curva dose-resposta para a injeção do Trichonephiline-1 na hemocele de abelhas <i>A. mellifera</i>.</b> Foram injetadas cinco diferentes concentrações, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 24 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-toxicidade foi obtido o valor de DL50 = 1,06 ng/mg (69 ng do extrato/65 mg da abelha), com limite de confiança (área cinza) = 0,78-1,55 ng/mg.....	148
<b>Figura 45. Curva dose-resposta para a injeção do Trichonephiline-2 na hemocele de abelhas <i>A. mellifera</i>.</b> Foram injetadas cinco diferentes concentrações, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 24 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-toxicidade foi obtido o valor de DL <sub>50</sub> = 0,846 ng/mg (55 ng do extrato/65 mg da abelha), com limete de confiança (área cinza) = 0,53-1,32 ng/mg.....	154
<b>Figura 46. Curva dose-resposta para a injeção do Trichonephiline-3 na hemocele de abelhas <i>A. mellifera</i>.</b> Foram injetadas cinco diferentes concentrações, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 24 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-toxicidade foi obtidos os valores de DL50 = 1,01 ng/mg (66 ng do extrato/65 mg da abelha), com limete de confiança (área cinza) = 0,67-1,52 ng/mg.....	155
<b>Figura 47. Resultados do ensaio FLIPR após adição de 1mM, 100uM, 10uM de sequências de peptídeos da teia de aranha de <i>T. clavipes</i> em canais de íons Nav, usando células de neuroblastoma SH-SY5Y, Veratridina para evocar respostas de influxo de cálcio (controle positivo) e TTX para bloquear canais de Nav. a)</b> Trichonephiline-1: MVDDALGAADAEMV <b>b)</b> Trichonephiline-2: GVDDALGAADNLDT <b>c)</b> Trichonephiline-3: MVSVDLGAACMDPV <b>d)</b> Trichonephiline-4: YVTDDALEAADNLES <b>e)</b> Trichonephiline-8: MVADDLGAACDPVM <b>f)</b> Trichonephiline-13: EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL.....	157

**Figura 48. Resultados do ensaio FLIPR após adição de 1mM, 100uM, 10uM de seqüências de peptídeos da teia da aranha *T. clavipes* no canal de íons Cav 2.2, usando células de neuroblastoma SH-SY5Y e 90 mM KCl 5 Mm CaCl<sub>2</sub> para evocar respostas de influxo de cálcio (controle positivo) e CVIF para bloquear canais Cav 2.2. a) Trichonephiline-1: MVDDALGAADAEMV b) Trichonephiline-2: EGVDDALGAADNLDT c) Trichonephiline-3: MVSVDLGAACMDPV d) Trichonephiline-4: YVTDDALEAADNLES e) Trichonephiline-8: MVADDLGAACDPVM f) Trichonephiline-13: EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL.....**

158

**Figura 49. Resultados do ensaio FLIPR após adição de 1 mM, 100 uM, 10 uM de seqüências de peptídeos da aranha *T. clavipes* usando células de neuroblastoma SH-SY5Y. a) Trichonephiline-10: TIGRASSLSK contra o receptor AChR $\alpha$ 7 usando Colina / PNU para evocar resposta ao influxo de cálcio e Tubocurarina para bloquear nAChR $\alpha$ ; b) Trichonephiline-8: MVADDLGAACDPVM contra o canal Cav 1.3 usando 90 mM KCl 5Mm CaCl<sub>2</sub> para evocar a resposta ao influxo de cálcio e Nefedipina para bloquear Cav 1.3; c) Gráfico representativo mostrando atividade insignificante ou inibitória baixa para as outras seqüências de peptídeos.....**

160

**Figura 50. Ensaio de FLIPR contra canais Nav e Cav 2.2. a) Curvas de dose-resposta representativas e b) valores IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) para canais de Nav. c) Curvas de dose-resposta representativas e d) valores de IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) para o canal Cav 2.2. Trp 1: Trichonephiline-1 - MVDDALGAADAEMV, Trp 2: Trichonephiline-2 - EGVDDALGAADNLDT, Trp 3: Trichonephiline-3 - MVSVDLGAACMDPV, Trp 4: Trichonephiline-4 - YVTDDALEAADNLES, Trp 8: Trichonephiline-8 - MVADDLGAACDPVM, Trp 13: Trichonephiline-13 -EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL.....**

161

**Figura 51. Distribuição das proteínas totais identificadas na seda da teia e das glândulas produtoras de seda da aranha *T. plumipes*, organizado em seis diferentes grupos de acordo com seu papel funcional relacionado à teia: (i) proteínas estruturais da teia de seda; (ii) proteínas relacionadas ao transporte de íons e oxigênio para manter a estabilidade das espidroínas;(iii) proteínas relacionadas ao dobramento/conformação e modificação de espidroínas; (iv) proteínas relacionadas à preservação da espidroína contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas à preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas relacionadas com a captura de presas e pré-digestão. As proteínas *housekeeping* foram removidas.....**

161

**Figura 52. Distribuição das proteínas identificadas de acordo com seu papel funcional nas glândulas produtoras de seda e na seda da teia. As proteínas foram organizadas em seis grupos funcionais diferentes: (i) proteínas estruturais da seda da teia; (ii) proteínas relacionadas ao transporte de íons e oxigênio para manter a estabilidade das espidroínas; (iii) proteínas relacionadas ao dobramento/conformação e modificação de espidroínas; (iv) proteínas relacionadas à preservação da espidroína contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas à preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas relacionadas com a captura de presas e pré-digestão.....**

172

**Figura 53. a) *T. plumipes* - aranha tecedora de teia orbital, coletada no campus da Universidade de Queensland em Brisbane, QLD, Austrália. b) Fio de seda sem gotículas. c) Gotículas depositadas ao longo do fio de seda. d) Visão aproximada das gotículas depositadas sobre os fios da teia. As imagens da teia em b,c e d foram obtidas com o microscópio Invertido Nikon Ti-U.....**

179

**Figura 54. a) Imagem obtida por microscopia invertida da seda da teia em uma lâmina de vidro evidenciando as gotículas tocando umas às outras. b) Esquema representativo das gotículas se tocando umas às outras (feito à partir da figura "a"). c) Área da teia selecionada, evidenciando os fios de seda analisados por MALDI-Imaging. d) Imagem da distribuição do peptídeo de valor de m/z 2717 a forma ([M+H]<sup>+</sup>) detectado na seda da teia de *T. plumipes*. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto.....**

193

<b>Figura 55. Distribuição heterogênea de peptídeos sobre os fios da teia. a)</b> área da teia selecionada para realizar análise de MALDI-Imaging. Imagem da distribuição do peptídeo com valor de m/z 715 <b>(b)</b> , m/z 2753 (c) e m/z 1952 <b>(d)</b> detectado nos fios da teia da <i>T. plumipes</i> . A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma ([M+H] <sup>+</sup> ).....	194
<b>Figura 56.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural LFDDAAHAAD-OH, selecionando-se o íon de m/z 523.2342 [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme (código de acesso: WP_146864660.1), nos bancos de dados NCBIInr – Tabela 14.....	195
<b>Figura 57.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural DDAAHAADKLL-OH, selecionando-se o íon de m/z 570.2897 [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína hypothetical protein NCL1_13025 (código de acesso: MAE71440.1), nos bancos de dados NCBIInr – Tabela 14.....	197
<b>Figura 58.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural mDDAAHAADQL-OH, selecionando-se o íon de m/z 587.2802 [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #13 está presente na seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína hypothetical protein (código de acesso: MAE71440.1), nos bancos de dados NCBIInr – Tabela 14.....	198
<b>Figura 59.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural MLGGDAAHQEDTPT-OH, selecionando-se o íon de m/z 721.8485 [M + 2H] <sup>2+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína hypothetical protein, nos bancos de dados NCBIInr – Tabela 14.....	200
<b>Figura 60.</b> Espectro CID representativo do peptídeo natural QDVAKGLEAQVPLTNLL-OH, selecionando-se o íon de m/z 1019.5385 [M + 1H] <sup>1+</sup> , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína hypothetical protein AVEN_85707_1, nos bancos de dados NCBIInr – Tabela 14.....	201
<b>Figura 61.</b> Alinhamento entre as sequências de peptídeo oriundos da teia de aranha <i>T. plumipes</i> (Trichonephiline-16, -17, -19 e -20 da tabela 14) com as sequências de 2 peptídeos “semelhantes a toxinas” previamente identificados na teia de aranha <i>T. clavipes</i> (Trichonephiline-1 e -2 da tabela 4). Cor vermelha: alto consenso (> 90%); cor azul: baixo consenso (> 50%).....	200
<b>Figura 62. Sequências de peptídeos oriundos da teia da aranha <i>T. plumipes</i> que se apresentaram semelhantes a peptídeos previamente identificados como tóxicos na teia da aranha <i>T. clavipes</i>. Imagem da distribuição do peptídeo a)</b> Trichonephiline-19: DDAAHAADKLL, m/z: 1139; <b>b)</b> Trichonephiline-16: SLFDDAAAH, m/z: 945; <b>c)</b> Trichonephiline-20: MDDAAHAADQL, m/z: 1172 e <b>d)</b> Trichonephiline-17: LFDDAAHAAD, m/z: 1044. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma ([M+H] <sup>+</sup> ).....	203
<b>Figura 63. Sequências peptídicas não caracterizadas identificadas na seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i>.</b> Imagem da distribuição do peptídeo <b>a)</b> Trichonephiline-22: KPVAQLGNSQLVGSK, m/z: 1525; <b>b)</b> Trichonephiline-18: YNDNALGVGPT, m/z: 1120;	

c)Trichonephiline-23 QDVAKGLEAQVPLTNLL, m/z: 1809; d)Trichonephiline-24: PQPTYDTGESVQSAQDARSQDNP, m/z: 2491; e)Trichonephiline-14: KALVGLL, m/z: 713; f) Trichonephiline-15: MLNDASC, m/z: 753 e g) Trichonephiline-21: MLGGDAAHQEDTPT, m/z: 1442. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma ([M+H]<sup>+</sup>)..... 205

**Figura 64.** Valores de m/z das sequências de peptídeos que foram detectados na seda da teia (a) e também na glândula agregada da aranha *T. plumipes* (b), evidenciando que são produzidos por esta glândula e subsequentemente secretados na teia de seda. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pela cor azul/preta. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma ([M+H]<sup>+</sup>)..... 206

## LISTA DE TABELAS

Página

<p><b>Tabela 1.</b> Identificação do perfil lipídico presente na amostra da porção oleosa da teia da aranha <i>T. clavipes</i>, mostrando os valores de m/z, massa molecular (MM), número (#) de possíveis identificações para cada lipídio detectado - para ambos os modos de análises ESI (positivo e negativo).....</p>	48
<p><b>Tabela 2.</b> Identificação dos compostos presentes na amostra da glândula agregada da aranha <i>T. clavipes</i>, mostrando o tempo de retenção da primeira (Tr1) e da segunda (Tr2) dimensão, relação massa carga (m/z) e a % do volume do pico.....</p>	63
<p><b>Tabela 3.</b> Peptídeos da família das bradicininas identificados na seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> (Volsi et al., 2006).....</p>	72
<p><b>Tabela 4. Sequência peptídicas sintetizadas.</b> #: Número do peptídeo; Sequence: sequência peptídica; #AA: número de aminoácidos; Mm: massa molecular; Nome: nome dado a sequência peptídica; (*): troca do resíduo de C por S.....</p>	79
<p><b>Tabela 5.</b> Agrupamento dos peptídeos naturais apresentando massas moleculares de até 3kDa de acordo com o seu papel funcional na teia.- i) Peptídeos estruturais da seda da teia - as espidroínas. Na tabela foram apenas considerados peptídeos pertencentes à ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae /ou sequenciamento <i>de novo</i>. #: Número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glândula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.....</p>	96
<p><b>Tabela 6.</b> Agrupamento dos peptídeos de 3-10 kDa de acordo com o seu papel funcional na teia.- i) Peptídeos estruturais da seda da teia - as espidroínas. Na tabela foram apenas considerados peptídeos pertencentes à ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae. #: número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.....</p>	105
<p><b>Tabela 7.</b> Agrupamento dos peptídeos naturais apresentando massas moleculares de até 3kDa de acordo com o seu papel funcional na teia: Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos pertencentes apenas a ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae / ou sequenciamento <i>de novo</i>. #: número, #AA: Número de aminoácidos, MM: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.....</p>	130
<p><b>Tabela 8.</b> Agrupamento dos peptídeos de 3-10 KDa de acordo com o seu papel funcional na teia: Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos pertencentes apenas a ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae. #: número, #AA: Número de aminoácidos, MM: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.....</p>	132
<p><b>Tabela 9.</b> Agrupamento dos peptídeos naturais de massas moleculares de até 3kDa de acordo com o seu papel funcional na teia: Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos obtidos através da busca contra o banco de dados Arthropoda e NCBI nr / ou sequenciamento <i>de novo</i>. #: número, #AA: Número de</p>	

aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glândula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo..... 137

**Tabela 10.** Agrupamento dos peptídeos de 3-10 kDa de acordo com o seu papel funcional na teia. Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos obtidos através da busca contra o banco de dados Arthropoda e NCBI. #: número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.. 138

**Tabela 11. Resposta de cada sequência peptídica aos testes de inseto-toxicidade.** Peptídeos que paralizaram/mataram as abelhas mais de 70% (cor vermelha) e menos de 55% (cor verde), após a injeção de 200 ng/μL de cada sequência peptídica na hemocele de abelhas *Apis mellifera*. Nome: nome dado a sequência peptídica; Sequência: sequência peptídica; Mm: massa molecular; Amostra: origem da sequência peptídica; Mortalidade (%): % de abelhas paralizadas/mortas; Nome da potencial proteína de origem: nome da proteína obtido usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST); Organismo: organismo de origem da proteína. .... 154

**Tabela 12. Respostas de cada peptídeo aos testes de inseto-toxicidade e FLIPR.** Nome: nome dado a sequência peptídica; Sequência: sequência peptídica; Nome da potencial proteína de origem: nome da proteína obtido usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST); Bioensaio: Peptídeos que paralisaram mais de 70% (cor vermelha) e menos de 55% (cor verde) das abelhas, após a injeção de 200 ng/μL de cada sequência peptídica na hemocele de abelhas *Apis mellifera*; Ensaio FLIPR: todas as sequências de peptídeos que apresentaram resposta inibitória em concentrações de 1mM (assinalados com +), nos canais de íons Cav e Nav e receptor AChRα7, utilizando células de neuroblastoma SH-SY5Y..... 164

**Tabela 13.** Resposta de cada sequência peptídica aos testes de antibiose. Valores de concentração mínima inibitória (MIC) expressos em ug/mL, frente à bactérias Gram+ e Gram-. Os valores de MIC com sinal de "<" indica que a amostra exibiu atividade antimicrobiana (cor azul). Os valores de MIC com sinal de ">" indica que a amostra não exibiu atividade, ou exibiu atividade parcial na concentração mais alta testada. Nome: nome dado a sequência peptídica; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Ab: *Acinetobacter baumannii*..... 168

**Tabela 14.** Sequências de peptídeos identificadas na teia de seda da aranha *T. plumipes*, usando análise de sequenciamento *de novo*. Nome: Nome dado a sequência peptídica; Sequência: sequência peptídica; Nome da potencial proteína de origem: nome da proteína obtido usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST); Mm: Massa molecular; Amostra: amostra onde a sequência foi identificada..... 204

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

% - Por cento	HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão
$\alpha$ - Alfa	IAA – Iodoacetamida
$\beta$ - Beta	IMS – Imageamento por espectrometria de massas
$\Delta$ – Delta	kDa – Kilodalton
°C - Graus Celsius	L/min - Litros por minuto
$\gamma$ - Gama	LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
$\mu\text{g}$ - Micrograma	M - Molar
$\mu\text{L}$ - Microlitro	MEV - Microscopia eletrônica de varredura
$\phi$ – Diâmetro	MET - Microscopia eletrônica de transmissão
Å - Angstrom	mg - Miligrama
ACN - Acetonitrila	MS - Espectrometria de massas
AGRE - Glândula agregada	MS/MS - Espectrometria de massas sequencial
AMA - Glândula ampulada maior	mL - Mililitros
AME - Glândula ampulada menor	mL/min - Mililitros por minuto
CID - Dissociação induzida por colisão	ML - Microscopia de luz
cm - Centímetro	Min – Minutos
Da - Dalton	mM - Milimolar
DDT - Ditreitol	mm - Milímetros
DI - Diâmetro	m/v - Massa por volume
ESI - Ionização por eletrospray	m/z - Massa por carga
ETD - Dissociação por transferência de elétrons	N – Normal
FA - Ácido fórmico	ng – Nanograma
FLA - Glândula flageliforme	ng/ $\mu\text{L}$ - Nanograma por microlitro
GC - Cromatografia gasosa	nm – Nanômetro
GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	ns – Nanossegundo
GCxGC-MS - Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada ao espectrômetro de massas	PTMs - Modificações pós- traducionais

GO - Gene Ontology

RMN - Ressonância magnética nuclear

RP-HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho

rpm - Rotações por minuto

SCAN - Varredura de espectro

TFA - Ácido trifluoracético

TIC - Cromatograma de íons totais

Tr<sup>1</sup> - Tempo de retenção da primeira dimensão

Tr<sup>2</sup> - Tempo de retenção da segunda dimensão  
ug- Micrograma

VE - Vesículas extracelulares

VMLs - Vesículas multilamelares

V/min - Volts por minuto

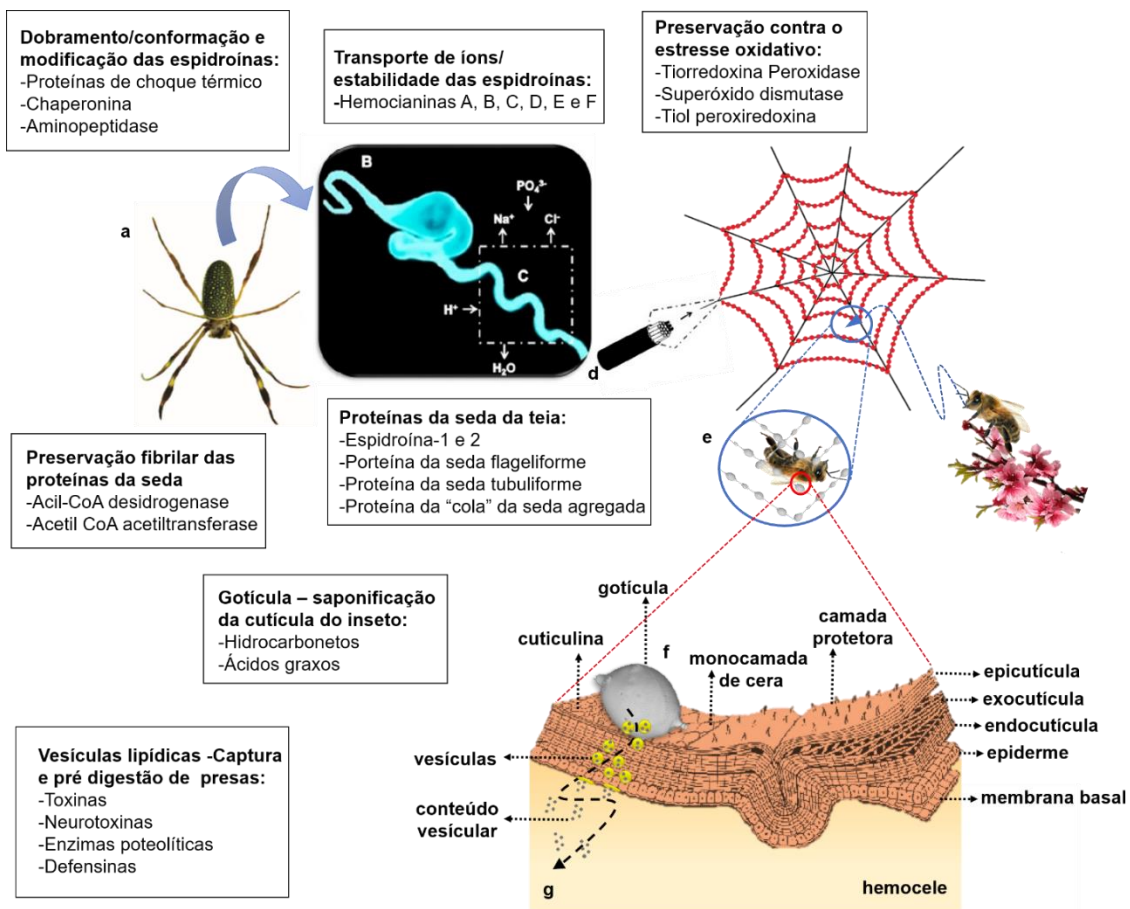
v/v - Volume volume

## INTRODUÇÃO GERAL

As aranhas do gênero *Trichonephila* sintetizam fios adesivos que são encontrados na espiral de captura das teias. Esses fios apresentam gotículas oleosas contendo vesículas lipídicas que aprisionam em seu interior soluções de proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. Dentre essas moléculas muitas são toxinas de natureza proteica e de baixas massas moleculares, que facilitam a captura das presas quando as mesmas entram em contato com a teia. A ação prévia desses compostos afeta o sistema nervoso da presa, paralisando-a (Marques et al., 2005; Salles et al., 2006; Volsi et al., 2006; Zhang et al., 2012; Sanggaard et al., 2014; Dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020).

Mediante os estudos já realizados, todas essas moléculas presentes nas teias de aranhas, descritas até então, e suas possíveis atuações, evidenciam que essas teias desempenham um papel “químico-ativo”, estratégico na captura de suas presas. Porém, o mecanismo através do qual, as toxinas que estão presentes nas teias, conseguem penetrar o corpo do inseto ainda não está totalmente elucidado; uma vez que, para que as toxinas encontradas nas vesículas lipídicas entrem em contato com o corpo e o tecido mole dos insetos-presa existe uma barreira física a ser ultrapassada: a cutícula do inseto.

Em estudos anteriores (Esteves, 2017) foi possível elaborar uma hipótese, que pela primeira vez tenta relacionar o papel das gotículas, vesículas lipídicas e compostos identificados na teia, como parte da estratégia de captura e pré-digestão de presas. Essa hipótese descreve que quando um inseto é capturado pela teia, ocorre o primeiro contato entre a cutícula do inseto e as gotículas depositadas sobre a seda. A camada de cera dos insetos é constituída principalmente por hidrocarbonetos e ácidos graxos de cadeia longa; estes quando entram em contato com as gotículas da teia podem interagir quimicamente formando micelas, promovendo então a dissolução/desestabilização da camada de cera; formando espaços/poros que aumentarão a permeabilidade da cutícula (Eisner et al., 1978; Esteves et al., 2020). Dessa forma, o aumento de permeabilidade pode favorecer a entrada das vesículas lipídicas para dentro do corpo do inseto. Uma vez dentro do corpo do inseto, essas vesículas lipídicas podem se fundir com as membranas dos tecidos moles do inseto, liberando na hemolinfa as toxinas aprisionadas pelas vesículas, paralisando o inseto conforme o esquema representativo mostrado abaixo.



**Esquema representativo do mecanismo geral de ação proposto para as proteínas e compostos de baixas massas moleculares identificados nas glândulas produtoras de seda e na teia. (a)** aranha *T. clavipes*. **(b)** glândula produtora de seda; **(c)** ducto de fiação, onde ocorrem as trocas de íons, perda de água, dobramento/conformação das espidroínas; **(d)** fibras da seda, constituídas pelas espidroínas, após a secreção pelo ducto de fiação; **(e)** captura do inseto-presa pela teia, destacando o contato da cutícula do inseto com as gotículas presentes na seda; **(f)** ácidos graxos presentes na gotícula podem interagir quimicamente com a camada de cera da cutícula do inseto, promovendo a dissolução/desestabilização da camada de cera com abertura de espaços/poros e aumento da permeabilidade da cutícula; **(g)** representação básica do tegumento do inseto-presa, destacando a liberação de vesículas (em amarelo) após o contato da cutícula do inseto-presa com as gotículas. A seta curvilínea pontilhada indica o processo de liberação e fusão das vesículas com a membrana do tecido mole do inseto-presa; após essa fusão ocorre a liberação do conteúdo vesicular que contém toxinas, neurotoxinas e enzimas proteolíticas (representadas pelos pontos em cinza) dentro da hemocele (esquema proposto nos resultados obtidos na dissertação de mestrado de Esteves, 2017 – processo FAPESP 2015/14220-8).

Como já mencionado acima, os estudos das moléculas presentes na seda da teia evidenciam a presença de compostos tóxicos (proteínas e compostos de baixas massas moleculares) que estão relacionados com a captura e pré-digestão das presas aprisionadas por essas teias (Marques, et al., 2005; Salles, et al., 2006, Volsi et al., 2006; dos Santos-Pinto et al., 2016); Porém, sabe-se muito pouco em relação a composição peptídica das glândulas produtoras de seda e da seda da teia de aranhas. Sendo assim, existe a necessidade de se elucidar e conhecer esse perfil peptídico, o

que poderá contribuir para uma melhor compreensão sobre o papel “químico-ativo” da teia na captura dos insetos-presa.

Além disso, faz-se necessário também investigar o perfil lipídico das gotículas e vesículas depositadas sobre a teia, a fim de entender mais sobre o mecanismo de penetração e interação das mesmas com a camada de cera e tecido mole dos insetos; além de servir de inspiração e modelo para o desenvolvimento de novas estratégias de aplicação de inseticidas-seletivos. E ainda, esse estudo poderá proporcionar uma melhor compreensão sobre as propriedades da seda que podem contribuir em aplicações biomédicas, farmacológicas e biotecnológicas de novos materiais à base da seda de aranhas.

Dessa forma, a presente tese foi dividida em três capítulos: Capítulo 1 - Análise investigativa do perfil lipídico das gotículas e vesículas lipídicas da seda da teia da aranha *Trichonephila clavipes*; Capítulo 2 - Desvendando os segredos venenosos das teias das aranhas *Thichonephila clavipes* e *Thichonephila plumipes*; Capítulo 3 - Distribuição espacial dos peptídeos sobre as gotículas da seda da teia da aranha *Trichonephila plumipes*.

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1 - Análise investigativa do perfil lipídico das gotículas e vesículas lipídicas da seda da teia da aranha *Trichonephila clavipes***

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. A aranha <i>Trichonephila clavipes</i> e sua teia para captura de presas.....	29
1.2. A estrutura da seda da teia e as glândulas produtoras de seda.....	30
1.3. O fio viscoso - as gotículas e vesículas lipídicas depositados sobre o fio de seda.....	32
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1 Obtenção da glândula agregada e da seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> ...	37
3.2. Análise semi-quantitativa da porção vesicular da teia.....	37
3.2.1 Contagem das vesículas extracelulares presentes na porção vesicular da teia através de Câmara de Neubauer.....	37
3.2.2. Quantificação por peso seco e quantificação das proteínas/peptídeos presentes no extrato da porção vesicular da teia.....	38
3.3. Caracterização do perfil lipídico da teia.....	39
3.3.1. Extração dos lipídios da teia.....	39
3.3.2. Análise de espectrometria de massas da porção oleosa da teia.....	39
3.3.3. identificação dos lipídios da porção oleosa da teia.....	40
3.4. Microscopia de luz da glândula agregada.....	40
3.5. Perfilagem química dos compostos de baixa massas moleculares da glândula agregada .....	40
3.5.1. Extração dos compostos de baixa massas moleculares da glândula.....	40
3.5.2. Análise dos compostos de baixas massas moleculares por cromatografia bidimensional abrangente (GCxGC), acoplada ao detector de massas.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
4.1. Análise semi-quantitativa da porção vesicular da teia.....	43
4.1.1. Contagem das vesículas extracelulares, presentes no extrato da porção vesicular da teia, através da Câmara de Neubauer.....	43

4.1.2.	Quantificação por peso seco e quantificação das proteínas/peptídeos presentes no extrato da porção vesicular da teia.....	44
4.2.	Caracterização do perfil lipídico da teia da aranha <i>T. clavipes</i> .....	45
4.3.	Microscopia de luz da glândula agregada.....	56
4.4.	Perfilagem química dos compostos de baixa massas moleculares da glândula agregada .....	59
5.	CONCLUSÃO.....	65

## **CAPÍTULO 2 - Desvendando os segredos venenosos das teias das aranhas**

### **Thichonephila clavipes e Thichonephila plumipes**

1.	INTRODUÇÃO.....	71
1.1.	Composição química da seda da teia.....	71
1.1.1.	Compostos de baixas massas moleculares.....	71
1.1.2.	Proteínas/peptídeos.....	72
2.	OBJETIVOS .....	74
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3.1	Análise do perfil peptídico da seda e glândulas produtoras de seda da aranha <i>T. clavipes</i> .....	76
3.1.1.	Obtenção das glândulas e da seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> .....	76
3.1.2	Extração da fração de peptídeos solúveis da seda da teia.....	76
3.1.3.	Extração dos peptídeos presentes nas secreções das glândulas produtoras de seda.....	76
3.1.4	Fracionamento das amostras para a obtenção dos peptídeos de até 3kDa.....	77
3.1.5.	Fracionamento das amostras para a obtenção dos peptídeos de 3 kDa até 10kDa.....	77
3.1.6.	Digestão em solução das frações de 3-10 kDa (estratégia shotgun).....	77
3.1.7.	Quantificação das amostras.....	78
3.1.8.	Análises de espectrometria de massas dos extratos da seda da teia e glândulas produtoras de seda.....	78
3.1.9	Identificação da origem em potencial dos peptídeos observados.....	79
3.2.	Síntese dos peptídeos identificados na aranha <i>T. clavipes</i> .....	79
3.3.	Bioensaio de Inseto-toxicidade via hemocele de abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	79
3.3.1.	Bioensaio com a porção vesicular da teia da aranha <i>T. clavipes</i> .....	80
3.3.2.	Bioensaio com os peptídeos oriundos da aranha <i>T. clavipes</i> .....	82

3.4.	Ensaio antimicrobiano com o extrato bruto da teia e peptídeos oriundos da aranha <i>T. clavipes</i> .....	84
3.5.	Ensaio de <i>Fluorescence Imaging Plate Reader</i> – FLIPR40.....	85
3.5.1.	Cultura de células.....	85
3.5.2.	Avaliação da atividade inibitória dos peptídeos contra canais de íons hNav, hCav2.2, hCav1.3 e receptor nAChR $\alpha$ 7.....	85
3.6.	Análise do perfil protéico da seda e das glândulas produtoras de seda da aranha <i>T. plumipes</i> por abordagem proteotranscriptômica.....	85
3.6.1.	Obtenção das glândulas e da seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> .....	86
3.6.2.	Procedimentos experimentais de transcriptômica para amostras de glândulas produtoras de seda.....	86
3.6.3.	Procedimentos experimentais de proteômica para as amostras de glândula produtora de seda e a seda da teia, abordagem shotgun.....	87
3.6.4.	Aquisição e Análise de dados proteômicos.....	87
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	88
4.1.	Perfilagem peptidômica da seda da teia e da secreção das glândulas produtoras de seda da aranha <i>T. clavipes</i> .....	88
4.2.	Bioensaio de inseto-toxicidade via hemocele de abelhas <i>A. mellifera</i> .....	148
4.3.	Ensaio de <i>Fluorescence Imaging Plate Reader</i> (FLIPR).....	158
4.4.	Ensaio Antimicrobiano com o extrato bruto da teia e peptídeos sintetizados.....	164
4.5.	4.5. Perfilagem proteômica da seda da teia e da secreção das glândulas produtoras de seda por uma abordagem proteotranscriptômica.....	168
5.	CONCLUSÃO.....	180

### **CAPÍTULO 3 - Distribuição espacial dos peptídeos sobre as gotículas da seda da teia da aranha *Trichonephila plumipes***

1.	INTRODUÇÃO.....	186
2.	OBJETIVOS.....	188
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	189
3.1	Obtenção das glândulas agregadas e da seda da teia da aranha <i>T. plumipes</i> .....	189
3.2.	Microscopia da teia da aranha <i>T. plumipes</i> .....	190

3.3.	Imageamento químico por espectrometria através de MALDI (IMS-MALDI).....	190
3.3.1.	IMS-MALDI das gotículas sobre os fios da teia <i>T. plumipes</i> .....	190
3.3.2.	IMS-MALDI da glândula agregada da aranha <i>T. plumipes</i> .....	191
3.3.3.	Análise de IMS-MALDI.....	191
3.4.	Análise de sequenciamento dos peptídeos encontrados no secretoma da glândula agregada e da seda da teia .....	191
3.4.1.	Extração dos peptídeos presentes na seda da teia e na secreção da glândula agregada.....	191
3.4.2.	Procedimentos experimentais para análise dos peptídeos - aquisição e análise de dados .....	191
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	192
5.	CONCLUSÃO.....	206
6.	REFERÊNCIAS.....	208

## **CAPÍTULO 1**

**Análise investigativa do perfil lipídico das gotículas  
e vesículas lipídicas da seda da teia da aranha  
*Trichonephila clavipes***

## RESUMO

A aranha *Trichonephila clavipes* pertence ao grupo das aranhas construtoras de teia orbital, que constroem teias grandes e circulares para capturar suas presas. Através de uma glândula produtora de seda denominada de agregada, essas aranhas depositam gotículas oleosas que recobrem os fios da espiral de captura. Essas gotículas oleosas contêm muitas vesículas lipídicas que aprisionam em seu interior soluções de proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. Dentre essas moléculas muitas são toxinas de natureza proteica e de baixas massas moleculares, as quais podem, por exemplo, paralisar as presas no momento em que as mesmas entram em contato com a teia. Especula-se ainda que quando um inseto-presa é aprisionado pela teia, as gotículas e vesículas lipídicas desempenham um papel importante em penetrar, armazenar, transportar, e por fim, liberar as toxinas para o interior do corpo da presa. Considerando isso, neste capítulo foi investigado o perfil lipídico das gotículas e vesículas lipídicas a fim de entender mais sobre o mecanismo de penetração e interação das mesmas com a camada de cera e tecido mole dos insetos. Utilizando análises de espectrometria de massas, foi possível identificar seis classes de lipídios que compõem as gotículas e vesículas lipídicas da teia. Dentre elas, principalmente os ácidos e ésteres graxos, além de fosfolipídios do tipo glicerofosfolipídio e esfingolipídios, e também glicérolipídios e esterolipídios. Os ácidos e ésteres graxos também foram identificados na glândula agregada, uma vez que esta glândula é responsável por produzir e depositar as gotículas sobre a seda da teia. Além disso, foi revelado que a glândula agregada possui secreção holócrina e este tipo de mecanismo de secreção, possivelmente, pode estar contribuindo de forma direta no processo de formação das vesículas lipídicas. Até o momento, as vesículas lipídicas da teia estão sendo designadas apenas como vesículas lipídicas extracelulares. No entanto, devido a presença de algumas moléculas típicas de exossomos apresentados neste estudo, e também em estudos anteriores, foi possível sugerir que as vesículas possam ser do tipo exossomos. Por fim, através da análise quantitativa do extrato vesicular da teia, foi possível estimar que para uma única teia, o extrato vesicular apresentou em média 14.709.800 vesículas lipídicas, com um valor expresso em massa de 700µg de proteínas/peptídeos; de forma que cada vesícula possivelmente aprisiona em seu interior  $\cong$  47 pg de proteínas/peptídeos. Este conteúdo proteico/peptídico provavelmente corresponde às toxinas que paralisam o inseto-presa no momento em que as mesmas são liberadas para o interior do corpo

do inseto. Portanto, os resultados obtidos neste capítulo contribuem para um melhor entendimento sobre a composição, formação e funcionalidade das gotículas e vesículas lipídicas quando as mesmas entram em contato com a presa que foi capturada pela teia; além de servir de inspiração para o desenvolvimento de novas estratégias de aplicação de inseticidas-seletivos.

**Palavras chave:** seda de aranha, glândula agregada, gotículas lipídicas, vesículas lipídicas, caracterização do perfil lipídico.

## ABSTRACT

*Trichonephila clavipes* spider belongs to the group of orb-web weaving spiders, which build large and circular webs to capture their prey. Through aggregate silk-producing gland, these spiders deposit oily droplets that coat the threads of the capture spiral. These oily droplets contain many lipid vesicles that trap solutions of proteins, peptides, and low molecular weight compounds. Among these molecules, many are low molecular weight toxins and toxic proteins which can, for example, paralyze prey at the moment they come in contact with the web. It is further speculated that when an insect-prey is trapped by the web, droplets and lipid vesicles play an important role in penetrating, storing, transporting, and ultimately releasing the toxins into the prey's body. Considering this, in this chapter the lipid profile of droplets and vesicles was investigated in order to understand more about their mechanism of penetration and interaction with the wax layer and soft tissue of insects. Using mass spectrometry analyses, it was possible to identify six classes of lipids that constitute the web droplets and vesicles lipids. Those classes include mainly fatty acids and esters, as well as glycerophospholipids and sphingolipids, and also glycerolipids and sterolipids. Fatty acids and esters were also identified in the aggregate gland, as this gland is responsible for producing and depositing the droplets on the web silk. Furthermore, it was revealed that the aggregate gland possesses holocrine secretion and this type of secretion mechanism, possibly, may contribute directly to the formation process of the lipid vesicles. So far, the web lipid vesicles are being designated only as extracellular lipid vesicles. However, due to the presence of some typical exosome molecules presented in this and previous studies, it was possible to suggest that the vesicles may be exosome type. Finally, through the quantitative analysis of the web vesicular extract, it was possible to estimate that, for a single web, the vesicular extract presented an average of 14,709,800 lipid vesicles, with a value expressed in mass of 700 $\mu$ g of protein/peptides; so that each vesicle possibly traps inside  $\cong$  47 pg of protein/peptides. This protein/peptide content probably corresponds to the toxins that paralyze the insect-prey at the time they are released into the insect body. Therefore, the results obtained in this chapter contribute to a better understanding of the composition, formation and functionality of the lipid droplets and vesicles when they come into contact with into the prey that has been captured by the web; as well as serving as inspiration for the development of new insecticide-selective application strategies.

**Keywords:** spider silk, aggregate gland, lipid droplets, lipid vesicles, lipid profile characterization.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A aranha *Trichonephila clavipes* e sua teia para captura de presas

As aranhas pertencem ao filo Arthropoda, sendo amplamente dispersas em todo o mundo, e cuja história evolutiva possui relatos de até 390 milhões de anos (Selden et al., 2008). Existem pelo menos, 49.555 espécies de aranhas descritas em 129 famílias, ocupando o sétimo lugar na diversidade total de espécies entre todos os outros grupos de organismos (disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/COUNTS.html>>, acessado em: 09/07/2021). As aranhas do gênero *Nephila* - recentemente mudada para *Trichonephila* (Kuntner et al., 2019; Kallal et al., 2020) estão situadas dentro da ordem Araneae, pertencente à família Nephilidae, cuja distribuição geográfica é predominantemente subtropical, sendo encontradas nas três Américas, África e Austrália (Kuntner et al., 2008; Platnick, 2010).

A aranha *Trichonephila clavipes* (Figura 1a), pertence ao grupo de aranhas construtoras de teia orbital, que constroem teias grandes circulares, com coloração amarelada e fios altamente resistentes (Figura 1b), capazes de capturar até pequenas aves como o beija-flor. Essas aranhas são carnívoras, localizando-se nos espaços entre a vegetação e em áreas de florestas nas margens de rios. Também são encontradas em áreas externas às moradias, construindo refúgio junto às paredes próximo de luminárias, o que facilita a captura de presas, uma vez que as presas são atraídas pela luz (Comstock, 1975; Humenik, et al., 2011).

Para a captura de suas presas, essas aranhas utilizam de estratégias nas quais tanto o veneno quanto a teia apresentam papéis relevantes. Uma das principais funções do veneno das aranhas é promover a paralisia ou morte de suas presas, e ainda realizar pré-digestão da presa capturada (Humenik, et al., 2011). Esse veneno é constituído de uma mistura complexa de substâncias, sendo os principais constituintes: proteínas, peptídeos, poliaminas, ácidos nucleicos, aminoácidos livres, moaminas livres, sais inorgânicos e muitos compostos orgânicos de baixas massas moleculares (Vassilevski, et al., 2009; Zhong et al., 2014).



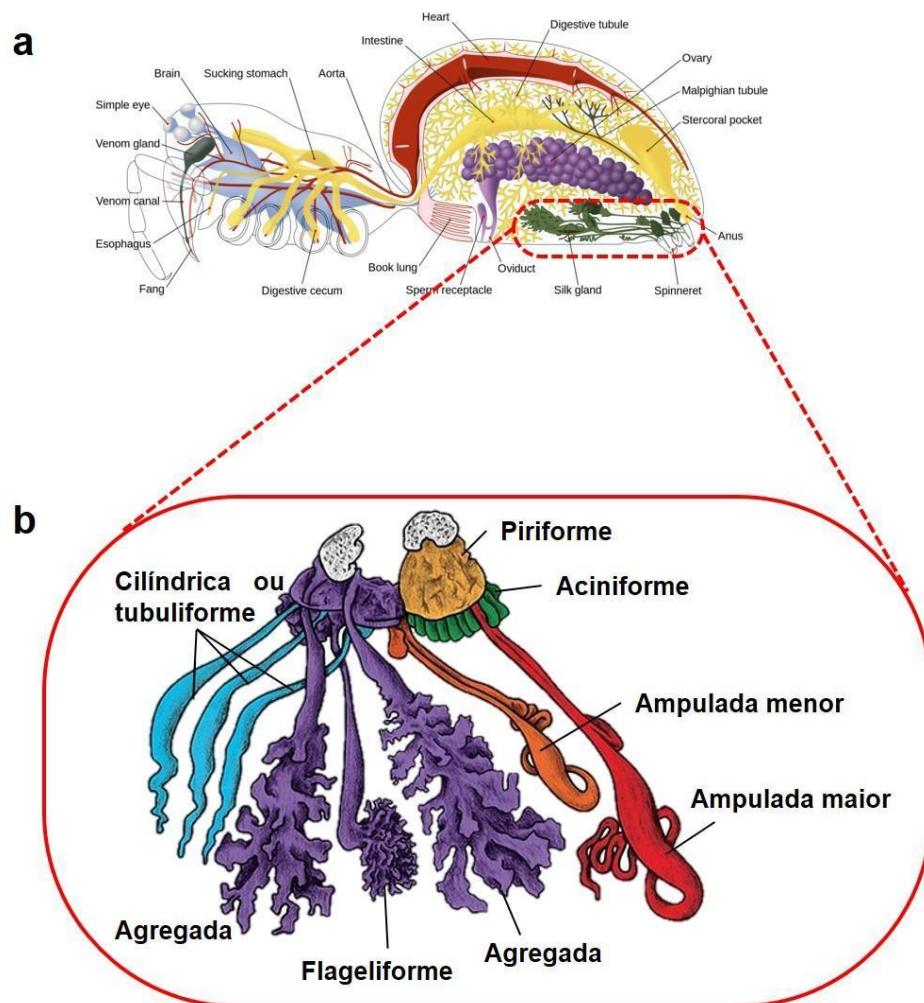
**Figura 1. a)** *Trichonephila clavipes* - aranha construtora de teia aérea orbital, na cidade de Santa Gertrudes/SP. **b)** Em detalhe, os fios de coloração amarelada que formam a teia orbital (figura extraída da dissertação de mestrado de Esteves, 2017).

A maioria das aranhas apresentam venenos que contêm muitos tipos de peptídeos com propriedades de bioinseticidas, que atuam com uma elevada potência e rapidez na morte de uma grande quantidade de pragas (Vassilevski et al., 2009; Windley et al., 2012). Assim, como no veneno das aranhas, estudos anteriores realizados em nosso laboratório, têm demonstrado que a teia também é composta por proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. A presença dessas moléculas tem evidenciado que a teia não é uma simples ferramenta para captura mecânica e aprisionamento de presas, mas sim uma complexa estrutura, que parece desempenhar um papel estratégico “químico-ativo” na captura e pré-digestão de suas presas (Salles et al., 2006; Marques et al., 2005; Volsi et al., 2006; dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020). Sendo assim, o uso de veneno letal para subjugar as presas, em combinação com a produção de teias, facilita a eficiente captura de presas a um gasto mínimo de energia (Terborgh et al., 2001; Langellotto et al., 2004).

## **1.2. A estrutura da seda da teia e a glândulas produtoras de seda**

A teia de captura é um sistema fibroso de sedas organizado em um desenho complexo, para a produção de uma armadilha moderadamente forte, mas excepcionalmente extensível (Swanson, 2007) e eficaz na absorção de energia de presas voadoras (Sensenig, et al 2010). Essas fibras são produzidas pelas glândulas de seda, as quais estão localizadas dentro da metade posterior do abdômen da fêmea (Figura 2a). Existem diferentes tipos de glândulas produtoras de seda, sendo cada

uma delas responsável pela produção de um tipo específico de fio de seda, cuja localização dentro da arquitetura funcional da teia é bem definida pela aranha (Blamires, et al., 2017). As aranhas tecedoras de teias orbitais, como aquelas do gênero *Trichonephila*, possuem um conjunto de glândulas abdominais composto por até sete diferentes glândulas: ampulada maior, ampulada menor, flageliforme, cilíndrica ou tubuliforme, aciniforme, piriforme e agregada (Rousseau et al., 2009), assim como demonstrado na figura 2b.



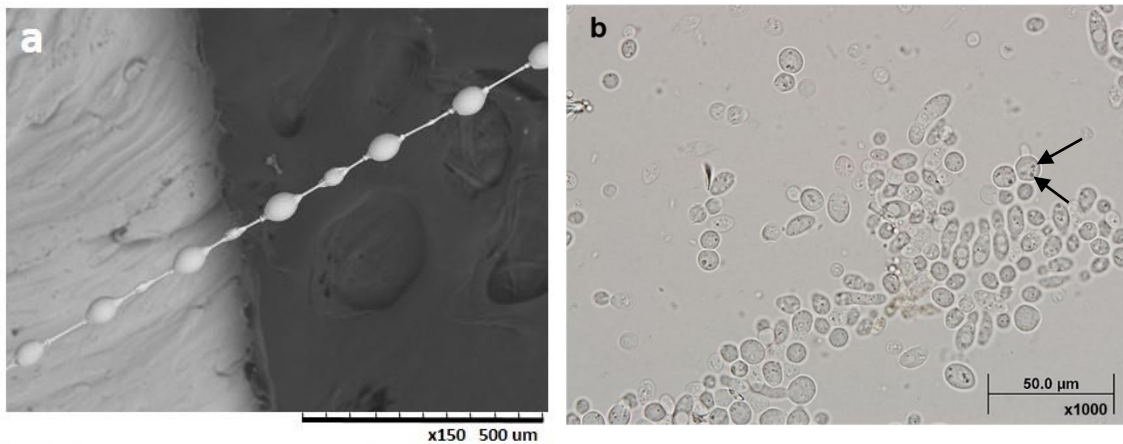
**Figura 2.** a) Esquema representativo da anatomia de aranhas, destacando a região posterior abdominal, a qual estão localizadas as glândulas produtoras de seda. b) Em detalhe as sete glândulas produtoras de seda descritas para as aranhas do gênero *Trichonephila*: ampulada maior, flageliforme, ampulada menor, piriforme, agregada, tubuliforme e aciniforme (adaptado de RÖMER et al., 2008).

As glândulas de seda, presentes na aranha *T. clavipes*, representam uma conquista fundamental para o desenvolvimento dessa espécie, uma vez que a seda é utilizada, não só na construção das teias de captura, como também nos cuidados com a prole e para atrair os machos no processo de acasalamento (Rising et al., 2005; Bittencourt et al., 2012). A geometria espacial das teias é constituída

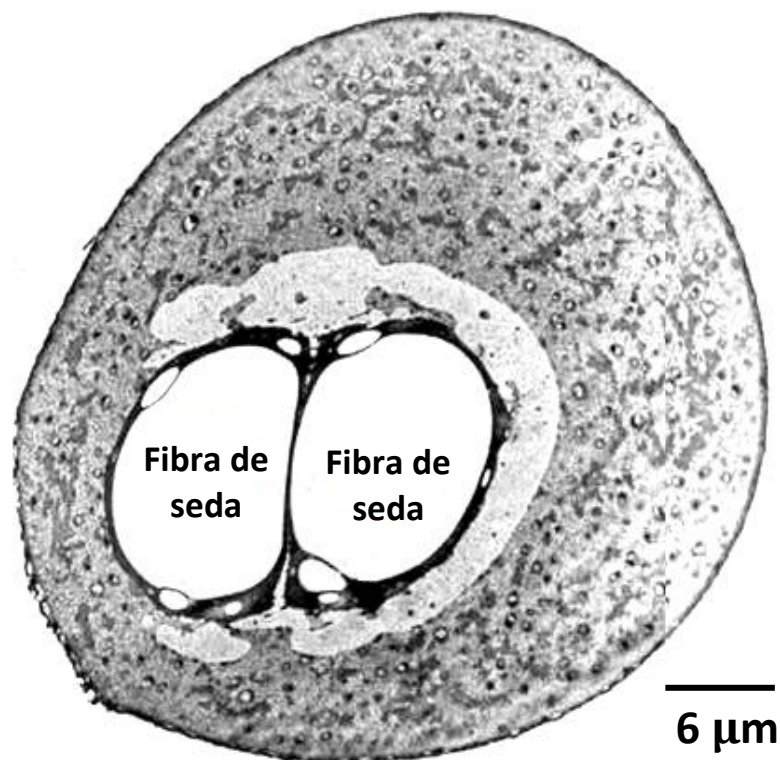
macroscopicamente por dois tipos de fios de sedas: um fio rígido, o qual estabelece a estrutura primária da teia (também chamado de *frame*), que corresponde aos fios radiais formados por fibras de seda predominantemente constituídas pelas proteínas espidroínas-1 e espidroínas-2, produzidas pela glândula ampulada maior (Rising et al., 2007; dos Santos-Pinto et al., 2014; dos Santos-Pinto et al., 2016); e um fio viscoso situado ao centro, em forma de espiral formado por fibras constituídas pelas proteínas da seda flageliforme, as quais são produzidas pela glândula flageliforme. Conhecido como fio de captura, este fio possui uma camada externa de seda adesiva não polimerizada e revestida por uma camada aquosa (Römer et al., 2008). À medida que as fibras axiais são expelidas pela glândula flageliforme, um revestimento bastante viscoso é depositado simultaneamente pela glândula agregada sobre as fibras axiais, formando gotículas, facilmente visíveis a olho nú (Salles et al., 2006; Blackledge, et al., 2009).

### **1.3. O fio viscoso - as gotículas e vesículas lipídicas depositados sobre o fio de seda**

Estudos com uma abordagem morfológica, realizados por Salles e colaboradores (2006) através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), demonstraram que a teia da aranha *T. clavipes* apresenta gotículas (40  $\mu\text{m } \Phi$ ) (Figura 4), contendo muitas vesículas lipídicas (0,4  $\mu\text{m } \Phi$ ), em suspensão dentro do interior aquoso destas gotículas. Também através de MET juntamente com técnicas de citoquímica, por reações com imidazol e ácido tânico, foi demonstrada a presença de lipídios e de conteúdo proteico aprisionado por essas vesículas. Em nossos estudos anteriores (Esteves, 2017), essas gotículas (50-100 $\mu\text{m } \Phi$ ) foram analisadas por MEV, e as vesículas lipídicas presentes no interior das gotículas foram extraídas e analisadas por microscopia de luz (ML) (Figura 3a-b). Essas vesículas (0,3-1 $\mu\text{m } \Phi$ ) revelaram aprisionar um conteúdo, que possivelmente corresponde ao mesmo tipo de conteúdo proteico que também foi identificado nos resultados de MET obtidos nos estudos realizados por Salles e colaboradores (2003).



**Figura 3. a)** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das gotículas dos fios de seda da teia da aranha *T. clavipes*. Imagem da distribuição das gotículas sobre o fio intacto da espiral de captura **b)** Microscopia de luz (ML) das vesículas lipídicas extraídas das gotículas da teia da aranha *T. clavipes*. Imagem destacando o formato globular das vesículas e o conteúdo mais denso (possivelmente proteínas e peptídeos tóxicos - apontado pelas setas pretas) armazenado no interior da vesícula. Adaptado de Esteves, 2017.



**Figura 4.** Ultra secção da gotícula envolta no fio de seda pertencente à espiral de captura da teia de *T. clavipes* - técnica de citoquímica de ácido tânico e imidazol para identificação de proteínas e lipídios respectivamente através de MET. É possível observar diversas estruturas globulares (vesículas lipídicas) suspensas dentro do conteúdo aquoso da gotícula. No interior das vesículas lipídicas há conteúdo eletrodense, que correspondem às proteínas armazenadas (figura extraída da tese de Salles, 2003).

Até o momento, nossos resultados evidenciam a presença de vesículas lipídicas extracelulares, as quais são retidas no interior das gotículas, porém ainda não foi possível verificar a composição completa (tipo de lipídios que as compõem), ou classificar com segurança a categoria a que pertence essas vesículas (como por exemplo: micela, ectossomo, exossomos e etc).

Nos estudos realizados por Esteves (2017), foi investigado o perfil químico de compostos de baixas massas moleculares, presentes nas gotículas da seda da teia da aranha *T. clavipes*, utilizando um sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente, acoplado a um detector de massas (GCxGC/MS). Nessa análise foram encontrados 316 compostos, dentre os quais, foram identificados hidrocarbonetos saturados e insaturados, ácidos carboxílicos e graxos, metil ésteres, e álcoois, onde os ácidos palmítico, oléico e linoléico foram os compostos mais abundantes presentes nas gotículas. A mesma análise com GC-MS revelou a presença de ácidos graxos saturados, insaturados e poliinsaturados, como o ácido oléico, linoléico, miristoléico e entre outros presentes nas gotículas da teia da aranha *T. clavipes* (Salles et al., 2006).

Ainda não se sabe exatamente qual é a função dos ácidos orgânicos presentes nas teias de aranhas, porém existem estudos que descrevem a ação de alguns destes ácidos como agentes tensoativos, que auxiliam no processo de desestabilização da cutícula dos artrópodes, atuando como uma ferramenta de captura e/ou defesa (Eisner et al., 1978; Wood-Manson, 1882). Como exemplo, pode-se mencionar a secreção de ácidos orgânicos (principalmente acético e caprílico) liberados pelo escorpião vinagre *Mastigoproctus giganteus*. Esses ácidos são secretados na forma de um jato de spray, pulverizado sobre o predador/presa quando o escorpião vinagre é perturbado (Wood-Manson, 1882). Atuando como um agente tensoativo, o ácido caprílico promove a propagação das gotículas liberadas pelo spray do escorpião vinagre sobre a cutícula do predador/presa; e assim, aumenta a eficácia da área de contato e penetração do ácido acético através do tegumento do predador/presa, provavelmente pelo aumento da permeabilidade da barreira lipídica epicuticular (Bettini, 1978). Além dos ácidos citados acima, também foi identificado nas gotículas da teia da aranha *T. clavipes*, o ácido dodecanóico, o qual mostrou exercer ação repelente à formigas invasoras *Nylanderia fulva*, consideradas insetos oportunistas que roubam os recursos nutricionais da teia (Esteves, 2017). Assim como, Zhang e colaboradores (2011) demonstraram que o composto 2-pirrolidinona isolado da teia de *Trichonephila antropodiana* tem efeito repelente a algumas espécies de formigas

como *Pheidole angulicollis* e *Monomorium pharaonis*. Mais detalhes sobre a composição química das gotículas da aranha *T. clavipes* serão discutidos no próximo capítulo.

Como mencionado acima, ainda pouco se sabe sobre a composição lipídica e funcionalidade das gotículas e vesículas lipídicas extracelulares na teia. Dessa forma, neste capítulo serão discutidos os resultados desde aspectos morfológicos e químicos das gotículas e vesículas lipídicas, a fim de entender melhor os papéis das mesmas no que se refere a estratégia de captura de presas pela teia da aranha *T. clavipes*. Sendo assim, através de análises semi-quantitativas do extrato vesicular da teia, foi estimada para uma única teia, a quantidade de vesículas lipídicas aprisionadas pelas gotículas e a quantidade de proteínas/peptídeos que são aprisionados por essas vesículas. Em seguida, são apresentados os resultados da investigação do perfil lipídico da seda da teia da aranha *T. clavipes*, através da separação da porção lipídica da teia, e injeção direta desta porção em espectrômetro de massas do tipo microQ-TOF.

Além disso, é importante retomar aqui que a glândula agregada é a responsável por depositar sobre a teia as gotículas e conseqüentemente as vesículas que estão aprisionadas em seu interior. Dessa forma, foi realizado um exame por microscopia de luz da glândula agregada, a fim de observar se o processo de formação das vesículas pode estar diretamente relacionado com o mecanismo de secreção desta glândula. Por fim, através de análise de GCxGC-MS, também foram investigados os compostos de baixas massas moleculares presentes na secreção da glândula agregada, a fim de explorar os compostos que estão envolvidos na formação das gotículas e vesículas secretados por esta glândula.

## 2. OBJETIVOS

1. i) Estimar a quantidade de vesículas lipídicas aprisionadas dentro das gotículas, através da contagem em câmara de Neubauer; ii) estimar a massa de vesículas por teia, através da medida de peso seco; iii) quantificar as proteínas/peptídeos aprisionadas por essas vesículas, através de espectrofotometria de fluorescência;
2. Investigar e elucidar o perfil lipídico presente na seda da teia - gotículas e vesículas lipídicas, por injeção direta em espectrômetro de massas do tipo microQ-TOF;
3. Investigar a morfologia da glândula agregada, a qual deposita as gotículas sobre a seda, por cortes histológicos através de microscopia de luz (ML);
4. Investigar e elucidar o perfil químico de compostos de baixas massas moleculares presentes no secretoma da glândula agregada, através da análise por GCxGC-MS;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção da glândula agregada e da seda da teia da aranha *T. clavipes***

As aranhas *T. clavipes* e suas teias foram coletadas na cidade de Santa Gertrudes/SP, de maneira georreferenciada (22°39'64.55"S 47°54'52.66"W). As aranhas foram dissecadas para a retirada da glândula agregada, a qual é responsável por produzir e depositar as gotículas sobre a teia.

#### **3.2. Análise semi-quantitativa da porção vesicular da teia**

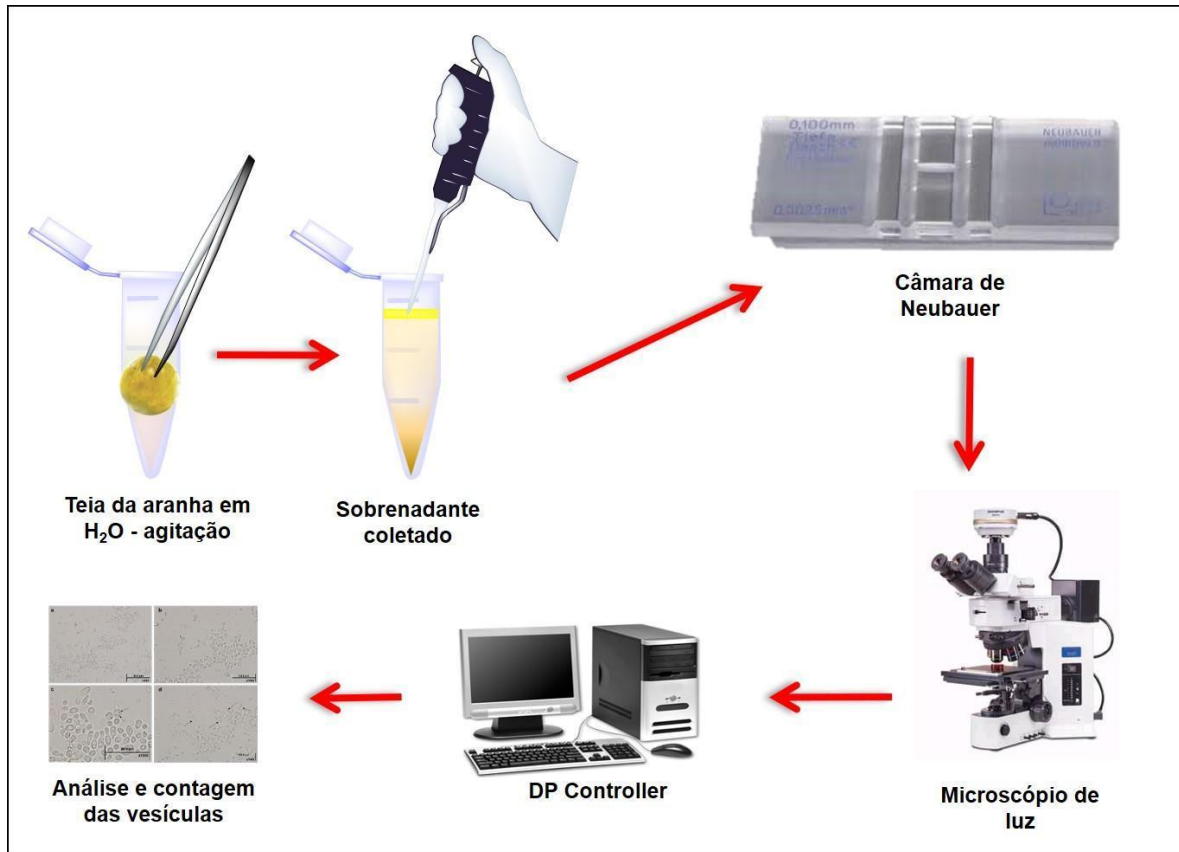
##### **3.2.1. Contagem das vesículas extracelulares presentes na porção vesicular da teia através de Câmara de Neubauer**

A técnica de contagem através da câmara de Neubauer foi realizada com a finalidade de quantificar as vesículas lipídicas extracelulares, as quais se encontram retidas no interior das gotículas oleosas, que por sua vez, estão depositadas sobre os fios de captura da teia, conforme representado na figura 3.

Primeiramente foi obtida a porção vesicular da teia. Para isso, as teias orbitais foram coletadas no campo, e limpas com o auxílio de pinças para a retirada de partículas contaminantes, restos de insetos, folhas e galhos aderidos à seda. Os fios de seda foram "lavados" com água (Milli-Q) à 25°C, sob leve agitação por 4 horas (190mg de teia/1mL de água). Após esse período, a amostra foi deixada em repouso, e por decantação duas fases foram separadas: uma fina camada oleosa sobrenadante, e uma fase aquosa mais densa. A fase sobrenadante, a qual denominamos de porção vesicular da teia, foi coletada (350µL) e inserida em um novo microtubo, a mesma foi diluída em água a uma proporção 1:200.

Para a determinação da contagem total de vesículas lipídicas extracelulares, 10µL da porção vesicular da teia foi inserida na câmara de Neubauer (Boeco - 1/10 mm). Em seguida, foi realizada a contagem de vesículas por mL da porção vesicular da teia, em cinco quadrantes da câmara através do microscópio de luz (Olympus, BX51). Para localizar os cinco quadrantes maiores utilizou-se o aumento de 100x e para efetuar a contagem utilizou-se o aumento de 400x no microscópio. As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, acoplada ao microscópio; e para a aquisição das imagens foi utilizado o software DP Controller (Figura 5). Não foi realizado nenhum tipo de coloração da amostra. O cálculo do número de vesículas extracelulares por mL foi determinado conforme a fórmula abaixo (Lee et al., 1981):

$$\text{Vesículas/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de vesículas contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contatos}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$



**Figura 5.** Esquema representativo da preparação de amostra, para a análise quantitativa por câmara de Neubauer. Coleta da teia e separação da camada oleosa extraída das gotículas presentes nos fios de seda. Essa separação ocorreu em água, sob agitação durante um período de 4 horas. Posteriormente o microtubo foi deixado em repouso para que houvesse a separação das fases pelo processo de decantação. A camada sobrenadante denominada de porção vesicular da teia, que corresponde a uma fina camada de óleo, foi coletada e inserida em câmara de Neubauer e coberta por lamínula, para ser analisada e as vesículas contadas através da observação por microscopia de luz.

### 3.2.2. Quantificação por peso seco e quantificação das proteínas/peptídeos presentes no extrato da porção vesicular da teia

Com o mesmo extrato vesicular que foi realizada a contagem de vesículas em câmara de Neubauer, também foi realizada a quantificação por peso seco. E por fim, foi quantificado as proteínas/peptídeos deste mesmo extrato vesicular da teia através do kit Qubit® Protein Assay (Life Technologies - Qubit® 3.0 fluorometer), conforme instruções do fabricante.

### **3.3. Caracterização do perfil lipídico da teia**

#### **3.3.1. Extração dos lipídios da teia**

A porção oleosa da teia foi separada assim como descrito na seção de materiais e métodos 3.2.1. Analisando a literatura, observou-se que dentre os métodos de extração de lipídios, a extração utilizando o clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$  - base das extrações descritas em Bligh & Dyer, 1959) é a que apresenta a maior eficiência de extração em relação aos diferentes tipos de lipídios (Sarafian et al., 2014), tanto para amostras de origem vegetal como animal (Brum et al., 2009).

Dessa forma, a extração dos fosfolipídios da camada oleosa da teia foi realizada conforme descrito no método desenvolvido por Bligh e Dyer (1959). Este tipo de extração consiste na formação de um sistema bifásico baseado na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água). Dessa forma, no microtubo contendo 80 $\mu\text{L}$  da camada oleosa da teia, foi adicionado 200 $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Sigma-Aldrich), 200 $\mu\text{L}$  de metanol (Sigma-Aldrich) e 100 $\mu\text{L}$  de água (Milli-Q). Posteriormente, esta solução foi agitada e em seguida deixada em repouso para que finalmente a fase clorofórmica (aquela em que contém os lipídios) fosse coletada e injetada de forma direta no espectrômetro de massas.

#### **3.3.2. Análise de espectrometria de massas da porção oleosa da teia**

Para as análises de espectrometria de massas foi utilizado um espectrômetro do tipo  $\mu\text{LC-ESI-microTOF-Q-III}$  (Bruker Daltonics), para a detecção dos fosfolipídios. 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 negativo, utilizando o princípio de dissociação de íons CID (dissociação induzida por colisão) e o hélio como gás de colisão, a uma pressão de 100kPa, energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz. Antes das análises, o espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução calibrante de formiato de sódio.

### 3.3.3 Identificação dos lipídios da porção oleosa da teia

Os dados de espectrometria de massas foram analisados e validados com o auxílio dos softwares DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) e Peaks 7 (Complete software for proteomics).

Inicialmente a identificação dos lipídios foi realizada conforme descrito por Ribeiro (2017). Dessa forma, a identificação dos compostos mais intensos foi realizada através da submissão dos valores de massas experimentais obtidos em bancos de dados específico - The LIPID MAPS® Structure Database (LMSD). A diferença de massa (teórica e experimental) máxima considerada para esta análise foi de  $\pm 0,5$  Da. Os *features* foram classificados usando o Sistema de Classificação de Lipídios LIPID MAPS, em 6 diferentes categorias (*Fatty Acyls* [FA], *Glycerolipids* [GL], *Glycerophospholipids* [GP], *Sphingolipids* [SP], *Sterol lipids* [ST] e *Polyketides* [PK] - (<https://www.lipidmaps.org/resources/databases/index.php>). Por fim, avaliou-se qual classe de lipídios tinha o maior número de *matches* para cada *feature*.

### 3.4. Microscopia de luz da glândula agregada

A glândula agregada foi fixada em paraformaldeído 4% (v/v) em água. Posteriormente, foram desidratadas em uma série crescente de tratamento com álcool (15% a 95%). Em seguida a amostra foi transferida para a resina de embebição (*overnight*) e incluída em historresina. Os cortes foram realizados em micrótomo (Leica), com espessura de 6  $\mu\text{m}$ , e posicionadas sobre lâminas histológicas, as quais foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE). As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio (Olympus, BX51). Para a aquisição das imagens foi utilizado o software DP Controller.

### 3.5. Perfilagem química dos compostos de baixa massas moleculares da glândula agregada

#### 3.5.1. Extração dos compostos de baixa massas moleculares da glândula

Para as análises do perfil químico dos compostos de baixa massa molecular, a glândula agregada foi levemente pressionada em solução contendo hexano 95% (Sigma-Aldrich) à 25°C, sob agitação por 4h. Após esse período, a amostra foi

centrifugada a 8000 x g por 15 minutos, com o sobrenadante sendo coletado e imediatamente analisado no sistema GCxGC-MS.

### **3.5.2. Análise dos compostos de baixas massas moleculares por cromatografia bidimensional abrangente (GCxGC), acoplada ao detector de massas**

Como equipamento analítico foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente, acoplado a um detector de massas (GCxGC/MS, Shimadzu, mod. QP2010 Ultra). A separação cromatográfica foi realizada em duas colunas capilares conectadas em série, localizadas em um mesmo forno. A primeira coluna foi uma DB-1-5MS (Agilent) (com fase estacionária apolar: 100% Dimetilpolisiloxano; com dimensões de 15m x 0.25mm DI, 1µm de filme), utilizada na primeira dimensão para separação por ponto de ebulição; e a segunda coluna foi uma BPX-50 (SGE) (com fase estacionária polar: 50% Fenilpolisilfenileno Siloxano, com dimensões de 2.75 m x 0.1 mm DI, 0.1 µm de filme), usada na segunda dimensão para separação por polaridade.

Utilizou-se o gás Hélio (pureza 99.995%) como carreador, a um fluxo constante de 9,8 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna variou de 90 °C a 296 °C em um gradiente não linear de 126,5 minutos. A temperatura inicial de 90° C permaneceu por 5 minutos, aumentando-se então gradativamente a uma inclinação de 4° C /min até 240 °C; após esse tempo a temperatura aumentou a uma inclinação de 1 °C/min até alcançar a temperatura de 285 °C, que foi mantida 8 minutos. Então, aumentou-se a temperatura à uma inclinação de 1 °C/min até a temperatura de 296 °C, a qual foi mantida nos 20 minutos finais de análise.

O atraso de solvente foi de 5 minutos e o tempo de equilíbrio de 3 minutos. A porta de injeção foi mantida aquecida a 280 °C e 1µL da amostra foi injetada no modo “splitless” (50s). O eluente da coluna de GC foi transferido via uma linha de transferência aquecida a 270 °C e introduzido em uma fonte de ionização por impacto eletrônico (EI) ajustada para 70 eV, e mantida a 230 °C. Os dados foram adquiridos e processados utilizando-se o programa Shimadzu GC Solution e para edição e construção de gráficos de imagem utilizou programa o GC Image R2.2 (GCxGC Edition).

Como sistema de modulação foi utilizado o modulador de loop fornecido pela ZOEEX, mod. ZX-2. O sistema de modulação é composto por 2 jatos (dualjet) mais a região do trapping loop. Os jatos utilizam gás nitrogênio à um fluxo de

aproximadamente 6L/min. Um jato libera ar frio permanecendo aberto constantemente, enquanto que o outro jato libera ar quente periodicamente. Foi estabelecido um período de modulação de 7,5 segundos. A duração do jato quente (tempo em que o mesmo permanece aberto) variou de 220-950 milisegundos, a uma temperatura de 275°C.

Os compostos foram inicialmente identificados por comparação com a biblioteca de espectros de massas NIST MS 11, 2011. Além da comparação de seus tempos de retenção e espectros de massas obtidos no modo SCAN (varredura de espectro) com padrões de alcanos saturados (C7-C40) (Sigma-Aldrich) Catalog 49452-U e alguns ácidos graxos (C16:1, C18:1, C18:2) (Sigma-Aldrich) UN10-1KT.

## **4.RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Análise semi-quantitativa da porção vesicular da teia**

Os resultados serão apresentados e discutidos de forma que a leitura do texto e interpretação dos dados, no decorrer deste capítulo, possa ocorrer de maneira compreensível, mas não necessariamente refletem a ordem em que o estudo foi realizado.

Diferentes métodos de quantificação foram determinantes para obter valores semi-quantitativos acerca do extrato vesicular da teia. Primeiramente foi realizada a contagem das vesículas extracelulares, presentes no extrato da porção vesicular da teia, através da Câmara de Neubauer. Em seguida, foi realizada a quantificação do extrato da porção vesicular da teia por peso seco, e por fim, foram quantificadas as proteínas/peptídeos presentes neste mesmo extrato por espectrofotometria de fluorescência.

#### **4.1.1. Contagem das vesículas extracelulares, presentes no extrato da porção vesicular da teia, através da Câmara de Neubauer**

A técnica de contagem através da câmara de Neubauer foi realizada com a finalidade de quantificar as vesículas lipídicas extracelulares, presentes no extrato vesicular da teia. A câmara de Neubauer (CNB) consiste em uma lâmina de microscopia com espessura bem maior que uma lâmina normal, onde existe marcação de área que permite, através de uso de uma lamínula de cobertura, determinar o volume da amostra contida em cada espaço determinado por quadrantes. Sendo assim, após contagem do número vesículas lipídicas extracelulares nesses quadrantes, foi possível determinar o número dessas vesículas/mL da porção vesicular da teia.

Inicialmente foi colocado em microtubo de vidro 190mg de teia em 1 mL de água Milli-Q, o microtubo foi mantido sob leve agitação por 4 horas. Assim como descrito na seção de materiais e métodos 3.2.1., após esse período a amostra foi deixada em repouso, ocorrendo a formação de uma fina camada oleosa sobrenadante com um volume de 350µL. Essa fase sobrenadante, denominada de porção vesicular da teia, foi coletada e colocada em um novo microtubo, a mesma foi diluída em uma proporção 1:200. Após a contagem do número de vesículas lipídicas extracelulares nos quadrantes da CNB, os valores foram aplicados à fórmula descrita na seção 3.2.1

(Figura 6). Esse resultado mostrou que em 350µL da porção vesicular da teia existem 105.070.000 de vesículas lipídicas extracelulares.

$$\text{Vesículas/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de vesículas contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contatos}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

$$\text{Vesículas/mL} = 150,1 \times 200 \times 10^4$$

$$\text{Vesículas/mL} = 300.200.000$$

$$\text{Vesículas/350}\mu\text{L} = 105.070.000$$

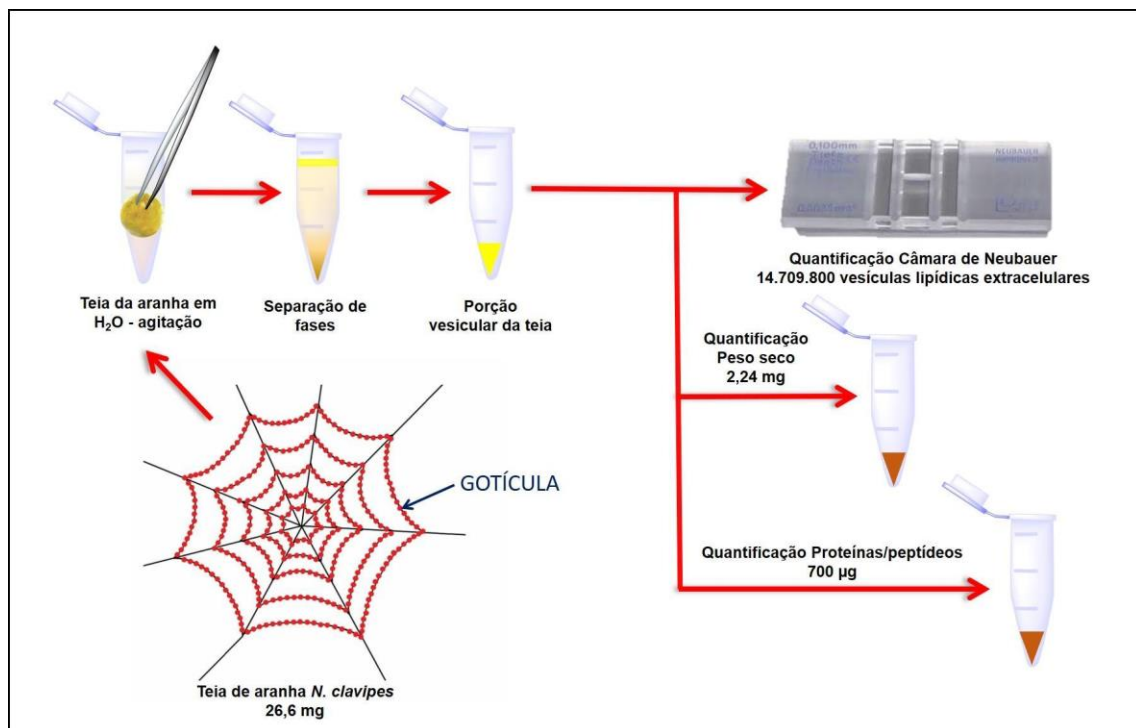
**Figura 6.** Fórmula utilizada para a realização do cálculo do número de vesículas extracelulares por mL. Dessa forma, foi possível estimar a quantidade real dessas vesículas lipídicas extracelulares, presentes na porção vesicular da teia.

#### **4.1.2. Quantificação por peso seco e quantificação das proteínas/peptídeos presentes no extrato da porção vesicular da teia**

Após estimar a quantidade de vesículas, resolvemos quantificar a porção vesicular da teia por peso seco. Esse resultado mostrou que, em 350µL da porção vesicular da teia existem 16 mg totais de massa (considerando todas as moléculas que possam estar presentes nesse extrato). Para essa mesma porção vesicular da teia, foi realizada uma quantificação de proteínas/peptídeos presentes no extrato. Essa quantificação foi realizada através do kit Qubit® Protein Assay (Life Technologies - Qubit® 3.0 fluorometer), e o resultado mostrou que, em 16 mg totais da porção vesicular da teia existem 5 mg de proteínas/peptídeos. Podemos sugerir que essa quantidade (5 mg de proteínas/peptídeos) está distribuída de forma aprisionada homogeneamente nas 105.070.000 vesículas lipídicas extracelulares (valor estimado no cálculo do número de vesículas extracelulares por mL da porção vesicular da teia). E ainda, de acordo com esses resultados, podemos sugerir que cada vesícula lipídica aprisiona  $\cong$  47 pg de proteínas/peptídeos em seu interior. Sendo assim, cerca de 1/3 do peso seco (16 mg) da porção vesicular da teia é constituída de proteínas/peptídeos.

A partir deste momento os valores que serão apresentados, são aproximados, os quais foram inferidos com base nos cálculos realizados anteriormente. Para realização de todos os cálculos de quantificações, mostrados acima, foi utilizado o mesmo extrato de teia (190mg/mL de água), o qual foi constituído de 7 teias para o

seu preparo. Dessa forma, para uma única teia pesando 26,6 mg, o peso seco da sua porção vesicular é de 2,24 mg, contendo 700 µg de proteínas/peptídeos que estão aprisionados em 14.709.800 vesículas lipídicas extracelulares; de forma que cada vesícula lipídica aprisiona  $\cong$  47 pg de proteínas/peptídeos em seu interior. A figura 7 representa, de forma simplificada, o procedimento realizado para a quantificação estimada da porção vesicular de uma única teia, considerando que a mesma possa estar no seu meio natural para a captura de presas.



**Figura 7.** Esquema representativo dos diferentes métodos de quantificação da porção vesicular da teia. Inicialmente a porção vesicular foi submetida a análise em câmara de Neubauer para obter o número de vesículas lipídicas extracelulares/teia; com a mesma porção vesicular foi realizada a quantificação por peso seco e a quantificação de proteínas/peptídeos.

#### 4.2. Caracterização do perfil lipídico da teia da aranha *T. clavipes*

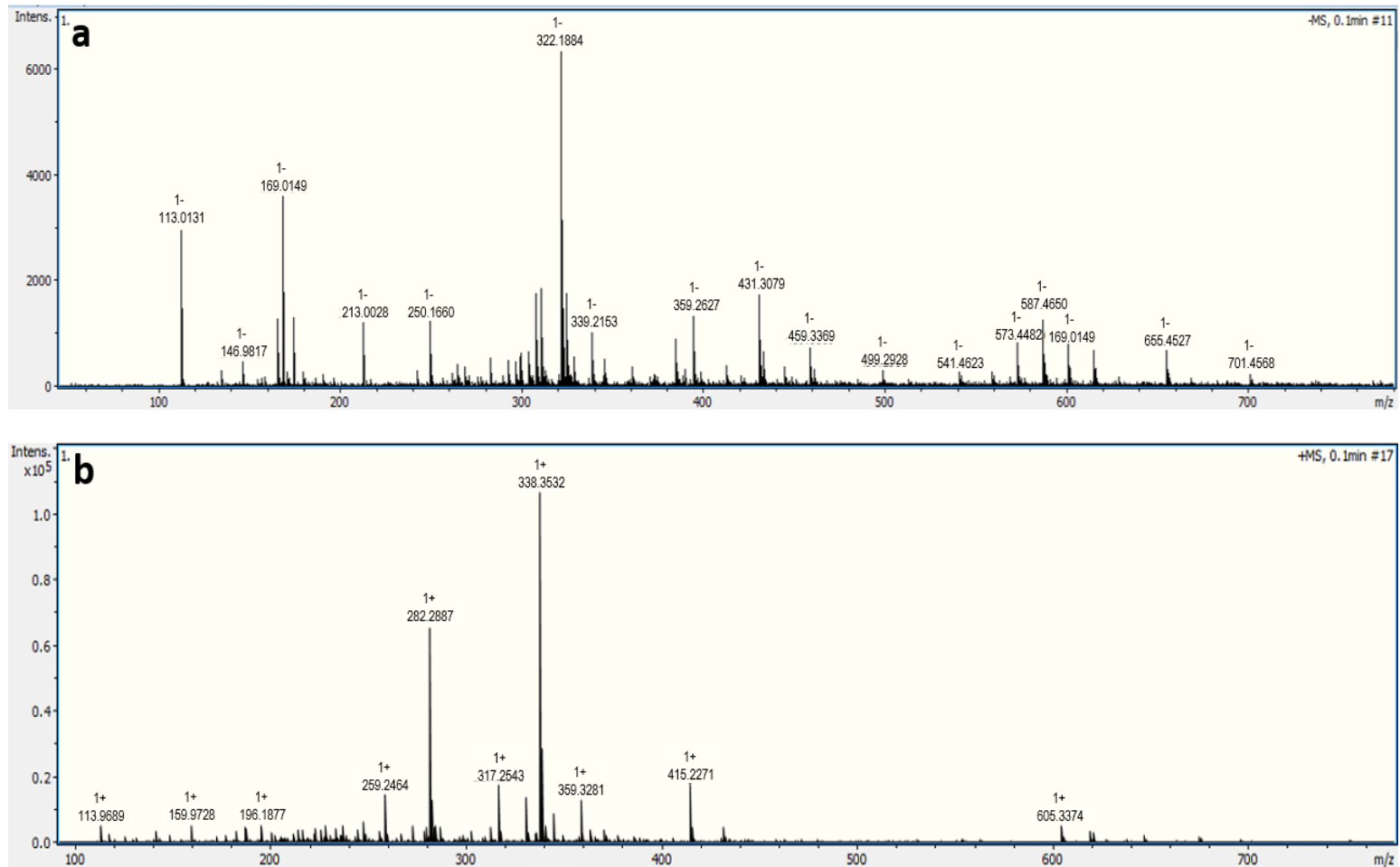
Através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), foi demonstrado que a teia da aranha *T. clavipes* apresenta gotículas contendo muitas vesículas lipídicas em suspensão no interior aquoso destas gotículas (Sales et al., 2006; Santos et al., 2015; Esteves et al., 2020). Através de microscopia de luz (ML) também foi evidenciado a presença dessas vesículas lipídicas, as quais são retidas no interior das gotículas, porém ainda não foi possível identificar quais lipídios constituem essas vesículas (Esteves 2017).

O estudo da composição e da classificação das gotículas e vesículas da teia se faz necessário, uma vez que ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo

de penetração dessas gotículas e vesículas lipídicas pelo corpo (cutícula) e tecido mole do inseto, conforme hipótese elaborada e descrita na seção “Introdução geral”. Sendo assim, no presente estudo a porção oleosa da teia da aranha *T. clavipes* foi separada, com a finalidade de explorar e caracterizar o perfil lipídico que constituem as gotículas e as vesículas – a extração e análise dos lipídios foram realizadas segundo protocolo descrito na seção de materiais e métodos 3.3.

A figura 8 apresenta os perfis dos espectros de massas adquiridos nos modos positivo e negativo, após a injeção direta do conteúdo lipídico extraído da teia da aranha *T. clavipes*. Foram identificados 44 valores de  $m/z$  no modo ESI positivo e 30 valores de  $m/z$  no modo ESI negativo, sendo que 5 identificações com mesmo valor de massa molecular apareceram em ambos os modos, ESI positivo e negativo (MM: 298 Da, 312 Da, 330 Da, 434 Da e 574 Da – todos classificados como *Fatty acyls*).

Na tabela 1 estão apresentados os valores de  $m/z$  adquiridos no modo ESI positivo e negativo, a massa molecular (Mm), e a possível classe de lipídio correspondente a massa molecular, de acordo com o Sistema de Classificação de Lipídios do LIPID MAPS (<https://www.lipidmaps.org/resources/databases/index.php>). Após a classificação dos lipídios detectados e mostrados genericamente nas figuras 9-11, é possível observar as classes de lipídios e suas respectivas porcentagens que compõem o perfil lipídico total da teia (modo ESI positivo + ESI negativo), e também o perfil lipídico para o modo ESI positivo e ESI negativo separadamente.



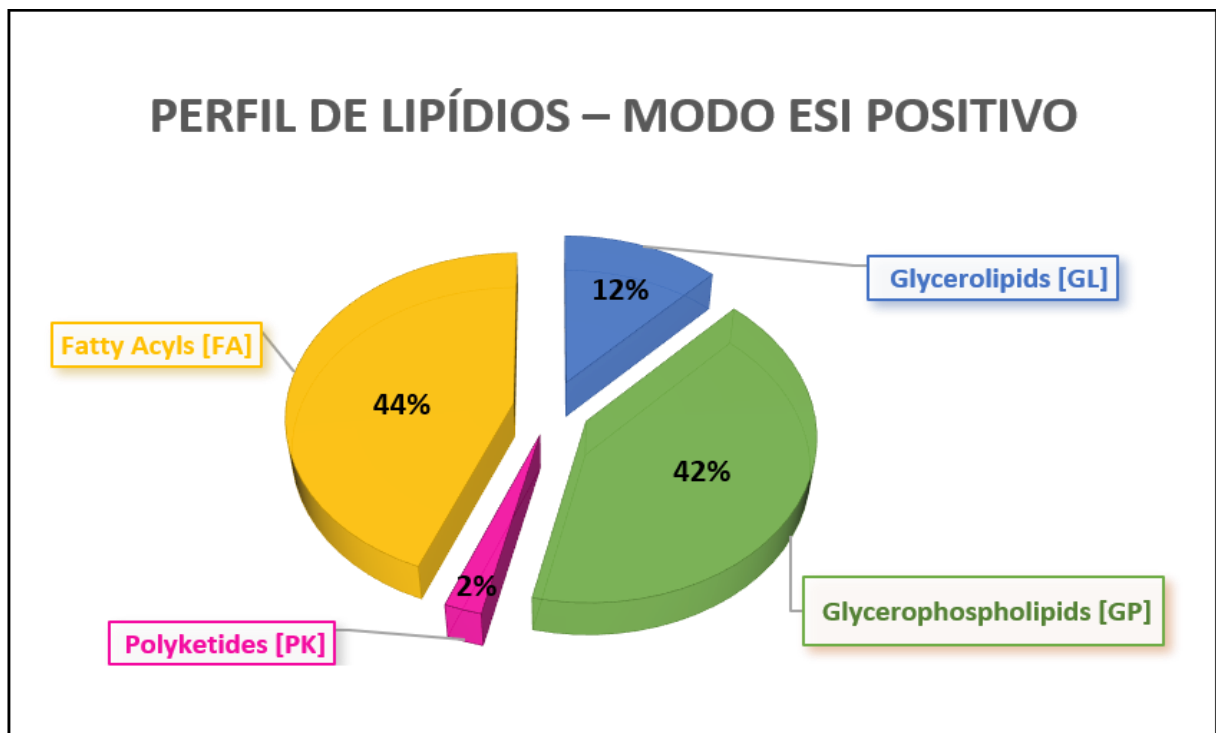
**Figura 8.** Espectros ESI-MS nos modos negativo (**a**) e positivo (**b**) da porção lipídica da teia da aranha *T. clavipes*. Os valores de m/z detectados estão na forma  $[M + H]^+$  para o modo positivo, e na forma  $[M - H]^-$  para o modo negativo.

**Tabela 1.** Identificação do perfil lipídico presente na amostra da porção oleosa da teia da aranha *T. clavipes*, mostrando os valores de m/z, massa molecular (Mm), número (#) de possíveis identificações para cada lipídio detectado - para ambos os modos de análises ESI (positivo e negativo).

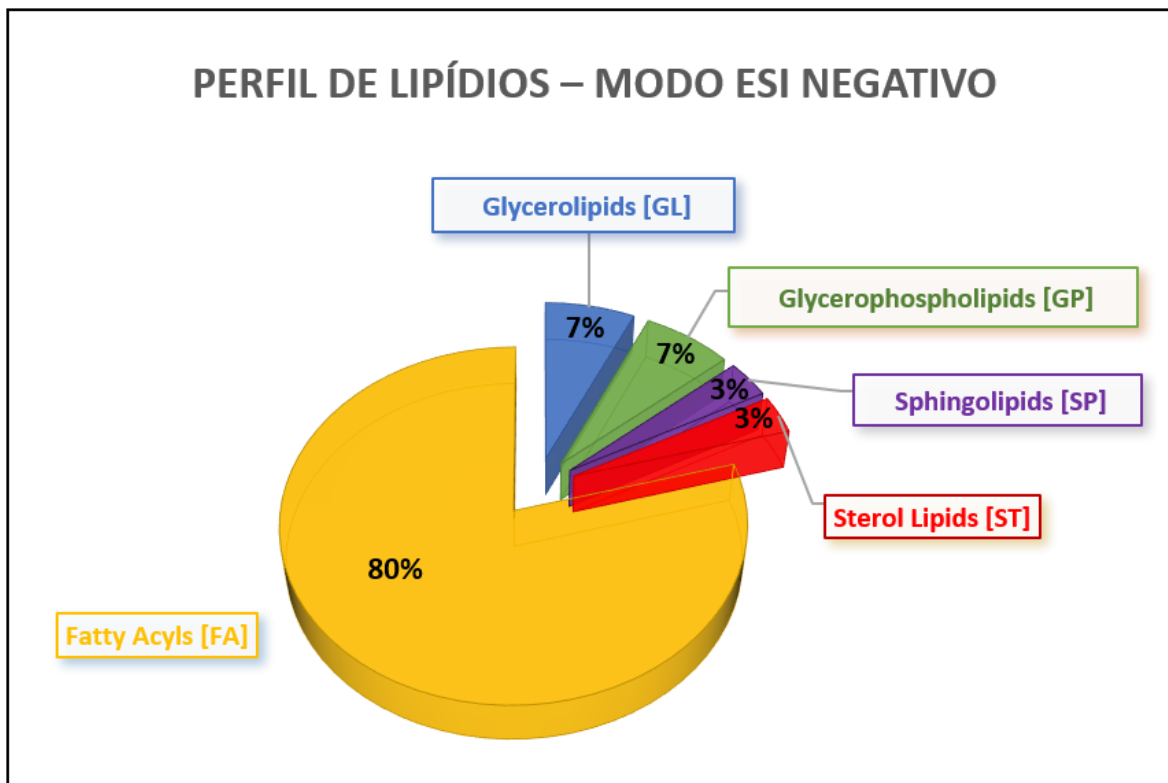
m/z	Mm	# possíveis identificações	Classe de lipídio	Modo ESI
113,0136	114,0136	48 ID	Fatty acyls [FA]	-
166,0433	167,0433	-	-	-
180,0581	181,0581	1 ID	Fatty acyls [FA]	-
197,1891	196,1891	72 ID	Fatty acyls [FA]	+
250,1635	251,1635	1D	Fatty acyls [FA]	-
259,2464	258,2464	31 ID	Fatty acyls [FA]	+
262,1324	263,1324	2 ID	Fatty acyls [FA]	-
273,2623	272,2623	109 ID	Fatty acyls [FA]	+
282,2887	281,2887	2 ID	Fatty acyls [FA]	+
283,2883	282,2883	118 ID	Fatty acyls [FA]	+
285,2259	284,2259	116 ID	Fatty acyls [FA]	+
287,2779	286,2779	134 ID	Fatty acyls [FA]	+
297,1754	298,1754	160 ID	Fatty acyls [FA]	-
299,2428	298,2428	160 ID	Fatty acyls [FA]	+
299,2557	300,2557	187 ID	Fatty acyls [FA]	-
300,2523	301,2523	8 ID	Fatty acyls [FA]	-
303,238	302,2380	127 ID	Fatty acyls [FA]	+
304,1794	305,1794	2 ID	Sphingolipids [SP]	-
308,1745	309,1745	2 ID	Fatty acyls [FA]	-
309,1789	310,1789	82 ID	Fatty acyls [FA]	-
311,1889	312,1889	128 ID	Fatty acyls [FA]	-
313,2604	312,2604	128 ID	Fatty acyls [FA]	+
317,2543	316,2543	164 ID	Fatty acyls [FA]	+
322,1902	323,1902	1 ID	Fatty acyls [FA]	-
323,1923	324,1923	69 ID	Fatty acyls [FA]	-
324,1876	325,1876	12 ID	Fatty acyls [FA]	-
325,2046	326,2046	102 ID	Fatty acyls [FA]	-
329,2644	330,2644	165 ID	Fatty acyls [FA]	-
331,2844	330,2844	140 ID	Glycerolipids [GL]	+
338,3532	337,3532	5 ID	Fatty acyls [FA]	+
339,3563	338,3563	103 ID	Fatty acyls [FA]	+

339,2202	340,2202	73 ID	Fatty acyls [FA]	-
345,2864	344,2864	280 ID	Glycerolipids [GL]	+
346,256	347,2560	4 ID	Fatty acyls [FA]	-
385,3033	386,3033	71 ID	Fatty acyls [FA]	-
395,2648	396,2648	84 ID	Glycerophospholipids [GP]	-
415,2271	414,2271	102 ID	Fatty acyls [FA]	+
431,3075	432,3075	139 ID	Fatty acyls [FA]	-
432,2512	431,2512	6 ID	Sphingolipids [SP]	+
433,3241	434,3241	132 ID	Fatty acyls [FA]	-
435,3938	434,3938	134 ID	Fatty acyls [FA]	+
443,2867	442,2867	56 ID	Fatty acyls [FA]	+
445,3246	446,3246	113 ID	Fatty acyls [FA]	-
448,2982	449,2982	7 ID	Sterol Lipids [ST]	-
459,3408	460,3408	66 ID	Fatty acyls [FA]	-
472,249	471,2490	2 ID	Fatty acyls [FA]	+
480,1784	479,1784	16 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
500,2787	499,2787	7 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
531,2921	530,2921	20 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
554,565	553,5650	8 ID	Sphingolipids [SP]	+
563,5618	562,5618	32 ID	Fatty acyls [FA]	+
573,4452	574,4452	21 ID	Fatty acyls [FA]	-
575,4908	574,4908	21 ID	Fatty acyls [FA]	+
579,5505	578,5505	86 ID	Glycerolipids [GL]	+
587,4674	588,4674	18 ID	Glycerolipids [GL]	-
601,4841	602,4841	25 ID	Glycerolipids [GL]	-
605,3374	604,3374	28 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
606,3457	605,3457	9 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
610,4047	609,4047	16 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
619,6352	618,6352	31 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
621,3303	620,3303	40 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
622,3354	621,3354	16 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
628,2208	627,2208	9 ID	Polyketides [PK]	+

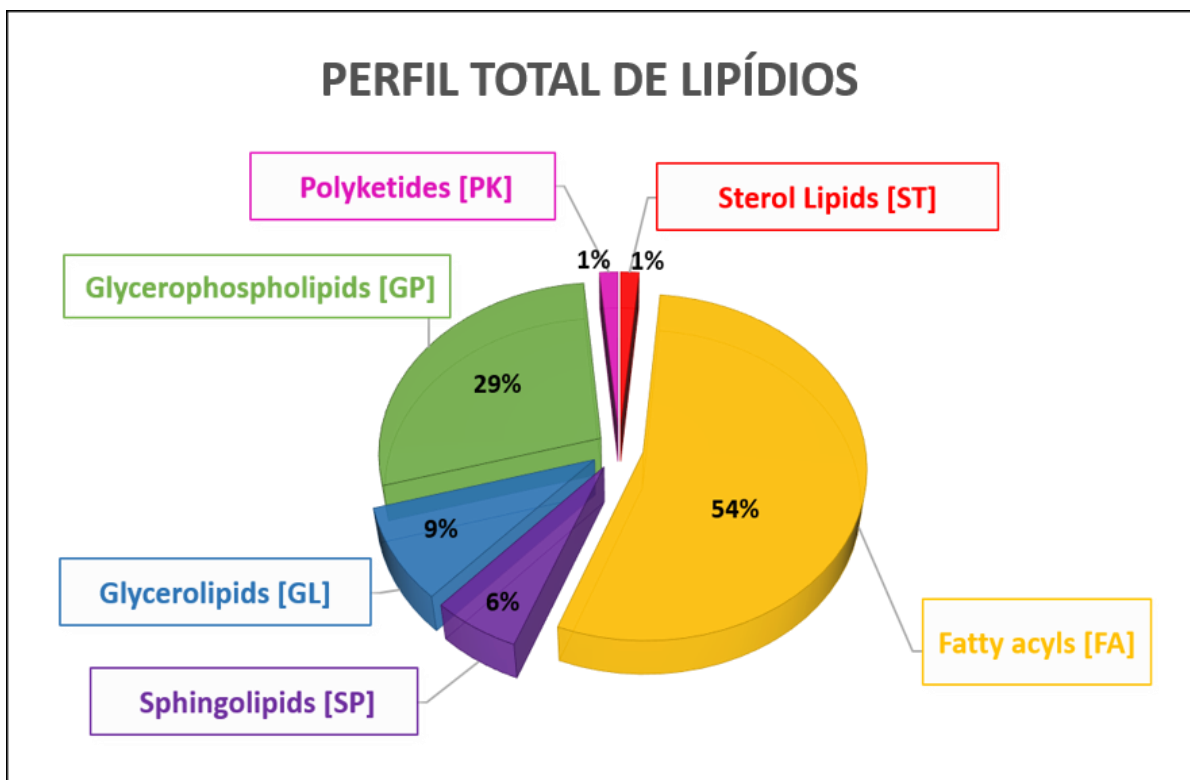
638,3512	637,3512	10 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
647,4806	646,4806	43 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
663,4795	662,4795	39 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
675,6923	674,6923	45 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
695,3943	694,3943	41 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
696,6760	695,6760	15 ID	Sphingolipids [SP]	+
702,2373	701,2373	32 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
708,4931	709,4931	13 ID	Glycerophospholipids [GP]	-
710,5079	709,5079	13 ID	Glycerophospholipids [GP]	+
717,6460	716,6460	52 ID	Glycerolipids [GL]	+
752,5636	751,5636	33 ID	Glycerophospholipids [GP]	+



**Figura 9.** Classes de lipídios presentes no extrato oleoso da teia da aranha *T. clavipes* obtidas usando o banco de dados do LIPID MAPS no modo ESI positivo.



**Figura 10.** Classes de lipídios presentes no extrato oleoso da teia da aranha *T. clavipes* obtidas usando o banco de dados do LIPID MAPS no modo ESI negativo.



**Figura 11.** Classes de lipídios totais (ESI positivo + ESI negativo) presentes no extrato oleoso da teia da aranha *T. clavipes* obtidas usando o banco de dados do LIPID MAPS.

Os resultados da tabela 1 mostram que 69 lipídios de diferentes tipos foram detectados nas análises. Inicialmente foi definido apenas a possível categoria lipídica que cada um está inserido. E isso foi realizado através da comparação dos valores de massa molecular obtidos experimentalmente com valores de massas teóricas depositados no banco de dados LIPID MAPS – (<https://www.lipidmaps.org/resources/databases/index.php>). Ainda na tabela 1 podemos observar que a partir de um único valor de massa foi possível obter dezenas ou até centenas de identificações, pois dentre os diferentes tipos de lipídios, muitos são isômeros e/ou isóbaros, quando comparados entre si. A elucidação estrutural destes compostos, exige o uso de padrões específicos para cada composto.

Dessa forma, diante da riqueza de lipídios encontrados nas amostras, e das dificuldades de se elucidar as estruturas químicas, optou-se inicialmente pelo uso da classificação geral dos mesmos, conforme mostrado nas figuras 9-11. Os resultados destas figuras revelam que os lipídios encontrados nas gotículas da teia de *T. clavipes* são de seis diferentes categorias: ácidos graxos, glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, esterolipídeos e poliquetídeos.

Considerando-se as classes lipídicas de glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, e esterolipídeos nas proporções em que as mesmas foram detectadas, sugere fortemente que estes compostos são constituintes de membranas plasmáticas das células secretoras que estão presentes nas glândulas de seda das aranhas. Possivelmente, com o rompimento dessas células durante o processo secretório (Salles et al., 2006), os compostos lipídicos liberados podem formar as membranas das vesículas lipídicas sob investigação no presente trabalho.

Já os poliquetídeos têm sido descritos como metabólitos secundários produzidos por bactérias (antibióticos), fungos (toxinas) e algumas plantas (pigmentos), a partir de ésteres de cadeia curta da coenzima A (Martin, 1992). Esta classe de compostos pode estar presente nas gotículas oleosas das teias através de contaminação das secreções glandulares por fungos ou bactérias que frequentemente se associam as aranhas (Johnson et al., 2009; Costa, 2014), ou a partir de regurgitação de fluidos digestivos das presas (insetos fitófagos).

Através dos resultados das figuras 9-11 podemos observar que para ambos os modos ESI positivo e negativo, a classe funcional de *Fatty acyl* apresentou-se em maior porcentagem, correspondendo a 54% do perfil lipídico total da teia. Esta classe de lipídios compreende principalmente aos ácidos e ésteres graxos. Isto corrobora

com os dados obtidos por Esteves et al (2020), que identificou diversos ácidos graxos e metil ésteres nas gotículas da teia da aranha *T. clavipes*, através da técnica de GCxGC-MS. E como será demonstrado na seção de resultados a seguir, a glândula agregada apresenta uma contribuição significativa na deposição desses ácidos e ésteres na seda da teia, uma vez que esta é a glândula responsável por depositar as gotículas oleosas sobre o fio de seda.

Como já mencionado anteriormente neste capítulo, em estudos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com técnica de citoquímica para detecção de lipídios foi possível observar ácidos graxos sobre a superfície das fibras da seda da aranha *T. clavipes* (Salles et al., 2006; Dos Santos-Pinto et al., 2015). E ainda, a análise metabolômica do material extraído das gotículas lipídicas por cromatografia gasosa, acoplada a um detector de massas (GC-MS) revelaram a presença de alguns ácidos graxos saturados, insaturados e poliinsaturados (Sales et al., 2006). Alguns desses lipídios também já foram relatados previamente em outros estudos sobre os lipídios que recobrem as fibras da teia (Prouvost et al., 1999; Schulz, 2001).

Até o momento, a função dessa camada de ácidos graxos sobre as fibras da seda ainda não está bem esclarecida, porém muitos dos ácidos graxos relatados podem estar envolvidos com a estrutura central da fibra, proporcionando uma superfície suave, regulação do conteúdo de água, repelindo-a da seda, e proteção da seda contra a degradação (Schulz, 2001; Salles et al., 2006).

A presença de alguns ácidos graxos na teia (Salles et al., 2006) também foram descritos como possíveis agentes tensoativos, responsáveis pela desestabilização da cutícula de insetos, deixando-a mais permeável, o que favorece a penetração e ação de toxinas como as da família das tetrahydro- $\beta$ -carbolinas, que paralisam e matam as presas como descrito anteriormente por Marques, et al. (2005). Esteves (2017) identificou uma quantidade significativa do ácido palmítico nas gotículas da seda da teia da aranha *T. clavipes*. Esse ácido foi descrito com ação potencial na dissolução/desintegração da camada superficial da cutícula de abelhas *A. mellifera* - após aplicação tópica do ácido nas concentrações de 20-50 ng (Esteves et al., 2020). É importante mencionar que, as gotículas lipídicas depositadas sobre os fios de seda da teia da *T. clavipes*, variaram de 50-100  $\mu$ m de diâmetro (Esteves, 2017). Sendo assim, podemos sugerir que as gotículas depositadas sobre os fios de seda também possam penetrar através dos espiráculos (estígmias) quando os mesmos colidem com a teia e se tornam presas capturadas; e/ou ainda, serem absorvidas por determinadas partes

do inseto, como por exemplo, através de partes não esclerosadas como antenas, patas, aparelho bucal, regiões intersegmentares do corpo do inseto.

A abundância dos ácidos graxos identificados neste estudo também pode estar relacionada com a composição das vesículas lipídicas da teia. Dessa forma, seria possível sugerir a classificação das vesículas lipídicas da teia como micelas. Uma vez que a micela é comumente composta de ácidos graxos (de comprimentos variáveis), cujos grupos carboxila polares são expostos em direção à superfície, enquanto as cadeias de hidrocarbonetos apolares estão voltadas para o centro hidrofóbico (Wang et al., 2014). O tamanho das micelas varia de 1 a 100 nm, e as mesmas têm sido utilizadas com sucesso como transportadores de drogas hidrofóbicas, por exemplo, no tratamento de câncer de mama. (Oerlemans et al., 2010; Jhaveri et al., 2014).

No presente estudo, além dos *Fatty acyl* (ácidos e estéres graxos), foram também identificadas outras possíveis classes de lipídios que até o momento não tinham sido relatadas na porção oleosa da teia da aranha *T. clavipes*. Dentre essas possíveis classes destacamos aqui os fosfolipídios do tipo glicerofosfolipídios e esfingolipídios que correspondem respectivamente a 29% e 6% do perfil lipídico total da teia. A presença desses fosfolipídios identificados na presente investigação também pode estar relacionada com a composição das vesículas lipídicas da teia, uma vez que as membranas das vesículas lipídicas extracelulares, assim como as membranas plasmáticas de células animais, são compostas principalmente de fosfolipídios de sua maioria glicerofosfolipídeos (Alberts et al., 2017).

As vesículas lipídicas são definidas como estruturas esféricas constituídas por um entorno de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, podem apresentar diferentes tamanhos e organizações e são amplamente utilizadas como sistemas miméticos de membrana celular (Lasic, 1988). Estas vesículas são frequentemente classificadas com base no seu mecanismo de biogênese e divididas em três grandes classes: exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos. (Vader et al., 2014; Yáñez-mó et al., 2015).

Os exossomos, são vesículas extracelulares originados de vesículas multilamelares (MLVs), com tamanho médio que varia de 40 a 100 nm de diâmetro (Raposo e Stoorvogel, 2013), esses podem aprisionar em seu interior proteínas, lipídios e até ácidos nucleicos (Cocucci et al., 2009). Além dos exossomos há outros tipos de vesículas extracelulares, como as microvesículas (MVs), as quais são

geradas pela gemulação da membrana plasmática para o exterior da célula. O tamanho das mesmas varia de 50 nm a 1 µm de diâmetro, (Brownlee et al., 2014).

Os exossomos e principalmente os lipossomos (que não foram mencionados no texto por se tratarem de vesícula produzidas de forma artificial), são importantes nos estudos de aplicações terapêuticas, pois os mesmos podem aprisionar fármacos ou DNA para experimentos de terapia gênica; e interagem facilmente com a membrana plasmática de muitos tipos de células, introduzindo nelas as moléculas aprisionadas (Alberts et al., 2012).

Utilizando-se os dados das Figuras 3 e 4, pode-se estimar que as vesículas observadas no interior das gotículas da teia possuem tamanho médio de 450 nm. Assim, considerando-se apenas a dimensão física para classificar esse tipo de material (exossomos com diâmetros variando de 40 a 100 nm; microvesículas com tamanhos de 50 a 1000 nm; micelas variando de 1 a 100 nm), podemos classificar as vesículas em suspensão no interior das gotículas da teia mais adequadamente como microvesículas.

A literatura destaca que, apesar de muitos estudos atualmente publicados sobre a compreensão das diferentes vesículas, é importante salientar que mesmo com a combinação de diversas técnicas como a análise proteômica, microscopia eletrônica e diferentes protocolos de ultracentrifugação, ainda não são suficientes para discriminar com segurança os diferentes tipos de vesículas (Bobrie, et al., 2011). É importante enfatizar que a maioria dos estudos não consegue elucidar exatamente qual é o tipo de vesículas identificadas em cada amostra, e se as mesmas são do tipo exossomos ou MVs; portanto, o termo vesículas extracelulares (EVs) é o mais apropriado ao nos referirmos em vesículas que não estão claramente definidas (Raposo e Stoorvogel, 2013).

No presente estudo, foi revelado que o perfil lipídico das gotículas e vesículas é constituído principalmente de ácidos graxos, glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e esterolipídeos. A presença tanto dos ácidos graxos como dos fosfolipídios pode estar relacionada com a formação das vesículas que são encontradas no interior das gotículas da teia. Sugerindo então, que através da composição química essas vesículas possam ser do tipo micela ou exossomos.

Além disso, também sabemos que através da análise proteômica das glândulas de seda e da teia da aranha *T. clavipes* foram identificadas proteínas envolvidas na biogênese, transporte e secreção de exossomos (dos Santos-Pinto et al., 2019). A

presença destas proteínas conseqüentemente sugere a possibilidade de que tais vesículas possam ser do tipo exossomos.

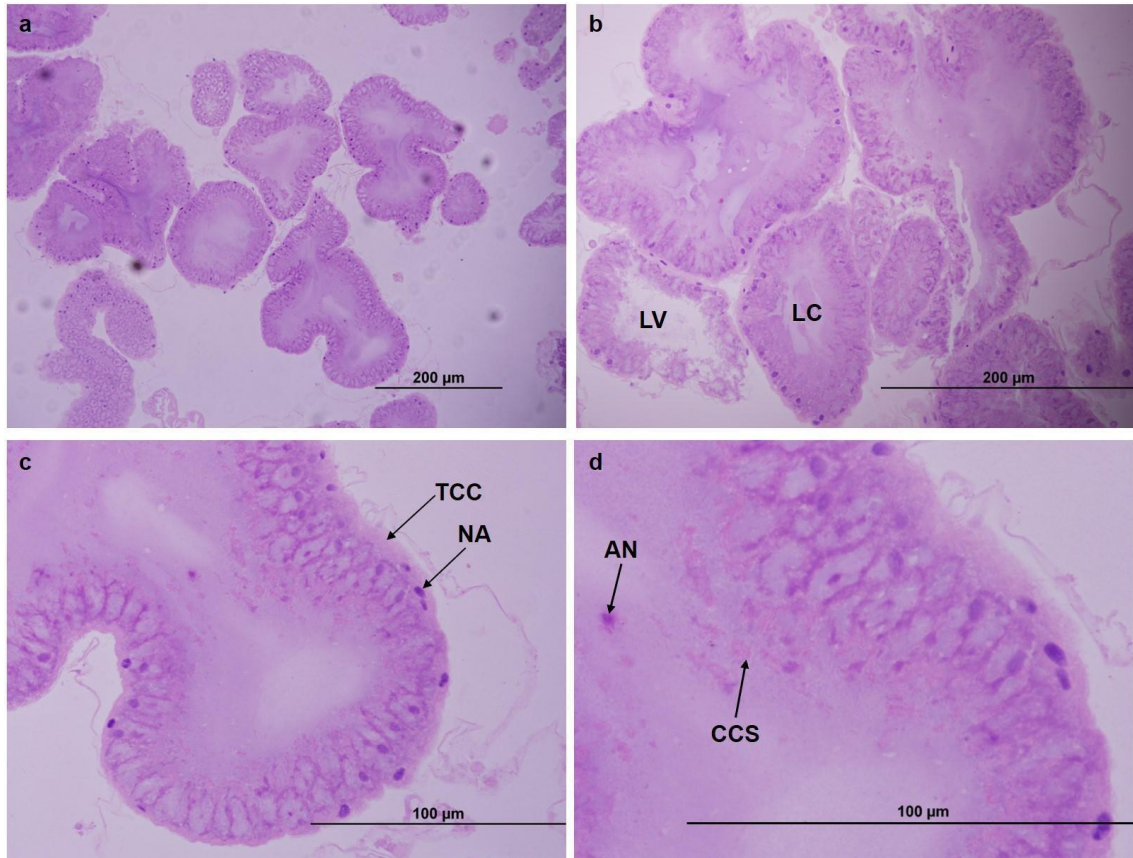
Com os resultados obtidos até o momento, ainda não é possível classificar, com certeza, qual é o tipo de vesícula lipídica que se encontra aprisionado nas gotículas. Dessa forma, de acordo com o guia publicado pela “International Society of Extracellular Vesicles” ([www.isev.org](http://www.isev.org)), decidimos utilizar somente o termo vesículas extracelulares para designar as vesículas lipídicas identificadas na seda da teia.

### **4.3. Microscopia de luz da glândula agregada**

A glândula agregada foi escolhida para realizar este tipo de análise, pois foi a glândula que demonstrou produzir o maior número de toxinas proteicas dentre as glândulas produtoras de seda (Esteves et al., 2020), além de ser a glândula responsável por produzir e secretar as gotículas, contendo as vesículas lipídicas extracelulares, sobre os fios de seda da teia (Salles, et al 2006; Esteves, 2017).

Após examinar as fotos obtidas por microscopia de luz (ML) obtivemos informações sobre as características morfológicas da glândula agregada. Através do corte transversal dessa glândula foi observado a parede secretora (porção secretora) do tipo tubular simples ramificada, com dobras, a qual é composta por células epiteliais altas com núcleo basal, conforme demonstrado na figura 12a.

Na figura 12b é possível observar que a eliminação do produto final pela glândula agregada ocorre de forma assincrônica, ou seja, não ocorre simultaneamente. Foi observado, que o lúmen de algumas dobras da glândula estava cheio de secreção, enquanto que o lúmen de outras dobras estava vazio, pois já havia eliminado seu produto para o meio externo, nesse caso sobre as fibras da seda da teia. Esta assincronia deve ocorrer, possivelmente, porque a teia necessita de manutenções periódicas, e haveria um gasto energético muito alto para a glândula se regenerar por completo para começar a secretar novamente. Sendo assim, conforme a necessidade de manutenção da teia, apenas porções dessa secreção são eliminadas.



**Figura 12.** Microscopia de luz (ML). **a)** imagem do corte transversal da glândula agregada da aranha *T. clavipes*. **b)** imagem evidenciando o assincronismo da eliminação do conteúdo pela glândula, em LV é possível observar o lúmen vazio, enquanto que em LC o lúmen ainda está cheio. **c)** aumento da figura “a” destacando o tecido conjuntivo circunjacente (TCC) com o núcleo alongado (NA). **d)** aumento da figura “c” destacando fragmentos de ácido nucleico (AN) e citoplasma das células secretoras (CCS) caracterizando o mecanismo holócrino da porção secretora desta glândula.

Por fim, nas Figuras 12c-d é possível observar o tecido conjuntivo circunjacente com o núcleo alongado (indicado por setas), este tecido confere sustentação à porção secretora da glândula. Através dessas figuras foi possível classificar o mecanismo de secreção da glândula agregada, que até este momento ainda era desconhecido. Dessa forma, podemos sugerir que o mecanismo de secreção é holócrino, isto porque, a secreção liberada para o lúmen contém além do produto de secreção, também parte do citoplasma e até ácidos nucleicos das células secretoras. Essa observação corrobora com o estudo anterior de Esteves (2017), o qual tinha sugerido inicialmente o mecanismo de secreção holócrino, uma vez que identificou no secretoma desta glândula diversas proteínas intracelulares típicas, geralmente designadas como “proteínas *housekeeping*”, que provavelmente eram oriundas do extravasamento de células/tecidos glandulares (dos Santos-Pinto et al., 2019).

Mediante esses resultados, apresentados por Esteves (2017), e os resultados de microscopia de luz apresentados no presente estudo, podemos elaborar a seguinte

questão: Qual seria a função do mecanismo de secreção holócrino e a relação do mesmo com o produto final secretado pela glândula agregada na teia?

Sabemos até o momento que a glândula agregada é a responsável por secretar um revestimento bastante viscoso na forma de gotículas sobre a teia, e que existem diversas vesículas lipídicas extracelulares suspensas dentro do conteúdo aquoso de uma gotícula (Salles, 2003; Esteves 2017). Porém ainda não sabemos o processo pelo qual essas vesículas lipídicas extracelulares são produzidas, transportadas e liberadas dentro das glândulas, para então serem secretadas sobre a teia.

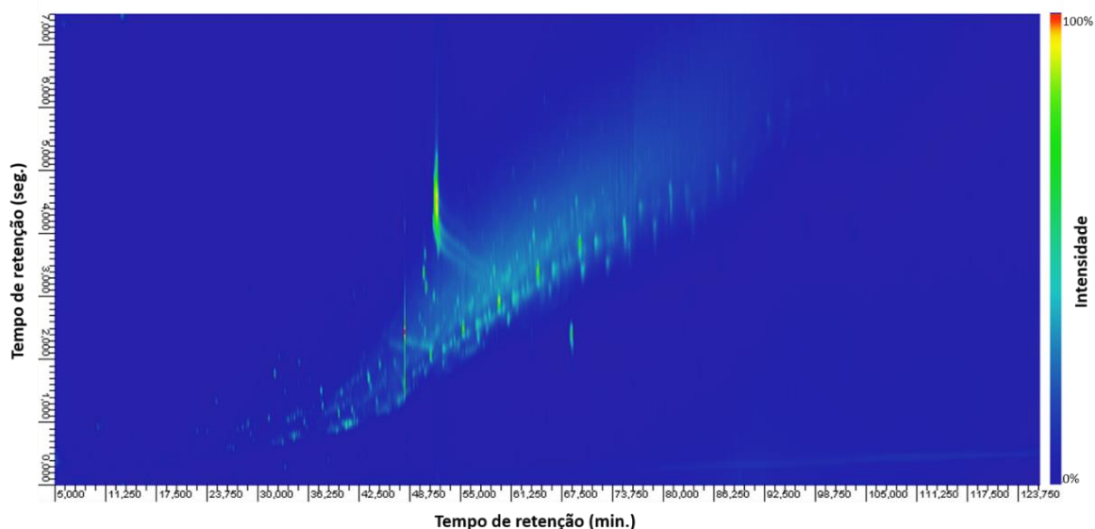
No entanto, o presente resultado nos revelou que o mecanismo de secreção das células secretoras da glândula agregada é holócrino, ou seja, ocorre o extravasamento de proteínas intracelulares citoplasmática e até ácidos nucleicos para o lúmen da glândula (figura 12c-d). E que além disso, foram identificadas no secretoma da glândula agregada diversas proteínas intracelulares, dentre elas: *Ras-related protein ORAB-1*, *Ras-related protein Rab-1A* e *predicted rab-like protein 1-like*, além de muitas formas de actinas, tropomiosinas, miosinas, cinesinas e pequenas GTPases (dos Santos-Pinto et al., 2019) Todas essas proteínas já foram relatadas na literatura (Rao et al, 2004; Savina et al., 2005; Cai et al., 2007) como sendo relacionadas com a formação, transporte e secreção de vesículas extracelulares do tipo exossomos. Dessa forma, é possível que as proteínas do conteúdo intracelular das células secretoras da glândula agregada estejam diretamente relacionadas com o processo de produção, transporte e liberação das vesículas lipídicas extracelulares na teia. Portanto, o mecanismo de secreção holócrino não ocorre ao acaso, e dessa forma, possivelmente contribui de forma direta no processo de formação das vesículas presentes no conteúdo aquoso das gotículas.

#### **4.4. Perfilagem química dos compostos de baixa massas moleculares da glândula agregada**

Com a finalidade de se investigar e elucidar o perfil químico de compostos de baixa massa molecular presentes na glândula agregada, enfatizando aqueles que segundo a literatura possivelmente desempenham um “papel ativo” na estratégia na captura de presas, a amostra foi então analisada em um sistema de GCxGC/MS. O sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplado a um espectrômetro de massas é adequado para a caracterização de compostos de baixa

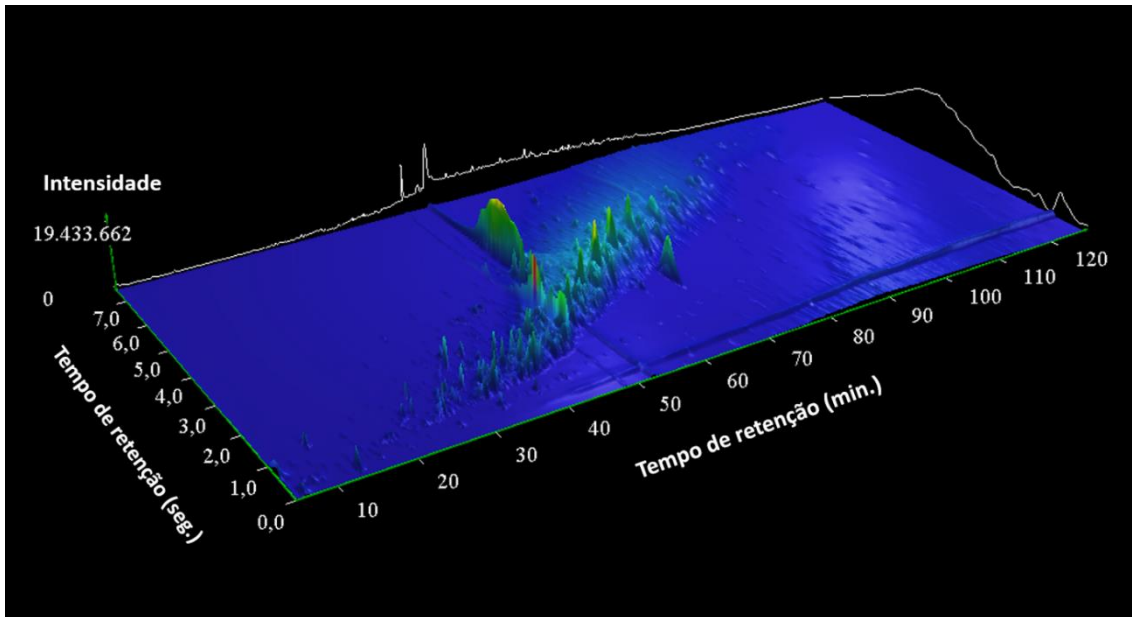
massa molecular em misturas complexas, possibilitando uma maior quantidade de informações qualitativas e quantitativas em uma única análise.

Os resultados dessa análise estão demonstrados nas figuras 13 e 14. A figura 13 mostra o cromatograma 2D representativo da análise, que apresenta uma separação abrangente; as cores representam a intensidade do sinal de detecção dos compostos, onde os sinais mais intensos são representados por cores próximas ao vermelho, e os sinais menos intensos são representados por cores próximas ao azul escuro; o eixo X representa o tempo de retenção na primeira dimensão, e o eixo Y representa o tempo de retenção na segunda dimensão; o eixo Z foi substituído pela representação em cores de cada pico, conforme descrito acima. Cada “mancha” visualizada no cromatograma representa a visão superior de um pico cromatográfico. Em uma análise prévia foram detectados aproximadamente 211 compostos.



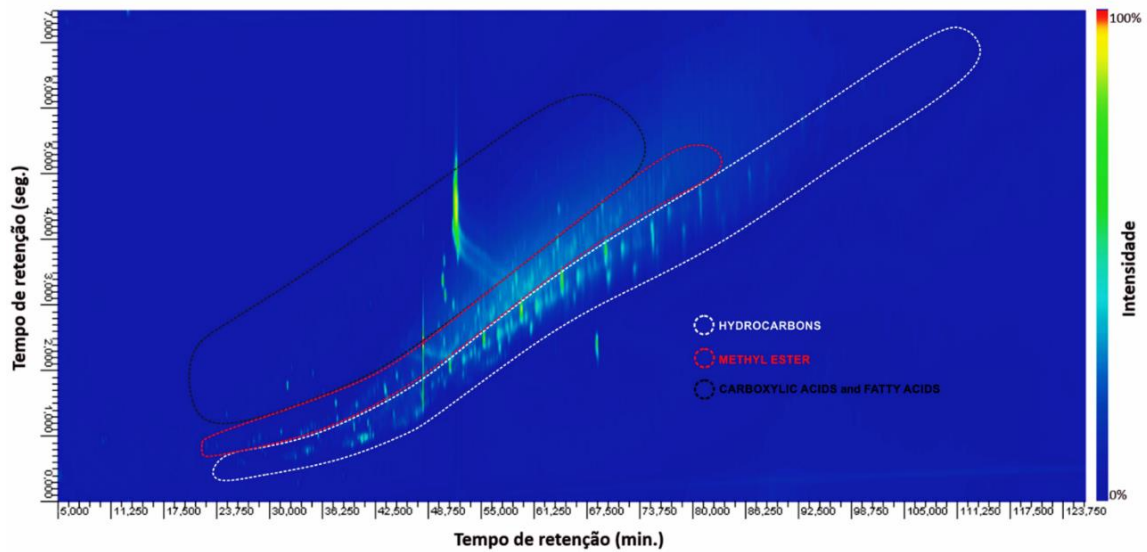
**Figura 13. Cromatograma GCxGC-2D.** Cromatograma bidimensional representativo da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando os 211 picos cromatográficos (cada “mancha” representa um pico).

A figura 14 mostra a representação do cromatograma em 3D, da separação por GCxGC, no qual eixo X representa o tempo de retenção na primeira dimensão, o eixo Y, o tempo de retenção na segunda dimensão e o eixo Z, a intensidade de sinal (Muhlen, 2007).



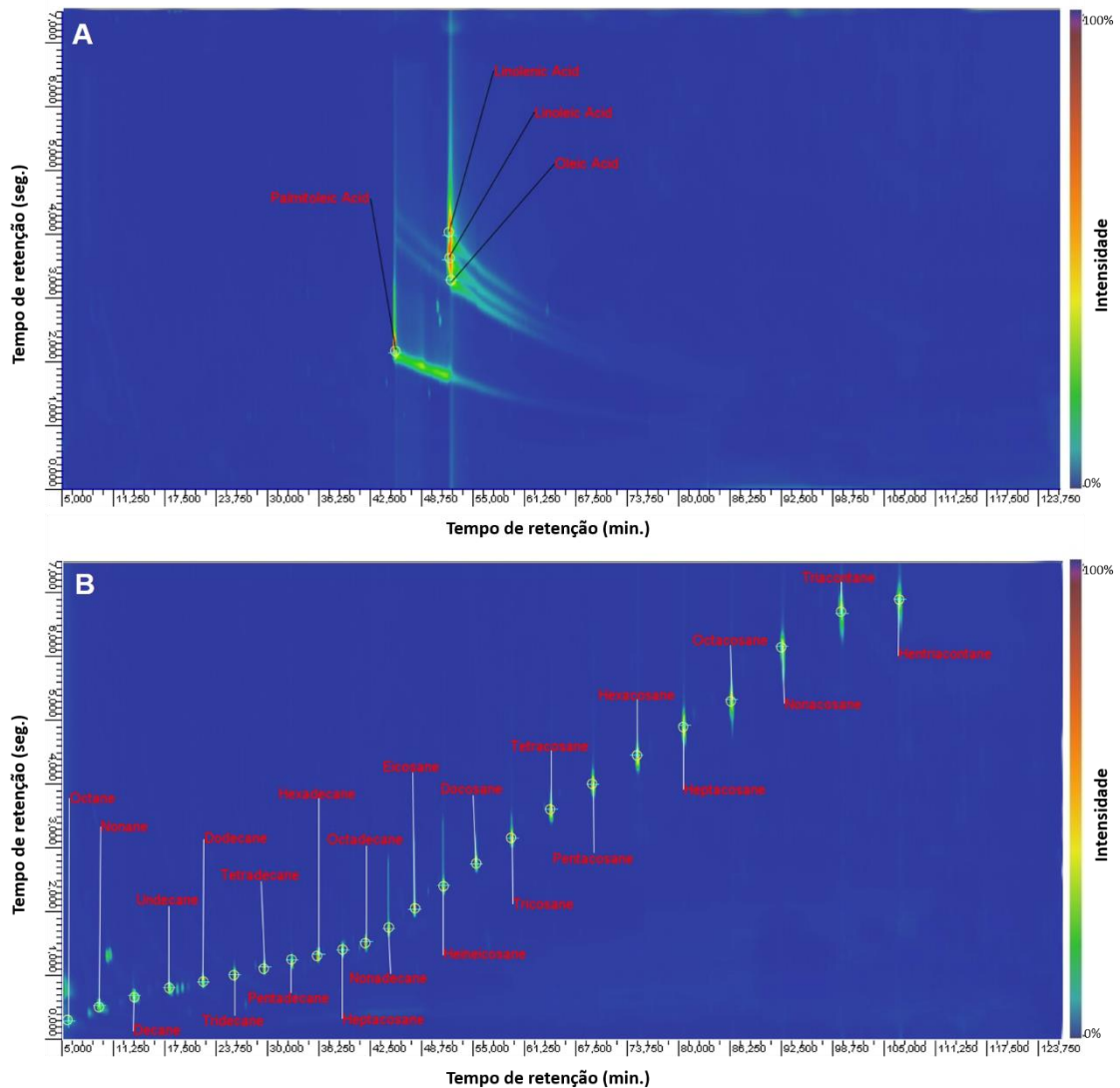
**Figura 14. Cromatograma GCxGC-3D.** Cromatograma tridimensional representativo da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*.

A partir dos resultados obtidos e através de uma análise prévia dos espectros, os compostos quimicamente relacionados foram agrupados de acordo com a sua função orgânica: hidrocarboneto, ácido e éster. A figura 15 mostra esse agrupamento, no qual cada grupo está representado por uma cor diferente. Esse agrupamento, conhecido como “efeito telhado” (“roof-tile effect”) é um perfil relativo ao agrupamento dos picos de uma classe de compostos quimicamente relacionados em um espaço de separação, o qual se repete quando o número de carbonos destes compostos aumenta ou diminui de forma a causar uma impressão visual de “telhado” na representação do cromatograma 2D, sendo que cada conjunto corresponde a um grupo de compostos pertencentes a uma mesma classe de função orgânica, que apresenta um número determinado de carbonos (Von Muhlen et al., 2007). Podemos notar na figura 15 uma tendência à formação do “efeito telhado”, principalmente para o grupo dos hidrocarbonetos.



**Figura 15. Cromatograma GCxGC-2D.** Cromatograma bidimensional representativo da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando o agrupamento de cada função orgânica representado por uma cor diferente. Contorno preto - ácidos graxos, contorno vermelho - metil éster e contorno branco – hidrocarbonetos.

Podemos notar uma grande quantidade de compostos visualizados no cromatograma, porém, devido à necessidade de se obter todos os padrões químicos para confirmação dos tempos de retenção e espectros EI-MS, até o momento foram identificados 19 compostos, sendo 17 hidrocarbonetos alcanos saturados, e 2 ácidos graxos. Esses resultados e outras informações referentes a esses compostos: tempo de retenção das duas dimensões (Tr1 e Tr2), relação massa carga ( $m/z$ ) e a % do volume do pico, estão mostrados na tabela 2. Esses compostos foram inicialmente identificados por comparação de seus tempos de retenção e espectros de massas obtidos no modo SCAN (varredura de espectro) com padrões de alcanos saturados (C7-C40) e padrões de ácidos graxos (C16:1, C18:1, C18:2, C18:3) (Sigma-Aldrich). A figura 16A-B mostra os resultados desses padrões. E ainda, a partir dos resultados obtidos com o cromatograma 2D representativo da análise da amostra será possível realizar uma análise quantitativa dos compostos já identificados.



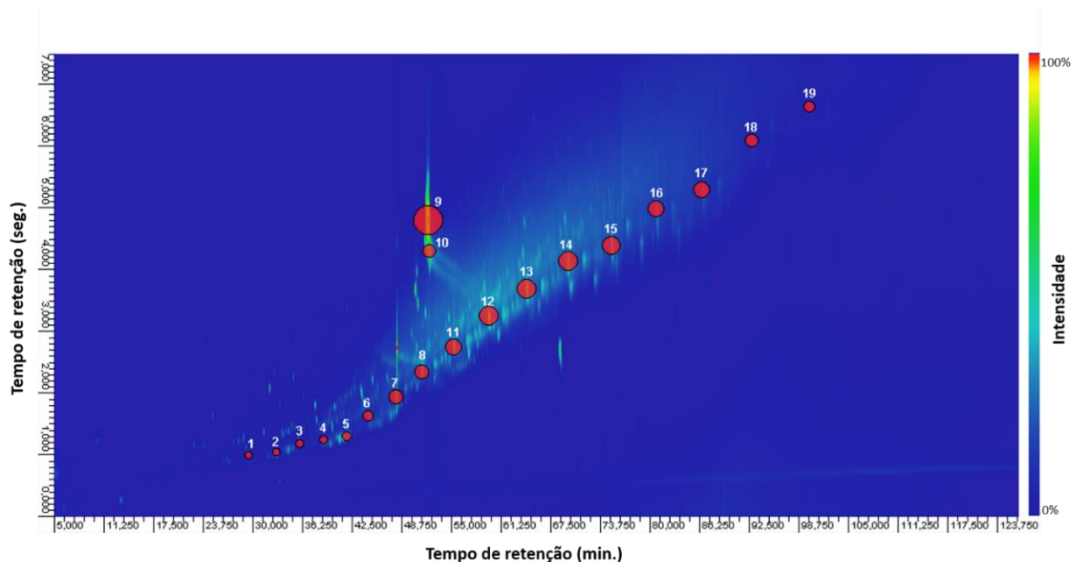
**Figura 16. Cromatogramas GC x GC-2D.** Cromatogramas bidimensionais representativos das análises de GCxGC-MS dos padrões. **A** - Padrões de ácidos graxos (C16:1, C18:1, C18:2, C18:3). **B** - Padrões de alcanos saturados (C7-C40).

A figura 17 e a tabela 2 mostram os dados representativos sobre a área superficial de cada pico cromatográfico, em que cada pico foi representado por uma “bolha” (“*bubble-plot*”) e sua área é proporcional ao valor do diâmetro da mesma. Valores do volume (comprimento x largura x intensidade) de cada pico cromatográfico da amostra também foram anotados (% volume do pico).

Como já descrito anteriormente, a glândula agregada é responsável por produzir e secretar as gotículas oleosas, contendo as vesículas lipídicas extracelulares, sobre os fios de seda da teia (Salles, et al 2006; Esteves, 2017). Por isso, foi possível identificar nessa glândula os ácidos oleico, linoleico e palmítico com as maiores porcentagens de volume do pico (Tabela 2).

**Tabela 2.** Identificação dos compostos presentes na amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando o tempo de retenção da primeira (Tr1) e da segunda (Tr2) dimensão, relação massa carga (m/z) e a % do volume do pico.

Pico	Nome do composto	Tr1 (min)	Tr2 (min)	m/z	Volume do pico (%)
1	Tetradecane	29,50	1,00	198	0,1755
2	Pentadecane	33,00	1,05	212	0,1710
3	Hexadecane	36,00	1,20	226	0,2888
4	Heptadecane	39,00	1,25	240	0,2412
5	Octadecane	41,88	1,30	254	0,6561
6	Nonadecane	44,63	1,65	268	0,9584
7	Eicosane	48,13	1,95	282	3,7799
8	Heneicosane	51,38	2,35	296	3,3481
9	Linoleic Acid	52,13	4,80	280	29,0086
10	Oleic Acid	52,25	4,30	282	3,2632
11	Docosane	55,38	2,75	310	5,9861
12	Tricosane	59,75	3,25	324	9,2717
13	Tetracosane	64,50	3,70	338	9,0750
14	Pentacosane	69,75	4,15	352	9,5260
15	Hexacosane	75,25	4,40	366	7,5027
16	Heptacosane	80,88	5,00	380	6,1656
17	Octacosane	86,63	5,30	394	5,9259
18	Nonacosane	92,88	6,10	408	3,1011
19	Triacontane	100,13	6,65	422	1,5552



**Figura 17.** Cromatograma GCxGC-2D de bolhas (“bubble-plot”). Cromatograma bidimensional de bolhas da análise de GCxGC-MS da amostra da glândula agregada da aranha *T. clavipes*, mostrando a área superficial e cada pico cromatográfico representado por uma bolha, a qual possui um valor de área proporcional ao seu tamanho em diâmetro ( $\phi$ ). A numeração acima de cada bolha corresponde aos números dos compostos indicados na tabela 2.

Assim como na glândula agregada, em nossos estudos anteriores realizados com o uso de análises GCxGC-MS com a seda da teia da aranha *T. clavipes*,

demonstraram a presença dos mesmos ácidos: o ácido oleico, ácido linoleico e ácido palmítico. Além destes, foram também identificados na teia o ácido palmitoléico e o ácido dodecanóico (Esteves et al., 2020). E ainda, através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com técnica de citoquímica para detecção de lipídios foi possível observar ácidos graxos sobre a superfície das fibras da seda da aranha *T. clavipes* (dos Santos-Pinto et al., 2015); e como já evidenciado pelos resultados apresentados no presente capítulo, a glândula agregada contribui de forma significativa com a produção e secreção desses ácidos graxos sobre as fibras da seda.

Algumas das possíveis funções desempenhadas pelos ácidos graxos depositados sobre a teia, já foram discutidas em mais detalhes na seção de resultados 4.2 - ácidos como possíveis agentes tensoativos. Além de produzir os ácidos graxos, a glândula agregada também foi relatada como responsável por produzir e depositar a maioria das toxinas identificadas sobre a teia da aranha *T. clavipes* (Esteves et al., 2020). Dessa forma, a glândula agregada apresenta uma grande contribuição na secreção de compostos que auxiliam na estratégia de captura de presas pela teia.

Posteriormente os demais compostos também serão identificados para que possamos investigar e elucidar o perfil químico dos compostos de baixa massa molecular presentes na glândula agregada da aranha *T. clavipes*, enfatizando aqueles que segundo a literatura, possivelmente desempenham um “papel ativo” na estratégia em captura de presas.

## 5. CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados neste capítulo, foi possível identificar as diferentes classes de lipídios que compõem as gotículas e vesículas lipídicas da teia. Dentre elas, principalmente os ácidos e ésteres graxos, além de fosfolipídios do tipo glicerofosfolipídio e esfingolipídios. Os ácidos e ésteres graxos também foram identificados na glândula agregada, uma vez que esta glândula é responsável por produzir e depositar as gotículas contendo as vesículas lipídicas sobre a seda da teia. Além disso, foi revelado que o mecanismo de secreção da glândula agregada é do tipo holócrino. Este tipo de mecanismo de secreção pode não estar ocorrendo ao acaso, e possivelmente, pode estar contribuindo de forma direta no processo de formação das vesículas lipídicas.

Por fim, através da análise quantitativa do extrato vesicular da teia, foi possível estimar que para uma única teia (massa da teia pesada – peso seco), o extrato vesicular apresentou 14.709.800 vesículas lipídicas (contagem em câmara de Neubauer), com um valor expresso em massa de 700µg de proteínas/peptídeos (determinado por espectrofotometria de fluorescência); de forma que cada vesícula possivelmente aprisiona em seu interior  $\cong$  47 pg de proteínas/peptídeos.

Com os dados adquiridos até então, ainda não foi possível classificar com certeza qual é o tipo de vesícula lipídica que se encontra aprisionado nas gotículas. Portanto, até o momento, as vesículas lipídicas da teia podem ser designadas apenas como vesículas lipídicas extracelulares. No entanto, devido a presença tanto dos ácidos graxos como dos fosfolipídios, além dos dados proteômicos (dos Santos-Pinto et al., 2019), foi sugerido que as vesículas possam ser do tipo micela ou exossomos.

No decorrer deste capítulo também foram discutidas as possíveis funcionalidades das gotículas e vesículas lipídicas no auxílio da captura de inseto-presas pela teia. Dessa forma, as gotículas podem ser responsáveis por promover um aumento da permeabilidade da cutícula do inseto-presa quando o mesmo é capturado pela teia; enquanto que as vesículas lipídicas podem ser responsáveis em armazenar, transportar, e por fim, liberar as toxinas para o interior do corpo da presa. Mais detalhes estão apresentados na hipótese da seção “introdução geral”.

Portanto, os resultados obtidos até o momento contribuíram para um melhor entendimento sobre a composição, formação e funcionalidade das gotículas e vesículas lipídicas quando as mesmas entram em contato com a presa que foi capturada pela teia.

## **CAPÍTULO 2**

**Desvendando os segredos venenosos das teias das  
aranhas *Trichonephila clavipes* e *Trichonephila  
plumipes***

## RESUMO

A aranha *Trichonephila clavipes* pertence ao grupo das aranhas construtoras de teias orbitais, que desenvolveram a capacidade de sintetizar fios adesivos. Esses fios adesivos são encontrados na espiral de captura das teias, e apresentam gotículas oleosas contendo vesículas lipídicas que aprisionam em seu interior soluções de proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. Dentre essas moléculas muitas são toxinas de natureza proteica e de baixas massas moleculares, as quais podem apresentar ações letais em potencial para as presas capturadas. Até o momento não se sabe muito sobre a composição peptídica desta teia. Dessa forma, através da análise do perfil de peptídeos por LC-MS/MS, foram identificados um total de 729 peptídeos presentes na seda da teia e nas glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, sendo que 13 peptídeos foram selecionados e sintetizados em fase sólida, para que posteriormente o potencial tóxico dos mesmos fossem avaliados em ensaios de inseto-toxicidade. Foi observado que tanto o extrato vesicular da teia como os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 e 13 apresentaram efeitos tóxicos quando injetados na hemocele de abelhas. O extrato vesicular da teia apresentou valor de  $DL_{50} = 0,323$  ng/mg enquanto os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3 apresentaram valor de  $DL_{50} = 1,06$  ng/mg,  $0,846$  ng/mg e  $1,06$  ng/mg, respectivamente. Além disso, quando submetidos a ensaios de *Fluorescence Imaging Plate Reader* (FLIPR), os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 e 13 também apresentaram ação inibitória em canais de íons sódio (Nav) e cálcio (Cav2.2). O peptídeo Trichonephiline-8 também inibiu canais de íons cálcio (Cav1.3) e o receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (nAChR $\alpha$ 7), enquanto o peptídeo Trichonephiline-10 inibiu apenas o receptor nAChR $\alpha$ 7. Além dos peptídeos potenciais inseticidas envolvidos na captura de presas, o peptídeo Trichonephiline-6 foi identificado com ação antibiótica (MIC  $\leq 0,25$  ug/mL) para a bactéria Gram+ *Staphylococcus aureus*. O extrato total da teia também apresentou ação antibiótica com valor de MIC  $\leq 2$   $\mu$ g/mL para a bactéria Gram- *Pseudomonas aeruginosa*. Tanto a seda da teia quanto o peptídeo Trichonephiline-6 podem estar contribuindo no mecanismo de defesa da teia para que a seda, ou até os ovos da aranha em desenvolvimento, resistam à decomposição microbiana. Por fim, foram também apresentados os resultados da investigação do perfil proteico da seda da teia e das glândulas produtoras de seda da aranha *Trichonephila plumipes*, utilizando-se da abordagem proteotranscriptômica.

Foram identificadas um total de 932 proteínas (glândulas e seda). Dentre essas foram destacadas as proteínas que se mostraram semelhantes a toxinas e neurotoxinas comumente encontradas em venenos de aranhas, escorpiões, insetos e até organismos marinhos. Assim, como a aranha *T. clavipes* os resultados da aranha *T. plumipes* revelou que a teia não é uma ferramenta simples e passiva para a captura mecânica de presas, mas uma arquitetura naturalmente sofisticada que desempenha um papel ativo durante a captura de suas presas. Dessa forma, este capítulo fornece uma melhor compreensão químico-ecológica da captura de presas pelas teias das aranhas do gênero *Trichonephila*, além de servir de inspiração para o desenvolvimento de novos inseticidas-seletivos e/ou antibióticos.

**Palavras chave:** seda de aranha, glândulas de seda, toxinas peptídicas, abordagem peptidômica, abordagem proteotranscriptômica

## ABSTRACT

*Trichonephila clavipes* spider belongs to the group of orb-web weaving spiders that have developed the ability to synthesize adhesive threads. These adhesive threads are present in the capture spiral of the orb-webs, coated by a viscous solution that covers the entire silk fibers in the shape of droplets, which contain many vesicles under suspension, entrapping a solution containing proteins, peptides and low molecular mass compounds. Among these molecules many are low molecular weight and proteinaceous toxins, which may have potentially lethal actions on the prey capture. So far, not much is known about the peptide composition of this web. Thus, through the peptide profile analysis by LC-MS/MS, a total of 729 peptides were identified in the *T. clavipes* spider web silk and in its silk-producing glands. Thirteen peptides were selected and synthesized in solid phase, and their toxic potential could be evaluated in insect-toxicity assays. It was observed that both the web vesicular extract and the peptides named Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 and 13 showed toxic effects when injected into the bee hemocoel. Web vesicular extract showed LD<sub>50</sub> value = 0.323 ng/mg while Trichonephiline-1, -2, -3 peptides showed LD<sub>50</sub> value = 1.06 ng/mg, 0.846 ng/mg and 1.06 ng/mg, respectively. Furthermore, when subjected to Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR) assays, Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, 10 and 13 peptides also showed inhibitory action on sodium (Nav) and calcium (Cav2.2) ion channels. The Trichonephiline-8 peptide also inhibited calcium ion channels (Cav1.3) and the nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 (nAChR $\alpha$ 7), while the Trichonephiline-10 peptide inhibited only the nAChR $\alpha$ 7 receptor. In addition to potential insecticidal peptides involved in prey capture, the peptide Trichonephiline-6 was identified with antibiotic action (MIC  $\leq$  0.25  $\mu$ g/mL) for Gram+ *Staphylococcus aureus* bacteria. The total web extract also showed antibiotic action with MIC value  $\leq$  2  $\mu$ g/mL for Gram- *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Both web silk and Trichonephiline-6 peptide may be contributing to the defense mechanism of the web, or even the developing spider eggs, resist microbial decay. Finally, using the proteotranscriptomics approach were also presented the results of the investigation of the *Trichonephila plumipes* spider web protein profile and its silk-producing glands. A total of 932 proteins (glands and silk) were identified. Among these were proteins similar to toxins and neurotoxins commonly found in venoms of spiders, scorpions, insects, and even marine organisms. Thus, the results for the spider *T. plumipes* revealed that the web is not a simple, passive tool for mechanical prey capture, but a naturally sophisticated architecture that

plays an active role during prey capture. Thus, this chapter provides a better chemical-ecological understanding of prey capture by the webs of the genus *Trichonephila* spiders, and serves as inspiration for the development of new insecticide-selectives and/or antibiotics.

**Keywords:** spider silk, silk glands, peptide toxins, peptidomics approach, proteotranscriptomics approach

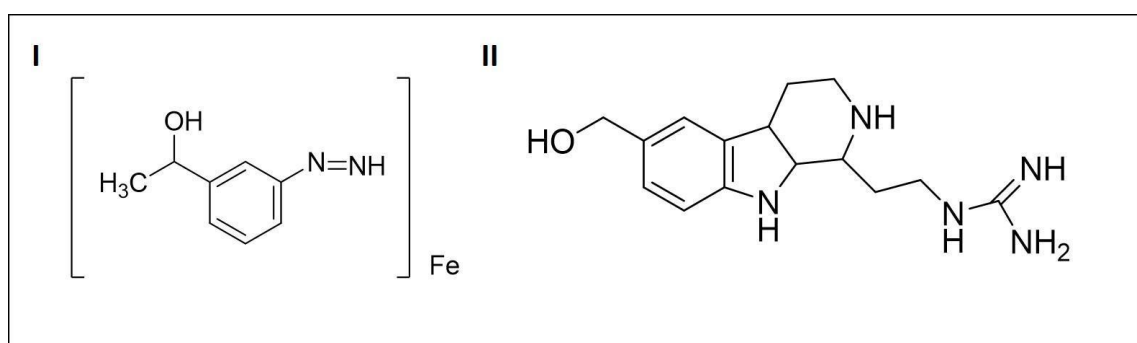
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Composição química da seda da teia

Estudos moleculares e estruturais revelam que a seda da teia da aranha *T. clavipes* é constituída por proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares; e essas moléculas têm demonstrado uma importância fundamental no que se refere às estratégias químicas adotadas, tanto na defesa da própria aranha quanto na captura de presas (Salles et al., 2006; Marques et al., 2005; Volsi et al., 2006; dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020).

#### 1.1.1. Compostos de baixas massas moleculares

Em estudos realizados por Higgins e colaboradores (2001) foi demonstrado a presença de neurotransmissores nas gotículas presentes na seda da aranha *T. clavipes*, tais como N-acetilaurina, 4-aminobutiramida, glicina, betaína, colina e putrescina. Marques e colaboradores (2005) demonstraram a presença de toxinas de baixas massas moleculares na teia da aranha *T. clavipes*; utilizando-se de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear foi caracterizado um composto organometálico (ferro [1-(3-diazenilfenil) etanol] e uma toxina alcalóide (1-(2-guanidinoetil)-1,2,3,4-tetrahidro-3-(hidroximetil)- $\beta$ -carbonila), os quais apresentam ações letais potentes para as presas capturadas nas teias de *T. clavipes* (Figura 18). Estes resultados indicam que o conteúdo das gotículas da teia pode ser letal e/ou paralítico para as presas e, conseqüentemente, deve desempenhar um importante papel no processo de paralisia/morte das mesmas.



**Figura 18.** Estrutura química da (II) toxina alcalóide (1-(2-guanidinoetil)-1,2,3,4-tetrahidro-3-(hidroximetil)- $\beta$ -carbonila) e de um (I) composto organometálico de ação inseticida ferro [1-(3-diazenilfenil) etanol] identificados na seda da teia da aranha *T. clavipes* (Marques et al., 2005).

Em outro estudo realizado anteriormente por nosso grupo, foram identificados na teia da aranha *T. clavipes* aminoácidos, neurotransmissores, poliaminas, nucleotídeos e alcalóides, dentre eles: ácido hidroxí-indolacético, glutamina, prolina,

arginina, ácido cisteico, epinefrina, adenosina difosfato, tripargina, hidroxitripargina e espermidina. Além disso, também foram identificados a presença de duas acilpoliaminas toxinas: NPTX-615 e NPTX-12 (Saidemberg, 2012 – Relatório de Pós-Doutorado, Proc. 09/15798-2). As acilpoliaminas foram descritas como toxinas neuroativas de baixas massas moleculares, que atuam como antagonistas de diferentes classes de receptores ionotrópicos de glutamato (Palma e Nakajima, 2005; Saidemberg, 2012– Relatório de Pós-Doutorado, Proc. 09/15798-2), geralmente encontradas em venenos de aranhas. Estes compostos possuem uma forte ação em junções neuromusculares de insetos, levando a uma rápida paralisia das presas (Adams et al., 1989).

### 1.1.2. Proteínas/peptídeos

Estudos com a seda da teia de *T. clavipes*, demonstraram a presença de proteínas de ação tóxica, como a proteinase cálcio-ativada e metaloproteinase *do tipo jararagina*, indicando assim o possível envolvimento dessas enzimas no processo de paralisação e/ou pré-digestão das presas antes do ataque final pelas aranhas (Salles et al., 2006). Além dessas proteínas, recentemente através da abordagem proteômica do tipo *shotgun*, foram identificadas 274 proteínas semelhantes a toxinas na seda da teia da aranha *T. clavipes* (Esteves et al., 2020). Muitas dessas toxinas mostraram-se semelhantes àquelas comumente encontradas em venenos de diferentes espécies de aranhas; alguns exemplos são: latrotoxinas, agatoxinas, ctenitoxinas, terafotoxinas, zodatoxinas e licotoxinas. Esses resultados corroboram os dados prévios obtidos por dos Santos-Pinto et al. (2016), usando de uma abordagem proteômica *Bottom-up* nos estudos com as glândulas de seda de *T. clavipes*.

Esteves e colaboradores (2020) também investigaram o secretoma da glândula agregada, a qual é responsável por depositar as gotículas sobre os fios de seda; a análise proteômica mostrou a identificação de um número expressivo de proteínas semelhantes a toxinas, sendo que a maioria dessas toxinas também foram identificadas na teia da aranha *T. clavipes*. Essas proteínas semelhantes a toxinas, muito provavelmente, estão armazenadas no interior das vesículas lipídicas, as quais estão em suspensão retidas dentro do material aquoso das gotículas. Além da glândula agregada, as outras glândulas produtoras de seda também produzem algumas proteínas semelhantes a toxinas e contribuem parcialmente na composição tóxica da teia.

Como se pode notar, os estudos realizados até então utilizando de uma abordagem metabolômica e proteômica, tem contribuído significativamente para a identificação e caracterização de compostos de baixas massas moleculares e proteínas, que podem apresentar algum potencial farmacológico e biotecnológico, presentes na seda da teia da aranha *T. clavipes*. Porém, até o momento sabe-se muito pouco em relação a composição peptídica da teia de aranhas. Dentre os poucos estudos acerca da composição peptídica da seda da teia da aranha *T. clavipes* podemos citar o estudo realizado por Volsi e colaboradores (2006), no qual foram identificados três peptídeos da família das bradicininas (nephilacinina-I, -II e -III), tabela 3. Esses compostos foram isolados por técnicas cromatográficas e suas sequências determinadas por espectrometria de massas (ESI-MS/MS), sendo caracterizados como toxinas aplicadas pela aranha sobre a teia, com a finalidade de causar a paralisia das presas.

**Tabela 3.** Peptídeos da família das bradicininas identificados na seda da teia da aranha *T. clavipes* (Volsi et al., 2006).

Peptídeo	Sequência Primária
Nephilacinina-I	GNPFGFSPFR
Nephilacinina-II	EAPPFGFSPFR
Nephilacinina-III	PSPPFGFSPFR

Dessa forma, neste capítulo serão apresentados os resultados da investigação do perfil peptídico da teia e das glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, utilizando-se da abordagem peptidômica. Além disso, considerando-se que os peptídeos, presentes na teia de aranhas, podem representar possíveis modelos moleculares para o desenvolvimento racional de novas drogas e/ou inseticidas, alguns dos peptídeos, foram sintetizados em fase sólida e submetidos a ensaios de inseto-toxicidade e também ensaios antibiose.

Por fim, serão também apresentados os resultados da investigação do perfil proteico da teia e das glândulas produtoras de seda da aranha *T. plumipes*, utilizando-se da abordagem proteotranscriptômica e destacando as proteínas que possivelmente desempenham um papel importante na captura de presas.

## 2. OBJETIVOS

Para a aranha *T. clavipes*:

1. Investigar e elucidar o perfil peptídico presente na seda da teia, e também no secretoma das glândulas produtoras de seda que estão associadas à secreção das fibras que formam a teia - ampulada maior, ampulada menor, flageliforme e agregada.
2. Selecionar e sintetizar em fase sólida 13 peptídeos identificados na teia, e posteriormente, realizar a caracterização funcional dos mesmos;
3. Avaliar o potencial tóxico da teia, através do bioensaio de inseto-toxicidade, via injeção da porção vesicular da teia e dos 13 peptídeos sintetizados em laboratório na hemocele de abelhas *Apis mellifera*;
4. Avaliar a atividade dos 13 peptídeos sintetizados em laboratório contra os canais de íons sódio (Nav), cálcio (Cav2.2 e Cav1.3) e receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (nAChR $\alpha$ 7), através de ensaios de FLIPR;
5. Avaliar a atividade antibiótica dos 13 peptídeos sintetizados em laboratório através de ensaios de antibiose;

Para a aranha *T. plumipes*:

1. Investigar e elucidar o perfil de proteínas presente na seda da teia, e também do secretoma das glândulas produtoras de seda - ampulada maior e agregada, através da abordagem proteotranscriptômica.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Análise do perfil peptídico da seda e glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes***

##### **3.1.1. Obtenção das glândulas e da seda da teia da aranha *T. clavipes***

As aranhas *T. clavipes* e suas teias foram coletadas na cidade de Santa Gertrudes/SP de maneira georreferenciada (22°39'64.55"S 47°54'52.66"W). As aranhas foram dissecadas para a retirada das glândulas produtoras de seda, mais especificamente aquelas que estão associadas com a produção das fibras que constituem a teia, que são as glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada e flageliforme.

##### **3.1.2 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 inibidores de proteases (p-metilsulfonil fluoreto - PMSF) 10 mM e um coquetel de inibidores de proteases (Sigma) 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 (denominadas de "lavado da teia") foram centrifugadas à 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.

##### **3.1.3 Extração dos peptídeos presentes nas secreções das glândulas produtoras de seda**

As glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada e flageliforme, foram armazenadas em frascos distintos para a extração dos peptídeos. Logo após, em presença de solução de acetonitrila 50% (v/v) em água, contendo inibidor de proteases (p-metilsulfonil fluoreto - PMSF) 10 mM, as glândulas (20 glândulas/1mL solução, em triplicata para cada amostra) foram comprimidas com o auxílio de um mini-pistilo de Teflon, para provocar a liberação do conteúdo glandular. Em seguida,

as amostras (denominadas de secretoma das glândulas) foram centrifugadas à 8000 x g por 15 minutos, com o sobrenadante sendo coletado, filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45 µm (Millipore) e liofilizado; os extratos secos resultantes foram fracionados assim como descrito abaixo.

#### **3.1.4. Fracionamento das amostras para a obtenção dos peptídeos de até 3kDa**

As amostras foram fracionadas através de centrifugação à 12000 x g por 90 minutos em filtros microconcentradores Amicon 3000, para separar os peptídeos que apresentam massas de até 3 kDa dos proteopeptídeos, que apresentam massas acima de 3 kDa. Após o fracionamento, as amostras de até 3 kDa foram quantificadas, liofilizadas e os extratos secos resultantes foram armazenados à -20°C, até o momento de serem utilizados.

#### **3.1.5. Fracionamento das amostras para a obtenção dos peptídeos de 3 kDa até 10kDa**

A frações de proteopeptídeos, que apresentam massas acima de 3 kDa, foram novamente fracionadas através de centrifugação à 12000 x g por 30 minutos em filtros microconcentradores Amicon 10.000, para a obtenção de proteopeptídeos que apresentam massas entre 3-10 kDa. Após o fracionamento, as amostras foram quantificadas, liofilizadas e os extratos secos resultantes foram armazenados à -20°C, até o momento de serem utilizados.

#### **3.1.6. Digestão em solução das frações de 3-10 kDa (estratégia *shotgun*)**

Apenas para as amostras correspondentes às frações que apresentam massas entre 3-10 kDa foram aplicadas a estratégia *shotgun*. Essas amostras foram solubilizadas em bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.9 contendo ureia 7.5 M, e incubadas por 60 minutos à 25°C sob leves agitações a cada 20 minutos. Em seguida, foi realizado o tratamento de redução e alquilação com a adição de Ditioneitol (DTT) 10 mM por 60 minutos à 37°C; e iodoacetamida (IAA) 40 mM também por 60 minutos à 25°C. Após esses tratamentos, as amostras foram diluídas cinco vezes com bicarbonato de amônio 100 mM, pH 7.8, contendo cloreto de cálcio 1M. Em seguida foi adicionado tripsina (Promega) 40 ng / µL a 37°C por 16h. A reação de digestão foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico. As amostras digeridas foram dessalinizadas utilizando uma coluna SPE C18 (Discovery DSC-18, Supelco) condicionada com

acetonitrila/ácido trifluoracético (ACN / TFA 0.1%). Os fragmentos peptídicos gerados da digestão foram eluídos da coluna com ACN 80%/ TFA 0.1%, secos em *speedvac* e solubilizados em ACN 2%/ácido fórmico 0.5% para serem analisados.

### 3.1.7. Quantificação das amostras

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

### 3.1.8. Análises de espectrometria de massas dos extratos da seda da teia e glândulas produtoras de seda

Para as análises de espectrometria de massas foi utilizado um espectrômetro do tipo  $\mu$ LC-ESI-microTOF-Q-III (Bruker Daltonics), para a detecção e sequenciamento de peptídeos. Um sistema UFLC (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, 12 nm (3 mm id x 100 mm, 2.2  $\mu$ m) (Shim-pack XR-ODS, Shimadzu) com a eluição dos peptídeos sendo monitorada à 214nm em 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 de íons 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 Calibrant (Agilent). Os espectros de massas foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada utilizando o software DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics).

### 3.1.9. Identificação da origem em potencial dos peptídeos observados

Os dados de espectrometria de massas foram analisados e validados com o auxílio dos softwares DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) e Peaks 7 (Complete software for proteomics). Em seguida, foram também manualmente analisados para a confirmação dos resultados, conforme método de interpretação e sequenciamento de peptídeos descrita 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. Após determinadas as sequências peptídicas, foram realizadas buscas através do software de alinhamento e busca local de sequências proteicas – BLASTp: (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) em banco de dados com sequências de proteínas não redundantes e restrição de organismo a classe Arachnida e/ou a ordem Araneae. Além do blastp, as sequências foram submetidas a buscas em bancos de dados mais específicos como o ArachnoServer spider toxin database (<http://www.arachnoserver.org/mainMenu.html>) e Uniprot animal toxin database ([www.uniprot.org/program/toxins](http://www.uniprot.org/program/toxins)).

### 3.2. Síntese dos peptídeos identificados na aranha *T. clavipes*

Treze peptídeos foram selecionados e sintetizados em fase sólida, pela empresa Life PROtein (New Jersey, Estados Unidos) – grau de pureza acima de 95%. As informações sobre as sequências dos peptídeos estão mostradas na tabela abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4. Sequência peptídicas sintetizadas.** #: Número do peptídeo; Sequence: sequência peptídica; #AA: número de aminoácidos; Mm: massa molecular; Nome: nome dado a sequência peptídica; (\*): troca do resíduo de C por S.

#	Sequence	#AA	Mm (Da)	Nome
1	MVDDALGAADAEMV	14	1406,606	Trichonephiline-1
2	EGVDDALGAADNLDL	15	1474,624	Trichonephiline-2
3	MVSVDLGAACMDPV (*)	14	1406,624	Trichonephiline-3
4	YVTDDALEAADNLES	15	1624,710	Trichonephiline-4
5	TAMKASVAAGALVSA	15	1346,722	Trichonephiline-5
6	ASVAEPSQTPLW	12	1284,635	Trichonephiline-6

7	MVDSVLGAACNNLT (*)	14	1406,653	Trichonephiline-7
8	MVADDLGAACDPVM (*)	14	1406,587	Trichonephiline-8
9	FNRLDGTGFIL	11	1307,723	Trichonephiline-9
10	TIGRASSLSK	10	1018,577	Trichonephiline-10
11	MTALSGAALCGPT (*)	13	1207,558	Trichonephiline-11
12	MSVVFAALGADDVL	14	1410,717	Trichonephiline-12
13	EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL	21	2350,264	Trichonephiline-13

### 3.3. Bioensaio de Inseto-toxicidade via hemocele de abelhas *Apis mellifera*

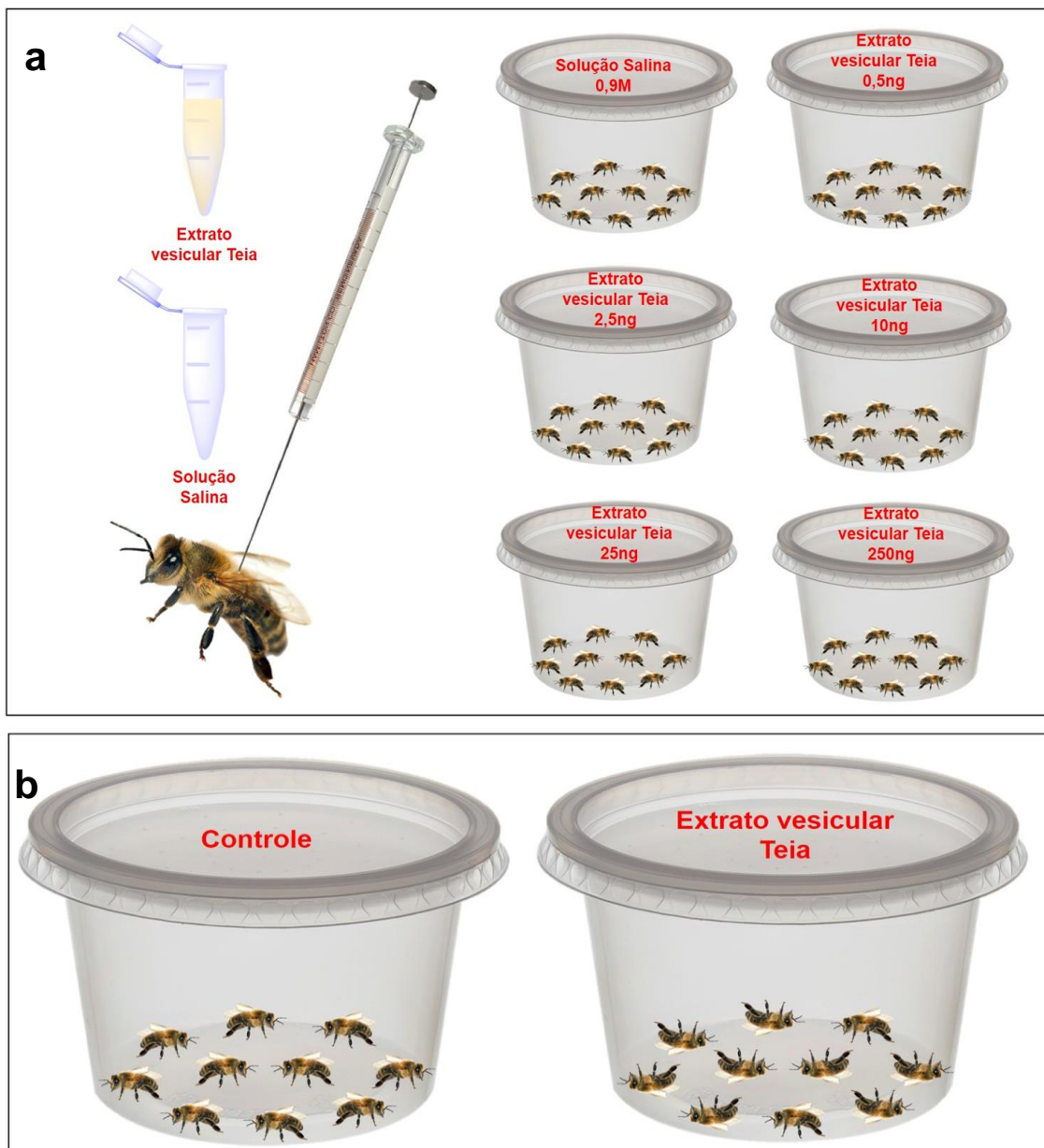
#### 3.3.1. Bioensaio com a porção vesicular da teia da aranha *T. clavipes*

Considerando que a teia é constituída por uma diversidade de toxinas proteicas, peptídicas e compostos de baixas massas moleculares, foram realizados bioensaios de inseto-toxicidade. Inicialmente o bioensaio teve como finalidade verificar a toxicidade do extrato da porção vesicular da teia, frente às abelhas *A. mellifera*, insetos que são presas naturais da aranha *T. clavipes*.

Primeiramente foi separada a porção vesicular da teia, uma vez que as vesículas lipídicas extracelulares provavelmente carregam em seu interior as proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas de caráter tóxico. Para isso, as teias orbitais foram coletadas no campo, e limpas com o auxílio de pinças para a retirada de partículas contaminantes, restos de insetos, folhas e galhos aderidos à seda. Os fios de seda foram “lavados” com água (Milli-Q) à 25°C, sob leve agitação por 4 horas (190mg de teia/1mL de água). Após esse período, a amostra foi deixada em repouso, e por decantação duas fases foram separadas: uma fina camada oleosa sobrenadante, e uma fase aquosa mais densa. A fase sobrenadante, a qual denominamos de porção vesicular da teia, foi coletada e colocada em um novo microtubo. Em seguida foi realizada a quantificação das vesículas lipídicas extracelulares em câmara de Neubauer, quantificação por peso seco e quantificação de proteínas/peptídeos, assim como descrito no capítulo 1 na seção de materiais e métodos 3.2. Por fim, a porção vesicular da teia foi liofilizada e ressuspendida em solução salina no momento da realização do bioensaio.

Os ensaios foram adaptados e realizados de acordo com o protocolo descrito por Manzoli-Palma e colaboradores (2003) utilizando indivíduos de abelhas recém-emergidas. As diferentes concentrações do extrato vesicular da teia foram calculadas através da relação em ng de vesículas que entram em contato com o corpo do inseto-modelo, quando o mesmo é capturado pela teia (ng de vesículas/cm<sup>2</sup> do corpo do

inseto). Sendo assim, foram injetados 1 $\mu$ L de diferentes concentrações do extrato vesicular da teia solubilizado em solução fisiológica, na hemolinfa do inseto - 0,5 ng/ $\mu$ L, 2,5 ng/ $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L, 25 ng/ $\mu$ L, e 250 ng/ $\mu$ L (Figura 19a). O grupo controle foi realizado a partir da injeção de 1  $\mu$ L de solução salina (0,9 M de NaCl). Dessa forma, os insetos foram separados em 6 grupos amostrais (controle e as cinco concentrações testadas) com 10 indivíduos em cada grupo; sendo que cada grupo amostral foi realizado em triplicata (figura 19b). O comportamento das abelhas foi observado por um período de 72 horas. Foram observadas as seguintes respostas ao extrato: animal ativo, movimentos lentos, paralisia e morte, conforme descrito por Zlotkin (1983) (figura 19b). Foi avaliado a toxicidade e estabelecido o valor dose letal (LD<sub>50</sub>) com auxílio do software GraphPad Prisma versão 6.01.



**Figura 19. Esquema representativo do Bioensaio de Inseto-toxicidade.** **a)** A imagem mostra a solução controle (solução salina) e a solução com potencial tóxico (extrato vesicular da teia) que foram injetadas nas abelhas, além de evidenciar o local da inserção da seringa na região dorsal do abdômen da abelha *Apis mellifera*, e os potes representativos de cada concentração injetada. **b)** Perfil esperado do comportamento das abelhas do pote controle em que foram injetadas apenas solução controle (solução salina) - abelhas vivas. Perfil esperado do comportamento das abelhas do pote em que foram injetadas a solução com potencial tóxico (solução vesicular da teia) - abelhas mortas.

### 3.3.2. Bioensaio com os peptídeos oriundos da aranha *T. clavipes*

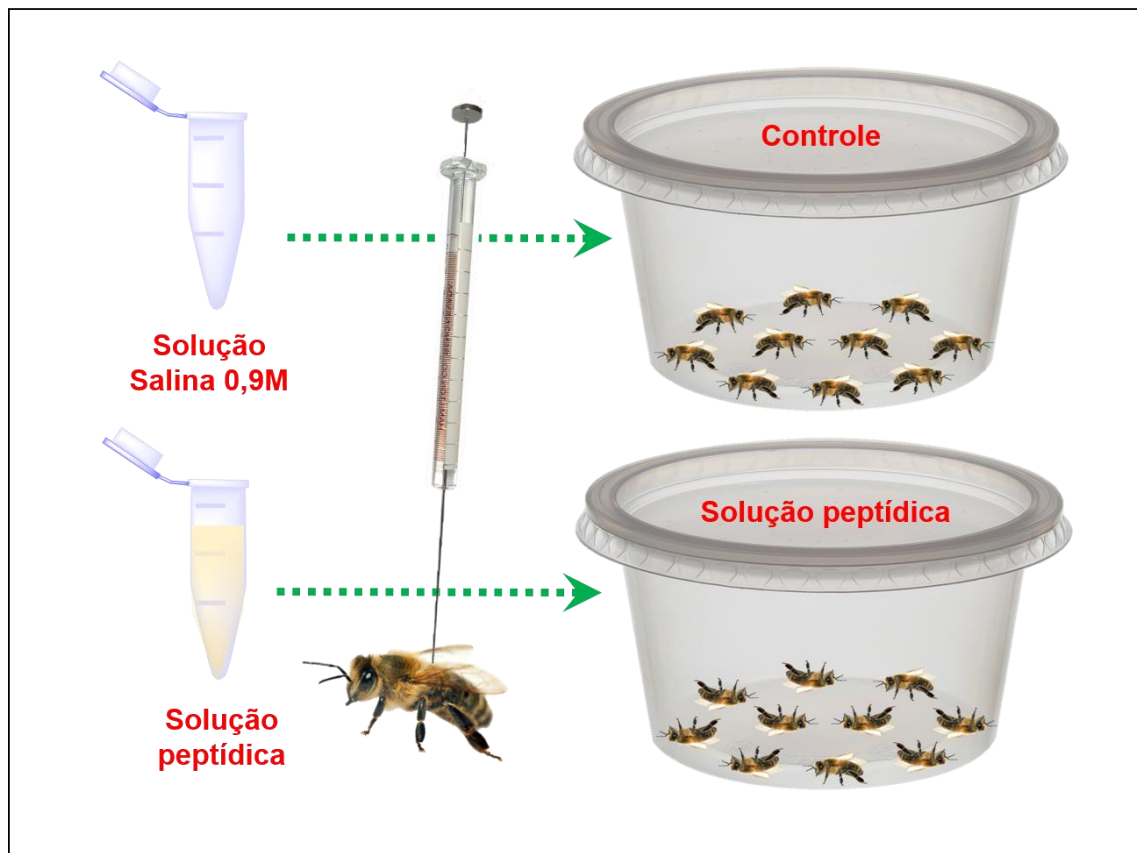
Foram selecionados 11 peptídeos que apresentaram ter similaridade com sequências de toxinas, oriundas da seda da teia e glândulas produtoras de seda. Além dessas 11 sequências foram selecionadas mais 2 sequências de peptídeos não caracterizados. Esses peptídeos foram sintetizados artificialmente (conforme descrito na seção de materiais e métodos 3.2), e posteriormente avaliado o potencial tóxico dos mesmos quando injetados em abelhas *Apis mellifera*. Os ensaios foram adaptados e realizados de acordo com o protocolo descrito por Manzoli-Palma e colaboradores (2003).

Inicialmente uma única concentração de 200 ng do peptídeo foi injetada em abelhas recém-emergidas a fim de separar quais dos 13 peptídeos apresentariam efeitos tóxicos ou não. Sendo assim, inicialmente foram injetados 1µL contendo 200 ng do peptídeo em solução fisiológica, na hemolinfa do inseto, enquanto que o grupo controle foi realizado apenas a injeção de 1 µL de solução salina (0,9% de NaCl). Dessa forma, os insetos foram separados em 2 grupos amostrais (controle e a concentração única) com 10 indivíduos em cada grupo; sendo que cada grupo amostral foi realizado em triplicata. A figura 20 traz um esquema geral sobre esse ensaio.

O comportamento das abelhas foi observado por um período de 24 horas. Foram observadas as seguintes respostas ao extrato: animal ativo, movimentos lentos, paralisia e morte, conforme descrito por Zlotkin (1983) (Figura 20). Foi avaliado a toxicidade e estabelecido o valor dose letal (LD<sub>50</sub>) com auxílio do software R versão 3.5.0 com o pacote HNP (Half-NormL Plots).

É importante mencionar que as soluções mencionadas nos ensaios acima foram injetadas com auxílio de uma seringa (Hamilton®) de 50 µL inserida em um dispenser (Hamilton® PB600) na inserção entre o primeiro e o segundo terço, diretamente na hemolinfa da abelha. Além disso, as abelhas foram alimentadas por meio de pequenos recipientes contendo uma solução pastosa de açúcar e mel (50%

m/v). Os recipientes foram mantidos em BOD a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e em escuridão constante.



**Figura 20. Esquema representativo do Bioensaio de Inseto-toxicidade.** A imagem mostra a solução controle (solução salina) e a solução com potencial tóxico (sequência peptídica similar à toxina) que foram injetadas nas abelhas. Além disso é evidenciado o local da inserção da seringa na região dorsal do abdômen da abelha *Apis mellifera* e apresentado o perfil esperado do comportamento das abelhas durante as 24 horas do bioensaio. O perfil esperado do comportamento das abelhas do pote controle em que foram injetadas apenas solução controle (solução salina) - abelhas vivas. O perfil esperado do comportamento das abelhas do pote em que foram injetadas a solução com potencial tóxico (200 ng da sequência peptídica similar à toxina) - abelhas paralisadas/mortas.

### 3.4. Ensaio antimicrobiano com o extrato bruto da teia e peptídeos oriundos da aranha *T. clavipes*

Os testes para verificação de atividade antimicrobiana do extrato bruto da teia e dos peptídeos sintetizados foram realizados através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Os peptídeos foram testados contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os microrganismos utilizados e o ensaio de atividade antimicrobiana foram realizados pela *Community for Open Antimicrobial Drug Discovery* (CO-ADD) – IMB/UQ, Austrália.

O extrato bruto da teia e os peptídeos foram inoculados seguindo uma dose resposta de 32 a 0,25 µg / mL (ou 20 a 0,156 uM) em duplicata, com um máximo de 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final do ensaio. A inibição do crescimento de todas as bactérias foi determinada medindo a absorbância a 600 nm (OD600), usando um leitor de placas monocromador Tecan M1000 Pro. A porcentagem de inibição do crescimento foi calculada para cada poço, utilizando o controle negativo (apenas meio) e o controle positivo (bactérias sem o extrato bruto da teia / peptídeos) na mesma placa como referências.

A porcentagem de inibição do crescimento de amostras individuais e a concentração foram calculadas com base nos controles negativos (apenas meio; 100%) e controles positivos (meio bacteriano sem o extrato bruto da teia / peptídeos 0%). As taxas de crescimento para todos os microrganismos tiveram uma variação de  $\pm 10\%$ , que está dentro da distribuição normal esperada. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), identificando a concentração mais baixa na qual a inibição total da bactéria foi detectada. A inibição total do crescimento foi definida em  $\leq 20\%$  do crescimento (ou  $> 80\%$  de inibição), e as concentrações só foram selecionadas se a próxima concentração mais alta também exibisse inibição total (ou seja, 80-100%).

Toda a triagem foi realizada em duplicata ( $n = 2$ ), com ambas as réplicas em placas de ensaio diferentes, mas de plaqueamento único e realizado em um único experimento de triagem. Além disso, dois valores são usados como controles de qualidade para placas individuais:  $Z\text{-Factor} = [1 - (3 * (sd (\text{NegCtrl}) + sd (\text{PosCtrl})) / (m\u00e9dia (\text{PosCtrl}) - m\u00e9dia(\text{NegCtrl})))]$  e controles de antibiótico padrão em diferentes concentrações ( $>MIC$  e  $<MIC$ ). A placa passa no controle de qualidade se o Fator Z  $> 0,4$  e os padrões estiverem ativos e inativos nas concentrações mais alta e mais baixa, respectivamente.

### **3.5. Ensaio de *Fluorescence Imaging Plate Reader* – FLIPR**

#### **3.5.1. Cultura de células**

Foi utilizada a linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a qual foi mantida a 37 ° C em uma incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> umidificada em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS) e 2 mM de L-glutamina. As células em replicação foram subcultivadas a cada 3-4 dias em uma proporção de 1:5 usando 0,25% de tripsina / EDTA. Todos os reagentes de

cultura de células foram obtidos da Gibco (Life Technologies Corporation), a menos que indicado de outra forma.

### **3.5.2. Avaliação da atividade inibitória dos peptídeos contra canais de íons hNav, hCav2.2, hCav1.3 e receptor nAChR $\alpha$ 7**

O ensaio de potencial de membrana FLIPR foi realizado no leitor de placas FLIPR<sup>TETRA</sup> (Molecular Devices) para examinar a atividade de 13 peptídeos sintetizados em fase sólida frente aos canais de NaV, Cav2.2, Cav1.3 e receptor nAChR $\alpha$ 7. Em resumo, as células SH-SY5Y foram plaqueadas a 40.000 células por poço em placas planas de fundo preto transparente de 384 poços (Corning Inc.) e cultivadas em uma incubadora a 37 ° C umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Foi adicionado nas células 20 $\mu$ L / poço de corante Cálcio 4 (Molecular Devices) reconstituído em tampão de ensaio contendo (em milimolar) 140 NaCl, 11.5 glicose, 5.9 KCl, 1.4 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub> e 10 HEPES (pH 7.4) e incubados em uma incubadora a 37 ° C umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, por 30 minutos.

As respostas de fluorescência foram registradas usando excitação de 470–495 nm e emissão de 515–575 nm por 10 segundos para definir a linha de base, então novamente 600 segundos após a adição de 1, 0,1 ou 0,01 mM de peptídeo/poço e finalmente por mais 300 segundos após adição de 3  $\mu$ M de veratridina para ativação de hNav, 90 mM KCl 5 Mm CaCl<sub>2</sub> para ativação de Cav2.2, 90 mM KCl 5Mm CaCl<sub>2</sub> para ativação de hCav1.3 e 30  $\mu$ M de colina / PNU para ativação de nAChR $\alpha$ 7. Para o ensaio hCav2.2, nifedipina a 10  $\mu$ M foi adicionada ao corante Cálcio 4 para inibir as respostas endógenas de hCav1. Os controles para a inibição das respostas de fluorescência de Ca<sup>2+</sup> foram tetrodotoxina (TTX) a 1  $\mu$ M para hNav, CVIF a 1  $\mu$ M para hCav2.2, nifedipina a 10  $\mu$ M para hCav1.3 e tubocurarina a 10  $\mu$ M para respostas de nAChR $\alpha$ 7. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada sequência de peptídeo de cada canal/receptor testado. Os dados foram normalizados em relação à linha de base e as respostas de fluorescência plotadas usando GraphPad Prism 7.

## **3.6. Análise do perfil proteico da seda e das glândulas produtoras de seda da aranha *T. plumipes* por abordagem proteotranscriptômica**

### **3.6.1. Obtenção das glândulas e da seda da teia da aranha *T. plumipes***

As aranhas *T. plumipes* e suas teias foram coletadas no campus da Universidade de Queensland localizada na cidade de Brisbane, Queensland, de

maneira georreferenciada (-2729'52.8"S 15301'01.9E"). As aranhas foram dissecadas para a retirada das glândulas produtoras de seda - ampulada maior e agregada.

### **3.6.2. Procedimentos experimentais de transcriptômica para amostras de glândulas produtoras de seda**

Duas glândulas produtoras de seda - ampulada maior e agregada - foram armazenadas na presença de reagente de estabilização RNAlater (Thermo Fisher Scientific) para preservação de RNA até o uso. As glândulas de 1 indivíduo feminino; e todos os procedimentos experimentais para sequenciamento do transcriptoma, montagem e anotação foram realizadas e processadas conforme descrito anteriormente por Walker e colaboradores (2019). O RNA total da glândula ampulada maior e glândula agregada foi extraído usando um kit RNeasy (# 74104, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA Poly (A)+ foi purificado usando um kit Dynabeads mRNA Direct (# 64011, Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante, rendendo 920 ng e 732 ng de mRNA para a glândula ampulada maior e agregada, respectivamente. As concentrações de ácido nucleico foram quantificadas por absorção a 260 nm (A260) em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). A preparação da biblioteca e o sequenciamento foram realizados na instalação de sequenciamento do Instituto de Biociência Molecular na Universidade de Queensland Austrália em um HiSeq 2500 (Illumina), rendendo 42.324.442 e 67.317.010 150 bp em pares de leituras para a ampulada maior e para a glândula agregada, respectivamente. As leituras foram montadas de novo em contigs usando o software Trinity 2.4.0 e CLC Genomics Workbench 8.0.2 (CLC Bio). Para a montagem Trinity, as configurações de corte padrão e um tamanho mínimo de contig de 120 bp resultaram em 83500 contigs. Para CLC Genomics Workbench, as leituras foram cortadas com um parâmetro de limite de 0,01, e quatro assemblies (tamanho mínimo de contig 120 bp) foram produzidos usando parâmetros de palavra (k-mer) de 31 (44176 contigs), 42 (47707 contigs), 53 (51439 contigs) e 64 (61120 contigs). Para produzir um banco de dados para identificação de proteínas com base em MS, esses conjuntos foram agrupados em um único arquivo, a partir do qual quadros de leitura abertos que codificam polipeptídeos > 30 resíduos de aminoácidos foram extraídos usando TransDecoder. Por fim, as sequências obtidas pelo TransDecoder foram comparadas com sequências depositadas em bancos de dados

(sequência de proteína não redundante) usando a ferramenta de busca de alinhamento local básica - BLASTp: (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com restrição de aracnídeos; e banco de dados Swiss-Prot.

### **3.6.3 Procedimentos experimentais de proteômica para as amostras de glândula produtora de seda e a seda da teia, abordagem shotgun**

Para cromatografia líquida em MS tandem (LC-MS/MS), 2 glândulas produtoras de seda - ampulada maior e agregada e a seda da teia foram inseridas em microtubo contendo água (Milli-Q) e centrifugadas individualmente 12.000 x g por 10 minutos à 4°C para remover particulados. Cerca de 5-50 µg de glândulas e seda da teia foram incubados com 20 µL de tampão de redução / alquilação (carbonato de amônio 50 mM pH 11, 1% de iodoetanol, 0,025% de trietilfosfina em 48,5% de acetonitrila) por 2 horas a 37°C. A amostra reduzida e alquilada foi então liofilizada, ressuspensa em 10 µL de reagente de digestão (20 ng / µL de tripsina de grau proteômico Sigma # T7575, em 40 mM de bicarbonato de amônio pH 8, 5% de acetonitrila) por 16 horas a 37°C. A reação foi então encerrada pela adição de 20 µL de ácido fórmico a 5% e a digestão trípica foi liofilizada.

### **3.6.4. Aquisição e Análise de dados proteômicos**

Os digestos trípticos foram ressuspensos em ácido fórmico a 1%, acetonitrila 2,5% (v/v) e carregados em uma coluna Zorbax 300SB-C18 de 150 x 0,1 mm (tamanho de partícula de 3,5 µm, tamanho de poro 300 Å) em um sistema Nano LC (Shimadzu). O fluxo de saída de LC foi acoplado a um espectrômetro de massa Triplo TOF (SCIEX 5600) equipado com uma fonte de íons Turbo V. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 70 min de 1–40% de solvente B (90% de acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico) e solvente A (0,1% de ácido fórmico) a uma taxa de fluxo de 0,2 mL / min. Varreduras de MS1 foram adquiridas em uma faixa de m/z 350-1800, e íons precursores na faixa de m/z 350-1500 com carga +2 a +5. As varreduras de MS/MS foram adquiridas com um tempo de acumulação de 250 milissegundos (ms) e um ciclo de tempo de 4 segundos. A opção “rolling collision energy” foi selecionada, permitindo que a energia de colisão seja variada dinamicamente com base em valores de m/z e de z do íon precursor. Até 20 espectros de MS/MS semelhantes foram agrupados a partir de íons precursores que diferem em menos de 0,1 Da.

Os espectros de massa resultantes no formato WIFF foram então comparados com uma biblioteca de ORFs traduzidos extraídos de transcriptomas gerados a partir de experimentos de RNA-Seq (junto com uma lista de comuns contaminantes MS) usando um algoritmo Paragon 4.0.0.0 implementado no software ProteinPilot 4.0.8085 (Sciex). Uma tolerância de massa de 50 mDa foi usada para íons precursores e MS/MS. Para amostras reduzidas, alquiladas e submetidas a digestão, o limite de identificação de proteína foi estabelecido em três fragmentos trípticos detectados, cada um com > 95% de confiança se nenhum peptídeo sinal de secreção foi previsto pelo SignalP 4.1, ou dois fragmentos trípticos detectados se um peptídeo sinal foi previsto. Os espectros de massa em tandem também foram analisados manualmente usando o software Analyst 6.1 e PeakView (Sciex).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados e discutidos de forma que a leitura do texto e interpretação dos dados, no decorrer deste capítulo, possa ocorrer de maneira compreensível, mas não necessariamente refletem a ordem em que o estudo foi realizado.

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos da análise do perfil peptídico da amostra da teia e das glândulas produtoras de seda, destacando aqueles que estão relacionados com a estratégia de captura de presas, pela teia da aranha *T. clavipes*. Ainda com esta espécie de aranha, através do ensaio de inseto-toxicidade serão apresentados os resultados dos possíveis efeitos tóxicos, exibidos pela amostra da teia e dos peptídeos sintetizados. Em seguida, através do ensaio de FLIPR também serão apresentados os resultados da atividade de inibição dos peptídeos sintetizados frente a diferentes canais iônicos/receptor. E posteriormente, através do ensaio de antibiose serão apresentados os resultados sobre ação antibiótica exibidos pela amostra da teia e peptídeos sintetizados oriundos da aranha *T. clavipes*.

Por fim, serão apresentados os resultados obtidos da análise das proteínas da amostra da teia e das glândulas produtoras de seda, destacando aquelas que estão relacionados com a estratégia de captura de presas, pela teia da aranha *T. plumipes*.

### 4.1. Perfilagem peptidômica da seda da teia e da secreção das glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*

O presente estudo teve início com a preparação dos extratos peptídicos através da lavagem da teia em acetonitrila 50% (v/v), e do secretoma das glândulas produtoras de seda em acetonitrila 50% (v/v) ambos na presença de inibidores de proteases, com a finalidade de extrair os peptídeos tanto hidrofílicos, quanto hidrofóbicos. É necessário comentar que em presença de inibidor de proteases, os peptídeos detectados nesses extratos são fisiológicos, i.e, ocorrem naturalmente na amostra e, portanto, não foram produtos de clivagem proteolítica artefactual.

Estes extratos foram então fracionados, através do uso de dois filtros seletivos por peso molecular, resultando em duas frações: uma fração com peptídeos de massas de até 3 kDa, e outra fração com peptídeos de massas entre 3-10 kDa, sendo que as amostras pertencentes a esta última fração foram submetidas à digestão em solução pela enzima tripsina.

Dessa forma, obtivemos amostras com peptídeos naturais, correspondentes a fração com peptídeos de massas de até 3kDa; e amostras com peptídeos de digestos trípticos, provindos da digestão tríptica da fração com peptídeos de massas entre 3-10kDa. Portanto, os dados apresentados neste capítulo foram divididos em duas partes, que correspondem às duas frações mencionadas acima: peptídeos naturais e peptídeos oriundos de digestos trípticos.

Para a fração de peptídeos de até 3 kDa, após as análises e processamento dos dados, foi possível identificar um total de 90, 31, 29, 52 e 64 peptídeos naturais para as glândulas: ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. Enquanto que para a fração de peptídeos de 3-10 kDa, após as análises e processamento dos dados, foi possível identificar um total de 62, 97, 174, 65 e 70 peptídeos de digestos trípticos para as glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente.

Devido a grande quantidade de dados que foram gerados e processados, e para que a redação deste capítulo possa ocorrer de forma contínua, de modo que a sua leitura não fosse interrompida, a relação completa de todas as sequências peptídicas identificadas está demonstrada no Apêndice A1-8.

Conforme descrito na seção de materiais e métodos 3.1.9. o sequenciamento dos peptídeos foi realizado com auxílio do Software DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) e Peaks 7. Mesmo com o auxílio dos softwares, todos os espectros de massas foram também manualmente analisados para a confirmação dos resultados, conforme método de interpretação e sequenciamento de peptídeos descrita por Cantú et al. (2008).

Todas as análises de espectrometria de massas foram realizadas no modo positivo (ESI+). Os espectros que são provenientes de fonte de ionização do tipo ESI, normalmente formam íons com múltiplas cargas (+2, +3, +4, etc). Considerando isso, a fim de interpretar os espectros de MS e MS/MS, os espectros contendo íons multiprotonados foram deconvoluídos para a forma de íons monoprotonados, com o objetivo de simplificar a interpretação de tais espectros; possibilitando dessa forma, o assinalamento das sequências primárias dos peptídeos.

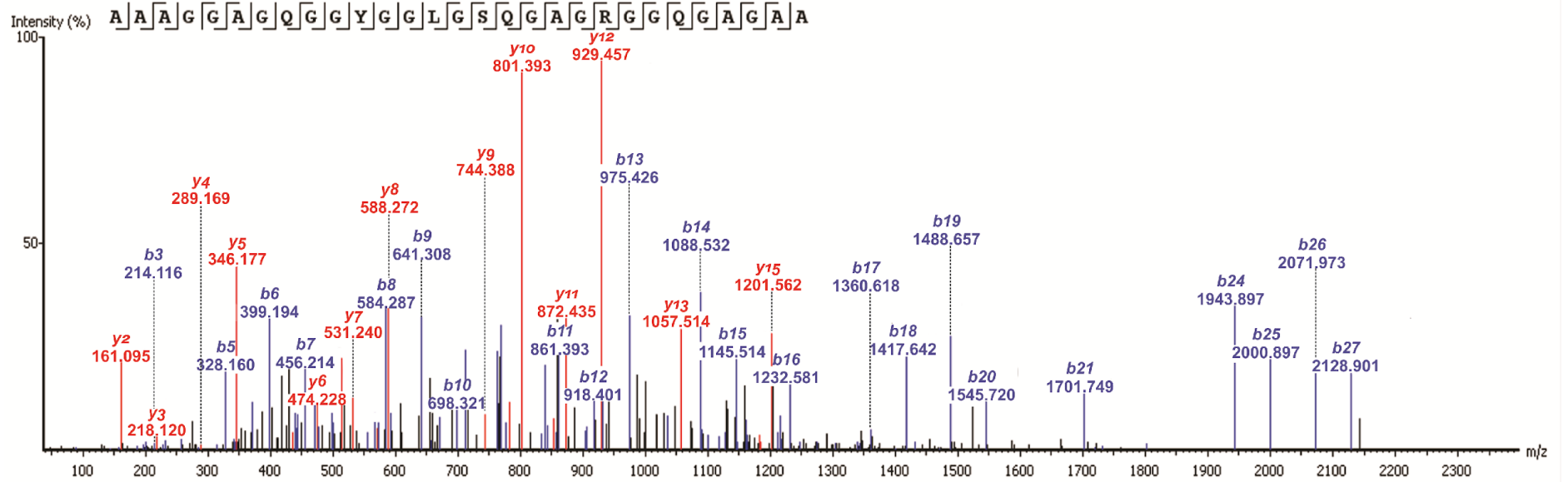
Além disso, os peptídeos foram fragmentados utilizando o princípio de dissociação induzida por colisão (CID). Os íons produzidos através do uso de CID, são majoritariamente das séries -b e -y (complementares entre si). A partir da subtração de valores de m/z entre dois íons consecutivos da mesma série, foi revelada

a massa de um resíduo de aminoácido. Dessa forma, a sequência completa do peptídeo foi determinada pela subtração de valores de  $m/z$  sequencial de íons da mesma série. Também foram considerados íons fragmentos de outras séries para a realização do sequenciamento dos peptídeos, como por exemplo íons das séries  $a/x$  e  $c/z$ .

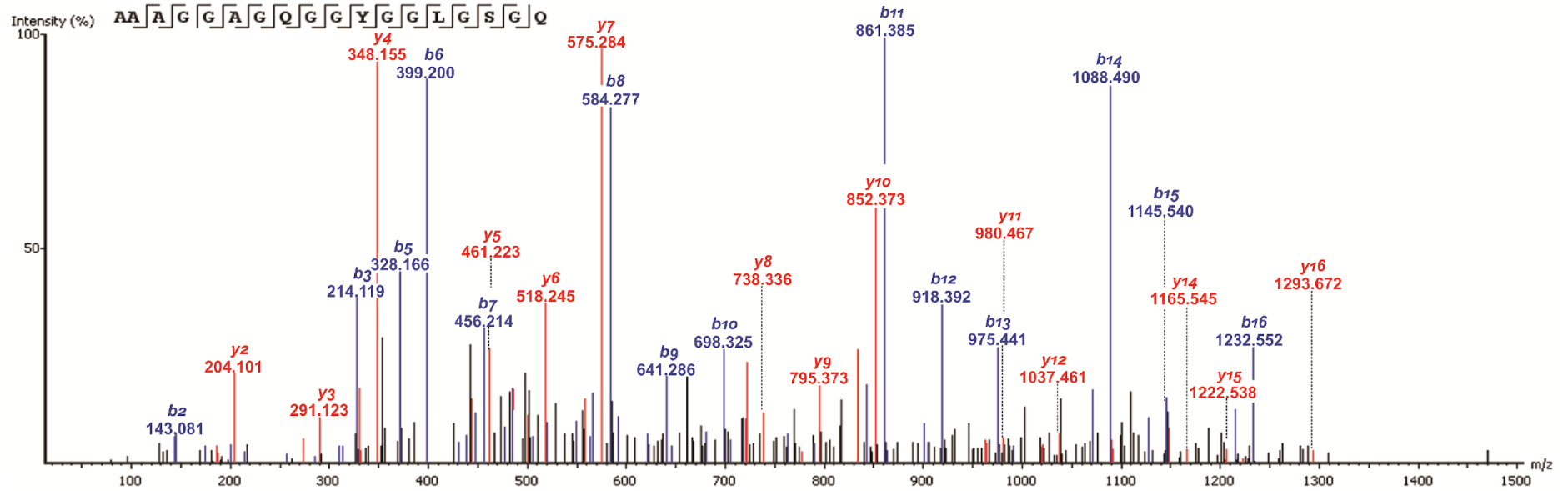
Enquanto as séries de íons do tipo  $-b$  e  $-y$  resultam diretamente da clivagem das ligações peptídicas, os íons do tipo  $-a$  são formados pela perda neutra de monóxido de carbono dos íons  $-b$  (diferença de 27,9949 u.m.a relativo ao íon  $-b$  correspondente) (Tabb et al., 2003; Dongre et al., 1996). Dessa forma, foi possível o reconhecimento de uma ou mais séries de íons (dos tipos  $b$  e/ou  $y$  principalmente), os quais por sua vez, permitiram a determinação das sequências dos peptídeos. Foi considerado uma tolerância de massa de 0,1 u.m.a para a realização dos cálculos para a obtenção das sequências.

Considerando a grande quantidade de espectros que foram gerados para a identificação das sequências peptídicas de todas as amostras, como exemplos, serão mostrados somente alguns espectros CID de algumas sequências peptídicas que se mostraram semelhantes a sequências de proteínas estruturais da seda já descritas e depositadas nos bancos de dados (Figuras 21-23).

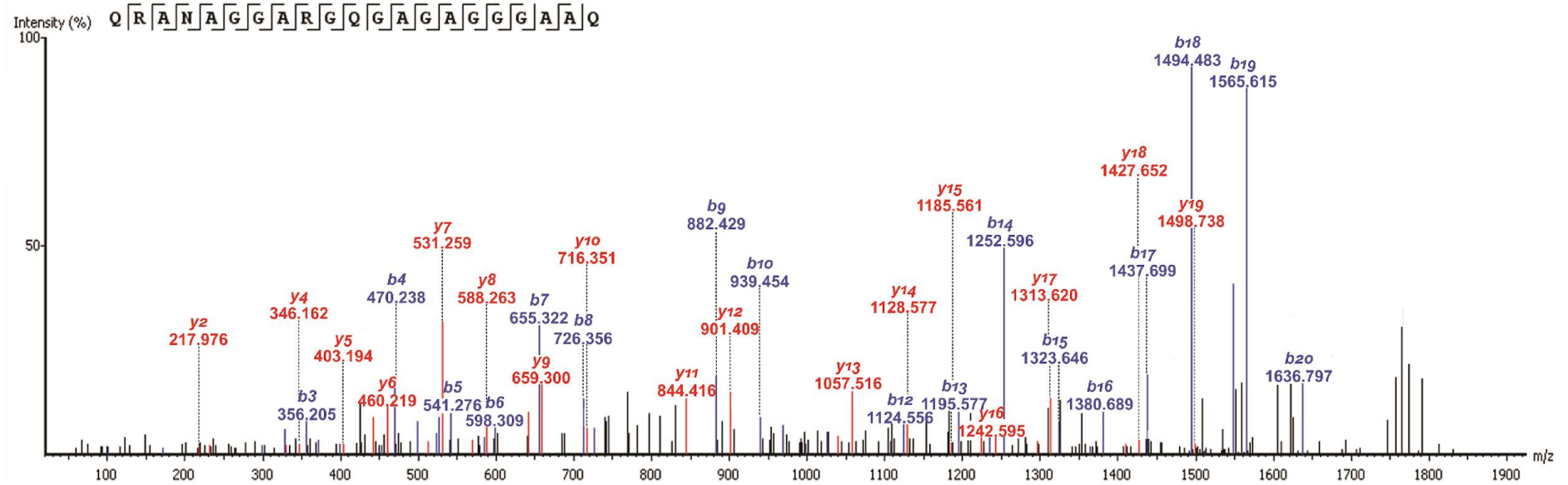
É importante mencionar que nos espectros de massas apresentados abaixo estão evidenciados os íons fragmentos da série  $-b$  e  $-y$ , mas também foram considerados íons-fragmentos de outras séries, para a realização do sequenciamento dos peptídeos identificados (Figuras 21-23).



**Figura 21:** Espectro CID representativo do peptídeo natural AAAGAGQGQGYGGLGSLGSGAGRGGQGAGAA-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  763.6979  $[M + 3H]^{3+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #18 está presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes*, e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *dragline silk fibroin partial* (código de acesso: AAA29380.2), nos bancos de dados Arachnidae – Tabela 5.



**Figura 22:** Espectro CID representativo do peptídeo natural AAAGGAGQGGYGGGLGSGQ-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  718.3342  $[M + 2H]^2$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #41 está presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *Dragline silk fibroin 1* (código de acesso: sp|P19837.3) nos bancos de dados Arachnidae – Tabela 5.



**Figura 23:** Espectro CID representativo do peptídeo natural QRANAGGARGQGAGAGGGAAQ-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  891.9343  $[M + 2H]^2$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #89 está presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *minor ampullate spidroin* (código de acesso: ARA91163.1) através do sequenciamento *de novo*. – Tabela 5

É importante mencionar novamente, que tanto a amostra da teia quanto as das glândulas produtoras de seda, são consideradas matrizes de composição complexa. Por isso, após determinadas as sequências peptídicas dessas amostras, foram realizadas buscas, através do software de alinhamento e busca local de sequências proteicas - BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), em banco de dados com sequências de proteínas não redundantes e restrição de organismo a classe Arachnida e/ou a ordem Araneae. Além do BLASTp, as sequências foram submetidas a buscas em bancos de dados mais específicos como o *Arachno Server spider toxin database* (<http://www.arachnoserver.org/mainMenu.html>) e *Uniprot animal toxin database* ([www.uniprot.org/program/toxins](http://www.uniprot.org/program/toxins)). E ainda, para as sequências que não foram obtidas identificações dentro dos bancos de dados, essas foram então submetidas ao sequenciamento *de novo*.

Dessa forma, a comparação com sequências depositadas em bancos dados nos auxiliou inicialmente na classificação e identificação das potenciais origens moleculares das sequências dos peptídeos obtidas nas diferentes amostras. É importante enfatizar que embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. clavipes* sejam conservadas a uma pequena região de uma proteína já caracterizada em banco de dados, isso não significa que esses peptídeos exercerão a função dessas mesmas proteínas. Por fim, foi considerado também o processo biológico específico das amostras, ou seja, a complexidade das glândulas produtoras de seda e a relação das mesmas com o processo de fiação para a construção da teia. Portanto, foi possível classificar os peptídeos em 4 diferentes grupos, relacionados com o seu papel em potencial na teia: (i) peptídeos estruturais da seda da teia; (ii) peptídeos potencialmente originados de toxinas; (iii) outros peptídeos (que não apresentam um papel funcional conhecido, em potencial na teia); e (iv) peptídeos ainda não caracterizados (existentes nos bancos de dados, mas que ainda não foram caracterizadas funcionalmente). Esses grupos serão melhor discutidos no decorrer do presente capítulo.

#### (i) Peptídeos estruturais da seda da teia

Para a fração de peptídeos de até 3 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 61, 2, 26 e 8 peptídeos aparentemente semelhantes a proteínas estruturais das fibras de seda para as glândulas ampulada maior, ampulada menor, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. Enquanto que para a fração de

peptídeos de 3-10 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 44, 13, 72, 27 e 11 peptídeos semelhantes a proteínas estruturais das fibras de seda para as glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. As tabelas 5 e 6 apresentam, de forma simplificada, os dados deste grupo de peptídeos, considerando apenas os peptídeos identificados como “semelhantes às proteínas” estruturais da seda pertencentes a ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae.

Os peptídeos naturais, identificados como semelhantes às sequências de proteínas estruturais da seda, incluídas nesse grupo foram: *dragline silk fibroin*, *dragline silk fibroin 1*, *fibroin -1*, e *-2*, *flagelliform silk protein*, *major ampullate spidroin*, *major ampullate spidroin 1*, *minor ampullate silk 1*, *minor ampullate spidroin*, *spidroin-2-like* (tabela 5).

**Tabela 5.** Agrupamento dos peptídeos naturais apresentando massas moleculares de até 3kDa de acordo com o seu papel funcional na teia.- i) Peptídeos estruturais da seda da teia - as espidroínas. Na tabela foram apenas considerados peptídeos pertencentes à ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae /ou sequenciamento *de novo*. #: Número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glândula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.

PEPTÍDEOS ESTRUTURAIS DA SEDA DA TEIA COM MASSAS MOLECULARES DE ATÉ 3 KDa														
#	Sequências dos Peptídeos	#AA	Mm (Da)	TR (min)	Código de Acesso	Nome da potencial proteína de origem	Organismo	Identidade	Amostra					
									TEIA	AMA	AME	AGRE	FLA	
1	AAAGGAGQGGYG GLGGQGAGQGGY GGLG	28	2145,99	9,83	AAA29380.2	dragline silk fibroin partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	+	-	-	-	
2	STISNVVSQIGA	12	1174,6194	18,46				100%	-	+	-	-	-	
3	GAGQGGYGGLGG QGAGQGGYGGLG	24	1951,8772	15,16				100%	-	+	-	-	-	
4	AAGGAGQGGYGGL GSQGAGRGGQGA GA	27	2145,99	10				100%	-	+	-	-	-	
5	AAAGGAGQGGYG GLG	15	1162,5366	11,9				100%	-	+	-	-	-	
6	AAAAGGAGQGGGLG QGAGQGAG	22	1639,7662	8,7				100%	-	+	-	-	-	
7	AAAGGAGQGGGLGG QGAGQGAGAA	23	1710,8033	9,32				100%	-	+	-	-	-	
8	AGGAGQGGYGGL G	13	1020,4624	11,71				100%	-	+	-	-	-	
9	AAAAAGGAGQGGY GGLGSQGAGRGG QGAGAAA	32	2501,1755	10,51				100%	-	+	-	-	-	
10	GAGQGGYGGLGS QGAGRGGQGAG	23	1875,8572	9,53				100%	-	+	-	-	-	
11	AAAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAGAA	30	2359,1013	10,29				100%	-	+	-	-	-	

12	AAAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAGA	29	2288,0642	10,17				100%	-	+	-	-	-
13	AAAGGAGQGGLG	12	885,4304	8				100%	-	+	-	-	-
14	AAAGGAGQGGLGG QGAGQGAGA	22	1639,7662	9,06				100%	-	+	-	-	-
15	AAGGAGQGGYGGL G	14	1091,4995	11,79				100%	-	+	-	-	-
16	AAAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAGAAA	31	2430,1384	10,43				100%	-	+	-	-	-
17	AAGGAGQGGLGG QGAGQGAG	20	1497,692	8,28				100%	-	+	-	-	-
18	AAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAGAA	29	2288,0642	10,21				100%	-	+	-	-	-
19	AAAAGGAGQGGLG GQGAGQGAGAA	24	1781,8405	9,45				100%	-	+	-	-	-
20	AAAAGGAGQGGLG GQGAGQGAGAAA	25	1852,8776	9,7				100%	-	+	-	-	-
21	AAAAGGAGQGGLG GQGAGQGAGA	23	1710,8033	9,21				100%	-	+	-	-	-
22	AGQGGYGGLG	10	835,3824	11,61				100%	-	+	-	-	-
23	AAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAGAAA	30	2359,1013	10,34				100%	-	+	-	-	-
24	AAAAGGAGQGGYG GLGGQGAGQGGY GGLG	29	2293,0471	15,12				100%	-	+	-	-	-
25	AAGGAGQGGLG	11	814,3933	7,65				100%	-	+	-	-	-
26	SAGQAAQIVGQSV YQAL	17	1746,89	19,95				100%	-	+	-	-	-
27	AGQAAQIVGQSVY QAL	16	1659,858	19,12				100%	-	+	-	-	-
28	GSAGQAAQIVGQS VYQAL	18	1803,9115	20,37				100%	-	+	-	-	-

29	AQIVGQSVYQAL	12	1332,7037	17,63				100%	-	+	-	-	-
30	SPQASSRVSAAVS NLVAS	18	1729,8959	15,55				100%	-	+	-	-	-
31	AAQIVGQSVYQAL	13	1403,7408	17,78				100%	-	+	-	-	-
32	SVYQAL	6	736,3755	13,74				100%	-	+	-	-	-
33	SSRVSAAVSNLVAS	14	1346,7153	14,07				100%	-	+	-	-	-
34	AAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAG	27	2145,99	9,83				100%	-	+	-	-	-
35	AAAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAG	28	2217,0271	9,94				100%	-	+	-	-	-
36	AAGGAGQGGYGGL GGQGAGQGGYGG LG	27	2150,9729	15,08				100%	-	+	-	-	-
37	AAGGAGQGGYGGL GSQGAGRGGQGA G	26	2074,9529	9,71				100%	-	+	-	-	-
38	AAAGGAGQGGYG GLGSQGAGRGGQ GAGA	28	2217,0271	10,07				100%	-	+	-	-	-
39	AGGAGQGGYGGL GGQGAGQGGYGG LG	26	2079,9358	15,13				100%	-	+	-	-	-
40	AAGGAGQGGGLGG QGAGQGAGAA	22	1639,7662	9,16				100%	-	+	-	-	-
41	AAAGGAGQGGYG GLGSQG	18	1434,6487	11,22	sp P19837.3	Dragline silk fibroin 1	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	+	-	-	-
42	STISNVVSQIGA	12	1174,6194	18,46				100%	-	+	-	-	-
43	AAAAGTG	7	517,2496	40,15	AAV48945.1	dragline silk spidroin 1	<i>Nephila pilipes</i>	100%	-	-	-	-	+
44	SSTTVTAAG	9	793,3818	15,29	AFM97624.1	fibroin 1	<i>Sphodros rufipes</i>	100%	+	-	-	-	-
45	SSGKASAF	8	753,3657	21,11	AAK30613.1	fibroin 4 partial	<i>Plectreureys tristis</i>	100%	+	-	-	-	-

46	YSPSAAAK	8	793,397	15,25	AAC47009.1	fibroin-2	<i>Araneus diadematus</i>	100%	+	-	-	-	-
48	SAYSNSVGRMFA	12	1288,5869	15,83	AAC38847.1	flagelliform silk protein	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	-	+
49	SAYSNSVGRMMA	12	1288,554	15,88				92%	-	-	-	-	+
50	APSPTAPAM	9	841,4004	11,18				78%	-	-	-	-	+
51	APSPTPAAM	9	841,4004	11,16				100%	-	-	-	-	+
52	GPSGTGGY	8	694,2922	7,96	AAF36090.1			100%	-	-	-	-	+
53	GPGGAGGPG	9	625,2819	3,79				100%	-	-	-	-	+
54	GPGGSGGPG	9	641,2769	2,41				100%	-	-	-	-	+
55	GGPASSGS	8	618,2609	103,85	AAC38846.1			flagelliform silk protein partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	+
56	APSPTPAAMSAYS NSVGRMFA	21	2111,9768	19,49	AAC38847.1	100%	-			-	-	-	+
57	AMSAYSNSVGRMF A	14	1490,6646	17,01		100%	-			-	-	-	+
58	MSAYSNSVGRMFA	13	1419,6274	16,51		100%	-			-	-	-	+
59	AYSNSVGRMFA	11	1201,5549	15,02		100%	-			-	-	-	+
60	SNSVGRMFA	9	967,4545	13,23		100%	-			-	-	-	+
61	APSPTPAA	8	841,4004	11,14		100%	-			-	-	-	+
62	SVGRMFA	7	766,3796	12,58		100%	-			-	-	-	+
63	GPGSAGG	7	501,2183	53,93		100%	-			-	-	-	+
64	GAGGPYGPG	9	731,3238	49,8		100%	-			-	-	-	+
65	TYGPG	5	493,2173	42,25		100%	-			-	-	-	+
66	AGGAGGPGG	9	599,2663	50,34		100%	-			-	-	-	+
67	GAGAGSGE	8	604,2452	70,8		ADM14324.1	major ampullate spidroin			<i>Agelenopsis aperta</i>	100%	-	-
68	AGAGSGE	7	547,2238	49,97	100%			-	-		-	-	+
69	AAAAGGAGQGGYG GLG	16	1233,5737	12	AAT75312.1	major ampullate spidroin 1	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	+	-	-	-
70	GGAGQGGYGGLG	12	949,4253	11,72				100%	-	+	-	-	-

71	GAGQGGYGGLG	11	892,4039	11,22				100%	-	+	-	-	-		
72	AGGAGQGGYGGL GGQG	16	1262,564	11,15				100%	-	+	-	-	-		
73	AAAAAGGAGQGGY GGLG	17	1304,6108	12,07				100%	-	+	-	-	-		
74	AAAGGAGQGGYG GLGGQG	18	1404,6382	11,28				100%	-	+	-	-	-		
75	GQGGYGGLG	9	764,3453	11,64				100%	-	+	-	-	-		
76	AAGGAGQGGYGGL GGQGAGAAA	22	1674,771	11,91				100%	-	+	-	-	-		
77	AAAAGGAGQGGYG GLGGQG	19	1475,6753	11,37				100%	-	+	-	-	-		
78	GGYGGQGAGAAAA AAGGAGQGGYGG LG	27	2079,9358	15,13	AAK30606.1			100%	-	+	-	-	-		
79	AAGGAGQGGYGGL GSQG	17	1363,6116	11,1						100%	-	+	-	-	-
80	SQGAGRGGYGGQ GAGAAA	18	1491,6814	6,86						100%	-	+	-	-	-
81	AAAAGGAGQGGYG GLGSQG	19	1505,6858	11,31						100%	-	+	-	-	-
82	FHQGGANLAGNA GANGAGAA	21	1781,8193	9,45	ABY67424.1	major ampullate spidroin 1 locus 2	<i>Latrodectus hesperus</i>	54%	-	+	-	-	-		
83	GCSNAGAAEAGAV M	14	1207,4961	18,61	CAJ90517.1	major ampullate spidroin 1 precursor	<i>Euprosthops australis</i>	75%	+	-	-	-	-		
84	GAGQGGYNLG	10	892,4039	11,22	AAZ15320.1	major ampullate spidroin 1-like	<i>Latrodectus geometricus</i>	100%	-	+	-	-	-		
85	GAGSGAAAASAS	12	665,269	15,73	ABR37275.1	major ampullate spidroin-like protein	<i>Nephilengys cruentata</i>	100%	+	-	-	-	-		
86	ISAAA	5	594,3013	15,09						100%	+	-	-	-	-
87	AGAGAGVYG	9	721,3395	52,06	AAC14589.1	minor ampullate silk protein MiSp1	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	-	+		
88	GSGAGAAAAASS	12	876,3937	18,56	AFV31615.1	minor ampullate spidroin	<i>Araneus ventricosus</i>	100%	+	-	-	-	-		
89	QRANAGGARGQG AGAGGAAQ	21	1781,8628	9,43	ARA91163.1	minor ampullate spidroin	<i>Latrodectus geometricus</i>	82%	-	+	-	-	-		

90	AGAGGAEAY	9	765,3293	8,7	AFV31615.1	minor ampullate spidroin	<i>Araneus ventricosus</i>	89%	-	-	-	-	+
91	GPGGAGPVG	9	841,4004	11,05	ARA91197.1	minor ampullate spidroin	<i>Steatoda grossa</i>	90%	-	-	-	-	+
92	GCGGAGGAGAGN ARGGAAHSR	21	1710,7717	9,27	ARA91153.1	minor ampullate spidroin c-terminal variant	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	100%	-	+	-	-	-
93	GQGGGGYLG	9	764,3453	11,55	ARA91188.1	minor ampullate spidroin variant 2	<i>Latrodectus tredecimguttatus</i>	100%	-	+	-	-	-
95	APIATY	6	634,3326	65,1	AAR21194.1	silk gland protein 1	<i>Argiope amoena</i>	100%	-	-	-	-	+
96	NCANGAGKGGGLGG AGGDHK	19	1639,7485	9,08	XP_01592296 9.1	spidroin-2-like	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	71%	-	+	-	-	-
97	APTGYAAEGSTHA ARLC	17	1674,7783	9,29	XP_02264873 7.1	spidroin-2-like	<i>Varroa destructor</i>	88%	-	-	-	-	+

Os peptídeos apresentando massas moleculares entre 3 e 10 kDa não foram analisados por espectrometria de massas com a estratégia de novo, mas por uma abordagem proteômica; desta maneira, os digestos trípticos dos peptídeos naturais apresentando massas moleculares entre 3 e 10 kDa, não terão seus espectros mostrados como aqueles detectados e identificados por espectrometria de massas de novo, mas sua identificação foi representada na tabela 6. Os componentes identificados por esta estratégia, como sendo semelhantes a proteínas estruturais seda foram: *aggregate spider glue 2*, *aggregate spidroin 1*, *dragline silk spidroin 1*, *fibroin -1*, *e -2*, *flagelliform silk protein*, *major ampullate silk protein -1*, *major ampullate spidroin-1*, *1A*, *1B*, *e -2 minor ampullate silk protein -1*, *minor ampullate spidroin-1*, *e -2*, *spidroin-1*, *e-2*.

As proteínas espidroína-1 e espidroína-2 são secretadas pela glândula ampulada maior, e constituem as fibras da seda dos raios da teia orbital, do *frame* e da linha de segurança “escape” (Vollrath, 2000; Römer et al., 2008); e podem ser codificadas por diferentes genes (Beckwitt & Arcidiacono 1994; Römer et al., 2008; Rising et al., 2007; Ayoub et al., 2008). A espidroína-1 está presente em maior quantidade na seda que a espidroína-2, sendo uniformemente distribuída por todas as fibras da seda. Já a espidroína-2 está ausente nas regiões periféricas, formando aglomerados em determinadas áreas centrais da fibra (Sponner et al., 2005; Yazawa et al., 2011). Os resultados mostrados acima, revelam muitos peptídeos naturais e peptídeos de digestos trípticos que são semelhantes a proteínas de diferentes formas de espidroínas.

Para todas as glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes* foram identificadas sequências de peptídeos semelhantes às proteínas fibroínas (tabela 5-6, apêndice A1 e A2). As proteínas fibroínas também são descritas nos mais diversos estudos com a glândula de seda de *Bombyx mori* (bicho da seda) (Zhang et al., 2006; Hou et al., 2007; Jia et al., 2007; Li et al., 2012; Dong et al., 2013; Yi et al., 2013). Atualmente a seda do bicho-da-seda (*Bombix mori*) é utilizada em larga escala pela indústria têxtil, demonstrando também aplicações biomédicas e desenvolvimento de novos biomateriais (Chen et al., 2010).

A exploração das aplicações da seda produzida pelas aranhas têm se mostrado potencialmente equivalente àquelas já conhecidas para a seda produzida pelo *Bombyx mori*, que tem sido domesticado a mais de cinco mil anos (Kluge et al., 2008).

Essas aplicações também estão sendo estabelecidas para a seda de aranhas, oferecendo um grande potencial em aplicações biomédicas e *eco-friendly* devido à combinação de notáveis propriedades mecânicas, biocompatibilidade e lenta biodegradabilidade (Altman et al., 2003; Foong et al., 2020).

Especificamente a seda do fio de segurança/escape de aranhas, conhecido como *dragline silk*, tem sido extensivamente estudada devido às suas características de alta resistência à tração, alta extensibilidade e seu baixo peso (Holland et al., 2019). Como já mencionado anteriormente, a seda da teia de aranhas é constituída principalmente por proteínas denominadas espidroínas. A produção em massa de espidroínas foi alcançada usando organismos hospedeiros recombinantes (Tokareva et al., 2013). As espidroínas tem sido expressas com sucesso em bactérias recombinantes (*Escherichia coli* - Prince et al., 1995;), leveduras (*Pichia pastoris* - Fahnestock et al., 1997), insetos (bicho-da-seda *Bombyx mori* - Xe, et al., 2018), plantas (tabaco e batata - Scheller et al., 2001) e animais (camundongos e culturas de células de mamíferos - Lazaris et al., 2002; Xu et al., 2007).

Usando tecnologias de fermentação bacteriana ou de levedura, algumas empresas lançaram vários protótipos feitos de fibras artificiais de seda de aranha (Service, 2017). Porém, ainda é um grande desafio produzir espidroínas em larga escala, pois as sequências em tandem hidrofóbicas de MaSp1 (major ampullate spidroin 1) podem reduzir a produtividade por fermentação microbiana. Além disso, o alto preço da seda de aranha devido ao alto custo de produção também continua sendo um desafio a ser resolvido. As matérias-primas utilizadas em sistemas de fermentação microbiana heterotrófica podem contribuir com até 70% do custo de produção (Singh et al., 2017).

Recentemente Foong e colaboradores (2020) desenvolveram uma fábrica econômica e sustentável utilizando *Rhodovulum sulfidophilum* - bactéria roxa marinha. Esta bactéria é capaz de produzir a sequência repetitiva hidrofóbica de MaSp1 usando pequena quantidade de substância orgânica em condições de crescimento foto-heterotrófico ou foto-autotrófico.

Ainda no ano de 2021 existe a possibilidade de ser lançada uma seda de aranha sintética a qual substituirá plásticos descartáveis em uma ampla variedade de produtos de consumo. Trata-se de um filme de polímero biomimético, projetado para imitar as propriedades da seda de aranha. Ayaka Kamada e colaboradores (2021), descobriram que a organização regular e precisamente espaçada das ligações de

hidrogênio que mantém coesas as proteínas da seda, confere uma densidade muito alta a essa seda. Dessa forma, o material sintético resultante (filme) é tão forte quanto muitos plásticos de uso comum a base de petróleo (Kamada et al., 2021).

**Tabela 6.** Agrupamento dos peptídeos de 3-10 kDa de acordo com o seu papel funcional na teia.- i) Peptídeos estruturais da seda da teia - as espidroínas. Na tabela foram apenas considerados peptídeos pertencentes à ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae. #: número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.

PEPTÍDEOS ESTRUTURAIS DA SEDA DA TEIA COM MASSAS MOLECULARES ENTRE 3 E 10 KDa														
#	Sequencias dos Peptídeos	#AA	Mm (Da)	RT (min)	Código de Acesso	Nome da potencial proteína de origem	Organismo	Identidade	Sample					
									TEIA	AMA	AME	AGRE	FLA	
1	LSNIGDNNNPTGGVFYLP EMV R	22	2406,1638	20,49	ACI41239.1	aggregate spider glue 2	<i>Nephila clavipes</i>	92%	-	-	-	+	-	
2	FVVPK	5	588,3635	10,78				100%	-	-	-	+	-	
3	GGKPINI	7	697,4122	76,62				100%	-	-	-	+	-	
4	LSNIGDNNNPTGGVFYLP MVR	22	2406,1638	20,49	AMK48677.1	aggregate spidroin 1 partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	+	-	
5	ISGFRDDYYVPSDVPVYTS F	20	2326,0793	20,31				100%	+	-	-	-	-	
6	ISGFRDDYYVPSDVPVYTSFL	21	2439,1633	22,43				100%	+	-	-	-	-	
7	ISGFRDDYYVPSDVPVYT	18	2091,9788	18,11				100%	+	-	-	-	-	
8	DNLQNIPIGFSGYDNL R	17	1922,9122	17,94				100%	+	-	-	-	-	
9	SFLSEIL	7	970,5011	24,45				100%	+	-	-	-	-	
10	MEGLVAALNAAK	15	1499,8018	22,59				100%	+	-	-	-	-	
11	SALMDVSSSTGVNTISQLT QDIISGINPSEDSVDY NKFF NK	41	4437,1167	25,01				100%	+	-	-	-	-	
12	KEESEEDDDDMGFGLFD	18	2105,7896	20,35	AMK48676.1	aggregate spidroin 1	<i>Latrodectus hesperus</i>	50%	-	-	-	+	-	
13	LILPEGSATTPTITGPEG QLIR	23	2350,2744	17,89				100%	-	-	-	+	-	
14	TVEGP	5	501,2435	43,26				100%	-	-	-	+	-	
15	FILPEGAGITPSMVK	15	1558,8429	18,31				58%	-	-	-	+	-	
16	ISGGY	5	495,2329	47,27	AAV48922.1	dragline silk spidroin 1, partial	<i>Nephila pilipes</i>	54%	-	-	-	+	-	
17	SASAVGGS	8	634,2922	103,55				100%	-	-	-	+	-	
18	GQGGYGAL	8	721,3395	24,13				100%	-	-	-	+	-	
19	QGGYGAGAGAGAAAAAG AGAGGAGGYGRGTGAG	33	2494,1333	14,79	AAV48945.1	dragline silk spidroin 1	<i>Nephila pilipes</i>	97%	-	+	-	-	-	

20	GTSGSSAIS	9	765,3505	51,88	AAV48925.1	dragline silk spidroin 1, partial	<i>Nephila pilipes</i>	67%	-	-	-	+	-
21	GQGGYGAL	8	721,3395	24,13				100%	-	-	-	+	-
22	GGGLATA	7	545,2809	55,37	AIU80193.1	fibroin 1	<i>Scytodes thoracica</i>	80%	-	-	-	+	-
23	GLATAAA	7	573,3122	74,73				100%	-	-	-	+	-
24	PGGDSASAAA	10	802,3457	74,3				100%	-	-	-	+	-
25	VAGSAAA	7	545,2809	57,58				100%	-	-	-	+	-
26	GSGAGA	6	418,1812	54,58				100%	-	-	-	+	-
27	AGAASGAAGGGGS	13	889,3889	41,05	AFM97626.1	fibroin 1, partial	<i>Megahexura fulva</i>	91%	-	+	-	-	-
28	GAAAAAAG	8	558,2761	60,99	AFM97624.1	fibroin 1, partial	<i>Sphodros rufipes</i>	88%	-	-	-	+	-
29	VASGAAA	7	545,2809	55,26				100%	-	-	-	+	-
30	GLGYA	5	479,238	47,13				100%	-	-	-	+	-
31	STGGYGGQGAGQQGLGG YGGQGHG	25	2150,9001	15,71	AAK30599.1	fibroin 2, partial	<i>Dolomedes tenebrosus</i>	90%	-	+	-	-	-
32	TSGGYGGQGAGQQGLGG YGGKGHG	25	2150,9365	15,62				94%	-	+	-	-	-
33	STGGYGGKAGQQGLGG YGGQGTHA	25	2150,9729	15,79				85%	-	+	-	-	-
34	SDQVALASSLAELVLAESS GGDQVR	25	2501,2607	24,78	AAC38846.1	flagelliform silk protein	<i>Nephila clavipes</i>	90%	-	-	-	-	+
35	DSQVALASSLAELVLAESS GGDVHF	25	2501,2285	24,67				86%	-	-	-	-	+
36	DSQVALASSLAELVLAESS GTAHVM	25	2501,2319	24,69				89%	-	-	-	-	+
37	QSSVVLASSLAELVLAESS GGNLDR	25	2501,2971	24,7				73%	-	-	-	-	+
38	SGWAVLASSLAELVLAESS GGDLRN	25	2501,2761	24,73				58%	-	-	-	-	+
39	SNEVALASSLAELVLAESS GGDVVAN	26	2501,2495	24,72				86%	-	-	-	-	+
40	SNMPALASSLAELVLAESS GGDAPSQ	26	2501,1953	24,67				89%	-	-	-	-	+
41	AMQVALASSIAELVIAESSG GDVQR	25	2517,2744	23,61				100%	-	-	-	-	+

42	AMQVALASSIAELVIAESSG GDVQRK	26	2629,3745	23,76				100%	-	-	-	-	+
43	NALMSTTGSPNEEFVHEV QDLIQMLSQEIQINEVDTSG PGQ	40	4372,0112	27,56				100%	-	-	-	-	+
44	APSPTPAAMSAYSNSVGR	18	1762,8308	13,47	AAC38847.1	flagelliform silk protein partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	-	+
45	SPTPAAMSAYSNSVGR	16	1594,741	12,73				100%	-	-	-	-	+
46	GGAGGFG	7	521,2234	57,94	AAK30594.1	flagelliform silk protein	<i>Argiope trifasciata</i>	100%	-	-	-	+	-
47	EGVGGGA	7	545,2445	56,03				100%	-	+	-	-	-
48	KEESDESDDDMGFGLF	16	1934,7363	20,37				100%	-	-	-	-	+
49	YLAAYMLASLGGNKNPSAS DIEK	23	2412,1995	18,95				100%	-	-	-	-	+
50	ILSSVGIEVDKER	13	1443,7932	12,81				100%	-	-	-	-	+
51	APSPTPAAMSAYSNSVGR	18	1762,8308	13,4	AAF36092.1	flagelliform silk protein	<i>Nephila inaurata madagascariensis</i>	100%	-	-	-	-	+
52	GPGGLGSGPGLGSGGS GSGGIGR	24	1853,8979	12,85				100%	-	-	-	-	+
53	GPGGLGSGSGSGGIGR	17	1328,6432	9,76				100%	-	-	-	-	+
54	SPTPAAMSAYSNSVGR	16	1594,741	12,73				100%	-	-	-	-	+
55	PGGLGS	6	543,2653	45,54				100%	-	-	-	-	+
56	GSGPGGAG	8	558,2397	45,37	AAF36090.1	flagelliform silk protein, partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	+	-
57	AGAVADGG	8	616,2816	52,8	AFN54362.1	major ampullate silk protein 1	<i>Nephila clavipes</i>	88%	-	-	+	-	-
58	AAAAATA	7	545,2809	53,75				100%	-	-	+	-	-
59	TSELADAFNLNEQR	17	1937,9482	25,52				92%	-	+	-	-	-
60	TSNYGGKGAGAGGGLGG YGGEYM	23	2079,8955	15,74	ACF19412.1	major ampullate spidroin 1B precursor	<i>Nephila clavipes</i>	94%	-	+	-	-	-
61	TQFTADQLDDMSTLGDWR	18	2098,9265	19,53				93%	-	+	-	-	-
62	WMLADAFNLNEQR	16	1937,9458	25,48				92%	-	+	-	-	-
63	GAGAGSSA	8	576,2503	56,84	ADM14325.1	major ampullate spidroin	<i>Agelenopsis aperta</i>	100%	-	-	-	+	-
64	GSGAGA	6	418,1812	54,58				100%	-	-	-	+	-
65	VNNGAQNYGGLGGQGAG GAGGYGGVA	26	2222,01	15,79	AAT75312.1	major ampullate spidroin 1, partial	<i>Nephila clavipes</i>	89%	-	+	-	-	-

66	NGRNAGYGLNGGQGAGQ GGYGGLGSQGRK	29	2707,2922	12,95	AAT75309.1	major ampullate spidroin 1, partial	<i>Nephila clavipes</i>	91%	-	-	-	+	-
67	AAGGAGQGGYGGLGSQG AGR	20	1647,7712	9,62	ACC77633.1	major ampullate spidroin 1 partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	+	-
68	AAAAGGAGQGGYGGLGS QGAGR	22	1789,8455	9,89				100%	-	-	-	+	-
69	AAAGGAGQGGYGGLGSQ GAGR	21	1718,8083	9,79				100%	-	-	-	+	-
70	YGGLGGQGAGQGAGQGG YGGLGSQGAGR	28	2394,106	13,29				100%	-	-	-	+	-
71	AAAAAGGAGQGGYGGLG SQGAGR	23	1860,8826	10,04				100%	-	-	-	+	-
72	GAGQGGYGGLGGQGAGQ GAGQGGYGGLGSQGAGR	34	2821,2876	15,32				100%	-	+	-	-	-
73	QGGYGGLGGQGAGQGAG QGGYGGLGSQG	28	2352,0479	14,82				100%	-	+	-	-	-
74	STGGYGGKAGAGGGLG GYGGAANDHG	27	2221,9736	15,7	ADE74592.1	major ampullate spidroin 1, partial	<i>Peucetia viridans</i>	70%	-	+	-	-	-
75	STGGYGGKAGAGGGLG GYGGAANDHG	27	2221,9736	15,7				70%	-	+	-	-	-
76	STGGYGGQGAGAGGGLG GYGGANAWHG	27	2292,9895	15,73				83%	-	+	-	-	-
77	TGAFTADQLDDMSTIGDTI K	20	2098,9729	18,93	ACF19411.1	major ampullate spidroin 1A precursor partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	+	-
78	TGAFTADQLDDMSTIGDTI K	20	2098,9729	19,47	ACF19414.1	major ampullate spidroin 1A precursor	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	+	-	-	-
79	STELADAFINAFMNEAGR	18	1955,9047	24,79				100%	-	+	-	-	-
80	TGAFTADQLDDMSTIGDTI K	20	2098,9729	18,93				100%	-	-	-	+	-
81	GGQGAGAAAA	10	729,3405	3,66				100%	-	-	-	+	-
82	GGYGQG	7	594,2397	56,74				100%	-	-	-	+	-
83	TGAFTADQLDDMSTLGDTL Q	20	2098,9363	19,47	ACF19415.1	major ampullate spidroin 1B precursor, partia	<i>Nephila clavipes</i>	95%	-	+	-	-	-
84	YYPWSSTELADAFNAFLN WLN	22	2634,2429	30,39				94%	-	+	-	-	-
85	YYPWSSTELADAFNAFLN LWN	22	2634,2429	30,35				94%	-	+	-	-	-

86	TQMTADQLDDMSTDAVRW	18	2098,8936	19,34				100%	-	+	-	-	-
87	PQTPWSSTELADAFNAFL NEFH	23	2634,239	29,85				95%	-	-	-	+	-
88	PQTPWSSTELADAFNAFL NVNLS	24	2634,2964	29,9				94%	-	-	-	+	-
89	DNPWPSSTELADAFNAFL NEHF	23	2634,2026	29,87				89%	-	-	-	+	-
90	TGAFTADQLDDMSTIGDTL K	20	2098,9729	19,47				100%	-	+	-	-	-
91	STELADAFINAFLNEAGR	18	1937,9482	25,6				100%	-	+	-	-	-
92	QNTPWSSTELADAFINAFL NEAGR	24	2651,2615	27,95				100%	-	+	-	-	-
93	AAAGGGGQGGYGNLGGQ GAGAAAAAASAAGQGGY G	36	2821,2764	15,22				100%	-	+	-	-	-
94	GPGASAS	7	545,2445	53,45	ABR68855.1	major ampullate spidroin 2	<i>Latrodectus hesperus</i>	100%	-	-	+	-	-
95	AAAAAAGG	8	558,2761	59,45				100%	-	-	+	-	-
96	GVYGP	5	491,238	74,71				100%	-	-	+	-	-
97	GGPAGQGAG	9	670,3034	63,8	ABR37275.1	major ampullate spidroin-like protein, partial	<i>Nephilengys cruentata</i>	90%	-	-	+	-	-
98	GAGSGAAAASAS	12	876,3937	18,63				100%	+	-	-	-	-
99	GGLGSGPG	8	600,2867	62,28				88%	-	-	-	+	-
100	FYEPGLGVVQNDPLLDENT GENFANVFER	29	3282,5469	22,3	XP_021004328.1	mesocentin isoform X9	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	30%	-	-	-	+	-
101	AFLVTTGVTNPYFISEVEK	19	2114,0935	20,32				100%	-	-	-	+	-
102	QIILVLTDAFGSFPDLQK	18	2004,0931	23,89				100%	-	-	-	+	-
103	GIPYSPVAFGDGGEDIGGG VQG	22	2047,9486	19,19				100%	-	-	-	+	-
104	ATAAGFASAVAER	13	1220,6149	13,22				100%	-	-	-	+	-
105	LIEVFYLTR	9	1152,6543	19,69				100%	-	-	-	+	-
106	TAADIGTGELYEK	13	1366,6616	12,64				100%	-	-	-	+	-
107	KAFVTTGVTNPYFISEVEK	20	2242,1885	18,54				100%	-	-	-	+	-
108	IVLLS	5	543,3632	44,7				100%	-	-	-	+	-
109	LANS GS	6	547,2602	60,27	AAC14589.1			87%	-	-	-	-	+

110	ESTASSA	7	651,2711	69,05		minor ampullate silk protein MiSp1, partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	-	+
111	GSGAGAAAAASS	12	876,3937	18,63	AFV31615.1	minor ampullate spidroin	<i>Araneus ventricosus</i>	100%	+	-	-	-	-
112	GAGTIGA	7	545,2809	55	ARA91152.1	minor ampullate spidroin variant 1	<i>Latrodectus hesperus</i>	86%	-	-	-	+	-
113	VAGTGAGG	8	588,2867	66,36				100%	-	-	+	-	-
114	AGAAAVAGA	9	657,3445	51,42	ARA91182.1	minor ampullate spidroin variant 2	<i>Latrodectus hesperus</i>	100%	-	-	+	-	-
115	VSGGY	5	481,2173	52,81				100%	-	-	+	-	-
116	GVGAR	5	458,2601	70,73				100%	-	-	+	-	-
117	AAASGAA	7	517,2496	41,23				100%	-	-	+	-	-
118	GAGAGAGAGALTGSAG	16	1144,5472	15,08				80%	-	+	-	-	-
119	PGAAGVY	7	633,3122	52,38	ARA91188.1	minor ampullate spidroin variant 2	<i>Latrodectus tredecimguttatu s</i>	100%	+	-	-	-	-
120	AGVDQG	6	545,2445	53,58				100%	+	-	-	-	-
121	PGLGGDLG	8	684,3442	46,41	ARA91183.1	minor ampullate spidroin, partial	<i>Steatoda grossa</i>	61%	-	-	-	+	-
122	GTGGASGA	8	576,2504	56,57				100%	-	-	-	+	-
123	AAAAGGAGQGGYGGGLGG QGAGQGGYGGGLGSQG	32	2565,1592	14,59	SPD1_NEPCl	Spidroin-1	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	+	-	-	-
124	AAAGGAGQGGYGGGLGGQ GAGQGGYGGGLG	28	2222,01	15,63				100%	-	+	-	-	-
125	AAAGGAGQGGYGGGLGGQ GAGQGGYGGGLGSQG	31	2494,1221	14,6				100%	-	+	-	-	-
126	AGGAGQGGYGGGLGGQGA GQGGYGGGLG	26	2079,9358	15,82				100%	-	+	-	-	-
127	AAGGAGQGGYGGGLGGQG AGQGGYGGGLG	27	2150,9729	15,62				100%	-	+	-	-	-
128	AAAAGGAGQGGYGGGLGG QGAGQGGYGGGLG	29	2293,0471	15,63				100%	-	+	-	-	-
129	AAGGAGQGGYGGGLGGQG AGQGGYGGGLGSQG	30	2423,085	14,66				100%	-	+	-	-	-
130	AAAAAGGAGQGGYGGGLG GQGAGQGGYGGGLGSQG	33	2636,1963	14,63				100%	-	+	-	-	-
131	AGGAGQGGYGGGLGGQGA GQGGYGGGLGSQG	29	2352,0479	14,63				100%	-	+	-	-	-

132	AAAAGGAGQGGYGGLG GQGAGQGGYGGLG	30	2364,0842	15,72				100%	-	+	-	-	-
133	RGQGAGQGGYGGLGSQG SGRGGLGGQ	26	2275,0801	14,62				100%	-	+	-	-	-
134	AAAAGGAGQGGYGGLGS QKGR	21	1789,8818	9,89				100%	-	-	-	+	-
135	AAGGAGQGGYGGLGSQQ VN	19	1647,76	9,64				100%	-	-	-	+	-
136	AAAAGGAGQGGYGGLGS QEVN	21	1789,8594	9,92				100%	-	-	-	+	-
137	AAAAGGAGQGGYGGLGS QGAGR	22	1789,8455	9,89				100%	-	-	-	+	-
138	AAAGGAGQGGYGGLGSQ GAGR	21	1718,8083	9,79				100%	-	-	-	+	-
139	AAGGAGQGGYGGLGSQG AGR	20	1647,7712	9,62				100%	-	-	-	+	+
140	GLGGQGAGAAAAAAGGA QGGYGGLGSQGAGR	32	2529,2068	13,14				100%	-	-	-	+	-
141	AAAAGGAGQGGYGGLG SQGAGR	23	1860,8826	10,04				100%	-	-	-	+	-
142	GRGGYGQAGAAAAA GGAGQGGYGGLGSQGAG R	35	2849,3301	13				100%	-	-	-	+	-
143	GGQGAGAAAA	10	729,3405	3,66				100%	-	-	-	+	-
144	GAAAAAAG	8	558,2761	60,99				100%	-	-	-	+	-
145	AAAAGGAGQGGYGGLGG QGAGQGGYGGLGSQGAG R	35	2849,3188	13	AAC38957.1	spidroin 1 partial	<i>Nephila clavipes</i>	100%	-	-	-	+	+
146	AAAGGAGQGGYGGLGGQ GAGQGGYGGLGSQGAGR	34	2778,2817	12,96				100%	-	-	-	+	+
147	AAGGAGQGGYGGLGGQG AGQGGYGGLGSQGAGR	33	2707,2446	12,95				100%	-	-	-	+	+
148	AAGGAGQGGYGGLGSQG AGR	20	1647,7712	9,62				100%	-	-	-	+	+
149	AAAAGGAGQGGYGGLGS QGAGR	22	1789,8455	9,89				100%	-	-	-	+	-

150	AAAGGAGQGGYGGLGSQ GAGR	21	1718,8083	9,79				100%	-	-	-	+	-
151	GGQGAGAAAAAAGGAG QGGYGGLGGQAGQGGY GGLGSQGAGR	44	3489,6118	13,88				100%	-	-	-	+	-
152	GLGGQGAGAAAAAAGGA QGGYGGLGSQGAGR	32	2529,2068	13,14				100%	-	-	-	+	-
153	AAAAAGGAGQGGYGGLG GQGAGQGGYGGLGSQGA GR	36	2920,356	13,05				100%	-	-	-	+	-
154	AAAAAGGAGQGGYGGLG SQGAGR	23	1860,8826	10,04				100%	-	-	-	+	-
155	GRGGYGGQGAGAAAAA GGAGQGGYGGLGSQG	32	2565,1704	14,59				97%	-	+	-	-	-
156	GGYGGQGAGAAAAAAGG AGQGGYGGLG	27	2079,9358	15,73				100%	-	+	-	-	-
157	GRGGYGGQGAGAAAAA GGAGQGGYGGLG	29	2293,0583	15,68				100%	-	+	-	-	-
158	GGYGGQGAGAAAAAAGG AGQGGYGGLGSQG	30	2352,0479	14,63				100%	-	+	-	-	-
159	AGRGGYGGQGAGAAAAA AGGAGQGGYGGLGSQG	33	2636,2075	14,73				100%	-	+	-	-	-
160	AGRGGYGGQGAGAAAAA AGGAGQGGYGGLG	30	2364,0955	15,72				100%	-	+	-	-	-
161	GGYGPGGYG	9	783,3187	68,41	XP_021002866.1	spidroin-2 isoform X9	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	100%	-	-	+	-	-
162	ALAAAAGSG	9	687,3551	55,04				100%	-	-	+	-	-

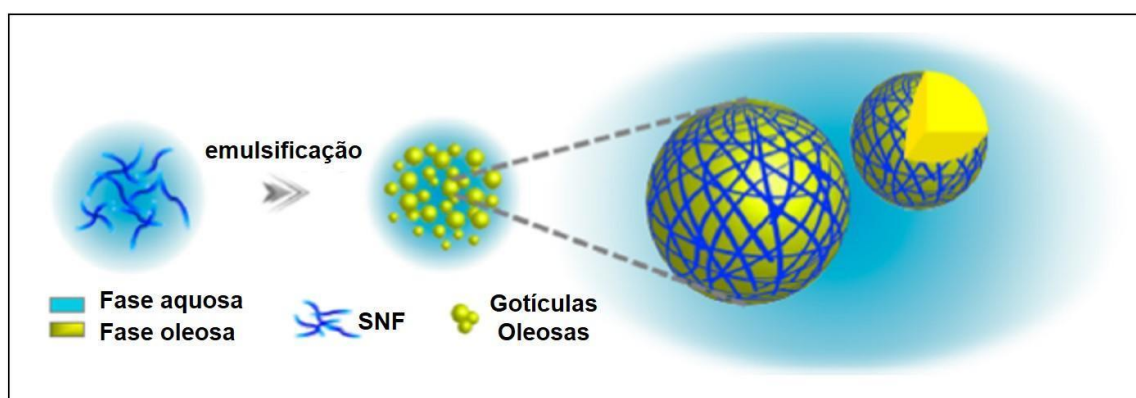
A discussão abaixo mencionará alguns estudos que estão sendo realizados com as proteínas e os peptídeos estruturais da seda, de aranhas e de outros artrópodes, evidenciando a importância dessas proteínas e peptídeos no processo de emulsificação e outras aplicações biotecnológicas. A discussão direcionada no processo de emulsificação e outras aplicações biotecnológicas não é aleatória e será revelada no decorrer do texto.

A emulsão é denominada pela dispersão coloidal de um líquido em contato com outro líquido, onde estes apresentam um certo grau de imiscibilidade entre si, ou seja, não se misturam, ou apresentam uma certa dificuldade para isso. Esse sistema é composto por uma fase apolar (fase oleosa) e uma fase polar (fase aquosa) (Almeida, 2014). Os emulsificantes desempenham um papel central na formação e estabilização de emulsões que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, cosmética, na catálise, no encapsulamento de drogas, e outras aplicações biomédicas. O emulsificante mais conhecido e frequentemente utilizado para estabilizar as emulsões, são os tradicionais surfactantes anfifílicos. Porém, atualmente, novos emulsificantes com estabilidade bem definida, biocompatibilidade e biodegradabilidade têm sido desenvolvidos para complementar os tradicionais surfactantes, entre eles: copolímeros, lipídios, proteínas, polimersomas (classe de vesículas artificiais) e partículas sólidas.

Recentemente, um estudo demonstrou que as nanofibras oriundas da fibroína da seda (FS), de *Bombyx mori*, são bons emulsificantes para estabilizar emulsões, se comparadas com emulsificantes tradicionais como os surfactantes e emulsificantes proteicos (Chen, et al., 2017). O estudo de Chen e colaboradores (2017), demonstrou que as nanofibras da fibroína da seda (NFS) são robustas e versáteis, pois conseguem manter a estabilidade da emulsão mesmo em condições adversas de alta concentração salina e baixo valor de pH. Isso porque, essas SNF apresentam uma quantidade elevada de folhas-beta, densidade de carga, propriedades hidrofóbicas e dispersibilidade na água (Chen et al., 2017).

Atualmente, os peptídeos estão emergindo como promissores emulsificantes biocompatíveis. Além de possuírem vantagens por serem derivados de emulsificantes à base de proteínas, esses peptídeos apresentam versatilidade superior através do design ativo, tamanho, e controle de sequências dos blocos de peptídeos com diversas funcionalidades químicas (Dexter et al., 2014; Frederix et al., 2014). Teoricamente, a formação e estabilidade de emulsões podem ser controladas através

do posicionamento das sequências de peptídeos e alterações químicas dos aminoácidos (Fletcher et al., 2013; Bai et al., 2014; Scott et al., 2016). Do mesmo modo, um aumento na estabilidade das emulsões tem sido alcançado através da formação de redes de nanofibras peptídicas, oriundos de peptídeos estruturais da fibra da seda, em camadas interfaciais. Essas camadas limitam as duas fases na emulsão, conforme demonstrado na figura 24, e estão sendo utilizadas como uma estratégia diferente para o encapsulamento estável em aplicações terapêuticas e na engenharia de tecidos (Fletcher et al., 2013; Bai et al., 2014; Scott et al., 2016).



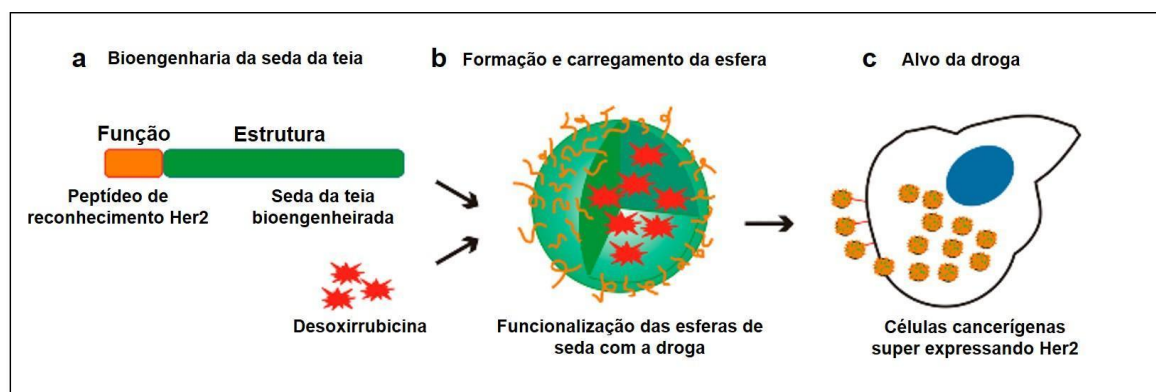
**Figura 24.** Esquema representativo da emulsão de óleo em água, evidenciando as redes de nanofibras de fibroína da seda (NFS) de *Bombyx mori*, as quais garantem o aumento na estabilidade dessas emulsões. Figura extraída de Chen et al., 2017.

Como já mencionado anteriormente as gotículas que estão depositadas sobre a teia da aranha *T. clavipes*, possuem diversas vesículas lipídicas extracelulares as quais ficam suspensas em seu interior aquoso. Diferentemente da emulsão promovida artificialmente, como discutido nos parágrafos acima, essas vesículas lipídicas extracelulares já estão suspensas dentro do conteúdo aquoso da gotícula, e portanto, podemos sugerir que estão naturalmente em estado de emulsificação.

Mediante os resultados apresentados por Chen e colaboradores (2017), e os resultados da identificação de peptídeos semelhantes a proteínas estruturais da seda, apresentados no presente estudo, podemos elaborar a seguinte questão: Essas sequências de peptídeos estruturais da seda, identificadas tanto na teia quanto nas glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, podem estar envolvidas na estabilização das vesículas lipídicas extracelulares, dentro do conteúdo aquoso das gotículas?

Ainda há outros estudos, como o de Florczak e colaboradores (2014), que desenvolveram a produção de esferas à base de seda de aranha. Essas esferas foram

utilizadas como carregadoras de drogas para terapia dirigida contra o câncer. Neste estudo, utilizando de uma abordagem de engenharia genética, foi possível modificar e atribuir uma funcionalidade para a seda através da adição de sequências de codificação de um peptídeo de interesse (Florczak et al., 2014). Sendo assim, sistemas híbridos foram produzidos, constituídos por peptídeos de ligação a receptores Her2 (ligam-se a células cancerígenas que superexpressam Her2) e seda MS1 (com base na sequência da proteína MaSp1 - espidroína da glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* – sequência com 33 resíduos de aminoácidos, Mm: 2632,23 Da). Os peptídeos com domínios de ligação a Her2 foram expostos na superfície das esferas, pois os mesmos ligam-se e internalizam de forma específica em células que superexpressam Her2 (células cancerígenas da mama). O interior das esferas de seda foram carregadas com a droga desoxirrubicina, as quais são liberadas somente após a internalização dessas esferas pela célula-alvo (célula cancerígena da mama), assim como demonstrado na figura 25.



**Figura 25. Esquema representativo das esferas funcionais de seda de aranha, utilizadas como carregadoras de drogas para terapia dirigida contra o câncer.** **a)** A imagem mostra o híbrido composto pelo peptídeo com domínio específico de ligação a Her2 (em laranja) e a seda MS1 modificada (em verde). **b)** A imagem evidencia o peptídeo de ligação exposto (em laranja) na superfície das esferas de seda (em verde), as esferas carregam em seu interior a droga desoxirrubicina (em vermelho). **c)** As esferas funcionais de seda se ligam especificamente, através do domínio de reconhecimento a Her2, a células cancerígenas da mama (células que estão superexpressando Her2). Figura extraída de Florczak et al., 2014.

Levando-se em consideração o modelo sugerido por Florczak et al (2014), que construíram esferas funcionais de seda da teia da aranha, direcionadas para a terapia de câncer; o presente estudo nos faz refletir se haveria a possibilidade de se construir um modelo similar direcionado a elaboração de um bioinseticida-seletivo. Sendo assim, seria possível construirmos esferas funcionais de seda de aranha através de híbridos constituídos por sequências de peptídeos estruturais da seda, e por

peptídeos com domínios específicos, que se liguem a receptores de membrana da presa-alvo?

Através dos resultados demonstrados até o momento, foram identificados peptídeos semelhantes a sequências de proteínas estruturais da seda da teia, com diferentes tamanhos - de 5 a 31 resíduos de aminoácidos para peptídeos naturais, e de 5 a 44 resíduos de aminoácidos para peptídeos oriundos de digestos trípticos. Depois da glândula ampulada maior, a agregada foi a glândula que mais produziu peptídeos semelhante a proteínas estruturais da seda. Uma vez que, esta glândula produz e secreta as gotículas sobre a teia, podemos sugerir que esses peptídeos semelhantes a proteínas estruturais da seda possivelmente, estão auxiliando na estabilização das vesículas lipídicas extracelulares que estão suspensas no interior aquoso das gotículas.

#### Perspectiva futura do presente estudo

Além de explorar o perfil peptídico da teia, futuramente, existe a intenção de tentar construir as vesículas artificiais carregadas de conteúdo tóxico, para posteriormente injetá-las na hemocele de insetos-presas. Dessa forma, será possível tentar se assemelhar ao “mecanismo com propriedades de inseticida” presente na teia da aranha *T. clavipes* - conforme já sugerido em estudo anterior por Esteves (2017): as vesículas lipídicas extracelulares, que são liberadas das gotículas, se fundem com a membrana do tecido mole do inseto-presa, e após essa fusão ocorre a liberação do conteúdo vesicular que contém toxinas, para dentro da hemocele do inseto-presa.

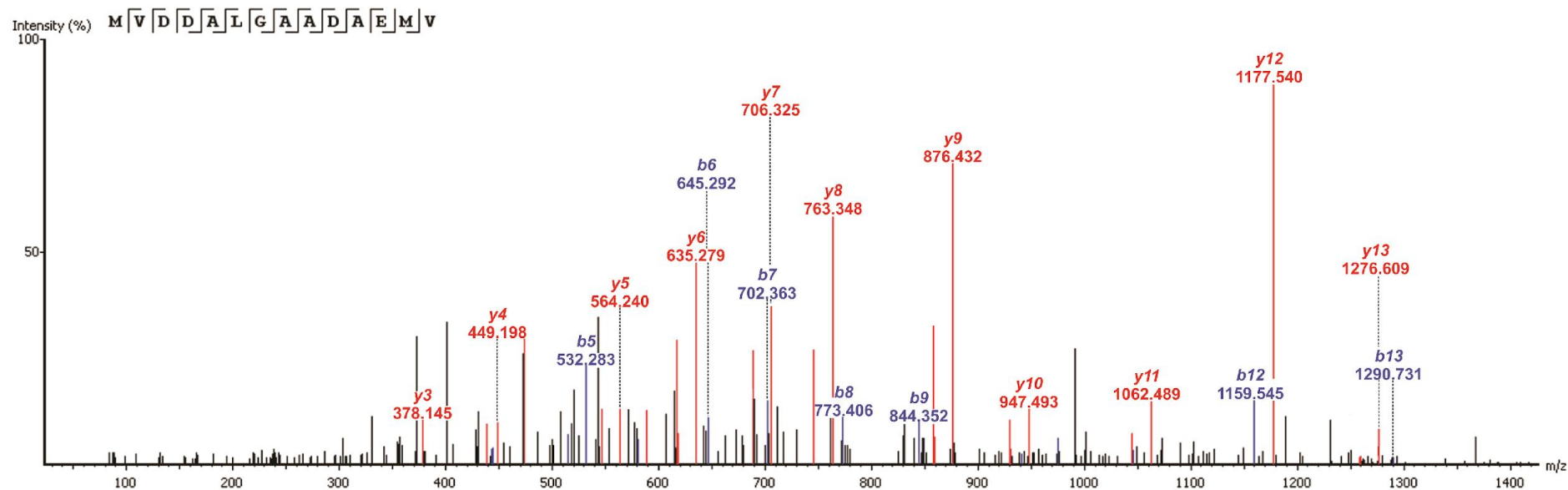
#### (ii) Peptídeos potencialmente originados de toxinas

Para a fração de peptídeos de até 3 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 11, 3, 6, 4 e 15 peptídeos semelhantes à toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas e defensinas presentes nas glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. Enquanto que para a fração de peptídeos de 3-10 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 3, 4, 7, 2, 8 peptídeos semelhantes a toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas e defensinas presentes nas glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. A maior parte desses peptídeos são semelhantes à sequências de proteínas típicas de venenos animais, ou seja, neurotoxinas utilizadas para a paralisia e morte de presas.

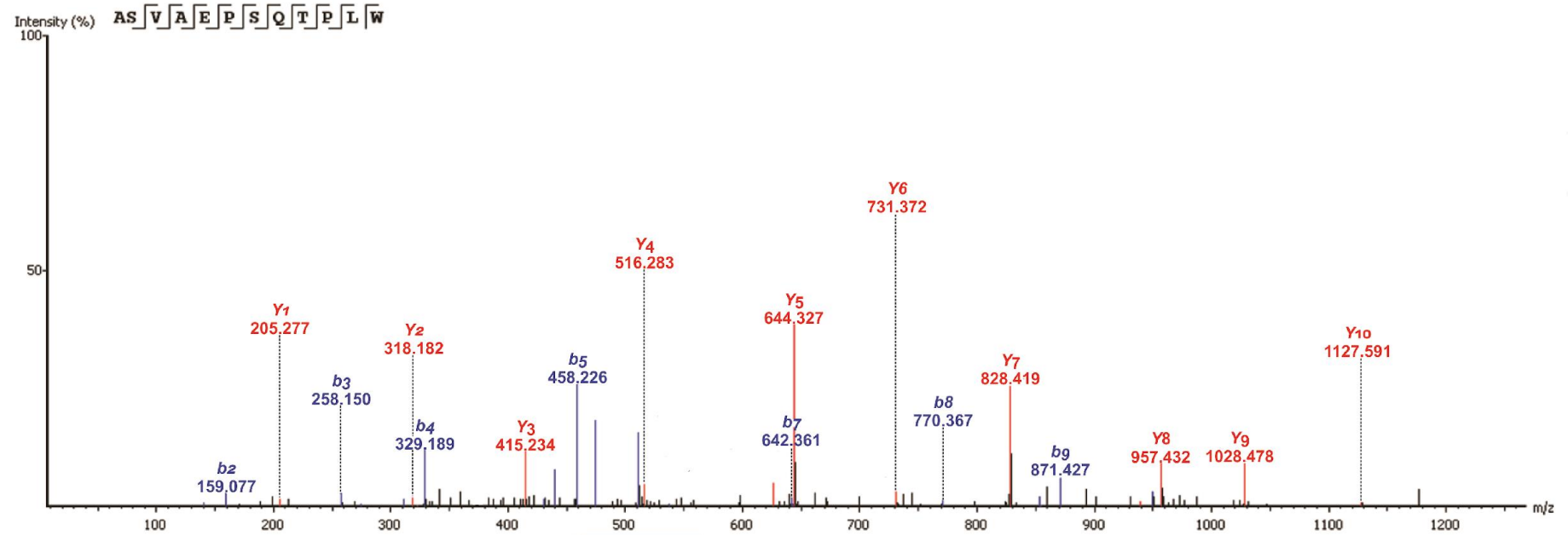
Considerando a grande quantidade de espectros que foram gerados para a identificação das sequências peptídicas de todas as amostras, como exemplos, serão mostrados somente alguns espectros CID de algumas sequências peptídicas. Dessa forma, para exemplificar serão mostrados apenas os espectros de massas correspondentes às sequências que serão sintetizadas, e que se mostraram semelhantes a sequências de toxinas de aranhas já descritas e depositadas nos bancos de dados.

É importante mencionar que nos espectros de massas apresentados abaixo estão evidenciados os íons fragmentos da série -b e -y, mas também foram considerados íons fragmentos de outras séries para a realização do sequenciamento dos peptídeos identificados (Figuras 26-36).

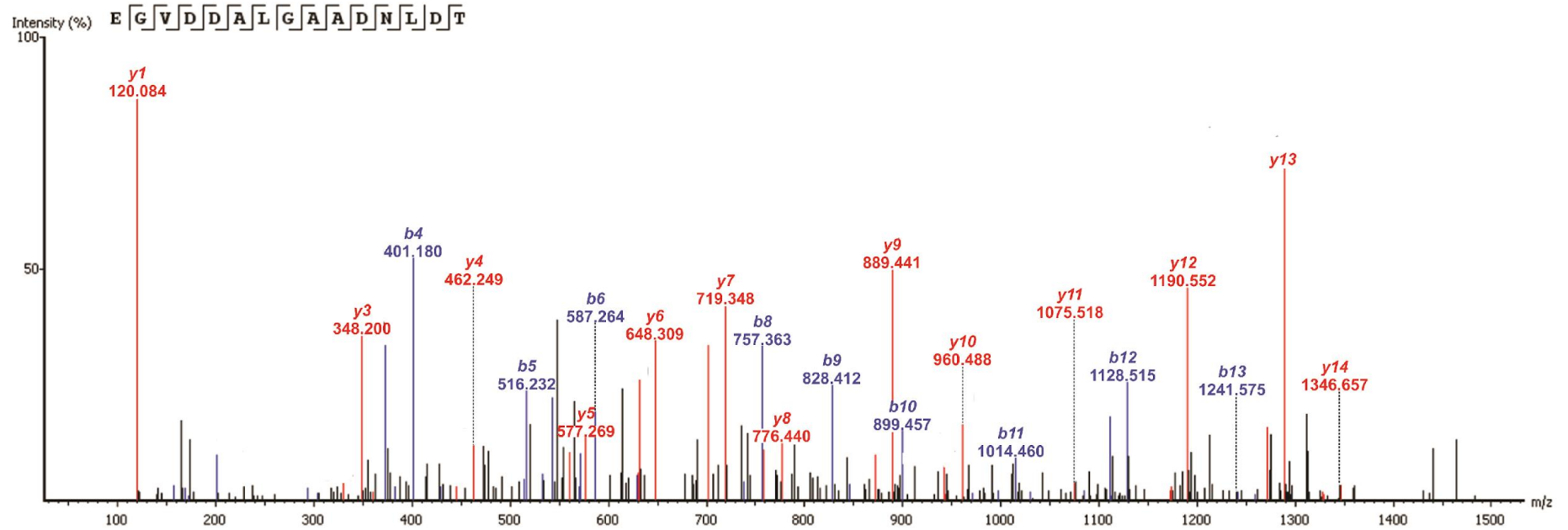
As tabelas 7 e 8 apresentam, de forma simplificada, os dados deste grupo de peptídeos identificados como semelhantes a sequências de toxinas de aranhas já descritas e depositadas nos bancos de dados. Neste caso está sendo considerado apenas as identificações pertencentes à ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae.



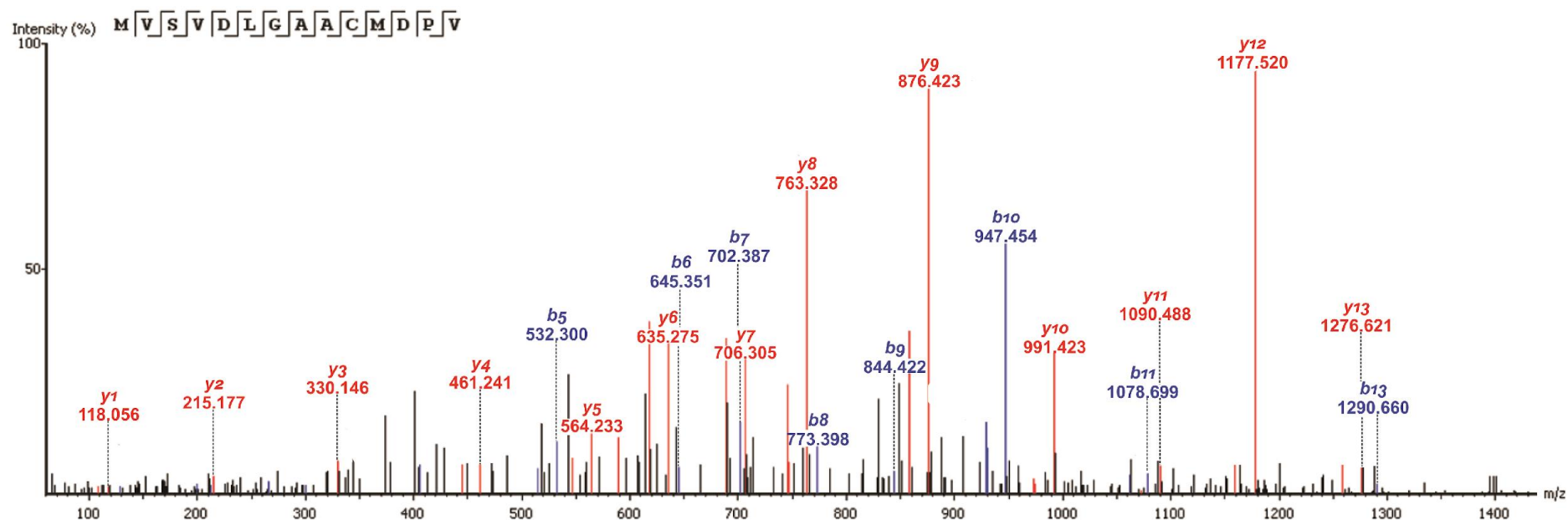
**Figura 26.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MVDDALGAADAEMV-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  704.3569  $[M + 2H]^2$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #9 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da *Serpin B6* (código de acesso: XP\_015915454.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 7.



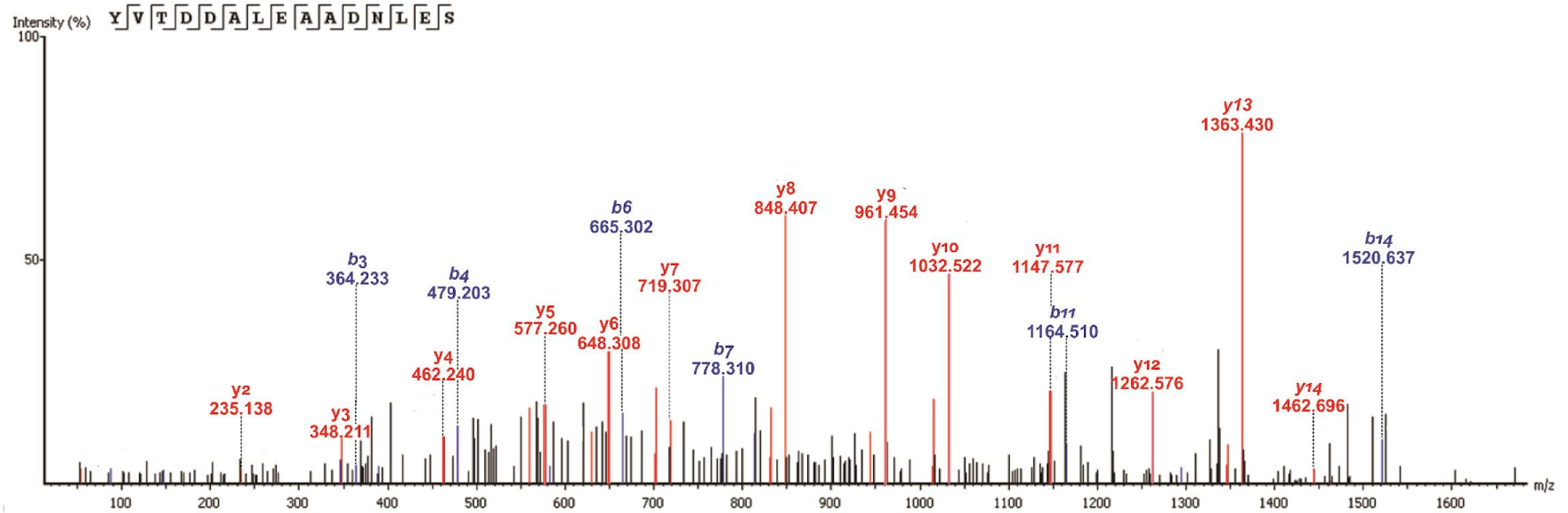
**Figura 27.** Espectro CID representativo do peptídeo natural ASVAEPSQTPLW-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  634.3249 na forma de  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #25 está presente na glândula agregada da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *venom peptide U3-SYTX-Sth1h\_1* (código de acesso: AIW62674.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 7.



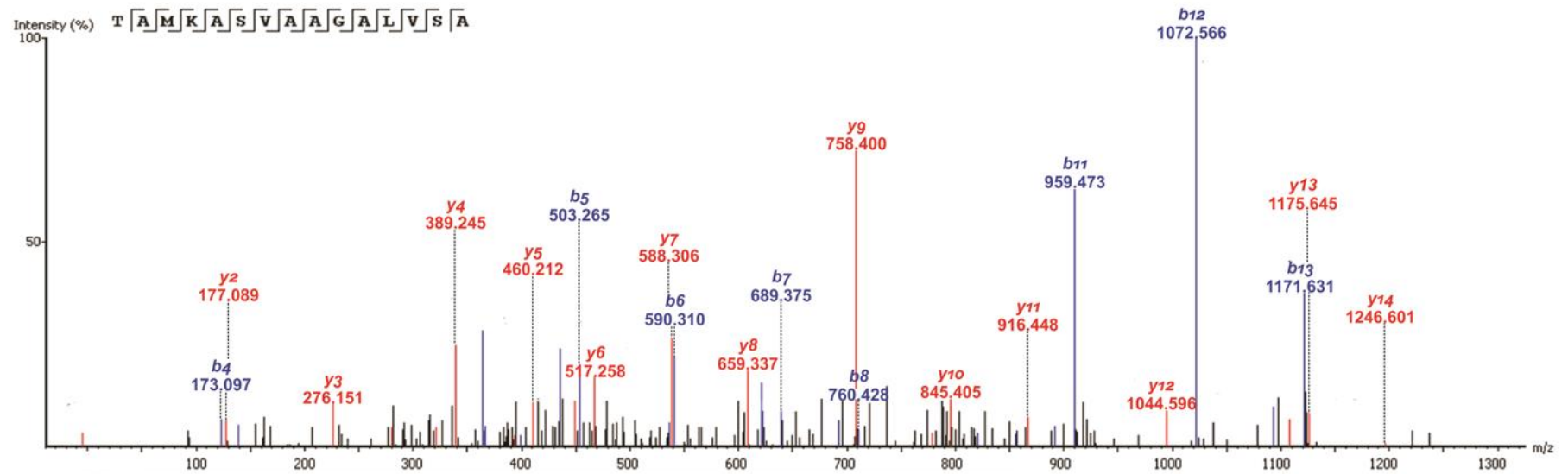
**Figura 28.** Espectro CID representativo do peptídeo natural EGVDDALGAADNLDLDT-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  738.3660  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #11 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *venom anionic peptide-5* (código de acesso: ABR21033.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 9.



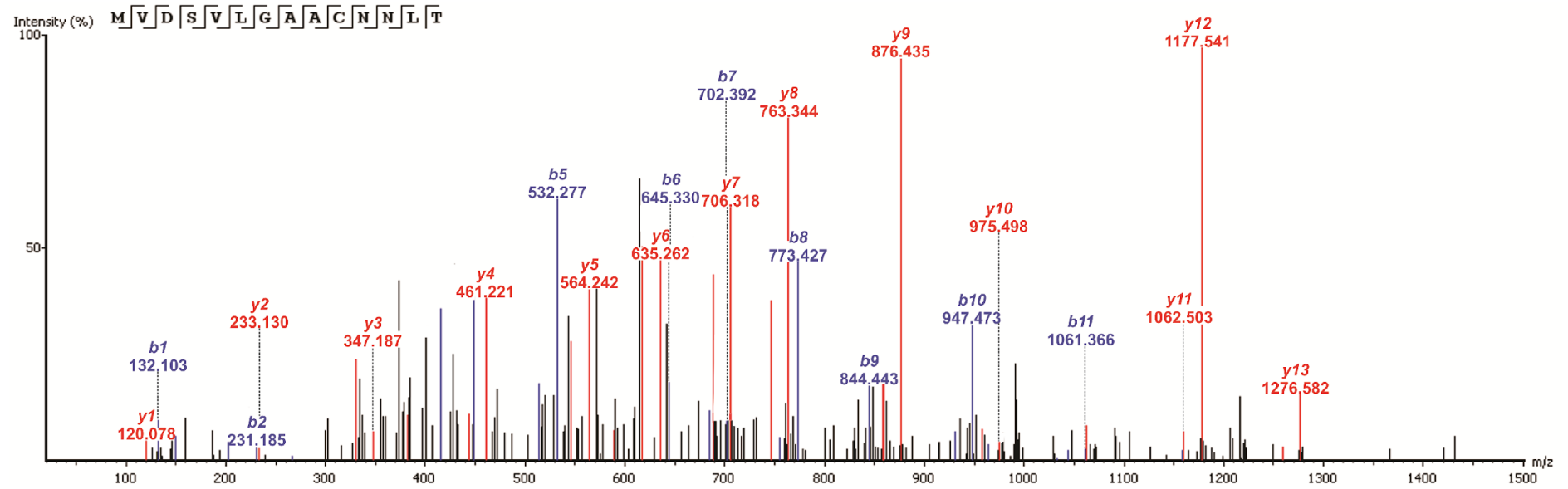
**Figura 29.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MVSVDLGAACMDPV-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  704.3449 na forma de  $[M + 2H]^2$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #10 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *TxLP4* (código de acesso: ABY26686.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 9.



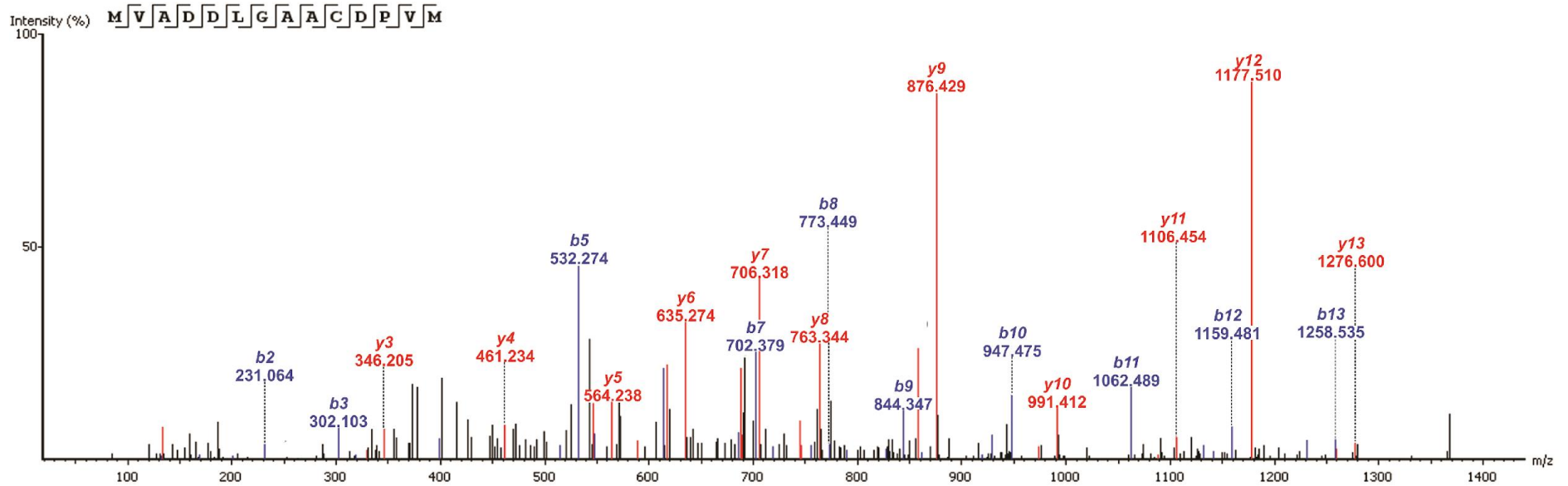
**Figura 30.** Espectro CID representativo do peptídeo de digestos trípticos YVTDDALEAADNLES-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  1624.7104  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #15 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *venom toxin meuTx19* (código de acesso: AMX81489.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 10.



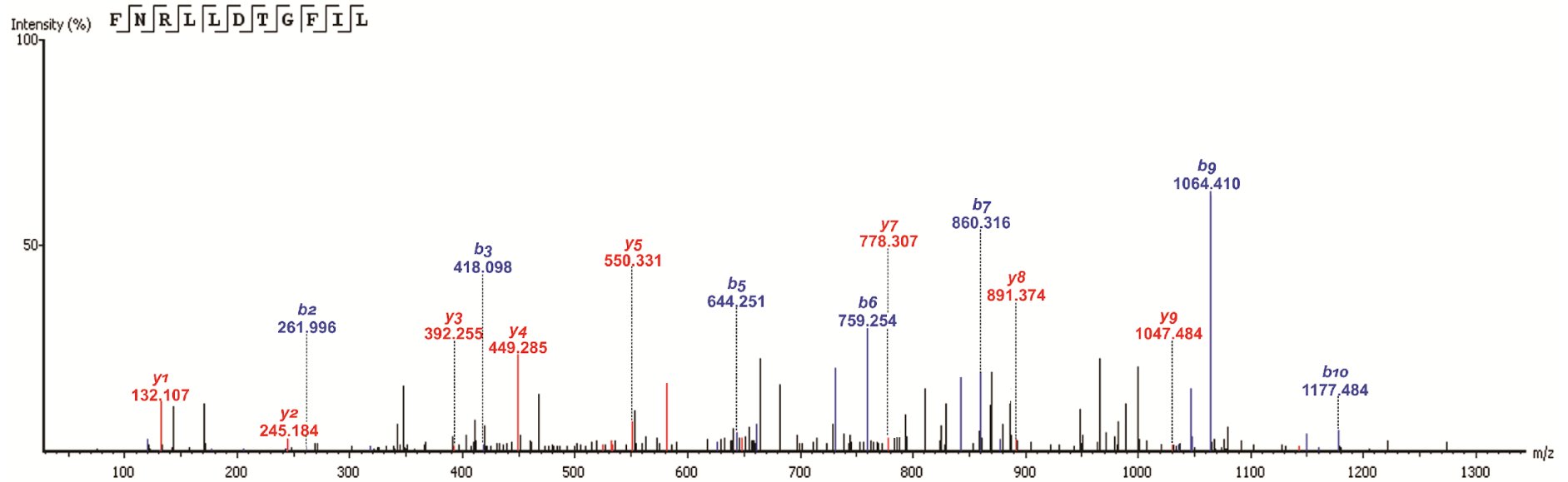
**Figura 31.** Espectro CID representativo do peptídeo natural TAMKASVAAGALVSA-OH, selecionando-se o íon de m/z 674.3691  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #15 está presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *venom peptide HtKTx2* (código de acesso: AOF40180.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 10.



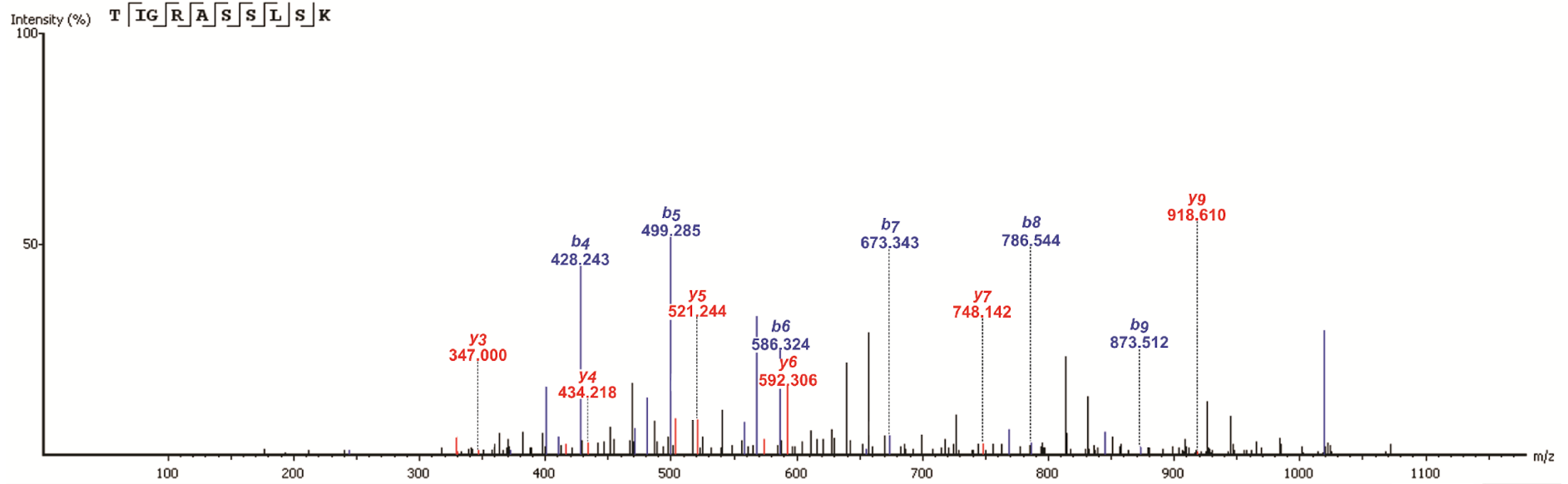
**Figura 32.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MVDSVLGAACNNLT-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  704.3522  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #12 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *Venom metalloproteinase antarease TserMP\_A-like isoform X3* (código de acesso: XP\_023216482.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 9.



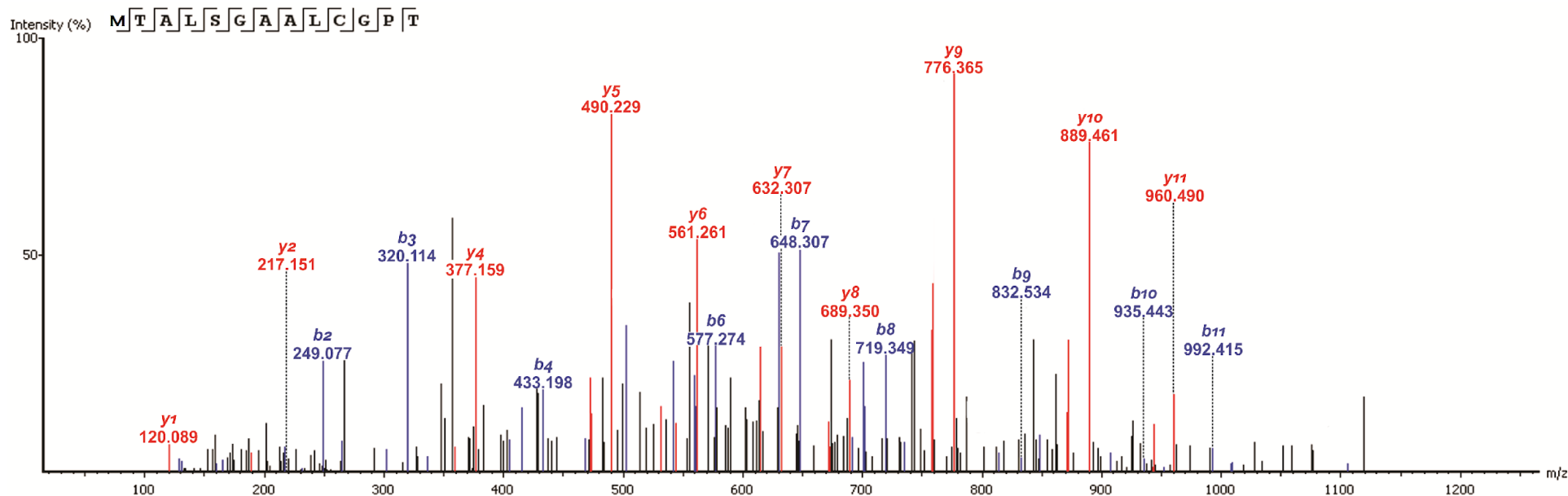
**Figura 33.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MVADDLGAACDPVM-OH, selecionando-se o íon  $m/z$  de 704.3517  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #13 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *Venom metalloproteinase antarease TserMP\_A-like isoform X3* (código de acesso: XP\_023216482.1), através do sequenciamento *de novo* – Tabela 9.



**Figura 34.** Espectro CID representativo do peptídeo natural FNRLD TGFI L-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  654.8019  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #2 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *Conotoxin* (código de acesso: ATF27505.1), nos bancos de dados conotoxinas – Tabela 9.



**Figura 35.** Espectro CID representativo do peptídeo natural TIGRASSLSK-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  1019.5385  $[M + 1H]^+$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #13 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *Mr\_precursor\_155* (código de acesso: BAO02229.1), nos bancos de dados conotoxinas – Tabela 10.



**Figura 36.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MTALSGAALCGPT-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  604.7927  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #16 está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *Conotoxin Superfamily 1* (código de acesso: BAS22205.1), através do sequenciamento de novo -Tabela 10.

**Tabela 7.** Agrupamento dos peptídeos naturais apresentando massas moleculares de até 3kDa de acordo com o seu papel funcional na teia: Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos pertencentes apenas a ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae / ou sequenciamento *de novo*. #: número, #AA: Número de aminoácidos, MM: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.

PEPTÍDEOS POTENCIALMENTE ORIGINADOS DE TOXINAS COM MASSAS MOLECULARES ATÉ 3 KDa													
#	Sequências dos Peptídeos	#A A	Mm (Da)	TR (min)	Código de Acesso	Nome da potencial proteína de origem	Organismo	Identidade	Amostra				
									TEIA	AMA	AME	AGRE	FLA
1	VSYAT	5	539,2591	42,07	XP_015925317.1	alpha-latrocrustotoxin-Lt1a-like	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	100%	-	-	-	+	-
2	WHHYVG	6	797,3609	2,48	XP_021003658.1	calsyntenin-1-like	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	100%	+	-	-	-	-
3	WHHYR	5	797,3721	2,49	XP_022651772.1	calsyntenin-1-like	<i>Varroa destructor</i>	100%	+	-	-	-	-
4	MVDDCAAGLPEGET	15	1406,569	24,95	KFM66487.1	Clotting factor B	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	75%	+	-	-	-	-
5	SNSVAAAMMS	10	967,4103	13,27	XP_015904885.1	dipeptidyl peptidase 2-like	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	78%	-	-	-	-	+
6	AHKSGHYR	8	954,4784	43,61	XP_021001151.1	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10-like	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	83%	-	-	-	+	-
7	MVSVMAAGLADPVM	14	1406,661	24,91	XP_020999933.1	membrane metallo-endopeptidase-like 1	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	71%	+	-	-	-	-
8	MVDDALGAADMLW	13	1406,621	24,86	XP_015915454.1	serpin B6	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	75%	+	-	-	-	-
9	MVDDALGAADAEMV	14	1406,606	24,96			<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	75%	+	-	-	-	-
10	SMETGAA	7	665,269	15,73	XP_015926267.1	tripeptidyl-peptidase 2	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	100%	+	-	-	-	-
11	SIAAAY	6	431,238	41			<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	100%	+	-	-	-	-
12	DCTCC	5	543,1127	44,1	AHG24517.1	Tx-3 precursor	<i>Oxyopes takobius</i>	100%	-	-	+	-	-
13	ECCGALAAGLW	11	1092,473	19,39	Q75WH4	U10-hexatoxin-Mg1a	<i>Macrothele gigas</i>	83%	+	-	-	-	-
14	STGGYGGQGGLGGYGGNHSR	20	1837,809	15,58	D2Y2F7	U15-theraphotoxin-Hhn1f	<i>Haplopelma hainanum</i>	77%	-	+	-	-	-
15	TSGGYGGQGGLGGYGGAPSPA	21	1766,786	15,65			<i>Haplopelma hainanum</i>	47%	-	+	-	-	-

16	TSGGYGGQGAGGAGGLGGNGGVT SG	25	1951,862	15,16				85%	-	+	-	-	-
17	GAGQGGYGGGLG	11	892,4039	11,75				85%	-	+	-	-	-
18	NCGAGGGAAGGGLGSSAHQ	19	1497,638	8,77	W4VSH9	U19-barytoxin-Tl1a	<i>Trittame loki</i>	53%	-	+	-	-	-
19	CGGAGGGAGAAGGGVAGGGAPDP	23	1639,701	9,13				61%	-	+	-	-	-
20	AAGGAGGAGGLG	12	814,3933	7,65				75%	-	+	-	-	-
21	NCGAGGKAGGGVAGAGHTQ	19	1568,711	8,88				85%	-	+	-	-	-
22	CGGAGAGGAGAGGGRAAGGHTA	22	1639,723	9,15				46%	-	+	-	-	-
23	GCGANGAGAGGGAVGAAHSQ	21	1639,712	9,1				B1P1C2	U1-theraphotoxin- Cg1b	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	63%	-	+
24	CCGDDALGAAGAPAVY	16	1452,601	26,33	P84063	U5-ctenitoxin-Pk1b	<i>Phoneutria keyserlingi</i>	63%	+	-	-	-	-
25	ASVAEPSQTPLW	12	1284,635	6,19	AIW62674.1	venom peptide U3- SYTX-Sth1h_1	<i>Scytodes thoracica</i>	86%	-	-	-	+	-

**Tabela 8.** Agrupamento dos peptídeos de 3-10 KDa de acordo com o seu papel funcional na teia: Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos pertencentes apenas a ordem Araneae (aranhas) obtidas através da busca contra o banco de dados Arachnidae. #: número, #AA: Número de aminoácidos, MM: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.

PEPTÍDEOS POTENCIALMENTE ORIGINADOS DE TOXINAS COM MASSAS MOLECULARES ENTRE 3 E 10 KDa														
#	Sequências dos Peptídeos	#AA	Mm (Da)	TR (min)	Código de Acesso	Nome da potencial proteína de origem	Organismo	Identidade	Amostra					
									TEIA	AMA	AME	AGRE	FLA	
1	FNAGYANYGLNWGYGAQGG	19	1978,86	23,03	XP_015923637.1	basic phospholipase A2 caudoxin-like isoform X2	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	73%	-	+	-	-	-	-
2	ALFAADLEDLLQAGLDLTVLTH	23	2395,263	26,31	P83561	Beta-hexatoxin-Mg1a	<i>Macrothele gigas</i>	73%	-	-	-	+	-	-
3	MNASLFVVRGEAEQFLANQA	20	2210,079	16,4	P82852	omega-hexatoxin-Hv2d	<i>Hadronyche versuta</i>	50%	-	-	+	-	-	-
4	LLHPYVAA	8	882,4963	16,73	Q7Z1Y7.1	Phospholipase D LarSicTox-alpha1B2a	<i>Loxosceles arizonica</i>	100%	-	+	-	-	-	-
5	GGYGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYG GLGG	31	2364,084	15,78				100%	-	+	-	-	-	-
6	FTALGAADNVDD	12	-	-	XP_015915454.1	serpin B6	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	75%	+	-	-	-	-	-
7	LPLQTLDGLGAQLLDELDAAAEL	23	2378,258	31,78	D2Y211.1	U11-theraphotoxin-Hhn1a	<i>Haplopelma hainanum</i>	63%	-	-	-	+	-	-
8	LPLQTLDGLGAQLLDELDAAAKN	23	2378,269	31,8				63%	-	-	-	+	-	-
9	HFKHASGPLSQLLDDMDEAGQAGFEGSS VLLSMGQ	35	3674,698	28,16	B6DCT2	U3-lycotoxin-Ls1s	<i>Lycosa singoriensis</i>	50%	-	-	-	-	-	+

As aranhas representam um dos grupos que possuem um grande número de espécies peçonhentas (Platnik, N.I. The World Spider Catalog, Version14.0.<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>). Os peptídeos potencialmente originados de toxinas, que foram identificados nas glândulas produtoras de seda e na seda da teia, são conservados em relação à pequenos trechos de sequências de proteínas típicas de venenos de diferentes famílias de aranhas (tabela 7 e 8, apêndice A3 e A4), como: *Theraphotoxin*, *Lycotoxins*, *Ctenitoxin*, *Hexatoxin*, entre outras que serão discutidas abaixo. É importante enfatizar novamente que embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. clavipes* sejam conservadas a uma pequena região de uma proteína já caracterizada em banco de dados, isso não significa que esses peptídeos exercerão a função dessas mesmas proteínas.

As *Theraphotoxins* são proteínas neurotóxicas, isoladas do veneno das aranhas tarântulas da família Theraphosidae. Essas neurotoxinas apresentam efeitos de ativação dos canais de potássio, inibição de canais de sódio, causando o bloqueio da transmissão neuromuscular e paralisia em insetos (Li et al., 2003). No presente estudo, as sequências de peptídeos nomeados de #14-17 e #23 da tabela 7, apresentaram similaridade com as sequências de neurotoxinas *U15-theraphotoxin-Hhn1f* (código de acesso: D2Y2F7) e *U1-theraphotoxin-Cg1b* (código de acesso: B1P1C2); e as sequências de peptídeos nomeados de #7-8 da tabela 8 apresentaram similaridade com a sequência de neurotoxina *U11-theraphotoxin-Hhn1a* (código de acesso: D2Y2I1.1).

As *Lycotoxins* constituem uma família de peptídeos antimicrobianos típicos do veneno da aranha *Lycosa singoriensis* (Yan et al., 1998). No presente estudo, a sequência de peptídeo nomeado de #9 da tabela 7, apresentou similaridade com a toxina *U3-lycotoxin-Ls1s* (código de acesso: B6DCT2).

As *Ctenitoxin Pn* ou *Pk* são peptídeos neurotóxicos presentes no veneno de aranhas pertencentes a família *Ctenidae* (Glenn et al., 2008), neste caso as aranhas *Phoneutria nigriventer* (*Pn*) e *Phoneutria keyserlingi* (*Pk*). No presente estudo a sequência de peptídeo nomeado de #24 da tabela 8, apresentou similaridade com a neurotoxina *U5-ctenitoxin-Pk1b* (código de acesso: P84063). Segundo Richardson e colaboradores (2006), esta neurotoxina demonstrou causar paralisia espástica e morte em camundongos, logo após a sua administração via intracerebroventricular (4-6 minutos).

As sequências de peptídeos nomeados de #13 da tabela 7, e os nomeados de #2 e #3 da tabela 8, apresentam similaridade com as neurotoxinas *hexatoxins* isoladas do veneno das aranhas *Hadronyche versuta* e *Macrothele gigas*. A *omega-hexatoxin-Hv2d* (código de acesso: P82852), apresenta potencial efeito inibitório em canais de cálcio em insetos (Mukherjee et al., 2006). Enquanto que, a *Beta-hexatoxin-Mg1a* (código de acesso: P83561) pode causar paralisia temporária em lepidópteros, e até a morte em camundongos se injetadas em altas concentrações (Corzo et al., 2003).

A identificação de diversas sequências peptídicas, semelhantes a neurotoxinas no presente estudo sugere que estes peptídeos contribuem para paralisia de presas, facilitando a captura, e corrobora com a hipótese de que a teia da aranha *T. clavipes* desempenha um papel ativo na captura dessas presas.

As sequências de peptídeos nomeados de #5, #7, #10 e #11 da tabela 7, possuem similaridade com enzimas proteolíticas do tipo peptidase, metaloproteinases e metalopeptidases, as quais são tipicamente encontradas em diferentes venenos animais (Tan e Ponnudurai, 1992; Fletcher et al., 2010). Um estudo comparativo da atividade enzimática de várias espécies animais, incluindo serpentes, anfíbios, lagartos e artrópodes (aranhas, escorpiões, formigas e abelhas) detectou atividade peptidásica no veneno de todos os animais testados, contudo em diferentes intensidades (Tan e Ponnudurai, 1992).

Além dos peptídeos já mencionados, a sequência de peptídeo nomeado de #4 da tabela 7, mostrou similaridade com a sequência da proteína *Clotting factor B* (código de acesso: KFM66487.1) isolada da aranha *Stegodyphus mimosarum*. Esta proteína está relatada com atividade de endopeptidase. As enzimas endopeptidases também são encontradas tipicamente em venenos animais (conforme descrito no UniProt o código de acesso: KFM66487).

E ainda, nos nossos resultados, as sequências de peptídeos nomeados de #8 e #9 da tabela 7, e a sequência de peptídeo nomeado de #6 da tabela 8, mostraram similaridade com a proteína *Serpin B6* (código de acesso: XP\_015915454.1), isolada da aranha *Parasteatoda tepidariorum* (conforme descrito no NCBI o código de acesso: XP\_015915454.1). A maioria das serpinas são inibidoras da enzima serina-protease, as mesmas foram identificadas em venenos animais e desempenham papéis como potenciais toxinas. Os mecanismos pelos quais as serpinas atuam e exercem seus efeitos nocivos, não estão totalmente esclarecidos; mas já foi proposto, que as

serpinas podem estar envolvidas na atividade de regulação de íons em canais iônicos (Yang et al., 2017). Além disso, foi proposto também que as serpinas podem estar presentes no veneno para proteger suas próprias toxinas, de proteases de defesa providas das presas.

Dessa forma, a presença de peptídeos semelhantes a serpinas na teia da aranha *T. clavipes*, sugere que as mesmas podem proteger as toxinas desta teia, descritas no presente estudo, contra proteases de defesa das presas, quando as mesmas são capturadas pela teia (tabela 7 e 8).

Nos resultados apresentados neste capítulo, algumas sequências peptídicas, contendo menos que 8 resíduos de aminoácidos, também foram comparadas à sequências dos bancos de dados; porém, essas sequências reduzidas não possuem número de resíduos de aminoácidos suficientes, para que as identificações advindas dos bancos de dados possam ser confiáveis. Este fato ocorreu para as sequências de peptídeos nomeados de #1 a #3, #11 e #12, da tabela 7.

Além das toxinas e neurotoxinas, originalmente descritas em venenos de aranhas, os nossos resultados também apresentam sequências peptídicas identificadas como semelhantes a toxinas presentes em outros venenos animais. Estudos têm demonstrado que as toxinas de venenos animais (aranhas, serpentes, escorpiões, moluscos marinhos – *Conus*, e anêmonas) são frequentemente membros de grandes famílias de genes que representam bibliotecas combinatórias naturais; isto é, eles contêm grupos de toxinas que apresentam sequências homólogas (Casewell et al., 2013; Sachkova et al., 2014; Haney et al., 2014). Assim, a evolução molecular de venenos animais pode ser altamente dinâmica e parece ser frequentemente moldada por duplicação de genes e uma forte seleção diversificada, assim como a co-evolução e a convergência (Fry et al., 2006; Binford et al., 2009; Doley et al., 2009). Dessa forma, decidimos também realizar uma busca dos dados obtidos no presente trabalho contra outros bancos de dados, tais como o Arthropoda e NCBI nr. Isto permitiu que, além das identificações de sequência de peptídeos semelhantes a toxinas de venenos de aranhas, também encontrássemos identificações de sequências de peptídeos semelhantes a toxinas comumente relatadas em outros venenos animais, como venenos de escorpiões, e até de organismos marinhos. Algumas dessas sequências de peptídeos identificadas estão apresentadas nas tabelas 9 e 10.

**Tabela 9.** Agrupamento dos peptídeos naturais de massas moleculares de até 3kDa de acordo com o seu papel funcional na teia: Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos obtidos através da busca contra o banco de dados Arthropoda e NCBI nr / ou sequenciamento *de novo*. #: número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.

PEPTÍDEOS POTENCIALMENTE ORIGINADOS DE TOXINAS COM MASSAS MOLECULARES ATÉ 3 KDa														
#	Sequências dos Peptídeos	#AA	Mm (Da)	TR (min)	Código de Acesso	Nome da potencial proteína de origem	Organismo	Identidade	Amostra					
									TEIA	AMA	AME	AGRE	FLA	
1	AATDNK	6	618,2973	54,5	AGK23166.1	Alpha-conotoxin-like	<i>Conus characteristicus</i>	100%	-	-	-	-	-	+
2	FNRLDGTGFI	11	1307,7238	30,29	ATF27505.1	Conotoxin	<i>Conus andremenezi</i>	100%	+	-	-	-	-	-
3	GFYGT	5	543,2329	48,11	B0L0Y5	Conotoxin Ca8.1	<i>Conus characteristicus</i>	100%	-	-	+	-	-	-
4	TLAMS	6	521,252	49,5				100%	-	-	+	-	-	-
5	TGCGCAC	7	613,1658	29,57	BAS22698.1	Conotoxin Superfamily S	<i>Conus episcopatus</i>	100%	-	-	-	-	-	+
6	GQSACG	6	521,1904	55,8	ABP48101.1	cysteine-rich secretory protein Mr30-1	<i>Conus marmoreus</i>	100%	-	-	-	+	-	-
7	GRCSV	5	520,2427	58,75	AAP75889.1	four-loop conotoxin partial	<i>Conus ermineus</i>	100%	-	-	-	-	-	+
8	GDAGRA	6	545,2557	55,97	XP_002399630.1	glycine rich secreted cement protein, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	100%	-	-	-	+	-	-
8	RAGRGIVC	8	830,4545	74,88	BAO02229.1	Mr_precursor_155	<i>Conus marmoreus</i>	100%	-	-	-	+	-	-
10	MVSVDLGAACMDPV	14	1406,624	23,31	ABY26686.1	TxLP4	<i>Lychas mucronatus</i>	100%	+	-	-	-	-	-
11	EGVDDALGAADNLD	15	1474,6423	24,68	ABR21033.1	venom anionic peptide-5	<i>Mesobuthus eupeus</i>	73%	+	-	-	-	-	-
12	MVDSVLGAACNNLT	14	1406,6533	23,25	XP_023216482.1	Venom metalloproteinase antarease TserMP_A-like isoform X3	<i>Centruroides sculpturatus</i>	100%	+	-	-	-	-	-
13	MVADDLGAACDPVM	14	1406,5879	23,34				86%	+	-	-	-	-	-
14	CGCDDALGAAGAPAVY	16	1452,6013	24,68	AOF40213.1	venom peptide HtLa12	<i>Hadogenes troglodytes</i>	75%	+	-	-	-	-	-
15	TAMKASVAAGALVSA	15	1346,7227	13,79	AOF40180.1	venom peptide HtKTx2	<i>Hadogenes troglodytes</i>	70%	-	+	-	-	-	-

**Tabela 10.** Agrupamento dos peptídeos de 3-10 kDa de acordo com o seu papel funcional na teia. Peptídeos potencialmente originados de toxinas. Na tabela foram considerados peptídeos obtidos através da busca contra o banco de dados Arthropoda e NCBI nr. #: número, #AA: Número de aminoácidos, Mm: Massa

Molecular, TR: Tempo de Retenção, AMA: Glândula ampulada maior, AME: Glândula ampulada menor, AGRE: Glândula agregada, FLA: Glandula flageliforme, (+) presença do peptídeo, (-) ausência do peptídeo.

PEPTÍDEOS POTENCIALMENTE ORIGINADOS DE TOXINAS COM MASSAS MOLECULARES ENTRE 3 E 10 KDa

#	Sequências dos Peptídeos	#AA	Mm(Da)	TR (min)	Código de Acesso	Nome da potencial proteína de origem	Organismo	Identidade	Amostra				
									TEIA	AMA	AME	AGRE	FLA
1	DGVRASASADA	11	1018,468	14,27	AFE82855.1	Conotoxin mr23a precursor, partial	<i>Conus marmoreus</i>	80%	+	-	-	-	-
2	VPYIIDYSLGGYDR	14	1629,804	19,21	CDJ26725.1	astacin-like metallopeptidase 10 protein	<i>Tityus serrulatus</i>	80%	-	-	-	+	-
3	SDRDDHLIIYIQNVVR	16	1955,023	18,41				80%	-	-	-	+	-
4	VPYLLDYSLNYDR	13	1629,804	19,18	CDJ26718.1	astacin-like metallopeptidase 3 protein	<i>Tityus serrulatus</i>	64%	-	-	-	+	-
5	HGGALTE	7	683,3239	86,47	AMP44595.1	conotoxin	<i>Conus betulinus</i>	100%	-	-	-	+	-
6	KGCCP	5	506,1981	68,32	BAS22127.1	Conotoxin Superfamily A	<i>Conus episcopatus</i>	100%	-	-	+	-	-
7	LVVLAT	6	614,4003	77,04				100%	-	-	+	-	-
8	KAAAGE	6	545,2809	53,46	AMM62651.1	conotoxin-specific protein disulfide isomerase (cspdi)	<i>Conus geographus</i>	100%	+	-	-	-	-
9	SGPKC	5	490,2209	35,38	JAI17931.1	Ctr_M_13 conopeptide precursor	<i>Conus tribblei</i>	100%	-	-	-	-	+
10	GMVCDCC	7	745,1904	50,84	AOF40152.1	insulin precursor	<i>Conus bandanus</i>	100%	-	-	+	-	-
11	VYADCNEP	8	909,3538	15,73	AMO02562.1	metalloserulase 20	<i>Tityus serrulatus</i>	100%	+	-	-	-	-
12	TMALGAADNVDD	12	1207,503	19,58	BAO02138.1	Mr_precursor_064	<i>Conus marmoreus</i>	66%	+	-	-	-	-
13	TIGRASSLSK	10	1018,577	14,32	BAO02229.1	Mr_precursor_155	<i>Conus marmoreus</i>	100%	+	-	-	-	-
14	CGCDDALGAAGAPAV Y	16	1452,601	26,32	AOF40213.1	venom peptide HtLa12	<i>Hadogenes troglodytes</i>	75%	+	-	-	-	-
15	YVTDDALEAADNLES	15	1624,71	29,01	AMX81489.1	venom toxin meuTx19	<i>Mesobuthus eupeus</i>	73%	+	-	-	-	-

16	MTALSGAALCGPT	13	1207,558	18,6	:BAS2220 i.1	<i>Conotoxin Superfamily I1</i>	<i>Conus episcopatus</i>	100%	+	-	-	-	-
----	---------------	----	----------	------	-----------------	-------------------------------------	------------------------------	------	---	---	---	---	---

As sequências de peptídeos, nomeados de #10-15 da tabela 9, e os nomeado de #2, #3, #14 e #15 da tabela 10, apresentam similaridade com toxinas já descritas em venenos de escorpiões, como por exemplo: *venom peptide HtLa12* (código de acesso: AOF40180.1), *astacin-like metalloproteinase 10 protein* (código de acesso: CDJ26725.1), *venom toxin meuTx19* (código de acesso: AMX81489.1, figura 30), *Venom metalloproteinase antarease TserMP\_A-like isoform X3* (código de acesso: XP\_023216482.1, figura 32 e 33) e *TxLP4* (código de acesso: ABY26686.1, figura 29). Segundo Marcussi e colaboradores (2011), são conhecidas dez famílias de peptídeos e proteínas escorpiônicas, as quais incluem: toxinas ligadas a canais de potássio, toxinas que agem em canais de íons cálcio, sódio, cloro e citolíticas.

Também podemos notar nos nossos resultados, que as sequências de peptídeos, nomeados de #1-7 da tabela 9, e os nomeados de #1, #5-10, #12, #13 e #16 da tabela 10, mostram-se semelhantes à conotoxinas, que constituem um grupo de neurotoxinas típicas dos venenos de caramujos marinhos do gênero *Conus* (Olivera et al., 1985). Entre as identificações, estão incluídas: *Conotoxin Ca8.1* (código de acesso: B0L0Y5), *Conotoxin Superfamily A* (código de acesso: BAS22127.1), *Conotoxin Superfamily S* (código de acesso: BAS22698.1), *Alpha-conotoxin-like* (código de acesso: AGK23166.1) e *Conotoxin Superfamily I1* (código de acesso: BAS22205.1, figura 36). Atualmente, conhece-se cerca de 10 superfamílias de conotoxinas com alta seletividade para um alvo molecular específico, como canais iônicos ou receptores (Olivera & Cruz, 2001; Oliveira et al, 2014).

Estes resultados estão indicando que os genes destas proteínas/peptídeos podem ter evoluído independentemente em todos esses animais. Corroborando esta hipótese é importante mencionar a ocorrência do peptídeo *glacontryphan-M*, com 100% de cobertura de sequência presente nas asas da borboleta *Hebomoia glaucippe*; o qual é estrutural e funcionalmente muito semelhante às toxinas peptídicas relatadas nos venenos de *Conus* (Bae et al., 2012).

Já está bem documentado que diversas toxinas presentes nos venenos de escorpiões, aranhas, serpentes e moluscos marinhos correspondem a peptídeos biologicamente ativos, dos quais, uma porcentagem significativa, é rica em pontes dissulfeto que estabilizam suas estruturas tridimensionais (Ueberheide et al 2009). A possível função biológica dessas moléculas, está na capacidade de interagirem especificamente com canais iônicos, sendo importantes ferramentas para se estudar o funcionamento desses canais (Ueberheide et al 2009).

Considerando-se todas as sequências de peptídeos identificadas no presente estudo, para este grupo (peptídeos potencialmente originados de toxinas), algumas delas foram selecionadas para serem sintetizadas. Essas sequências sintetizadas em fase sólida, foram submetidas a ensaios de inseto-toxicidade, a fim de avaliar e validar o potencial tóxico das mesmas ao serem injetadas na hemocele de insetos-presa (seção de resultados 4.2.).

### (iii) Outros peptídeos

Neste grupo foram incluídos os peptídeos que não apresentam um papel funcional conhecido, na teia da aranha *T. clavipes*. Para a fração de peptídeos naturais apresentando massas moleculares de até 3 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 8, 17, 20, 18 e 33 de “outros peptídeos”, presentes nas glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. Enquanto que para a fração de peptídeos apresentando massas moleculares de 3-10 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 6, 53, 56, 22 e 33 de “outros peptídeos”, presentes nas glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente (apresentadas no Apêndice A5 e A6).

Foram denominados de “outros peptídeos”, todos aqueles que não apresentaram semelhanças com proteínas/peptídeos estruturais da seda, ou toxinas dos venenos de aranhas e/ou venenos de outros animais. Sendo assim, foram identificados nas glândulas produtoras de seda algumas dessas sequências de outros peptídeos que se mostraram semelhantes à diferentes proteínas, tais como: proteoformas de *NADH dehydrogenase (subunidade 1,2, 4, e 5)*, e *cytochrome oxidase subunit I partial*. Essas proteínas já foram classificadas pelo modelo proposto por dos Santos-Pinto e colaboradores (2016), como proteínas relacionadas à proteção das espidroínas dentro da glândula, contra o estresse oxidativo durante o processo de fiação da seda.

Também foi identificada a sequência de peptídeo semelhante a proteína *fatty acyl-CoA elongase*. Essa proteína foi descrita nos estudos realizados por dos Santos-Pinto e colaboradores (2016), como proteína relacionada com a preservação das características fibrilares das espidroínas na seda; uma vez que essas proteínas podem estar relacionadas com a síntese de ácidos graxos, os quais compõem a solução aquosa das gotículas secretadas sobre as fibras, preservando-a.

Além dessas, também foram identificadas sequências de peptídeos semelhantes às proteínas ribossomais, como: *ribosomal protein S30-like protein*, *ribosomal protein S6 kinase beta-1 protein partial*, *60S acidic ribosomal protein P1 partial*. Em estudos prévios, essas proteínas foram descritas como proteínas *housekeeping*; provavelmente são oriundas das células/tecidos glandulares, que provavelmente extravasaram durante o método de preparação do extrato protéico das glândulas (dos Santos-Pinto et al., 2016).

Como já mencionado anteriormente, embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. clavipes* sejam conservadas a uma pequena região de uma proteína já caracterizada em banco de dados, isso não significa que esses peptídeos exercerão a função dessas mesmas proteínas.

#### (iv) Peptídeos não caracterizados

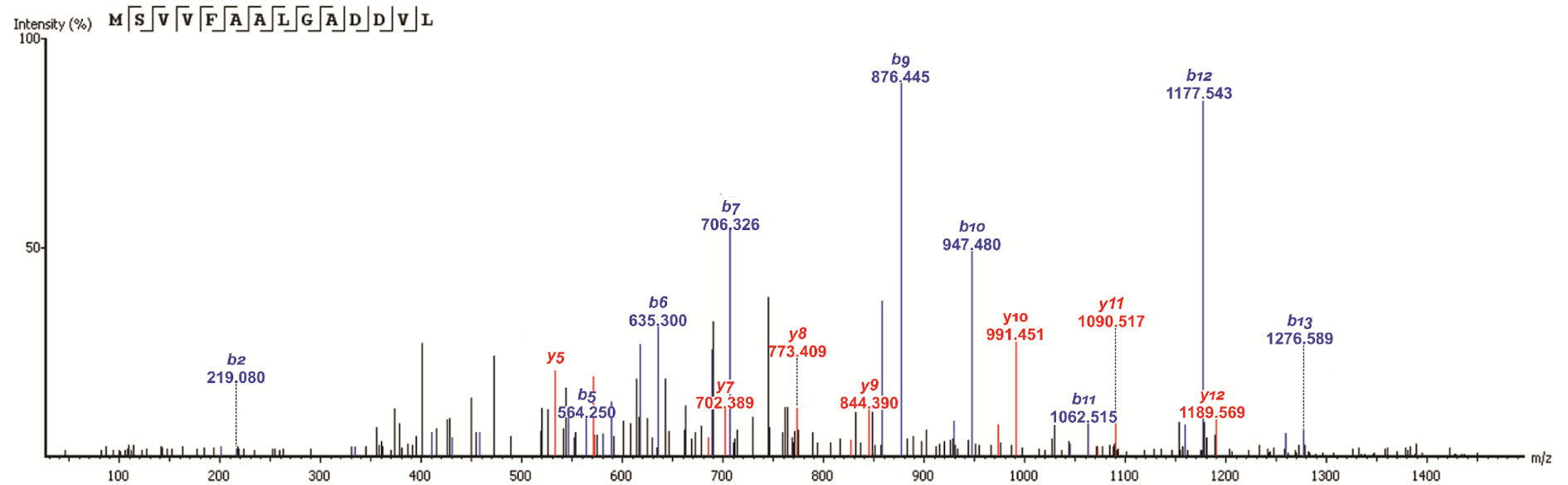
Neste último grupo, foram incluídos os peptídeos sequenciados, porém não caracterizados, ou seja, são sequências existentes nos bancos de dados, mas que ainda não foram caracterizadas funcionalmente. Para a fração de peptídeos apresentando massas moleculares de até 3 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 10, 9, 3, 4 e 8 de peptídeos não caracterizados nas glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente. Enquanto que para a fração de peptídeos apresentando massas moleculares de 3-10 kDa, foram identificadas na análise do presente estudo 9, 27, 39, 14 e 18 de peptídeos não caracterizados nas glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada, flageliforme, e na seda da teia, respectivamente (apresentadas no Apêndice A7 e A8).

Esses peptídeos não apresentaram similaridade com sequências parciais de nenhuma proteína, ou seja, suas sequências não apresentaram homologia nenhuma com as sequências já caracterizadas funcionalmente e depositadas em bancos de dados. Dessa forma, é necessário que, futuramente, essas sequências de peptídeos possam ser sintetizadas e submetidas a ensaios de atividades biológicas, para que possamos caracterizá-las funcionalmente e entender seus papéis na seda da teia.

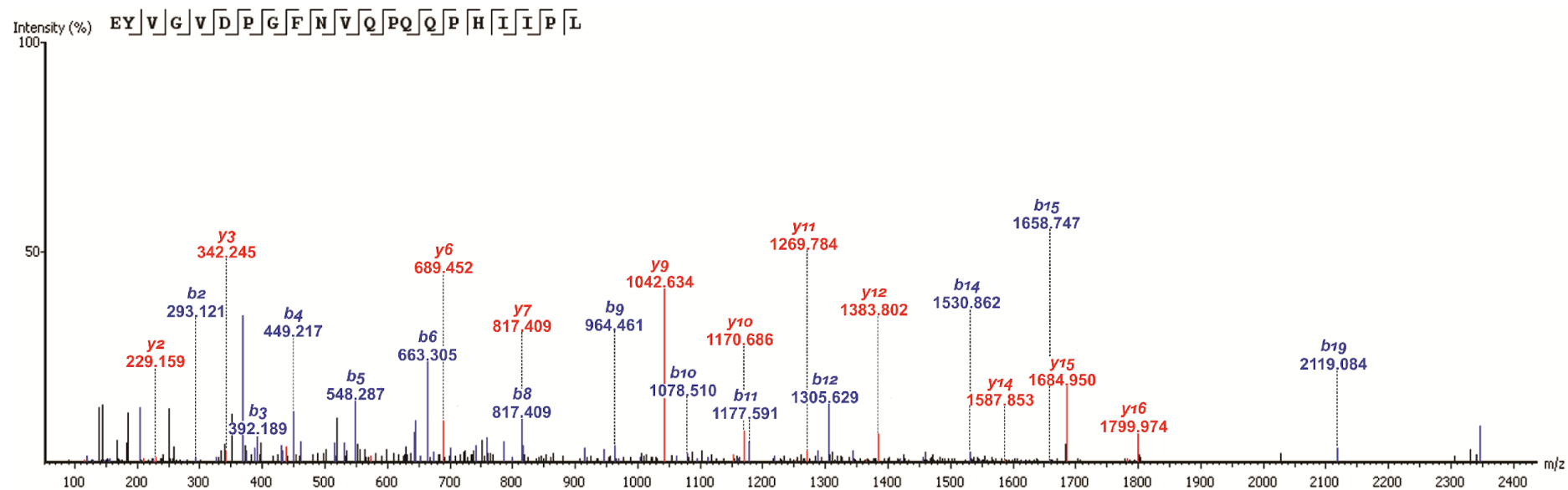
Considerando a grande quantidade de espectros que foram gerados para a identificação das sequências peptídicas de todas as amostras, como exemplos, serão mostrados somente alguns espectros CID de algumas sequências peptídicas. Dessa forma, para exemplificar serão mostrados apenas os espectros de massas

correspondentes às sequências que serão sintetizadas, e que se mostraram semelhantes a sequências não caracterizadas já descritas e depositadas nos bancos de dados.

É importante mencionar que nos espectros de massas apresentados abaixo estão evidenciados os íons fragmentos da série  $-b$  e  $-y$ , mas também foram considerados íons fragmentos de outras séries para a realização do sequenciamento dos peptídeos identificados (Figuras 37-38).

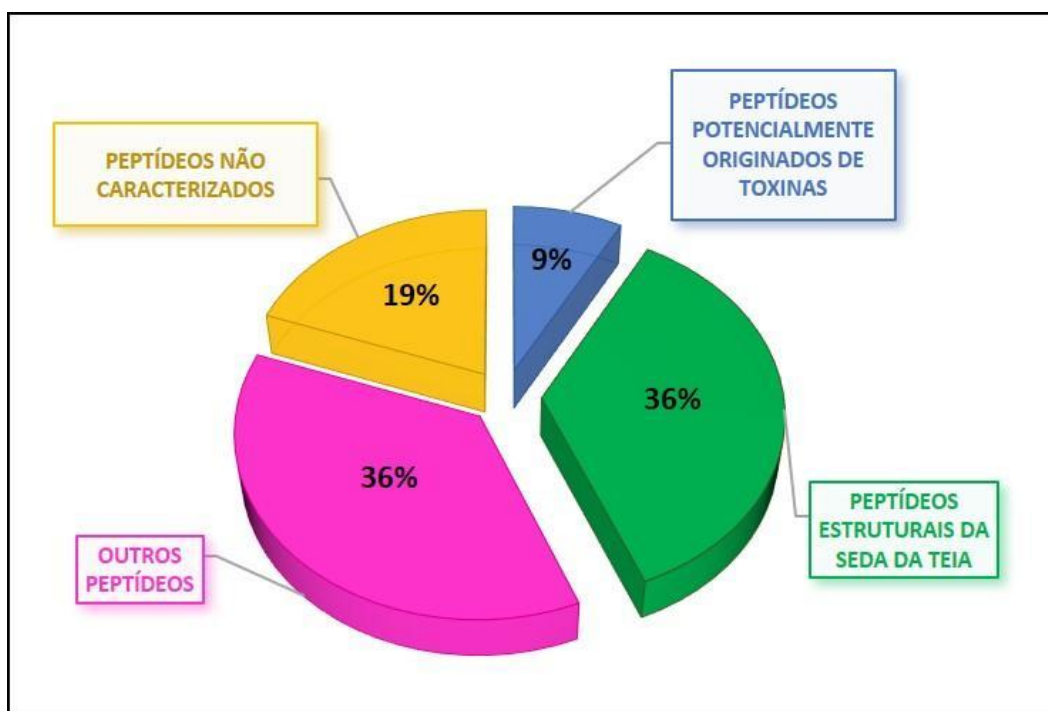


**Figura 37:** Espectro CID representativo do peptídeo natural MSVVFAALGADDVL-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  704.3585  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial de uma *uncharacterized protein LOC111251952 isoform X1* (código de acesso: XP\_022664869.1), através do sequenciamento *de novo* – Apêndice A7.



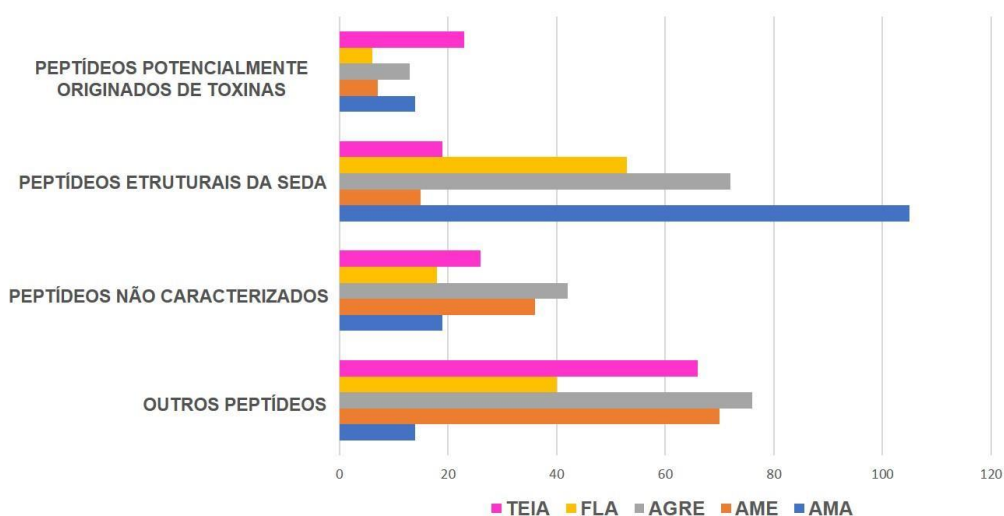
**Figura 38:** Espectro CID representativo do peptídeo natural EYVGVDPGFNVQPQQPHIIPL-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  1174.1318  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha *T. clavipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial de uma *hypothetical protein X975\_20520* (código de acesso: KFM78378.1), através do sequenciamento *de novo* – Apêndice A7.

Realizando-se uma breve síntese dos resultados obtidos pela análise do perfil peptídico do presente estudo, estamos apresentando um total de 729 sequências de peptídeos presentes na seda da teia e nas glândulas produtoras de seda. A figura 39 demonstra que, 36% são sequências peptídicas semelhantes a proteínas estruturais da seda; 9% são sequências peptídicas potencialmente originadas de toxinas; 36% são de “outros peptídeos”; e por fim 19% são sequências peptídicas que ainda não foram caracterizadas.



**Figura 39.** Distribuição do total das sequências de peptídeos identificadas nas glândulas produtoras de seda e na seda da teia da aranha *T. clavipes*, de acordo com os quatro grupos.

A figura 40, demonstra a quantidade de sequências de peptídeos de cada grupo, presentes na teia e glândulas produtoras de seda. Sendo assim, os peptídeos semelhantes às proteínas espidroínas, que compõem as fibras da seda, foram produzidas pelas quatro glândulas produtoras de seda. A biossíntese e secreção de peptídeos semelhantes às toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas e defensinas também foram observados nas quatro glândulas produtoras de seda.



**Figura 40.** Distribuição das proteínas identificadas nas glândulas de seda, e na seda da teia de *T. clavipes* de acordo com os 4 grupos funcionais.

Podemos notar que, a maior parte dos peptídeos secretados pela glândula ampulada maior e pela glândula agregada estão relacionados com a produção de peptídeos estruturais da seda da teia. Além disso, essas mesmas glândulas produziram o maior número de peptídeos potencialmente originados de toxinas dentre as glândulas produtoras de seda, conforme mostrado na figura 40.

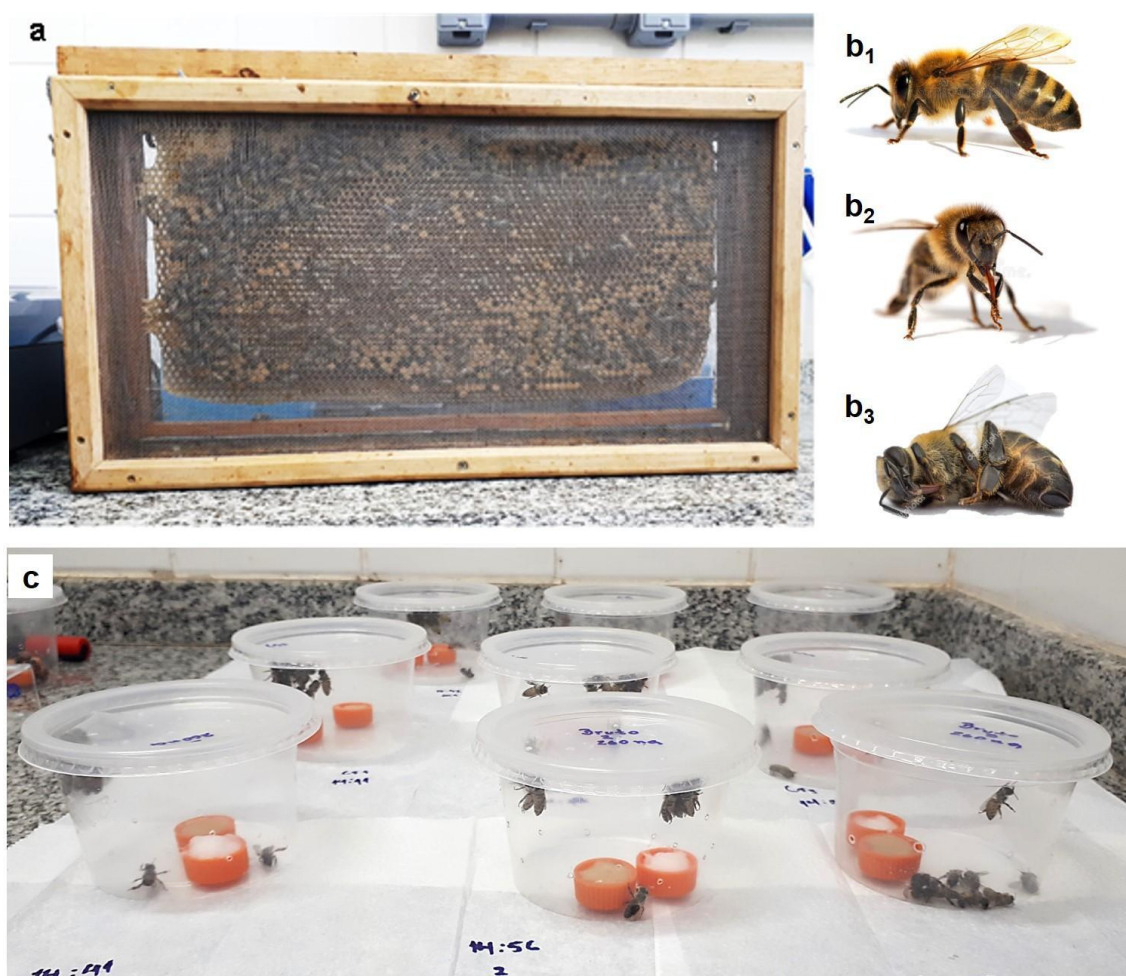
Através da análise da perfilagem peptidômica, utilizando o sistema LC-MS-QTOF, foi possível identificar centenas de peptídeos, que até então, não haviam sido identificados em estudos anteriores, com essas mesmas amostras de estudo, realizados pelo nosso grupo. Dessa forma, os nossos resultados podem contribuir para uma melhor compreensão sobre o papel das glândulas de seda e da seda da teia de *T. clavipes*.

## 4.2. Bioensaio de inseto-toxicidade via hemocele de abelhas *A. mellifera*

### (i) extrato vesicular da teia da aranha *T. clavipes*

Após a análise dos resultados obtidos dos extratos peptídicos das glândulas produtoras de seda e da seda da teia por LC-MS-QTOF, foi observada a presença de diferentes sequências de peptídeos semelhantes à toxinas. Por isso, decidiu-se realizar o ensaio de inseto-toxicidade para avaliar e validar o efeito tóxico do extrato vesicular da teia, frente a um inseto-presa.

É importante enfatizar que o ensaio foi realizado com a porção vesicular da teia, uma vez que os peptídeos e proteínas tóxicas estão provavelmente, aprisionados dentro das vesículas lipídicas extracelulares, que por sua vez estão suspensas no interior aquoso das gotículas. Sendo assim, após a quantificação e preparo do extrato da porção vesicular, o mesmo foi injetado dentro da hemocele de abelhas *A. melífera*, a fim obter uma avaliação inicial do potencial tóxico deste extrato, conforme procedimento ilustrado na Figura 41.

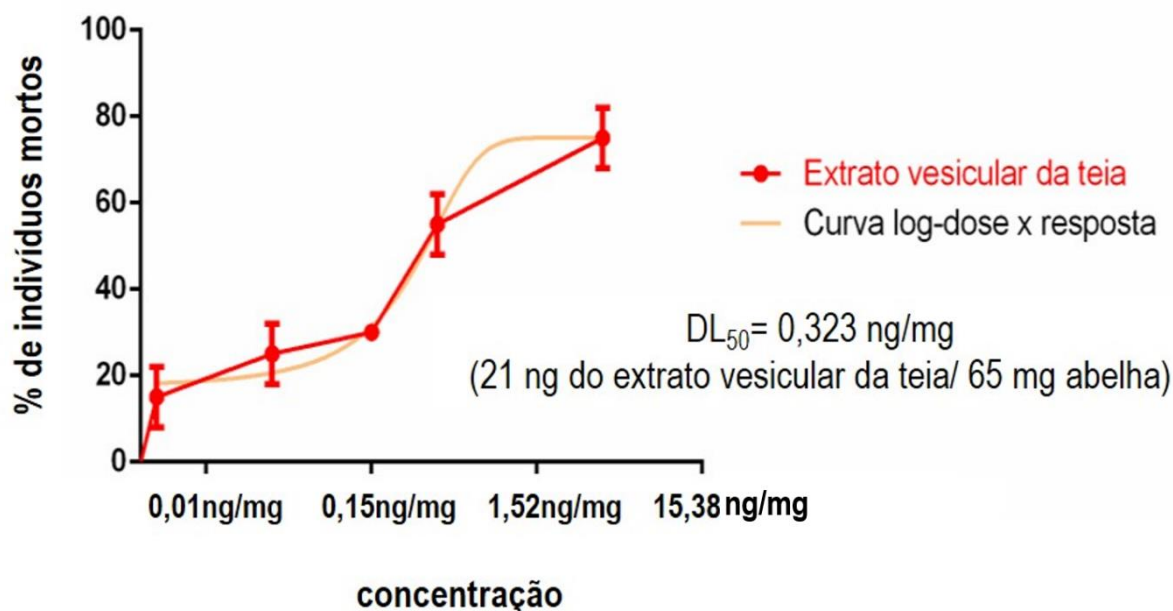


**Figura 41. Bioensaio de inseto-toxicidade.** a) favo de abelhas recém emergidas. b) imagens de 3 abelhas exercendo alguns dos comportamentos observados durante a execução do bioensaio: inseto ativo (b<sub>1</sub>), inseto ativo realizando auto-limpeza (b<sub>2</sub>), inseto paralizado ou morto (b<sub>3</sub>). c) Imagem registrada de um dos bioensaios de inseto-toxicidade.

Após 72 horas da injeção do extrato vesicular das teias, foi realizada a contagem do número de abelhas vivas e mortas de cada grupo amostral (controle + 5 concentrações do extrato vesicular (0,5 ng/μL, 2,5 ng/μL, 10 ng/μL, 25 ng/μL e 250 ng/μL) – em triplicatas). Após a contagem de indivíduos mortos e vivos foi estabelecido

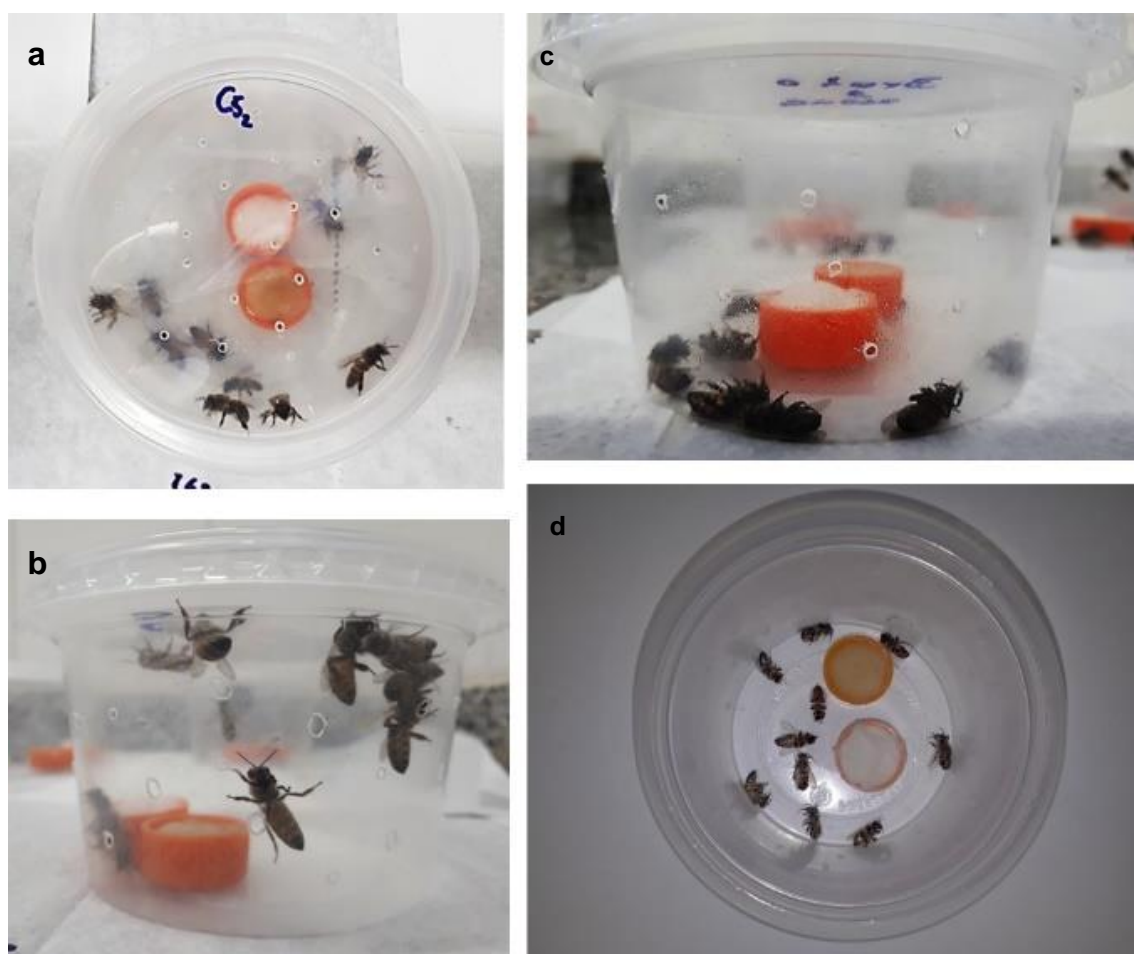
o valor de dose letal ( $DL_{50}$ ), ou seja, foi mensurada a quantidade necessária de extrato vesicular da teia em relação ao peso do inseto (ng/mg) para matar 50% das abelhas. Esse resultado está demonstrado na figura 42. O extrato vesicular da teia apresentou o valor de  $DL_{50}$  de 0,323 ng/mg (ou seja 21 ng extrato vesicular da teia / 65 mg do peso da abelha recém-emergida), foi necessária para matar 50% das abelhas *A. mellifera*, em um período de 72 horas. A curva de dose-resposta apresentou um  $r^2 = 0,95$  (Esteves et al., 2020).

E ainda, retomando os dados apresentados no capítulo anterior, foi sugerido que cerca de 1/3 do peso seco da porção vesicular da teia é constituída de proteínas/peptídeos e dessa forma, cada vesícula lipídica aprisiona  $\cong 47$  pg de proteínas/peptídeos em seu interior. Sendo assim, podemos estimar que em 21 ng do extrato vesicular da teia existem  $\cong 7$  ng de proteínas/peptídeos que se encontram aprisionados no interior  $\cong 150$  vesículas lipídicas extracelulares. Portanto, foram injetados na hemocele das abelhas cerca de 7 ng de proteínas/peptídeos, os quais possivelmente correspondem a proteínas/peptídeos semelhantes a toxinas que foram identificados neste presente estudo e em estudos anteriores (Marques et al., 2005; Volsi et al., 2006; dos Santos-Pinto, et al 2016; Esteves, 2017).



**Figura 42. Curva dose-resposta para a injeção do extrato vesicular da teia da aranha *T. clavipes*, na hemocele de abelhas *A. mellifera*.** Foram injetadas cinco diferentes concentrações do extrato vesicular da teia, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 72 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-toxicidade foram obtidos os valores de  $LD_{50} = 0,323$  ng/mg (21 ng do extrato/65 mg da abelha) e,  $r^2 = 0,95$  para a curva de dose-resposta (Esteves et al., 2020).

Após 72 horas, foi observado que  $\cong 100\%$  das abelhas avaliadas com a injeção de solução salina permaneceram vivas, enquanto que  $\cong 80\%$  das abelhas avaliadas com a injeção do extrato vesicular da teia na concentração de  $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$  morreram. A Figura 43 mostra imagens gerais deste tipo de ensaio. Por fim, foi também observado que, as abelhas que permaneceram vivas, após a injeção de diferentes concentrações do extrato, apresentaram outros tipos de comportamentos: atividade, inatividade e/ou movimentos lentos.



**Figura 43. Imagens registradas dos bioensaios de inseto-toxicidade, após 72 horas de injeção do controle/concentrações do extrato vesicular da teia. a)** vista superior do grupo controle evidenciando as abelhas vivas. **b)** vista lateral do grupo controle evidenciando que além de vivas as abelhas demonstraram movimentação normal dentro do pote. **c)** vista lateral do grupo que foi injetado a maior concentração do extrato vesicular da teia ( $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), evidenciando que além da morte da maioria das abelhas houve a ausência da movimentação normal das mesmas dentro do pote, de forma que as abelhas que não morreram apresentaram paralisia. **d)** vista superior do grupo que foi injetado a maior concentração do extrato vesicular da teia ( $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), evidenciando a morte da maioria das abelhas.

Em estudos de Marques e colaboradores (2005), também foram realizados o mesmo ensaio de inseto-toxicidade via hemocele, no qual o extrato total da teia da aranha *T. clavipes* foi injetado em abelhas *A. mellifera* recém emergidas. Este extrato total da teia apresentou DL<sub>50</sub> de 2 ng/mg, ou seja, 2ng do extrato total da teia/mg do peso da abelha, foi necessário para matar 50% das abelhas. Ao compararmos o valor de DL<sub>50</sub> do extrato total da teia (Marques et al., 2005) com o valor de DL<sub>50</sub> do extrato vesicular da teia no presente estudo (0,323 ng/mg, podemos constatar que o extrato vesicular da teia se mostrou 6 vezes mais tóxico em relação ao extrato total da teia.

A diferença de toxicidade entre os extratos pode ser explicada pelo fato do extrato vesicular da teia estar concentrado apenas com as vesículas lipídicas que carregam em seu interior as proteínas/peptídeos semelhantes a toxinas. Enquanto que, o extrato total da teia além de conter as vesículas lipídicas, as mesmas estão diluídas em meio de outras moléculas presentes no extrato total.

Além disso, Marques e colaboradores (2005) demonstraram que algumas toxinas, de baixas massas moleculares, só são sintetizadas por certas glândulas produtoras de seda e somente depositadas sob a seda da teia em determinados períodos do ano, como primavera e verão ou outono e inverno, de acordo com a dieta da aranha. Por isso, é importante mencionar que, possivelmente pode existir uma variabilidade na intensidade do efeito tóxico da teia, de acordo com a região e/ou estação do ano em que essas teias foram coletadas para a realização deste bioensaio.

Em estudos de Souza (2021), foram identificadas proteínas semelhantes a toxinas fosforiladas presentes nas glândulas produtoras de seda ampulada maior e agregada da aranha *T. clavipes*. Da mesma forma Souza (2021) realizou o mesmo ensaio de inseto-toxicidade via hemocele, no qual o extrato da secreção da glândula ampulada maior e agregada, ambos enriquecidos em fosfoproteínas, foram injetados em abelhas *A. mellifera* recém emergidas. Os extratos enriquecidos em fosfoproteínas da glândula ampulada maior e agregada apresentaram valor de DL<sub>50</sub> de 28,40 ng/mg e 23,07 ng/mg, respectivamente.

Os extratos da secreção das glândulas ampulada maior e agregada enriquecidos em fosfoproteínas se apresentaram, respectivamente, cerca de 90 e 75 vezes menos tóxicos em relação ao extrato vesicular da teia. Souza (2021), especula que essa diferença de toxicidade se deve principalmente pelo fato de que a secreção da glândula além de conter as proteínas semelhantes a toxinas fosforiladas, também contém outros componentes e proteínas não tóxicas que desempenham outras

funções, como por exemplo as espidroínas; dessa forma, as proteínas semelhantes a toxinas se apresentam mais diluídas no complexo material da secreção glandular. Além disso, especula-se a possibilidade da fosforilação estar reduzindo a atividade tóxica das proteínas semelhantes à toxina.

#### (ii) Peptídeos semelhantes a toxinas sintetizados em fase sólida

Foram identificados tanto na seda da teia como nas glândulas produtoras de seda, peptídeos que apresentaram ter similaridade com sequências de toxinas já relatadas na literatura e depositadas em bancos de dados. Onze desses peptídeos foram selecionados e sintetizados. Embora a sequência de um peptídeo sintetizado seja conservada em relação a uma pequena região de uma proteína tóxica (identificada por BLAST), isso não significa que este peptídeo irá exercer um efeito tóxico.

Considerando isso, decidiu-se realizar o ensaio de inseto-toxicidade para avaliar e validar o efeito tóxico das 11 sequências peptídicas semelhantes a toxinas, frente a um inseto-presa: abelhas recém-emergidas *A. mellifera*. Além das 11 sequências que se apresentaram semelhantes a toxinas foram selecionadas mais 2 sequências de peptídeos não caracterizados e estes também foram submetidos ao ensaio de inseto-toxicidade.

Após 24 horas da injeção dos peptídeos na hemolinfa das abelhas, foi realizada a contagem do número de abelhas vivas e mortas de cada grupo amostral (controle + concentração única de 200 ng/ $\mu$ L) – em triplicatas). Inicialmente o ensaio de inseto-toxicidade teve como finalidade apenas identificar quais dos 13 peptídeos poderiam apresentar efeitos tóxicos ou não - mais detalhes desses peptídeos estão apresentados na seção de métodos 3.3.1 e figura 20.

A concentração única de 200 ng/ $\mu$ L foi escolhida com base no valor de DL<sub>50</sub> de 0,3 ng/mg do extrato vesicular da teia (valor obtido após a injeção da concentração de 20 ng/ $\mu$ L do extrato vesicular da teia). O extrato vesicular é composto por milhares de proteínas, peptídeos e outros compostos que possivelmente atuam de forma conjunta quando um inseto é capturado pela teia. Entretanto, não se sabe a ação e nem a concentração para cada peptídeo quando testado isoladamente. Sendo assim, foi adotado um valor de concentração 10 vezes maior (200 ng/ $\mu$ L) para cada peptídeo injetado de forma isolada.

Após as 24 horas, foi observado que  $\cong 100\%$  das abelhas avaliadas com a injeção de solução salina permaneceram vivas, enquanto que parte das abelhas avaliadas com a injeção dos peptídeos na concentração de 200 ng/ $\mu$ L estavam mortas. Dessa forma, as abelhas que foram injetados os peptídeos nomeados de Trichonephiline -1, -2, -3, -4, -8, -10 e -13 apresentaram taxa de mortalidade  $\geq 70\%$ , enquanto que para os peptídeos nomeados de Trichonephiline -5, -6, -7, -9, -11 e -12 apresentaram taxa de mortalidade  $\leq 53\%$ .

A tabela 11 mostra a porcentagem de abelhas mortas para cada peptídeo na concentração 200 ng/ $\mu$ L. Por fim, foi também observado que, as abelhas que permaneceram vivas, após a injeção da concentração de 200 ng/ $\mu$ L, apresentaram outros tipos de comportamentos: atividade, inatividade e/ou movimentos lentos.

É importante ressaltar que as abelhas, antes de morrer, apresentaram anteriormente uma atividade de paralisia, e dessa forma ficaram incapacitadas de se locomoverem e se alimentarem. Possivelmente, o fato de não se alimentarem devido a paralisia ocasionada pela injeção do peptídeo, pode ter contribuído para a morte dessas abelhas. Isso pode ser sugerido, uma vez que do ponto de vista ecológico é mais interessante para aranha manter os insetos sob o efeito de paralisia, aprisionados pela teia - sem, no entanto, matar. Dessa forma, o inseto permanece vivo e fresco, para que mais tarde seja consumido pela aranha.

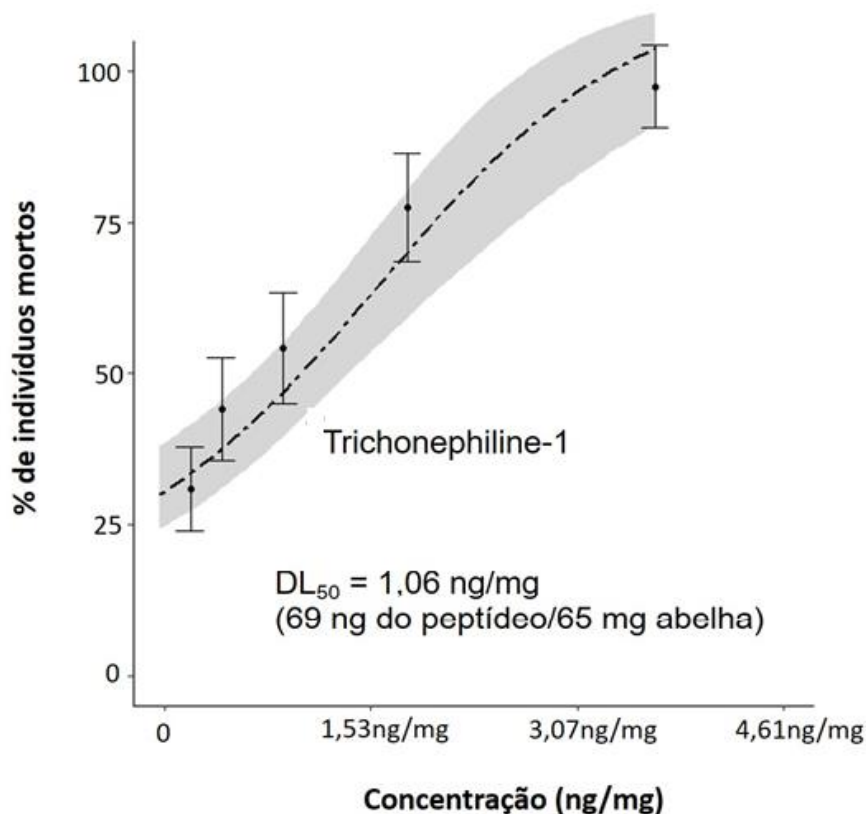
Corroborando com essa observação, pode-se mencionar o estudo realizado por Fuzita e colaboradores (2016) com a aranha *Nephilingis cruentata* que também é uma aranha construtora de teia e que se alimenta de presas que são capturadas por sua teia. Nesse estudo os autores demonstraram que as presas capturadas estão vivas até o momento em que a aranha secreta sobre a presa um fluido digestivo, rico em enzimas, que a ajudam a digerir suas presas. Esse fluido dissolve os tecidos das presas, de forma que a aranha consegue se alimentar lentamente, consumindo pequenas partes pré-digeridas (Fuzita et al., 2016).

**Tabela 11. Resposta de cada sequência peptídica aos testes de inseto-toxicidade.** Peptídeos que paralizaram/mataram as abelhas mais de 70% (cor vermelha) e menos de 55% (cor verde), após a injeção de 200 ng/μL de cada sequência peptídica na hemocele de abelhas *Apis mellifera*. Nome: nome dado a sequência peptídica; Sequência: sequência peptídica; Mm: massa molecular; Amostra: origem da sequência peptídica; Mortalidade (%): % de abelhas paralizadas/mortas; Nome da potencial proteína de origem: nome da proteína obtido usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST); Organismo: organismo de origem da proteína.

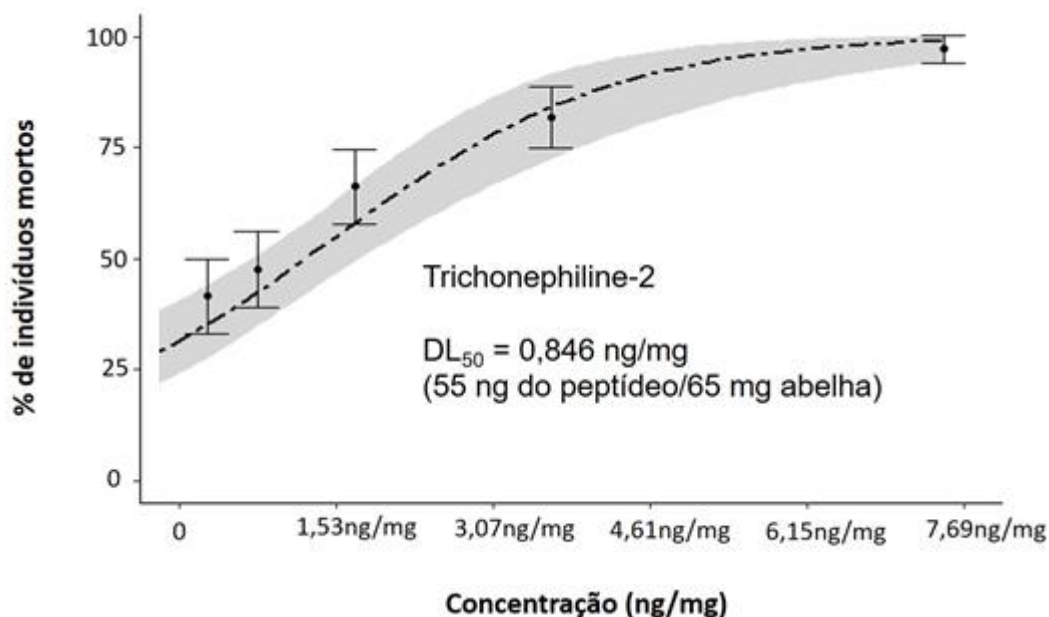
Nome	Sequência	Massa molecular (Da)	Amostra	Mortalidade (%)	Nome da potencial proteína de origem	Organismo
Trichonephiline-1	MVDDALGAADAEMV	1406,606	Web-silk	70%	serpin B6	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>
Trichonephiline-2	EGVDDALGAADNLDT	1474,624	Web-silk	76%	venom anionic peptide-5	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Trichonephiline-3	MVSVDLGAACMDPV (*)	1.406.624	Web-silk	73%	TxLP4	<i>Lychas mucronatus</i>
Trichonephiline-4	YVTDDALEAADNLES	1624,71	Web-silk	93%	venom toxin meuTx19	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Trichonephiline-5	TAMKASVAAGALVSA	1346,722	Major ampullate	40%	venom peptide HtKTx2	<i>Hadogenes troglodytes</i>
Trichonephiline-6	ASVAEPSQTPLW	1284,635	Aggregate	53%	venom peptide U3-SYTX-Sth1h_1	<i>Scytodes thoracica</i>
Trichonephiline-7	MVDSVLGAACNNLT (*)	1406,653	Web-silk	43%	venom metalloproteinase antarease TserMP_A-like isoform X3	<i>Centruroides sculpturatus</i>
Trichonephiline-8	MVADDLGAACDPVM (*)	1406,587	Web-silk	83%	venom metalloproteinase antarease TserMP_A-like isoform X3	<i>Centruroides sculpturatus</i>
Trichonephiline-9	FNRLLDTGFIL	1307,723	Web-silk	53%	Conotoxin	<i>Conus andremenezi</i>

Trichonephiline-10	TIGRASLSK	1018,577	Web-silk	76%	Mr_precursor_155	<i>Conus marmoreus</i>
Trichonephiline-11	MTALSGAALCGPT (*)	1207,558	Web-silk	43%	Conotoxin Superfamily I1	<i>Conus episcopatus</i>
Trichonephiline-12	MSVVFAALGADDVL	1410,717	Web-silk	33%	uncharacterized protein LOC111251952 isoform X1	<i>Varroa destructor</i>
Trichonephiline-13	EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL	2350,264	Web-silk	70%	hypothetical protein X975_2052	<i>Stegodyphus mimosarum</i>
<i>T. clavipes</i> Proteic extract of web-silk	-	-	web-silk	75%	-	<i>Trichonephila clavipes</i>

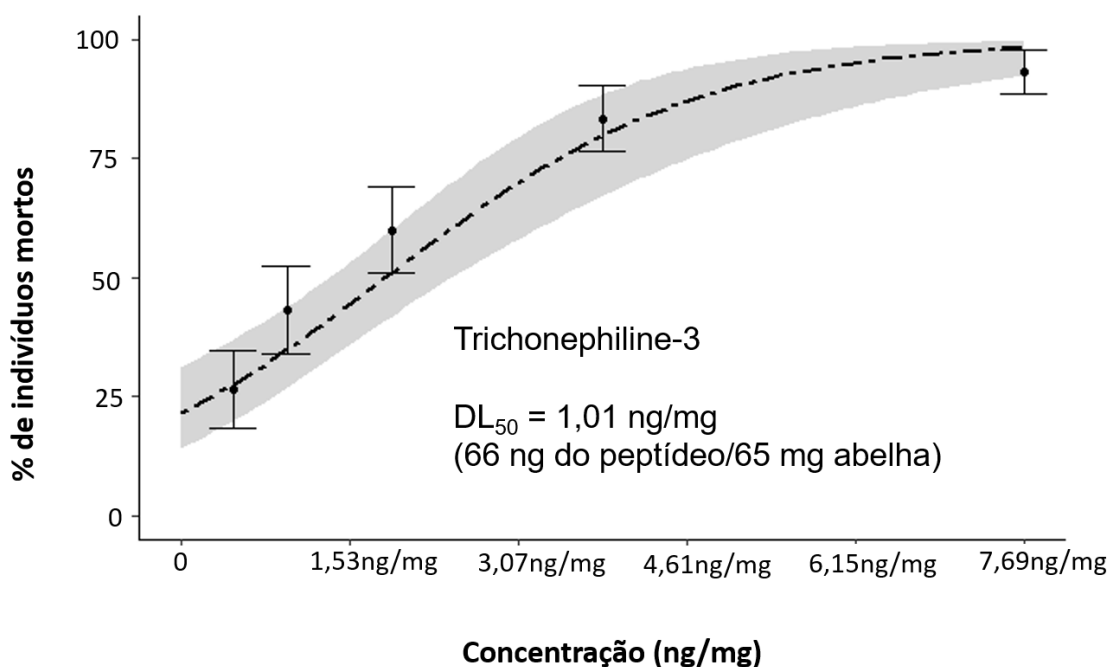
Com base nos resultados de inseto-toxicidade apresentados aqui, os peptídeos Trichonephiline-1, -2, -3, -4, -8, -10 e -13 mostraram-se potencialmente tóxicos em relação aos outros, quando injetados na hemocele de abelhas *Apis mellifera*. Sendo assim, para esses 7 peptídeos que se mostraram tóxicos foram iniciados novos testes de inseto-toxicidades para ser estabelecido o valor dose letal (DL<sub>50</sub>) – figuras 44-46.



**Figura 44. Curva dose-resposta para a injeção do Trichonephiline-1 na hemocele de abelhas *A. mellifera*.** Foram injetadas cinco diferentes concentrações, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 24 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-toxicidade foi obtido o valor de DL<sub>50</sub> = 1,06 ng/mg (69 ng do extrato/65 mg da abelha), com limite de confiança (área cinza) = 0,78-1,55 ng/mg.



**Figura 45. Curva dose-resposta para a injeção do Trichonephiline-2 na hemocele de abelhas *A. mellifera*.** Foram injetadas cinco diferentes concentrações, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 24 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-tocidade foi obtido o valor de  $DL_{50} = 0,846 \text{ ng/mg}$  (55 ng do extrato/65 mg da abelha), com limite de confiança (área cinza) = 0,53-1,32 ng/mg.



**Figura 46. Curva dose-resposta para a injeção do Trichonephiline-3 na hemocele de abelhas *A. mellifera*.** Foram injetadas cinco diferentes concentrações, além do grupo controle (solução salina), e observado o comportamento dessas abelhas em um período de 24 horas. Após o término deste bioensaio de inseto-tocidade foi obtidos os valores de  $DL_{50} = 1,01 \text{ ng/mg}$  (66 ng do extrato/65 mg da abelha), com limite de confiança (área cinza) = 0,67-1,52 ng/mg.

Para os peptídeos nomeados de Trichonephiline -4, -8, -10 e -13 não foi possível estabelecer o valor de dose letal ( $DL_{50}$ ) devido às medidas de distanciamento social e restrições de acesso a locais de coletas das abelhas, determinados pela Instituição decorrente a pandemia de COVID-19.

Os peptídeos Trichonephiline -1, -2 e -3 apresentaram valor de  $DL_{50}$  de 1,06 ng/mg, 0,84 ng/mg e 1,01 ng/mg, respectivamente – todos dentro dos limites de 95% de confiança. Ao compararmos o valor de  $DL_{50}$  do extrato vesicular da teia no presente estudo (0,32 ng/mg), com o valor de  $DL_{50}$  dos peptídeos podemos constatar que o extrato vesicular da teia se mostrou 2 a 3 vezes mais tóxico em relação aos peptídeos sintetizados e purificados.

A diferença de toxicidade entre o extrato vesicular da teia e peptídeos sintetizados pode ser explicada pelo fato de que os peptídeos da teia estão misturados e aprisionados dentro de vesículas lipídicas e provavelmente agem sinergicamente quando entram em contato com a presa. Assim, a ação tóxica dos peptídeos pode ter se apresentado de forma reduzida, uma vez que foram testados individualmente. É preciso levar em consideração que, quando uma presa é capturada pela teia, ela entra em contato com centenas de gotículas e cada uma dessas gotículas contém milhares de vesículas lipídicas que além de aprisionarem em seu interior os peptídeos tóxicos, também aprisionam uma mistura complexa de proteínas tóxicas.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos do bioensaio de inseto-toxicidade, será apresentado logo abaixo uma breve discussão sobre a potencial ação tóxica e/ou bioinseticidas de venenos de aranhas, disponível na literatura.

As aranhas são eficazes predadoras, uma vez que usam seu veneno contendo peptídeos inseticidas como armas bioquímicas para a captura de suas presas. Devido a alta especificidade e potência das suas toxinas peptídicas, novas descobertas de toxinas inseticidas de venenos de aranhas estão fornecendo uma oportunidade para se obter compostos naturais para as aplicações na agricultura sem afetar a saúde humana (Wang et al., 2017).

Estudos de toxinas inseto-seletivas de venenos de aranhas têm fornecido dados para o desenvolvimento de bioinseticidas (Zhang et al., 2003; Mourao et al., 2013). Como por exemplo, a toxina oxytoxin-1a isolada da aranha-lobo *Oxyopes takobius*, foi relatada por exibir uma positiva atividade de inseticida ( $DL_{50}$ = 75ng/mg em larvas de mosca). Porém, os mecanismos moleculares de ação dessas toxinas inseticidas permanecem incertos (Vassilevski et al., 2013). A neurotoxina *brachyin*,

caracterizada no veneno da aranha *Brachypelma albopilosum*, demonstrou forte efeito letal em insetos ( $LD_{50} = 0,005\text{ng/mg}$  em baratas adultas e  $LD_{50} = 0,007\text{ng/mg}$  em besouros) e atividade analgésica em mamíferos. Porém o mecanismo molecular de ação da *brachyinin* também ainda permanece desconhecido (Zhong et al., 2014).

Além dessas, a PrIT1, uma potente toxina inseticida isolada do veneno da aranha *Phoneutria reidyi*, demonstrou toxicidade em moscas ( $DL_{50} = 4\text{nmol/mg}$ ) e em baratas ( $DL_{50} = 230\text{nmol/mg}$ ), ambos quando injetadas via cavidade intratorácica (Oliveira et al., 2015). Enquanto que o veneno bruto desta mesma aranha apresentou valor de  $DL_{50} = 0,022\text{ng/mg}$  em moscas e  $0,278\text{ng/mg}$  em baratas.

Estudos recentes de Jin e colaboradores (2017) identificaram uma toxina inseticida, Nc1a, isolada do veneno da aranha *T. clavata*, a qual exibiu potente bioatividade inseticida com valor de  $DL_{50} = 0,573\text{ng/mg}$  e inibição da corrente de canais de sódio e potássio de baratas. E ainda foi relatado que um peptídeo inseticida, denominado de Ae1a isolado de aranha *Augacephalus ezendami*, e outro denominado de Dc1a isolado da aranha *Dieguetia canities*, mostraram ter ação seletiva em canais de sódio de apenas algumas espécies animais (Bende, et al., 2014). Esses estudos, com foco em peptídeos inseticidas espécies-seletivos, podem abrir perspectivas para encontrar ou modificar novos pesticidas que serão inofensivos para os insetos não-alvos.

É conhecido que, uma diversidade enorme de aranhas possui uma grande variedade de substâncias neuroativas em seus venenos, capazes de interagir com alvos distintos no sistema nervoso de suas presas. Essas moléculas peptídicas têm sido indicadas como ferramentas para aumentar nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares da neurotransmissão; desde mecanismos das funções neuronais, como a elucidação de canais iônicos ou caracterização das funções dos receptores (Harvey et al., 1993). E conseqüentemente, as pesquisas com essas neurotoxinas também estão se voltando para o desenvolvimento de inseticidas naturais, para aplicações agrícolas e drogas potenciais para o tratamento de neuropatologias (Belleboni et al 2004; Yoshimoto et al., 2019; Baptista & Konno, 2020).

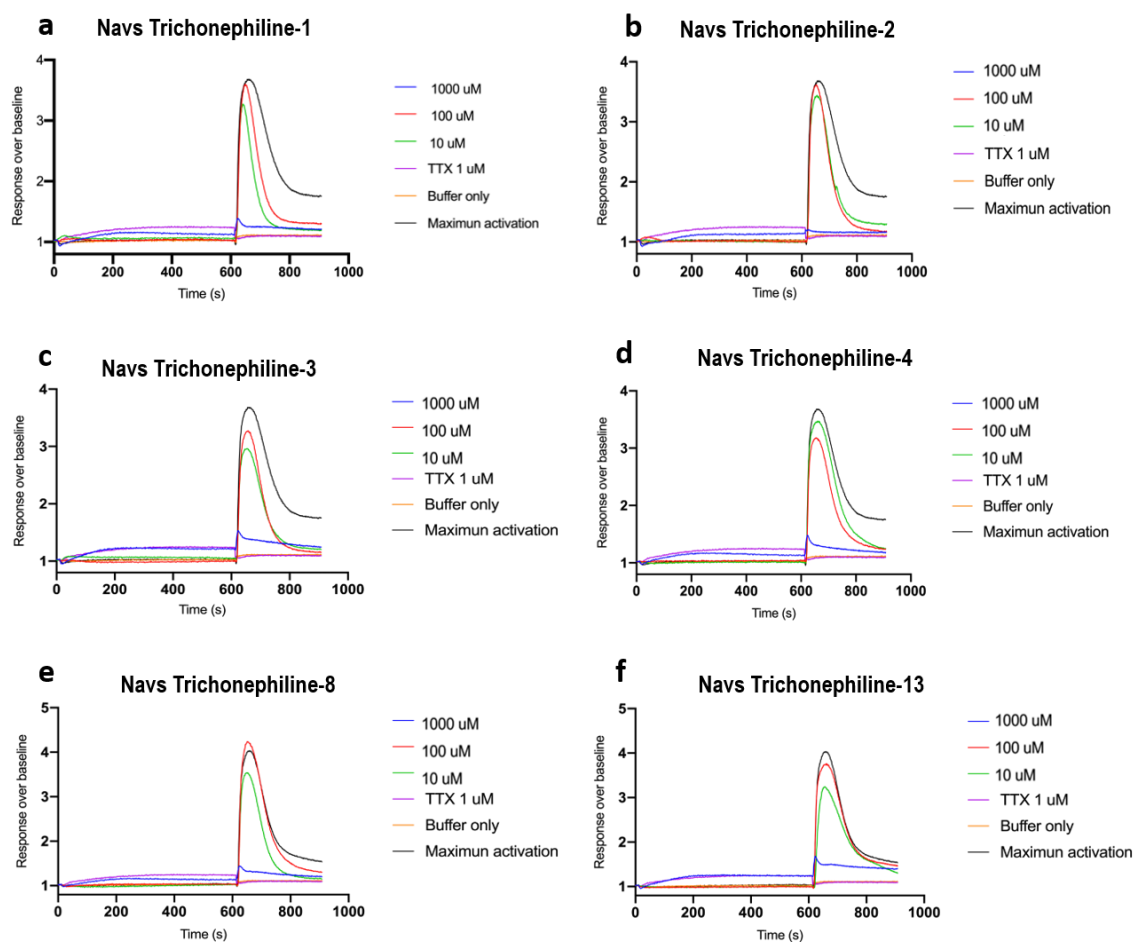
Assim como no veneno das aranhas, na teia da aranha *T. clavipes* foram identificadas diversas proteínas (dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves, et al 2020) e peptídeos que são semelhantes a toxinas/neurotoxinas e enzimas proteolíticas tipicamente caracterizados em venenos de aranhas, e de outros animais. A presença

dessas moléculas juntamente com os resultados dos ensaios de inseto-toxicidade tem fundamentado a hipótese de que a teia é uma complexa estrutura, que parece desempenhar um papel “químico-ativo” na captura e pré-digestão de suas presas (Salles et al., 2006; Marques et al., 2005; Volsi et al., 2006; dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020). Sendo assim, a combinação do veneno da aranha com uma teia “quimicamente ativa”, favorece o processo de captura de presas tornando-o mais eficiente.

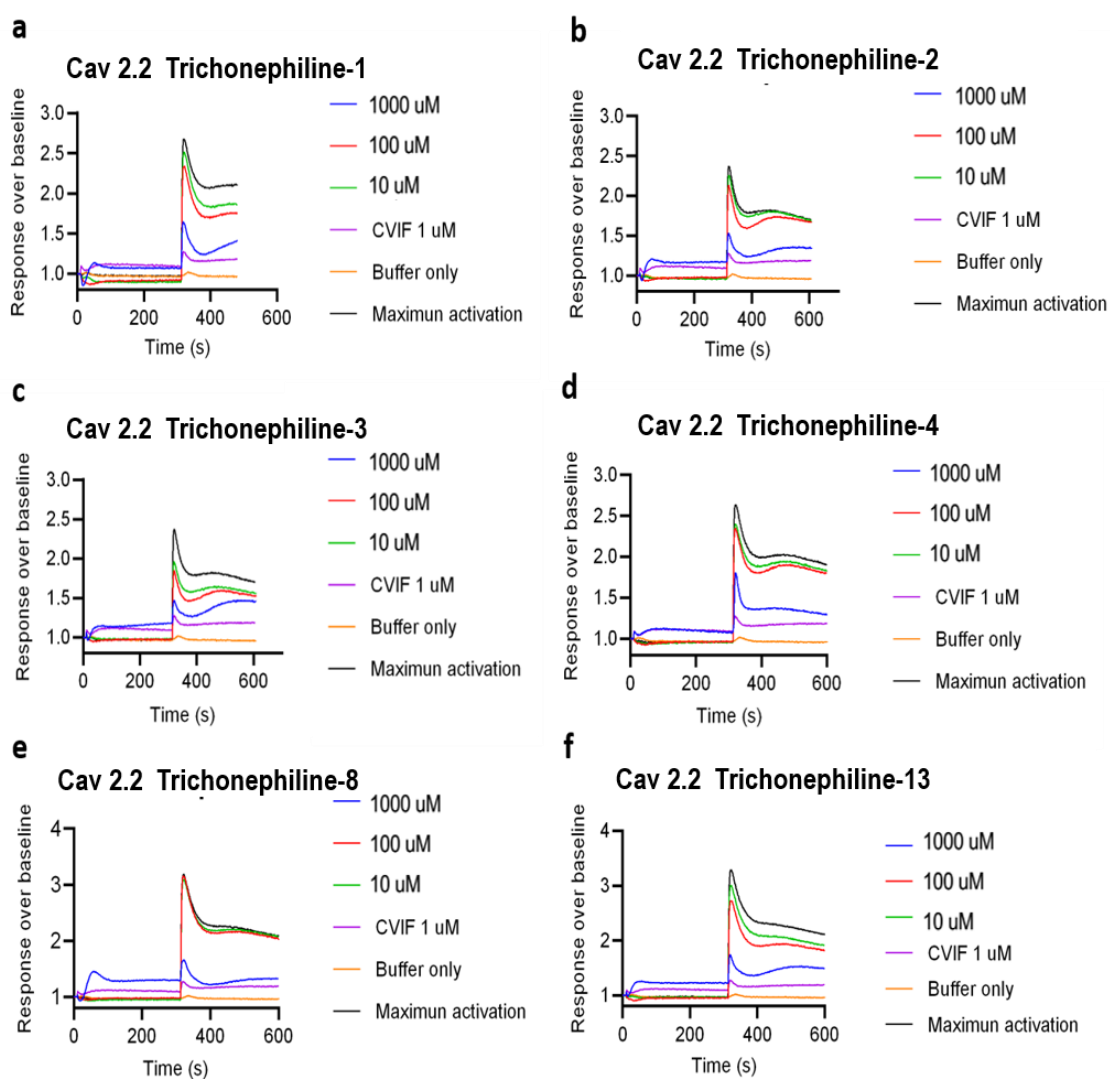
#### **4.3. Ensaio de *Fluorescence Imaging Plate Reader* (FLIPR)**

Como mencionado na discussão acima, uma variedade de substâncias neuroativas do veneno de diferentes aranhas são capazes de interagir com alvos distintos no sistema nervoso de suas presas, como por exemplo, em canais iônicos e/ou receptores neuronais. Sendo assim, além do ensaio de inseto-toxicidade, as mesmas 13 sequências peptídicas foram submetidas a ensaios de FLIPR em células de neuroblastoma SH-SY5Y, o qual avaliou a atividade das mesmas nos canais iônicos de íons sódio (hNav), íons cálcio (hCav1.3 e hCav2.2), e no receptor nAChR $\alpha$ 7.

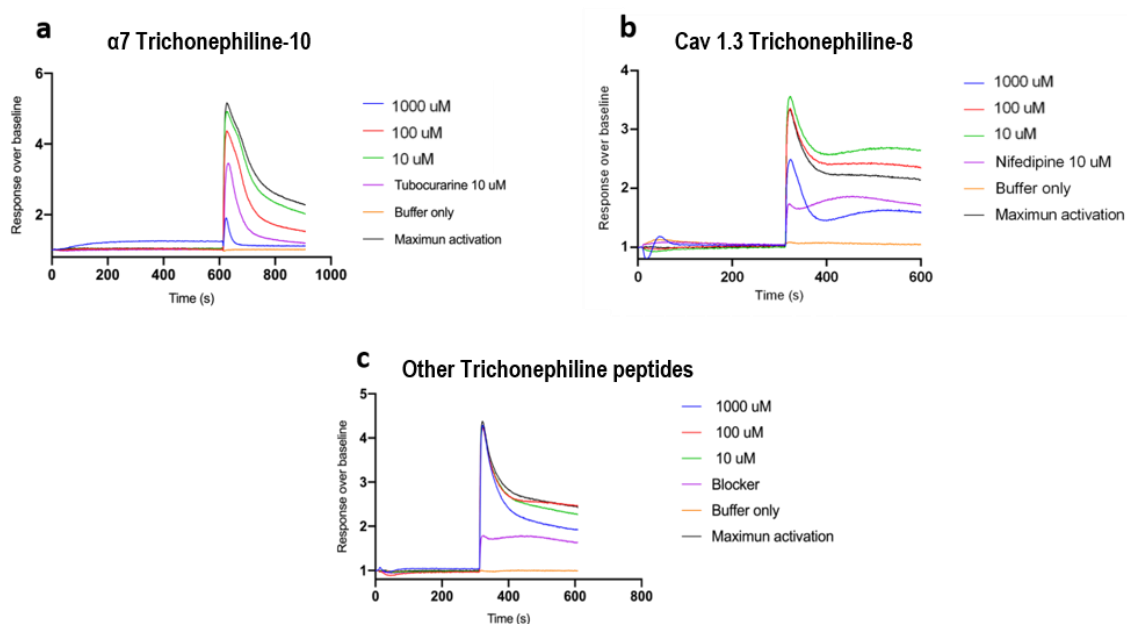
Verificou-se que 7 peptídeos inibiram hNav, hCav2.2, hCav1.3 e nAChR $\alpha$ 7 (pelo menos 75% de inibição) em concentrações de 1 mM. A Tabela 12 mostra resumidamente os canais iônicos que foram inibidos por cada uma das 13 sequências de peptídeos. Os peptídeos nomeados de Trichonephiline -1, -2, -3, -4, -8 e -13 apresentaram atividade inibitória em Nav e Cav2.2, sendo que a atividade inibitória foi maior em Nav (Figura 47) do que em Cav2.2 (Figura 48) para a maioria dos peptídeos. O peptídeo Trichonephiline-8 também inibiu Cav1.3 e nAChR $\alpha$ 7 (Figuras 47-49), enquanto o peptídeo Trichonephiline-10 inibiu apenas o nAChR $\alpha$ 7 (Figura 49).



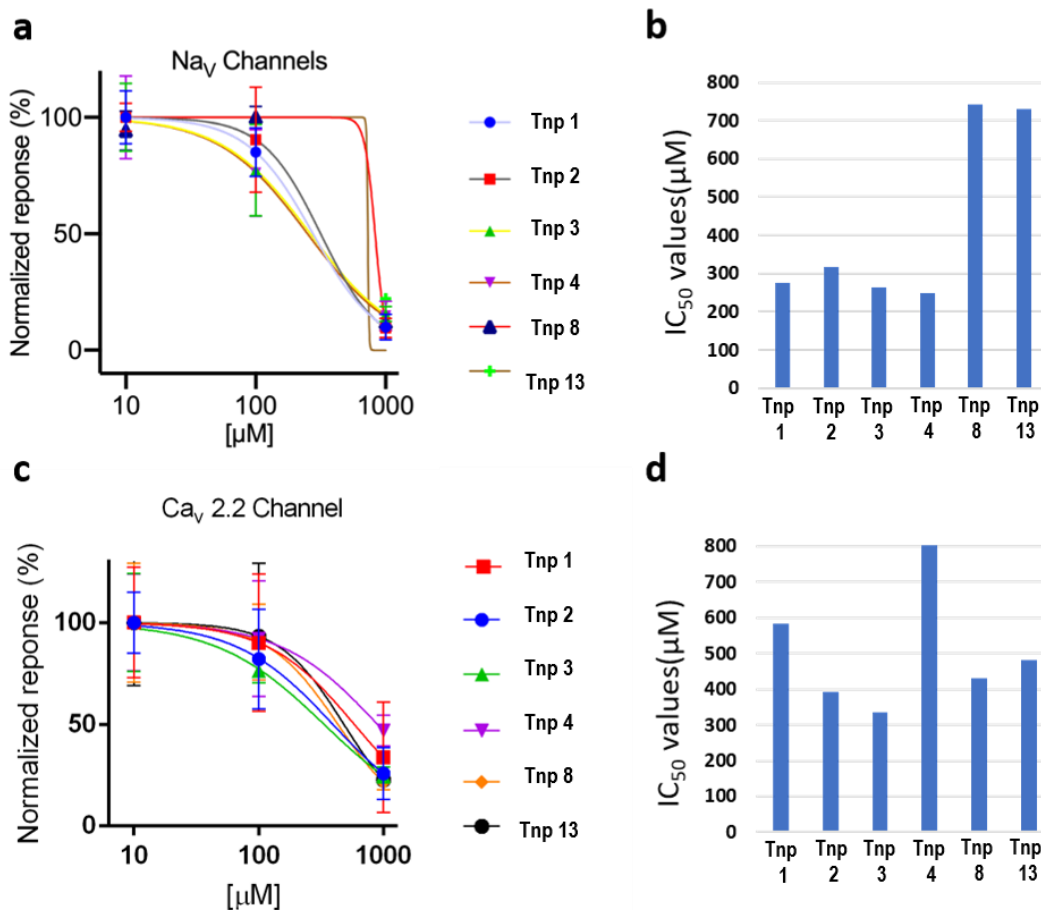
**Figura 47. Resultados do ensaio FLIPR após adição de 1mM, 100uM, 10uM de seqüências de peptídeos da teia de aranha de *T. clavipes* em canais de íons Nav, usando células de neuroblastoma SH-SY5Y, Veratridina para evocar respostas de influxo de cálcio (controle positivo) e TTX para bloquear canais de Nav. a) Trichonephiline-1: MVDDALGAADAEMV b) Trichonephiline-2: GVDDALGAADNLDT c) Trichonephiline-3: MVSVDLGAACMDPV d) Trichonephiline-4: YVTDDALEAADNLES e) Trichonephiline-8: MVADDLGAACDPVM f) Trichonephiline-13: EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL.**



**Figura 48. Resultados do ensaio FLIPR após adição de 1mM, 100uM, 10uM de sequências de peptídeos da teia da aranha *T. clavipes* no canal de íons Cav 2.2, usando células de neuroblastoma SH-SY5Y e 90 mM KCl 5 Mm CaCl<sub>2</sub> para evocar respostas de influxo de cálcio (controle positivo) e CVIF para bloquear canais Cav 2.2. a) Trichonephiline-1: MVDDALGAADAEMV b) Trichonephiline-2: EGVDDALGAADNLDT c) Trichonephiline-3: MVSVDLGAACMDPV d) Trichonephiline-4: YVTDDALEAADNLES e) Trichonephiline-8: MVADDLGAACDPVM f) Trichonephiline-13: EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL.**



**Figura 49. Resultados do ensaio FLIPR após adição de 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M de seqüências de peptídeos da aranha *T. clavipes* usando células de neuroblastoma SH-SY5Y. a) Trichonephiline-10: TIGRASSLSK contra o receptor AChR $\alpha$ 7 usando Colina / PNU para evocar resposta ao influxo de cálcio e Tubocurarina para bloquear nAChR $\alpha$ ; b) Trichonephiline-8: MVADDLGAACDPVM contra o canal Cav 1.3 usando 90 mM KCl 5mM CaCl<sub>2</sub> para evocar a resposta ao influxo de cálcio e Nefedipina para bloquear Cav 1.3; c) Gráfico representativo mostrando atividade insignificante ou inibitória baixa para as outras seqüências de peptídeos.**



**Figura 50. Ensaio de FLIPR contra canais Nav e Cav 2.2.** **a)** Curvas de dose-resposta representativas e **b)** valores IC<sub>50</sub> (µM) para canais de Nav. **c)** Curvas de dose-resposta representativas e **d)** valores de IC<sub>50</sub> (µM) para o canal Cav 2.2. Trp 1: Trichonephiline-1 - MVDDALGAADAEMV, Trp 2: Trichonephiline-2 - EGVDDALGAADNLDT, Trp 3: Trichonephiline-3 - MVSVDLGAACMDPV, Trp 4: Trichonephiline-4 - YVTDDALEAADNLES, Trp 8: Trichonephiline-8 - MVADDLGAACDPVM, Trp 13: Trichonephiline-13 -EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL.

É importante ressaltar que os mesmos peptídeos que inibiram os canais iônicos nos testes FLIPR, foram os mesmos que paralisaram mais de 70% das abelhas nos testes de inseto-toxicidade (Tabela 12). Os peptídeos Trichonephiline -5, -6, -7, -9, -11 e -12 apresentaram atividade inibitória baixa ou insignificante nos canais iônicos testados. Esses também foram os mesmos peptídeos que paralisaram menos de 55% das abelhas nos testes de inseto-toxicidade (Tabela 11).

Além disso, através da tabela 12 também foi possível verificar a seletividade de cada sequência peptídica para os diferentes canais iônicos testados. Por exemplo, o Trichonephiline-10 mostrou atividade inibitória apenas para nAChRα<sub>7</sub>, ou seja, este peptídeo foi seletivo apenas para este receptor específico. Já o Trichonephiline-8 apresentou atividade inibitória para todos os canais testados incluindo o receptor, demonstrando que não foi seletivo e, conseqüentemente, não possui um canal como alvo específico.

**Tabela 12. Respostas de cada peptídeo aos testes de inseto-toxicidade e FLIPR.** Nome: nome dado a sequência peptídica; Sequência: sequência peptídica; Nome da potencial proteína de origem: nome da proteína obtido usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST); Bioensaio: Peptídeos que paralisaram mais de 70% (cor vermelha) e menos de 55% (cor verde) das abelhas, após a injeção de 200 ng/µL de cada sequência peptídica na hemocele de abelhas *Apis mellifera*; Ensaio FLIPR: todas as sequências de peptídeos que apresentaram resposta inibitória em concentrações de 1mM (assinalados com +), nos canais de íons Cav e Nav e receptor AChRα<sub>7</sub>, utilizando células de neuroblastoma SH-SY5Y.

Nome	Sequência	Nome da potencial proteína de origem	Bioensaio	Ensaio FLIPR			
			Mortalidade das abelhas (%)	hNavs	hCav 1.3	hCav 2.2	nAChRα <sub>7</sub>
Trichonephiline-1	MVDDALGAADAEMV	serpin B6	70	+	-	+	-
Trichonephiline-2	EGVDDALGAADNLDT	venom anionic peptide-5	76	+	-	+	-
Trichonephiline-3	MVSVDLGAACMDPV	TxLP4	73	+	-	+	-
Trichonephiline-4	YVTDDALEAADNLES	venom toxin meuTx19	93	+	-	+	-

Trichonephiline-5	TAMKASVAAGALVSA	venom peptide HtKTx2	40	-	-	-	-
Trichonephiline-6	ASVAEPSQTPLW	venom peptide U3-SYTX-Sth1h_1	53	-	-	-	-
Trichonephiline-7	MVDSVLGAACNNLT	venom metalloproteínas e antarease TserMP_A-like isoform X3	43	-	-	-	-
Trichonephiline-8	MVADDLGAACDPVM	venom metalloproteínas e antarease TserMP_A-like isoform X3	83	+	+	+	+
Trichonephiline-9	FNRLLDTGFI	Conotoxin	53	-	-	-	-
Trichonephiline-10	TIGRASSLSK	Mr_precursor_15_5	76	-	-	-	+
Trichonephiline-11	MTALSGAALCGPT	Conotoxin Superfamily I1	43	-	-	-	-
Trichonephiline-12	MSVVFAALGADDVL	uncharacterized protein LOC111251952 isoform X1	33	-	-	-	-
Trichonephiline-13	EYVGVDPGFNVQPQQPHIPL	hypothetical protein X975_2052	70	+	-	+	+

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos do ensaio de FLIPR, será apresentado logo abaixo uma breve discussão de dados encontrados na literatura sobre a ação de toxinas peptídicas oriundas de veneno das aranhas frente a diferentes canais iônicos.

As aranhas desenvolveram venenos altamente complexos, ricos em toxinas peptídicas ativas para auxiliar na captura de suas presas; e esses venenos, em particular, são ricos em moduladores de canal de íons sódio (Nav). Um terço de todas as toxinas de canais de íons conhecidas de venenos de aranha atuam em canais de Nav (Herzig et al., 2011; Gilchrist et al., 2014).

O peptídeo ICK GpTx-1 ( $\mu/\omega$ -TRTX-Gr2a), isolado da tarantula *Grammostola rosea* foi descrito pela primeira vez como um inibidor nanomolar de Cav (Ono et al., 2011) e posteriormente como um inibidor nanomolar de Nav de *Grammostola Porter*, com alta potência para o subtipo de canal de NaV1.7 (IC<sub>50</sub> de 10 nM) (Murray et al., 2015).

O peptídeo Huwentoxin-IV ( $\mu$ -TRTX-Hs2a), isolado do veneno da aranha chinesa *Selenocosmia huwena*, foi identificado pela primeira vez como um potente inibidor de Nav ( $IC_{50}$  de 30 nM) de correntes sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S) em neurônios ganglionares da raiz dorsal em ratos adultos (Peng et al., 2002).

O peptídeo ProTx-II ( $\beta/\omega$ -TRTX-Tp2a) foi isolado da aranha *Thrixopelma pruriensusing* e está entre os inibidores de Nav mais potentes descritos até o momento, com valor de  $IC_{50}$  relatado de 0,3 nM, para a inibição de Nav1.7 (Schmalhofer et al., 2008).

O peptídeo CcoTx1 ( $\beta$ -TRTX-Cm1a) é um potente inibidor de Nav, isolado da tarântula *Ceratogyrus cornuatus* (Bosmans et al., 2006). Este peptídeo tem forte preferência pelo subtipo de Nav1.2 e menor afinidade para os alvos de Nav1.4 e Nav1.5 (Shcherbatko et al., 2016).

Estudos de Klint e colaboradores (2014), através de ensaios de FLIPR, analisaram 205 venenos brutos de aranhas frente a hNav1.7 humanos, expressos endogenamente em células de neuroblastoma SH-SY5Y. Oitenta e dois venenos de aranha inibiram hNav1.7, enquanto trinta venenos ativaram hNav1.7. E ainda alguns venenos supostamente mostraram conter ambos, ativadores e inibidores de hNav1.7.

Os canais de Cav2.2 são preferencialmente inibidos por uma gama de peptídeos ricos em pontes de dissulfeto (conotoxinas) isolados de caracóis marinhos (Lewis et al., 2000 e Lewis et al., 2012). No entanto, alguns peptídeos de veneno de aranha com atividade em Cav2.2 também foram descritos de *Haplopelma huwenum*, *Agelenopsis aperta*, *Phoneutria nigriventer*, *Phoneutria reidyi* e *Segestria florentina* (Dos Santos et al., 2002; Vieira et al., 2007; Jiang et al., 2008).

Por exemplo, o veneno de *Agelenopsis aperta* forneceu a primeira fonte de inibidores de Cav, tornando as agatoxinas alguns dos antagonistas do canal de Cav de aranha mais estudados, sendo que as agatoxinas do tipo II ( $\omega$ -Agatoxina-Aa2a) exibem atividade em Cav2.2 (Adams et al., 1990; Sousa et al., 2013).

Sousa (2014), através de ensaios de FLIPR, examinou a bioatividade de venenos de aranha em canais de Cav2.2 humanos, expressos endogenamente em células de neuroblastoma SH-SY5Y. De 60 venenos brutos de aranha analisados, 50% inibiram pelo menos 50% das respostas de  $Ca^{2+}$  mediadas por Cav2.2, indicando que os venenos de aranhas são fontes abundantes de inibidores de Cav2.2.

Em geral, os peptídeos inseticidas que são potentes bloqueadores de canais têm atividade inibitória na magnitude de picomolar, nanomolar e até mesmo poucos

micromolar. Os peptídeos da teia da seda de *T. clavipes* apresentaram valores de IC<sub>50</sub> que variaram de 250 a 742 µM e 334 a 896 µM para Nav e Cav 2.2 respectivamente e, portanto, valores considerados altos (Tabela 12 e Figura 50).

Esses peptídeos da teia estão misturados e aprisionados dentro de vesículas lipídicas e provavelmente agem sinergicamente quando entram em contato com a presa. Assim, a ação inibitória dos peptídeos pode ser reduzida, uma vez que foram testados individualmente. É preciso levar em consideração que, quando uma presa é capturada pela teia, ela entra em contato com centenas de gotículas e cada uma dessas gotículas contém milhares de vesículas lipídicas que aprisionam em seu interior uma mistura complexa de proteínas e peptídeos tóxicos. Por fim, o ensaio de FLIPR do presente estudo foi realizado com células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, e muito provavelmente, esses peptídeos poderão apresentar ação seletiva potente às células de insetos, os quais são os animais alvo da aranha. Futuramente é necessário repetir o ensaio de FLIPR para células do sistema nervoso de insetos.

#### **4.4. Ensaio Antimicrobiano com o extrato bruto da teia e peptídeos sintetizados**

Os ensaios antimicrobianos foram realizados com a finalidade de verificar se a teia da aranha *T. clavipes* e/ou possivelmente alguns dos peptídeos identificados na seda desta teia apresentariam um potencial efeito antimicrobiano. Dessa forma, os 13 peptídeos sintetizados e o extrato total da teia foram submetidos a ensaios antimicrobianos contra 5 diferentes bactérias, dentre elas uma bactéria Gram+ e quatro Gram- (*Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)). Os valores de dose-resposta para os peptídeos foram de 0,25 a 32 µg/mL (ou 0,156 a 20 µM), portanto, toda a amostra indicada com valor de MIC <32 exibiu atividade antimicrobiana, conforme demonstrado na tabela 13.

**Tabela 13. Resposta de cada sequência peptídica aos testes de antibiose.** Valores de concentração mínima inibitória (MIC) expressos em ug/mL, frente à bactérias Gram+ e Gram-. Os valores de MIC com sinal de “<” indica que a amostra exibiu atividade antimicrobiana (cor azul). Os valores de MIC com sinal de “>” indica que a amostra não exibiu atividade, ou exibiu atividade parcial na concentração mais alta testada. Nome: nome dado a sequência peptídica; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Ec*: *Escherichia coli*; *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Ab*: *Acinetobacter baumannii*.

Nome	Microorganismo – valores de MIC (ug/mL)				
	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>Ab</i>
Trichonephiline-1	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-2	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-3	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-4	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-5	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-6	≤ 0.25	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-7	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-8	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-9	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-10	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-11	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-12	>32	>32	>32	>32	>32
Trichonephiline-13	>32	>32	>32	>32	>32
<i>T. clavipes</i> web Proteic extract	>32	>32	>32	=2	>32

O Trichonephiline-6, apresentou MIC ≤0.25 µg/mL para a bactéria Gram+ *Staphylococcus aureus*, e o extrato total da teia apresentou MIC=2 µg/mL para a bactéria Gram- *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores de MIC observados para o peptídeo Trichonephiline-6 e para o extrato total da teia, apresentaram uma atividade antibiótica significativamente alta. A tabela 13 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica realizado para os 13 peptídeos sintéticos, e a discussão abaixo faz a comparação desses peptídeos a outros peptídeos antimicrobianos oriundos de venenos de aranhas, descritos em literatura, sendo os resultados expressos em µg/mL ou µM.

Nos estudos de Ferreira e colaboradores (2016) foi demonstrado que a peçonha bruta da aranha *Lasiadora sp* inibiu o crescimento de *S. aureus* e de *P. aeruginosa* - MIC de 31,25 µg/mL e 7,81 µg/mL, respectivamente. Afonso e colaboradores (2015) isolaram e caracterizaram um peptídeo antimicrobiano catiônico

des-His16-LyeTx I, análogo de um peptídeo obtido da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*. O valor de MIC para este peptídeo foi de 8 µg/mL para as amostras de *P. aeruginosa* e 4 µg/mL nos testes com *S. aureus*. Enquanto que nos estudos de Wang e colaboradores (2016), o peptídeo Lycosin-II isolado do veneno da aranha *L. singoriensis* apresentou efeito inibitório potente quando testado nas bactérias *S. aureus* e de *P. aeruginosa* - MIC de 3,1 e 12,5 µM, respectivamente. Sutti e colaboradores (2015) isolaram a acilpoliamina chamada VdTX-I do veneno da tarântula *Vitalius dubius*. Esta acilpoliamina demonstrou uma atividade antimicrobiana significativa, quando testada em *S. aureus* – MIC entre 6,25 e 12,5 µM.

Também podemos mencionar os estudos realizados por Zhao e colaboradores (2011). Nesse estudo os autores purificaram e caracterizaram um peptídeo antimicrobiano semelhante à defensina denominado Oh-defensina a partir do veneno da aranha *Ornithoctonus hainana*. A Oh-defensina exerceu atividades antimicrobianas potentes quando testados em *S. aureus* e de *P. aeruginosa* - MIC de 1,25 e 5 µg/mL, respectivamente.

Assim como nos estudos com venenos de aranhas, mencionados acima, também podemos mencionar alguns estudos que evidenciaram a presença de atividade antimicrobiana exercida pela amostra da seda da teia de diferentes aranhas. Sendo que todos esses ensaios foram realizados com o extrato total da seda da teia. Dessa forma, através de ensaio antimicrobiano por disco-difusão, realizado em placas de ágar, Amaley e colaboradores (2014) verificaram o potencial antibacteriano da seda da teia da aranha *Trichonephila pilipes*. Esta seda teve a capacidade de inibir o crescimento da bactéria *E. coli*, *S. aureus* e *P. Aeruginosa*. Wright e Goodacre (2012) testaram a seda da aranha *Tegenaria domestica* contra bactérias Gram-positivas *B. subtilis* e bactérias Gram-negativas *E. coli* e observaram que a seda foi eficaz contra bactérias gram-positivas (*B. subtilis*), mas não contra bactérias gram-negativas (*E. coli*). Porém, o estudo posterior de Al-Kalifawi e Kadem (2017) relatou a atividade antimicrobiana da seda de *Tegenaria domestica* contra ambas bactérias, gram-negativas e gram-positivas. E ainda, os estudos realizados por Phartale e colaboradores (2019) demonstraram que a seda da aranha *Pardosa brevivulva* apresentou potencial antimicrobiano significativo com propriedades bactericidas e fungicidas. A seda foi capaz de inibir o crescimento de *B. megaterium* (MIC =1,67 µg/mL), *S. typhi* (MIC =0,83 µg/mL), *K. Pneumoniae* (MIC =1,67 µg/mL), *A. flavus* (MIC =3,34 µg/mL), e *C. albicans* (MIC =1,67 µg/mL).

De acordo com a literatura, o efeito antimicrobiano da seda provavelmente é uma propriedade que pode ter evoluído para que a seda pudesse resistir à decomposição por microrganismos. A decomposição reduzida pode ser vantajosa se diminuir os custos energéticos de manutenção da teia, e/ou o nível de microrganismos prejudiciais aos quais uma aranha é exposta. O efeito pode ser ainda mais fortemente selecionado em sedas que protegem os ovos em desenvolvimento, que podem ser particularmente adaptados para resistir à decomposição ou destruição por predadores, parasitas ou flutuações em condições abióticas externas (Zhao et al., 2005).

Além do ponto de vista ecológico e funcional, essas moléculas antimicrobianas podem representar uma fonte promissora de potenciais novos antibióticos. As bactérias são notavelmente eficientes na adaptação aos estresses ambientais e desenvolveram pelo menos um mecanismo de resistência para todas as 17 classes de antibióticos que foram desenvolvidas até o momento (Alanis et al., 2005). Portanto, há uma necessidade urgente de descobrir e desenvolver novos antimicrobianos, com novos mecanismos de ação (Saez et al., 2010).

Dessa forma, ao fazer-se uma comparação entre os peptídeos citados na literatura e os peptídeos testados do presente estudo, observa-se que de maneira geral que além do extrato da teia, a sequência peptídica Trichonephiline-6 pode ser considerada um protetor da teia contra sua degradação por bactérias, além de seu um promissor modelo estrutural para o desenvolvimento de novos antibióticos, pois apresenta valores de MIC inferiores à maioria daqueles observados para seus equivalentes já relatados na literatura.

#### **4.5. Perfilagem proteômica da seda da teia e da secreção das glândulas produtoras de seda por uma abordagem proteotranscriptômica**

Deste ponto em diante serão apresentados os resultados obtidos com a abordagem proteotranscriptômica. Essa análise foi realizada com a finalidade de se investigar e elucidar o perfil proteínas das gotículas presentes nos fios de seda, e também do perfil proteínas do secretoma das glândulas produtoras de seda. Após as análises e processamento dos dados, foi possível identificar um total de 75, 255, e 64 proteínas na glândula ampulada maior, agregada e seda da teia, respectivamente (Apêndices A9-A11). Todas essas proteínas foram inicialmente classificadas de

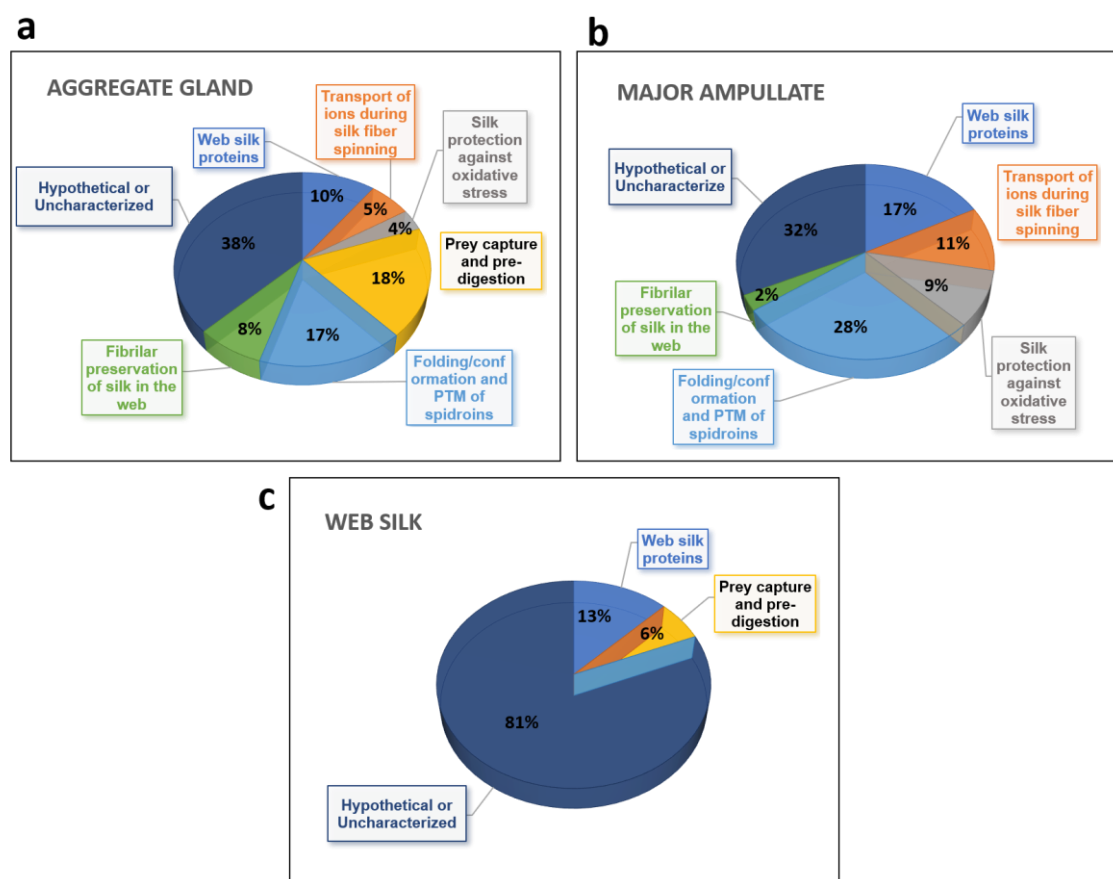
acordo com as funções atribuídas pelas análises no *Gene Ontology* – G.O. (componente celular, processo biológico e função molecular).

Lembrando que a teia é o produto da secreção de diferentes glândulas produtoras de seda envolvidas no processo de fiação, é importante considerarmos que a busca por papéis funcionais de proteínas na base de dados G.O. prevê função molecular, processo biológico, e os componentes celulares (quando a informação está disponível) com base em relatórios de papéis intracelulares destas proteínas. Os papéis funcionais de proteínas secretadas não são bem preditos pelas pesquisas de enriquecimento no G.O. (Dos Santos-Pinto et al., 2016); proteínas secretadas geralmente desempenham apenas papéis individuais no meio extracelular, uma vez que aparentemente, não existem interações como as proteínas observadas em rotas metabólicas do citoplasma ou organelas.

O mecanismo de secreção das glândulas de seda de aranha não é bem conhecido; algumas glândulas podem secretar os seus produtos através de mecanismos holócrinos, enquanto outras glândulas podem secretar suas proteínas através de um mecanismo merócrino e/ou apócrino (Bell et al., 1969). Sendo assim, o secretoma das glândulas de seda pode conter uma mistura complexa de proteínas que são secretadas, e proteínas intracelulares típicas (geralmente designadas como “proteínas *housekeeping*”). Há relatos freqüentes sobre a existência de citocromo-oxidase C, chaperoninas e outras enzimas mitocondriais localizadas em regiões extra-mitocondriais, sugerindo a possibilidade da existência de mecanismos ainda desconhecidos de translocação de proteínas para outros destinos celulares, ou mesmo para o meio extracelular (Soltys et al., 1999; Soltys et al., 2000; Gupta et al., 2008).

Com as análises G.O. não é possível prever de forma confiável a função de proteínas, quando estas são secretadas para o meio extracelular; algumas vezes, na presente investigação ocorreu uma situação semelhante. Sendo assim, decidiu-se assumir a função molecular destas proteínas previstas pelas análises G.O. e propor uma adaptação dessa função a um processo biológico específico para a situação de estudo no meio extracelular. Sendo assim, consideramos o processo biológico específico das amostras, ou seja, a complexidade das glândulas produtoras de seda e a sua relação com processo de fiação para a construção da teia, para classificar as proteínas em diferentes grupos funcionais.

Portanto, as proteínas foram organizadas em seis diferentes grupos funcionais relacionados com o seu papel, em potencial na teia (assim como descrito por Dos Santos-Pinto et al., 2016): (i) proteínas estruturais da seda da teia; (ii) proteínas relacionadas ao transporte de íons e oxigênio para manter a estabilidade das espidroínas; (iii) proteínas relacionadas com o dobramento/conformação e modificações pós traducionais (PTM) das espidroínas; (iv) proteínas relacionadas à preservação da espidroína contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas à preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas relacionadas com a captura de presas e pré-digestão (Figura 51). Esses grupos serão melhor discutidos no decorrer deste capítulo.



**Figura 51.** Distribuição das proteínas totais identificadas na seda da teia e das glândulas produtoras de seda da aranha *T. plumipes*, organizado em seis diferentes grupos de acordo com seu papel funcional relacionado à teia: (i) proteínas estruturais da teia de seda; (ii) proteínas relacionadas ao transporte de íons e oxigênio para manter a estabilidade das espidroínas; (iii) proteínas relacionadas ao dobramento/conformação e modificação de espidroínas; (iv) proteínas relacionadas à preservação da espidroína contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas à preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas relacionadas com a captura de presas e pré-digestão. As proteínas *housekeeping* foram removidas.

i) Proteínas estruturais da seda da teia

Na análise do presente estudo um total de 13, 26 e 8 proteínas estruturais das fibras de seda da teia foram identificadas na glândula ampulada maior, glândula agregada e seda da teia, respectivamente. As proteínas estruturais da seda identificadas neste grupo foram: *aciniform spidroin protein AcSp* (2 formas), *aggregate spider glue 2-like protein, partial* (5 formas), *aggregate spidroin 1, partial* (2 formas), *aggregate spidroin protein AgSp-a, partial* (2 formas), *aggregate spidroin protein AgSp-c* (14 formas), sendo que a maioria delas foi identificada na glândula ampulada maior (Apêndice A9-11).

As proteínas espidroína-1 e espidroína-2 são secretadas pela glândula ampulada maior, e constituem as fibras da seda dos raios da teia orbital, do *frame* e da linha de segurança “escape” (Vollrath, 2000; Römer et al., 2008); e podem ser codificadas por diferentes genes (Beckwitt & Arcidiacono 1994; Römer et al., 2008; Rising et al., 2007; Ayoub et al., 2008). A espidroína-1 está presente em maior quantidade na seda do que a espidroína-2, sendo uniformemente distribuída por todas as fibras da seda. Já a espidroína-2 está ausente nas regiões periféricas, formando aglomerados em determinadas áreas centrais da fibra (Sponner et al., 2005; Yazawa et al., 2011). Os resultados mostrados acima, revelam muitas diferentes formas de espidroínas, que ainda não têm suas funções bem conhecidas, abrindo um enorme campo de trabalho para o futuro.

Mais de 95% das espécies de aranhas tecedoras de teia orbital garantem o sucesso da captura de presas, produzindo fios viscosos equipados com gotículas pegajosas. A glândula agregada produz um material pegajoso semelhante a cola (rico em ácidos graxos) que interage diretamente com a presa (Vollrath, 2000; Römer et al., 2008). Aparentemente, as glândulas agregadas parecem produzir e secretar as gotículas pegajosas sobre as teias orbitais; essas gotículas são constituídas por uma série de compostos orgânicos de baixo peso molecular (principalmente ácidos graxos de cadeia média), neurotransmissores, peptídeos e proteínas que contribuem para a alta viscosidade das gotículas, o suficiente para manter a presa grudada na teia (Choresch et al., 2009; Sahni et al., 2011; Vasanthavada et al., 2012).

## (ii) Proteínas relacionadas com o transporte de íons durante o processo de fiação da seda

Foram identificadas para este grupo 113, 26 e 8 proteínas relacionadas com o transporte de íons durante o processo de fiação da seda na glândula ampulada maior, glândula agregada e na seda da teia, respectivamente.

Neste grupo, foram identificadas as proteínas Hemocianinas (formas de A a G), as quais estão relacionadas com o transporte de íons e oxigênio nas glândulas durante o processo de fiação da seda (Apêndice A9-11). Estudos descrevem as hemocianinas relacionadas, por exemplo, com o transporte de moléculas de oxigênio e íons cloreto, e processos de oxirredução (Rehm et al., 2012). Durante o processo de fiação ocorre uma notável mudança no meio, com o aumento na concentração dos íons potássio e fosfato, e uma diminuição na concentração dos íons cloreto e sódio, remoção de água e uma leve acidificação do meio (Knight et al., 2001; Sheibel et al., 2009).

A estabilidade das proteínas em uma solução aquosa, geralmente é afetada pelos íons circundantes. De acordo com estudos realizados, íons como sódio e cloreto, presentes na glândula inibem a agregação das proteínas da seda, e conseqüentemente a formação das fibras impedindo a separação da fase líquido-líquido (Sheibel et al., 2009). Enquanto que íons como potássio e fosfato promovem a agregação das proteínas e formação da estrutura. Essa mudança de íons, agindo sinergicamente com a diminuição do pH no meio favoreceria o desdobramento e  $\beta$ -cristalização das proteínas da seda (Knight et al., 2000; Vollrath et al., 2001).

Estudos de Knight et al. (2001), sugerem que a capacidade de transportar prótons e íons para dentro do lúmen da glândula, enquanto transporta água para fora pode ser fundamental para a formação das fibras da seda, visto que a aranha ativa e controla cuidadosamente o ambiente iônico durante o processo de fiação, o que proporciona conseqüências importantes durante o dobramento das espidroínas. Sendo assim, os muitos tipos de hemocianinas identificadas podem estar relacionados com o transporte/remoção de íons cloreto, sódio, potássio e fosfato; e moléculas de água que atuam no meio influenciando/favorecendo a estabilidade e dobramento das espidroínas, quando as mesmas estão sendo produzidas/sintetizadas pelas glândulas

As hemocianinas, ainda podem estar envolvidas na atividade da enzima fenoloxidase, ou seja, na pigmentação da teia. A fenoloxidase ocorre em quase todos os organismos, sendo essencialmente envolvida em vários processos como a

resposta imune, cicatrização de feridas, pigmentação e esclerotização nos artrópodes (Averdam et al., 2003; Cunningham et al., 2007; Jaenicke et al., 2008).

(iii) Proteínas relacionadas com o dobramento/conformação e modificações pós traducionais (PTMs) das espidroínas

Foram identificados para este grupo 21 e 43 proteínas relacionadas ao dobramento/conformação e modificações pós-traducionais (PTMs) das espidroínas na glândula ampulada maior e glândula agregada, respectivamente. Neste grupo foram identificadas peptidil-prolil cistrans isomerase, dissulfeto isomerase, chaperonina e proteínas de choque térmico, que podem atuar na complementação do dobramento das espidroínas (Apêndice A9-11).

Em condições normais, essas proteínas facilitam o transporte de proteínas entre os compartimentos celulares, o dobramento de proteínas recém-sintetizadas e a degradação de proteínas instáveis (Parcellieret al., 2003). As proteínas de choque térmico também foram identificadas nos estudos de Hou et al. (2007) com a glândula de seda *Bombix mori*. Embora a função das proteínas de choque térmico seja incerta, no presente estudo, sugere-se que desempenhem um papel no dobramento e transporte das espidroínas, durante o processo de formação da fibra no ducto de fiação da glândula.

(iv) Proteínas relacionadas com a proteção das espidroínas contra o estresse oxidativo

Para este grupo, foram identificadas 7 e 9 proteínas relacionadas à proteção das espidroínas contra o estresse oxidativo na glândula ampulada maior e glândula agregada, respectivamente. Este grupo inclui proteínas do citocromo P450 que possivelmente estão envolvidas na preservação das espidroínas contra o estresse oxidativo, quando as mesmas estão sendo produzidas/sintetizadas pelas glândulas produtoras de seda (Apêndice A9-A11).

Ainda neste grupo, também estão incluídas as proteínas tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase e tiol peroxiredoxina (Kanzok et al., 2001; Apel et al., 2004; Dayer et al., 2008). Essas proteínas, provavelmente estão relacionadas com a proteção das espidroínas contra o estresse oxidativo dentro das glândulas, no sentido de preservar intactas as estruturas das proteínas que constituem as fibras dos diferentes tipos de sedas das teias.

Tem sido sugerido que as proteínas peroxidases podem estar envolvidas também na formação de ligações cruzadas covalentes de ditirosina, para fortificar as fibras da seda. A atividade de peroxidases já havia sido detectada na glândula ampulada maior das aranhas do gênero *Trichonephila*, e foi proposto que essa atividade poderia catalisar a formação de ligações cruzadas de ditirosina, e dessa forma ajudar na estabilização das proteínas das fibras na seda. No entanto, até então essa formação de ligações cruzadas nas fibras da seda não tem sido relatada, permanecendo por ser elucidada (Vollrath e Knight, 1999; Pouchkina et al., 2003). As peroxidases também foram identificadas nas glândulas de seda de *Bombix mori* e descritas como possivelmente envolvida em cross-linking da matrix extracelular da glândula de seda (Suderman et al., 2006; Thein et al., 2009; Dong et al., 2013).

#### (v) Proteínas relacionadas com a preservação fibrilar da seda no ambiente

Foram identificadas para este grupo 2 e 20 proteínas foram identificadas relacionadas com a preservação fibrilar de seda na glândula ampulada maior e glândula agregada, respectivamente. A identificação dessas proteínas possivelmente está relacionada com a preservação das características fibrilares das espidroínas, quando as mesmas estão expostas ao meio ambiente, aos radicais livres e conseqüentemente variações de umidade e temperatura (Apêndice A9-A11).

As proteínas identificadas foram: *acetyl-CoA carboxylase*, *acyl-CoA synthetase* e *fatty acid synthase*. Essas proteínas podem estar envolvidas em processos metabólicos, como catálise e oxidação de ácidos graxos (Thorpe et al., 1995). Estudos relatam que as fibras da seda de aranhas são revestidas com uma camada de ácidos graxos que é aderida sobre a fibra, após a sua formação pela aranha (Vollrath et al., 2001; Salles et al., 2006; Sponner et al., 2007). Por exemplo, uma análise bioquímica e ultra estrutural das gotículas que são depositadas sobre a teia da aranha *T. clavipes* revelou a existência de muitas vesículas formadas por ácidos graxos em suspensão no material aquoso dessas gotículas (Salles et al., 2006; Esteves, 2017). Os ácidos graxos encontrados na solução viscosa da teia são secretados pela glândula agregada (Vollrath & Knight, 2001; Schulz, 2001; Romer et al., 2008).

Em uma investigação anterior sobre o papel dos ácidos graxos na secreção defensiva do pseudoescorpião *Mastigoproctus giganteus* (escorpião-vinagre), relatou o ácido caprílico como agente tensoativo. Esse ácido além de promover o espalhamento do material defensivo sobre a cutícula do inseto-presa, também auxilia

a dissolver a camada protetora lipídica do exoesqueleto (cutícula) da presa. Este processo facilita a difusão do material defensivo do pseudoescorpião, como por exemplo o ácido acético, para dentro do corpo da presa (Eisner et al., 1978). Estabelecendo um paralelo com a teia de aranha, a presença de ácidos graxos nas gotículas da teia contribuiria para tornar a cutícula dos insetos-presa permeável às toxinas presentes nas vesículas da teia.

#### (vi) Proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas

Foram identificadas 47 e 4 proteínas semelhantes a toxinas na glândula agregada e seda da teia, respectivamente. A maior parte dessas proteínas são típicas de venenos animais, ou seja, neurotoxinas utilizadas para a paralisia e morte de presas (Apêndice A9-A11).

Assim, neste grupo estão incluídas diferentes toxinas, neurotoxinas e proteoformas de metaloproteases que foram originalmente relatadas em venenos de diferentes gêneros de aranhas, tais como: *Stonustoxin subunit alpha* (*Trichonephila clavipes*), *Kunitz-type serine protease inhibitor A* (*Trichonephila clavipes*), *Astacin* (*Trichonephila clavipes*), *Nephitoxin-Nsp1f* (*Nephila* sp. SGP-2016), *Nephitoxin-Nsp1a* (*Nephila* sp. SGP-2016), *toxin 1* (*Araneus ventricosus*), *Eretoxin-Ek1a* (*Eresus cinnaberinus*), *Deinotoxin-Dsu1a* (*Deinopsis subrufa*), *Toxin CSTX-20* (*Cupiennius salei*), *U24-ctenitoxin-Pn1a* (*Phoneutria nigriventer*), *Astacin-like metalloprotease toxin 2* (*Loxosceles intermedia*), *CRISP/Allergen/PR-1* (*Trittame loki*).

Conforme descrito acima para a aranha *T. plumipes*, estudos anteriores já relataram a ocorrência de proteínas e toxinas peptídicas típicas de venenos, nas gotículas da teia e glândulas de seda de outras aranhas tecedoras de teias orbitais, como *T. clavipes* (Marques et al., 2005; Salles et al., 2006; Volsi et al., 2006; Zhang et al., 2011; Sanggaard et al., 2014, dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020).

O sequenciamento genômico do DNA da aranha africana *Stegodypus mimosarum* relatou a presença de nove proteínas comuns entre as secreções do veneno e das glândulas de seda dessa aranha. Entre essas proteínas foram identificadas *stegotoxins-A3, -B1, -B2 and -B4; venom phospholipase-A2; venom aminopeptidase-A; venom cystatin; astacin-like metalloprotease; venom pancreatic-like triacylglycerol lipase-D* (Sanggaard et al., 2014).

Outros estudos descrevem que os ovos da aranha “viúva-negra”, *Latrodectus tredecimguttatus*, possuem toxinas (Yan et al, 2014) com atividade na degradação de

proteínas teciduais, inibição em canais iônicos (neurotoxinas), bloqueio da transmissão neuromuscular, anafilaxia, indução a apoptose e hiperalgesia (Xu & Wang, 2016). Através de análises proteômicas e transcriptômicas foram identificados nos ovos de *Latrodectus tredecimguttatus* a neurotoxina *U24-ctenitoxin-Pn1a*, além de *metalloprotease phopolipase*, *phosphatase*, *allergen*, *Plancitoxin-1* e entre outras (Xu & Wang, 2016).

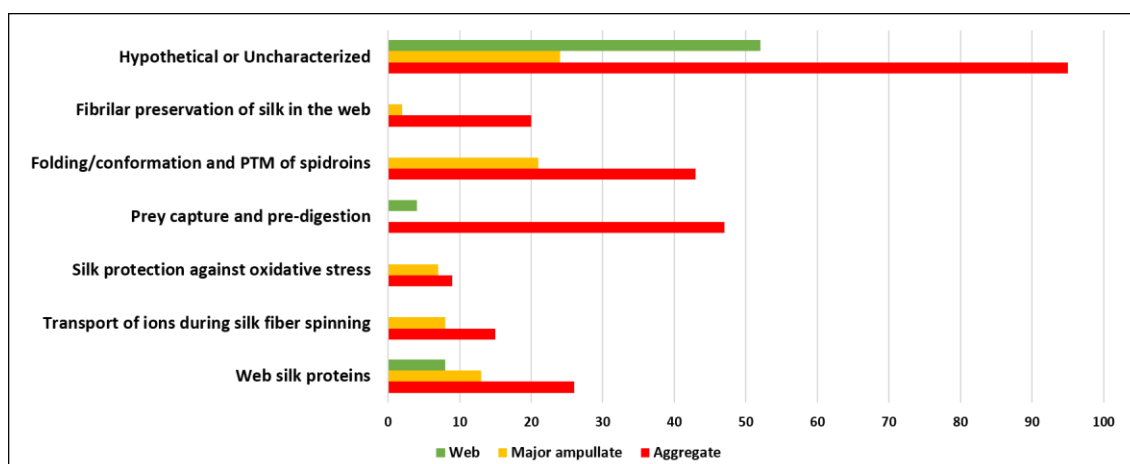
As toxinas de venenos animais (aranhas, serpentes, escorpiões, moluscos marinhos – *Conus*, e anêmonas) são frequentemente membros de grandes famílias de genes que representam bibliotecas combinatórias naturais; isto é, eles contêm grupos de toxinas que apresentam sequências homólogas (Casewell et al., 2013; Sachkova et al., 2014; Haney et al., 2014). Assim, a evolução molecular de venenos animais pode ser altamente dinâmica e parece ser frequentemente moldada por duplicação de genes e uma forte seleção diversificada, assim como a co-evolução e a convergência (Fry et al., 2006; Binford et al., 2009; Doley et al., 2009).

Dessa forma, decidimos também realizar uma busca dos nossos dados contra outros bancos de dados como o Arthropoda e SwissProt. Isto permitiu que, além das identificações das proteínas semelhantes a toxinas de venenos de aranhas, também encontrássemos identificações de proteínas semelhantes à toxinas comumente relatadas em outros venenos animais, como venenos de escorpiões, organismos marinhos e insetos, em sua maioria da ordem Hymenoptera. Algumas dessas proteínas identificadas são: *astacin-like metallopeptidase 3 protein (Tityus serrulatus)*, *Venom peptide SjAPI-2 (Scorpiops jendeki)*, *Venom serine protease inhibitor (Apis cerana)*, *U-actitoxin-Avd3g (Anemonia viridis)*, *Kunitz-type serine protease inhibitor A (Fragments) (Rhipicephalus microplus)*, *KappaPI-stichotoxin-Shd2a (Stichodactyla haddonii)*, *Neoverrucotoxin subunit alpha (Synanceia verrucosa)*, *Stonustoxin subunit alpha (Synanceia horrida)* – apêndice A9-A11.

Estes resultados estão indicando que os genes destas proteínas/peptídeos podem ter evoluído independentemente em todos esses animais. Corroborando esta hipótese é importante mencionar a ocorrência do peptídeo *glacontryphan-M* com 100% de cobertura de sequência presente nas asas da borboleta *Hebomoia glaucippe*, o qual é estrutural e funcionalmente muito semelhante às toxinas peptídicas relatadas nos venenos de *Conus* (Bae et al., 2012). Estudos de Esteves (2017) também identificaram na seda da teia da aranha *T. clavipes* a proteína *glacontryphan-M* com 40% de cobertura de sequência. Além dessa conotoxina foram identificadas

outras 85 proteínas semelhantes a conotoxinas tanto nas glândulas produtoras de seda quanto na seda da teia, destacando a  $\alpha$ -D-conotoxina Ms20.4 originalmente isolada do veneno de *Conus mustelinus* que foi identificada com 100% de cobertura de sequência na seda da teia de *T. clavipes* (Esteves, 2017).

Um papel ativo, além do papel mecânico de captura de presas, foi anteriormente proposto para as teias de aranhas do gênero *Trichonephila*, quando uma série de peptídeos tóxicos, proteases e neurotoxinas de baixas massas moleculares foram relatadas em gotículas da teia de *T. clavipes* (Marques et al., 2005; Salles et al., 2006; Volsi et al., 2006). A identificação de diversas neurotoxinas no presente resultado sugere que estas proteínas contribuem para a paralisia de presas, facilitando a captura, e corrobora com a hipótese de que a teia da aranha *T. plumipes* também desempenha um papel ativo na captura dessas presas.



**Figura 52. Distribuição das proteínas identificadas de acordo com seu papel funcional nas glândulas produtoras de seda e na seda da teia.** As proteínas foram organizadas em seis grupos funcionais diferentes: (i) proteínas estruturais da seda da teia; (ii) proteínas relacionadas ao transporte de íons e oxigênio para manter a estabilidade das espidroínas; (iii) proteínas relacionadas ao dobramento/conformação e modificação de espidroínas; (iv) proteínas relacionadas à preservação da espidroína contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas à preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas relacionadas com a captura de presas e pré-digestão.

A figura 52 mostra a contribuição de cada glândula para a biossíntese de proteínas de cada grupo funcional, bem como a quantidade de proteínas em cada grupo presente na teia. Assim, as proteínas espidroínas, que compõem as fibras da seda, foram produzidas por ambas as glândulas ampulada maior e agregada. Já a biossíntese e secreção de proteínas semelhantes a toxinas, neurotoxinas e enzimas proteolíticas foram observadas apenas na glândula agregada.

Podemos notar que a maioria das proteínas secretadas pela glândula ampulada maior está relacionada à função de proteção da seda contra o estresse oxidativo. Enquanto que para a glândula agregada, a maioria das proteínas está relacionada à captura e pré-digestão da presa, uma vez que essa glândula produz e secreta as gotículas aquosas na teia, e que por sua vez contém as vesículas lipídicas que aprisionam os peptídeos e proteínas tóxicas em seu interior.

Estudos, utilizando de uma abordagem proteômica e transcriptômica, tem demonstrado que apesar de todas as glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes* contribuírem na biossíntese e secreção de proteínas semelhantes às toxinas e neurotoxinas da teia, a glândula agregada é a que mais contribui de forma abundante - foram identificadas mais de 190 proteínas semelhantes a toxinas nesta glândula. (dos Santos-Pinto et al., 2019; Esteves et al. 2020).

## 5. CONCLUSÃO

Para a aranha *T. clavipes*:

Foram identificadas um total de 729 sequências de peptídeos (glândulas e seda). Todos esses peptídeos foram organizados em 4 grupos: (i) peptídeos estruturais da seda; (ii) peptídeos potencialmente originados de toxinas; (iii) outros peptídeos (que não apresentam um papel funcional, em potencial na teia); e (iv) peptídeos não caracterizados. O grupo dois (ii) é composto por uma série de sequências peptídicas que são semelhantes a proteínas típicas de venenos animais, ou seja, toxinas, neurotoxinas, enzimas digestivas utilizadas para pré-digestão das presas, e toxinas que causam paralisia/morte das presas. Foi observado que principalmente a glândula ampulada maior e a glândula agregada, podem sintetizar e depositar sobre a seda da teia sequências peptídicas pertencentes ao grupo (i) e (ii).

Treze sequências de peptídeos foram sintetizadas em fase sólida para que posteriormente o potencial tóxico dos mesmos fossem avaliados em ensaios de inseto-toxicidade. Os peptídeos nomeados de Trichonephiline -1, -2, -3, -4, -8, -10 e -13, foram considerados tóxicos, pois apresentaram taxa de mortalidade  $\geq 70\%$ , após a injeção da concentração de 200 ng/ $\mu\text{L}$  na hemocele de abelhas *A. mellifera*. O extrato vesicular da teia, também apresentou ação tóxica com o valor de  $DL_{50}=0,323$  ng/mg. Os mesmos peptídeos que apresentaram efeitos tóxicos também inibiram diferentes canais iônicos, tais como, hNAv, hCav2.2 e hCav1.3 e o receptor nAChR $\alpha 7$  em concentrações de 1mM. Possivelmente, esses peptídeos não têm alto efeito inibitório quando testados individualmente. Na natureza, esses peptídeos são misturados e aprisionados dentro de vesículas lipídicas, e provavelmente agem sinergicamente quando entram em contato com a presa.

Além dos peptídeos potenciais inseticidas envolvidos na captura de presas, também foi identificado um peptídeo que desempenhou ação antibiótica. O peptídeo Trichonephiline-6 apresentou MIC  $\leq 0.25$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a bactéria Gram+ *Staphylococcus aureus*. O extrato total da teia também apresentou ação antibiótica com valor de MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Tanto o peptídeo Trichonephiline-6 quanto o extrato total da teia apresentaram atividade antibiótica significativamente alta, se comparado com dados encontrados na literatura. A presença do peptídeo Trichonephiline-6 pode estar contribuindo como mecanismo de defesa da teia para que a seda, ou até os ovos da

aranha em desenvolvimento, resistam à decomposição microbiana. Também não se pode desconsiderar a possibilidade de que tais peptídeos também podem atuar prevenindo a infecção das presas capturadas e paralisadas, que servirão de alimento para as aranhas.

Portanto, os peptídeos tóxicos e antibióticos identificados neste trabalho juntamente com as proteínas neurotóxicas, enzimas proteolíticas e defensinas (já caracterizadas na literatura), têm fundamentado a hipótese de que a teia é uma complexa estrutura que desempenha um papel “químico-ativo” na captura de suas presas.

Para a aranha *T. plumipes*:

Foram identificadas um total de 932 proteínas (glândulas e seda). Todas essas proteínas foram organizadas em 5 grupos: (i) proteínas estruturais da seda da teia; (ii) proteínas relacionadas ao transporte de íons e oxigênio para manter a estabilidade das espidroínas; (iii) proteínas relacionadas com o dobramento/conformação e modificações pós traducionais (PTM) das espidroínas; (iv) proteínas relacionadas à preservação da espidroína contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas à preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas relacionadas com a captura de presas e pré-digestão. Foi observado que apenas a glândula agregada pode sintetizar e depositar sobre a seda da teia proteínas pertencentes ao grupo (vi).

Dessa forma, a análise proteotranscriptômica revelou que a seda da teia e a glândula agregada da aranha *T. plumipes* contém toxinas e neurotoxinas semelhantes às encontradas nos venenos de aranhas, escorpiões, insetos e até organismos marinhos. Assim, como a aranha *T. clavipes* os resultados da aranha *T. plumipes* revelou que a teia não é uma ferramenta simples e passiva para a captura mecânica de presas, mas uma arquitetura naturalmente sofisticada que desempenha um papel ativo durante a captura de suas presas.

Os resultados demonstrados no presente capítulo contribuem para um melhor entendimento da interação químico-ecológica na captura de insetos-presa pela teia da aranha do gênero *Trichonephila*. Esses resultados também poderão contribuir para futuros estudos, que possam possibilitar o uso dessas moléculas no desenvolvimento de inseticida-seletivo e/ou antibióticos.

## **CAPÍTULO 3**

**Distribuição espacial dos peptídeos sobre as  
gotículas da seda da teia da aranha *Trichonephila  
plumipes***

## RESUMO

Assim como as aranhas *T. clavipes*, as aranhas *T. plumipes* são aranhas construtoras de teias orbitais. Essas aranhas utilizam suas teias principalmente como ferramenta na captura de presas. No capítulo anterior foi evidenciado que a teia da aranha *T. plumipes* possui diversas proteínas, dentre elas as proteínas estruturais da seda (espidroínas), e além dessas, foram destacadas as proteínas identificadas como semelhantes a toxinas. As proteínas semelhantes a toxinas também foram identificadas na glândula produtora de seda agregada desta aranha. Além deste estudo, existem poucos ou nenhum estudo sobre a morfologia e análise química de macromoléculas constituintes da seda da teia e/ou das glândulas produtoras de seda para a espécie *T. plumipes*. Considerando isso, neste capítulo foram apresentados principalmente os resultados das análises de imagens morfológicas e química-espacial dos peptídeos distribuídos nos fios de captura da teia da aranha *T. plumipes*. Através de microscópio óptico, foi observado que assim como em outras espécies do gênero *Trichonephila*, a teia da aranha *T. plumipes* possui gotículas oleosas depositadas sobre a teia que provavelmente são produzidas e secretadas pela glândula agregada. Essas gotículas apresentaram morfologia globular, com tamanhos de aproximadamente 100 µm de diâmetro, distribuídas em intervalos regulares ao longo do fio. Posteriormente, através da análise de imageamento químico por espectrometria de massas (IMS-MALDI) foram investigadas as distribuições de 20 peptídeos sobre os fios de seda e também em cortes da glândula agregada, sendo que 6 peptídeos foram compartilhados por essas amostras. Esta foi a primeira vez que foi realizada a análise IMS-MALDI da seda da teia de uma aranha, e evidenciado que a distribuição dos peptídeos na teia ocorre de forma heterogênea. Por fim, através de análise de sequenciamento *de novo* foi possível determinar 11 sequências primárias dos 20 peptídeos investigados. Quatro sequências peptídicas denominadas de Trichonephiline-16, -17, -19 e -20 oriundos da teia da aranha *T. plumipes*, se mostraram similares a duas sequências dos peptídeos Trichonephiline-1 e -2, previamente identificados como “semelhantes às toxinas” na teia de aranha de *T. clavipes*. Embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. plumipes* sejam conservadas as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. clavipes*, isso não significa que esses peptídeos exercerão a mesma função. Em estudos futuros será necessário sintetizar as sequências primárias desses peptídeos oriundos da seda da

*T. plumipes* e realizar ensaios de inseto-toxicidade para avaliar o efeito tóxico dos mesmos. Portanto, os resultados deste capítulo contribuíram para um melhor entendimento sobre a morfologia e distribuição espacial de alguns peptídeos nas gotículas depositadas sobre a teia; além de também corroborar com a hipótese de que a teia é uma arquitetura naturalmente sofisticada que desempenha um papel ativo durante a captura de suas presas.

**Palavras chave:** seda de aranha, glândulas agregadas, toxinas, imageamento químico, espectrometria de massas.

## ABSTRACT

*T. plumipes* spiders use their webs mainly as a tool to capture prey. In the previous chapter, it was shown that the *T. plumipes* spider web has several proteins, among them the structural silk proteins (spidroins) and, besides these, the proteins identified as toxin-like were highlighted. Toxin-like proteins were also identified in the aggregated silk-producing gland of this spider. Apart from this study, there are few or no studies about morphology and chemical analysis of constituent macromolecules from the *T. plumipes* web silk and/or silk producing glands for these species. This chapter mainly presents the morphological and chemical-spatial image analyses results of peptides distributed in the *T. plumipes* spider web threads. Using light microscopy, it was observed that in other species of the genus *Trichonephila*, the *T. plumipes* spider web has oily droplets deposited on the web that are probably produced and secreted by the aggregate gland. These droplets showed globular morphology, with sizes of approximately 100  $\mu\text{m}$  in diameter, distributed in regular intervals along the web. Subsequently, through chemical imaging analysis by mass spectrometry (IMS-MALDI), the distribution of 20 peptides on the silk threads and sections of the aggregated gland were investigated and 6 peptides were shared by these samples. This was the first time that IMS-MALDI analysis of spider web silk was performed, and evidenced that the distribution of peptides in the web occurs heterogeneously. Finally, by de novo sequencing analysis, it was possible to determine 11 primary sequences of the 20 peptides investigated. Four peptide sequences named Trichonephilin-16, -17, -19 and -20 originating from the *T. plumipes* spider web, showed similar to two peptide sequences named Trichonephilin-1 and -2, previously identified as "toxin-like" in the *T. clavipes* spider web. Although the silk peptide sequences from the *T. plumipes* web are conserved the silk peptide sequences from the *T. clavipes* web, this does not mean that these peptides will exert the same function. In future studies, it will be necessary to synthesize the primary sequences of these peptides from the *T. plumipes* silk and perform insect-toxicity assays to evaluate their toxic effect. Therefore, the results of this chapter contributed to a better understanding of the morphology and spatial distribution of some peptides in the droplets deposited on the web; and also corroborated the hypothesis that the web is a naturally sophisticated architecture that plays an active role during prey capture.

**Keywords:** spider silk, aggregated glands, toxins, chemical imaging, mass spectrometry.

## 1.INTRODUÇÃO

A aranha *Trichonephila plumipes* é uma espécie de aranha encontrada na Austrália, Indonésia e algumas ilhas do Pacífico. Esta aranha costuma construir suas teias grandes e circulares em locais altamente urbanizados devido à maior disponibilidade de alimentos, temperaturas mais altas e menos predadores (Kerr et al., 2018).

No capítulo anterior foi evidenciado que a teia da aranha *T. plumipes* possui diversas proteínas, dentre elas as proteínas estruturais da seda (espidroínas), e além dessas, foram destacadas as proteínas identificadas como semelhantes a toxinas. Sendo que, as proteínas semelhantes a toxinas também foram identificadas na glândula produtora de seda agregada desta aranha.

De forma geral, existem poucos estudos sobre a aranha *T. plumipes*, e quase que a totalidade são acerca do comportamento de canibalismo sexual das fêmeas, e alguns estudos sobre a propriedades de resistência dos fios de seda (Elgar et al., 1996; Kasumovic et al., 2006; Schneider et al., 2001; Whaite et al., 2018).

Considerando isso, neste capítulo a fim de se obter mais informações morfológicas da teia, através de microscópio invertido foram apresentados resultados das análises de imagens das gotículas que estão depositadas sobre os fios de seda. Além disso, através de imageamento químico por espectrometria de massas foram adquiridas e analisadas pela primeira vez imagens da distribuição química-espacial de alguns peptídeos sobre os fios da teia aranha *T. plumipes*.

O imageamento por espectrometria de massas (Mass spectrometry imaging -MSI) tem emergido como uma importante ferramenta analítica na última década, mostrando informações valiosas em vários campos do conhecimento (WU et al., 2013). No presente estudo para as análises de imageamento das gotículas depositadas sobre os fios de seda será aplicada a técnica de IMS-MALDI. Uma das vantagens mais atrativas do imageamento por MALDI é a visualização de moléculas individuais, presentes nas superfícies de seções de tecidos sem a necessidade da utilização de anticorpos, coloração, ou etapas demoradas de pré-tratamentos.

Ao longo dos últimos anos diversos métodos para o estudo de moléculas in situ têm sido desenvolvidos, possibilitando a análise de uma variedade de moléculas por IMS (Rubakhin e Sweedler 2010). Essa tecnologia tem sido rotineiramente

aplicada para análise de diversos compostos biológicos e não biológicos, tais como: proteínas, peptídeos, lipídios, compostos de baixa massa molecular, nucleotídeos, metabólitos, cosméticos, dentre outros, devido a sua capacidade única de identificar e resolver espacialmente diferentes compostos simultaneamente (Eleanor et al.; 2013; Ye et al, 2013; Oliveira et al, 2013; Schwamborn e Caprioli, 2010). Apesar dessas características interessantes, o IMS-MALDI só tem sido aplicado a cortes e estruturas biológicas planas; por isso, estamos ainda trabalhando para adaptar o uso dessa técnica a estruturas cilíndricas, como os fios das teias de aranhas.

## 2. OBJETIVOS

1. Analisar a disposição das gotículas sobre os fios de seda presentes na espiral de captura da teia da aranha *T. plumipes*, através de microscopia óptica invertida;
2. Investigar a distribuição espacial do conteúdo peptídico identificados, principalmente sobre os fios de seda na teia e também em cortes da glândula agregada da aranha *T. plumipes*, através da análise MALDI-Imaging;
3. Análise de sequenciamento *de novo* dos peptídeos da seda da teia e da glândula agregada, a fim de apenas combinar a massa do peptídeo obtida por esta análise, com a massa correspondente identificada na análise MALDI-Imaging e, conseqüentemente, obter as seqüências dos peptídeos;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção das glândulas agregadas e da seda da teia da aranha *T. plumipes***

As aranhas *T. plumipes* e suas teias foram coletadas no campus da Universidade Queensland localizada na cidade de Brisbane, Queensland, de maneira georreferenciada (-2729`52.8 "S 15301`01.9E"). As teias foram limpas com o auxílio de pinças para a retirada de partículas contaminantes. E por fim, as aranhas foram dissecadas para a retirada das glândulas produtoras de seda agregada.

#### **3.2. Microscopia da teia da aranha *T. plumipes***

A teia foi disposta em lâmina de vidro, para então ser observada em um microscópio invertido. Não foi realizado nenhum tipo de coloração das lâminas. As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital Qi1 CCD, adaptada a um microscópio invertido Nikon Ti-U. Para a aquisição das imagens foi utilizado o software NIS Elements-BR e NIS Elements F.

#### **3.3. Imageamento químico por espectrometria através de MALDI (IMS-MALDI)**

##### **3.3.1 IMS-MALDI das gotículas sobre os fios da teia *T. plumipes***

Uma modificação de protocolos publicados (Caprioli et al., 1997; Yarnold et al., 2012) foi usada para investigar o conteúdo de peptídeos das gotículas presentes na teia da aranha *T. plumipes* através da análise de imagens de IMS-MALDI. Sendo assim, inicialmente um fragmento da seda da teia foi inserido em uma lâmina de vidro e fotografado opticamente por microscópio (Olympus, BX51). Posteriormente, a lâmina de vidro contendo o fragmento de teia foi imersa em metanol 100% (v/v) por 10 segundos antes da aplicação da matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA; 7 mg / mL em 50% ACN, 0,2% ácido trifluoroacético) através do pulverizador automatizado de matriz (Bruker ImagePrep). Não foi aplicada na lâmina vidro a solução de tripsina, ou qualquer solução de digestão, pois o objetivo foi investigar apenas os peptídeos na sua forma natural.

##### **3.3.2. IMS-MALDI da glândula agregada da aranha *T. plumipes***

A glândula agregada foi incluída em cera de parafina para que posteriormente fosse realizado cortes com 7  $\mu$ m de espessura. Os cortes foram inseridos em lâminas de vidro, desparafinizados por lavagem cuidadosa com xileno e fotografadas opticamente por microscópio (Olympus, BX51). Posteriormente, a lâmina de vidro

contendo o corte da glândula foi imersa em metanol 100% (v/v) por 10 segundos antes da aplicação de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA; 7 mg / ml em 50% ACN, 0,2% de ácido trifluoroacético) através do pulverizador automatizado de matriz (Bruker ImagePrep). Não foi aplicada na lâmina vidro a solução de tripsina, ou qualquer solução de digestão, pois o objetivo foi investigar apenas os peptídeos na sua forma natural.

### **3.3.3. Análise de IMS-MALDI**

O software FlexControl 2.1 (Bruker) foi utilizado para operar o espectrômetro de massa UltraFlex III TOF-TOF (Bruker) em ambos os modos: positivo linear e positivo de refletor. Para ambos os modos de operação, um tamanho de laser pequeno foi escolhido para dar uma resolução espacial de 50  $\mu\text{m}$ , com 300 tiros de laser por ponto de varredura, e habilitada a supressão de íons da matriz até 980m/z. Os dados adquiridos foram subsequentemente analisados através do software FlexImaging 2.1 (Bruker) o qual disponibiliza os dados em mapas de intensidade de íons 2D, produzindo um espectro médio baseado nos espectros individuais normalizados adquiridos durante o experimento.

## **3.4. Análise de sequenciamento dos peptídeos encontrados no secretoma da glândula agregada e da seda da teia**

### **3.4.1. Extração dos peptídeos presentes na seda da teia e na secreção da glândula agregada**

As amostras de seda da teia e das glândulas agregadas foram armazenadas em frascos distintos para a extração dos peptídeos. Logo após, as amostras foram suspensas em água Milli-Q (v/v) na presença de inibidores de proteases (p-metilsulfonil fluoreto - PMSF) 10 Mm e um coquetel de inibidores de proteases (Sigma) à 25°C, sendo que as glândulas foram comprimidas com o auxílio de um mini-pistilo de Teflon, para provocar a liberação do conteúdo glandular. Em seguida, a amostra contendo o secretoma da glândula agregada e a solução aquosa contendo a seda da teia foram centrifugadas individualmente a 12.000 x g por 10 minutos à 4° C com os sobrenadantes sendo coletados, filtrados em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e liofilizados. Posteriormente, cerca de 5-50  $\mu\text{g}$  dos extratos da glândula agregada e da seda da teia foram então incubados com 20  $\mu\text{L}$  de tampão de redução / alquilação (carbonato de amônio 50 mM pH 11, 1% de iodoetanol, 0,025% de

trietilfosfina em 48,5% de acetonitrila) por 2 horas a 37°C. As amostras reduzidas e alquiladas foram então liofilizadas, e mantidas em freezer -20° C até o momento da análise em LC-MS.

### **3.4.2. Procedimentos experimentais para análise dos peptídeos - aquisição e análise de dados**

Os extratos da glândula agregada e seda da teia (previamente reduzidos e alquilados) foram solubilizados em ácido fórmico a 1% (v/v), acetonitrila 2,5% (v/v) e carregados em uma coluna Zorbax 300SB-C18 de 150 × 0,1 mm (tamanho de partícula de 3,5 µm, tamanho de poro 300 Å) em um sistema Nano LC (Shimadzu). O fluxo de saída de LC foi acoplado a um espectrômetro de massa Triplo TOF (SCIEX 5600) equipado com uma fonte de íons Turbo V. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 70 min de 1–40% de solvente B (90% de acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico) e solvente A (0,1% de ácido fórmico) a uma taxa de fluxo de 0,2 mL / min. Varreduras de MS1 foram adquiridas em uma faixa de m/z 350-1800, e íons precursores na faixa de m/z 350-1500 com carga +2 a +5. As varreduras de MS/MS foram adquiridas com um tempo de acumulação de 250 milisegundos (ms) e um ciclo de tempo de 4 segundos. A opção “rolling collision energy” foi selecionada, permitindo que a energia de colisão seja variada dinamicamente com base em valores de m/z e de z do íon precursor. Até 20 espectros de MS/MS semelhantes foram agrupados a partir de íons precursores que diferem em menos de 0,1 Da.

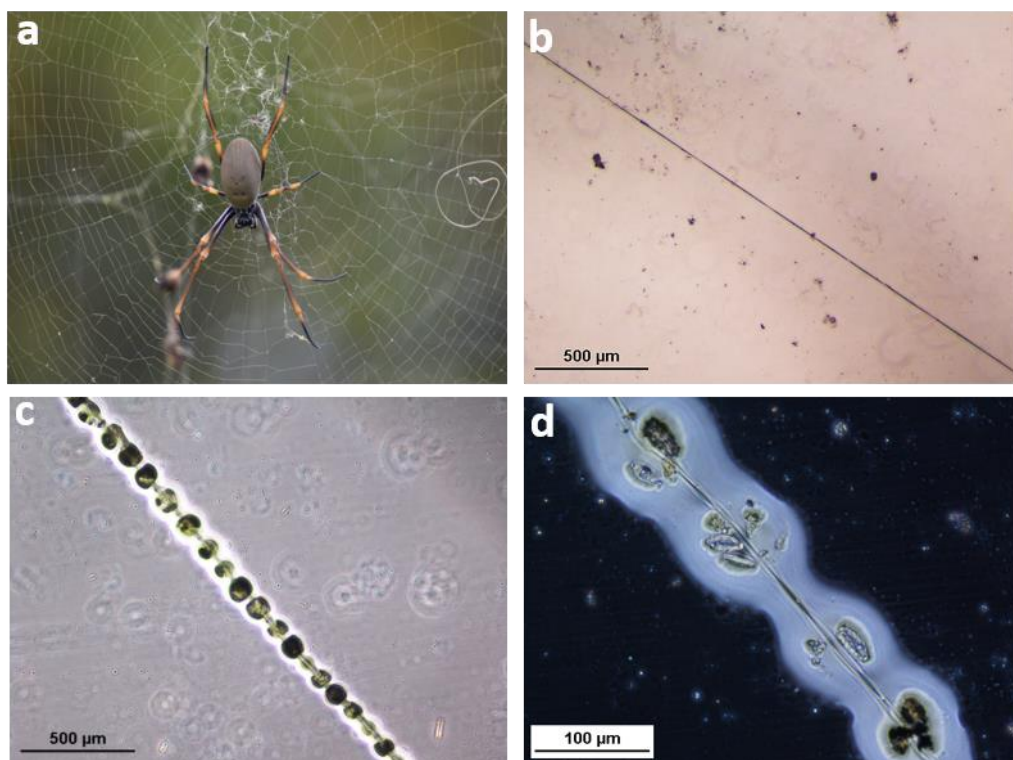
Os espectros de massa resultantes foram analisados no software ProteinPilot 4.0.8085 (Sciex). Uma tolerância de massa de 50 mDa foi usada para íons precursores e MS/MS. Os espectros de massa em tandem também foram analisados usando o software Analyst 6.1 e PeakView (Sciex). Em seguida, foram também manualmente analisados para a confirmação dos resultados, conforme método de interpretação e sequenciamento de peptídeos descrita por Cantú et al. (2008). Por fim, após a determinação das sequências peptídicas, estas foram comparadas com sequências depositadas em bancos de dados (sequência de proteínas não redundante) por meio da ferramenta de busca de alinhamento local básica - BLASTp: (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A comparação com sequências depositadas em bancos de dados nos ajudou inicialmente na classificação e identificação das sequências peptídicas oriundas da amostra da teia da aranha *T. plumipes*.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados serão apresentados e discutidos de forma que a leitura do texto e interpretação dos dados, no decorrer deste capítulo, possa ocorrer de maneira compreensível, mas não necessariamente refletem a ordem em que o estudo foi realizado.

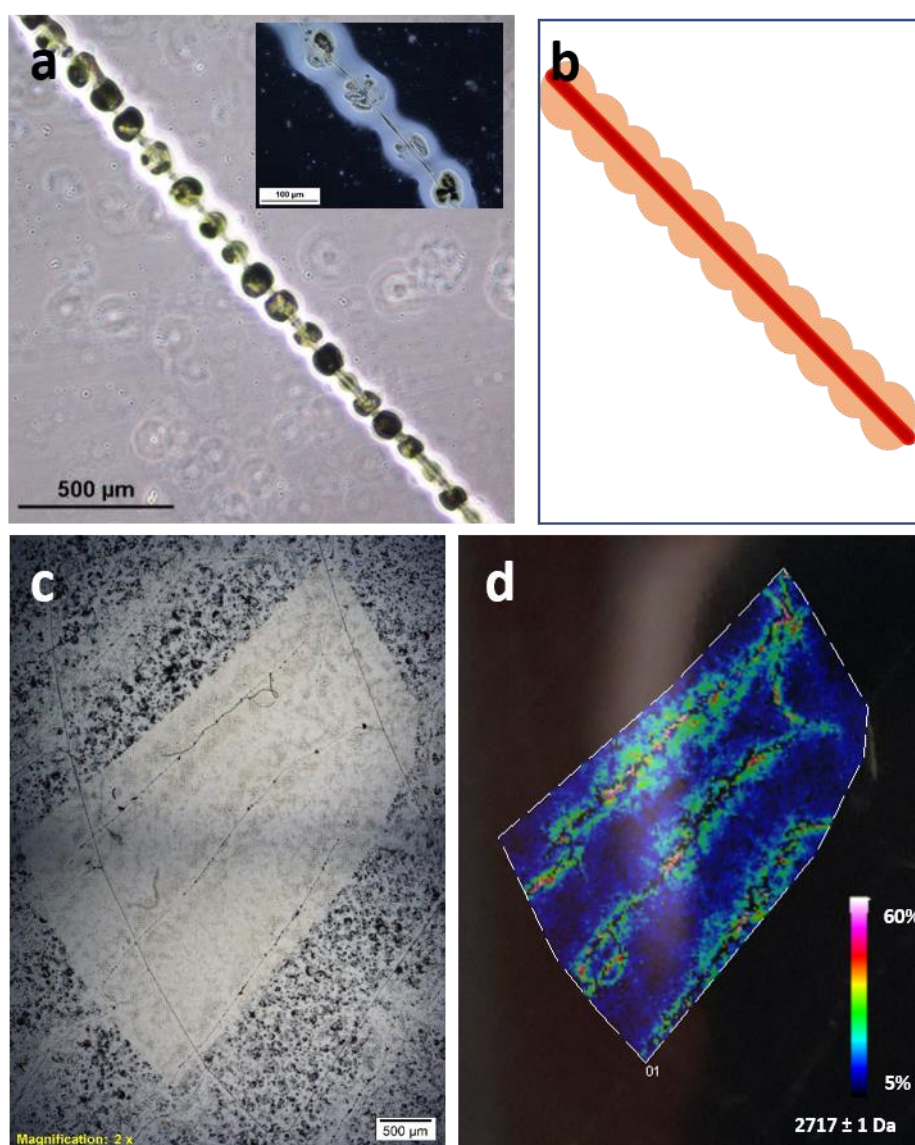
Após a coleta das teias, as mesmas foram observadas em microscópio para verificar a integridade dos fios e se não estavam contaminados, por folhas, ou mesmo cutículas e restos de outros animais. Assim, as melhores regiões da teia (as regiões mais estruturadas e preservadas em termos arquitetônicos) foram selecionadas e fotografadas para posterior análise pelo MALDI-Imaging (Figura 53a-d).

Da mesma forma, secções de tecido da glândula agregada foram selecionadas e fotografadas para posterior análise pelo MALDI-Imaging. A glândula agregada foi escolhida para análise de MALDI-Imaging uma vez que esta glândula é a responsável pela produção e secreção das gotículas sobre os fios da teia. Conforme mostrado na figura 54, no momento em que a teia entra em contato com a lâmina de vidro, as gotículas se tocam umas às outras e, portanto, não permanecem em sua forma intacta.



**Figura 53. a)** *T. plumipes* - aranha tecedora de teia orbital, coletada no campus da Universidade de Queensland em Brisbane, QLD, Austrália. **b)** Fio de seda sem gotículas. **c)** Gotículas depositadas ao longo do fio de seda. **d)** Visão aproximada das gotículas depositadas sobre os fios da teia. As imagens da teia em b,c e d foram obtidas com o microscópio Invertido Nikon Ti-U.

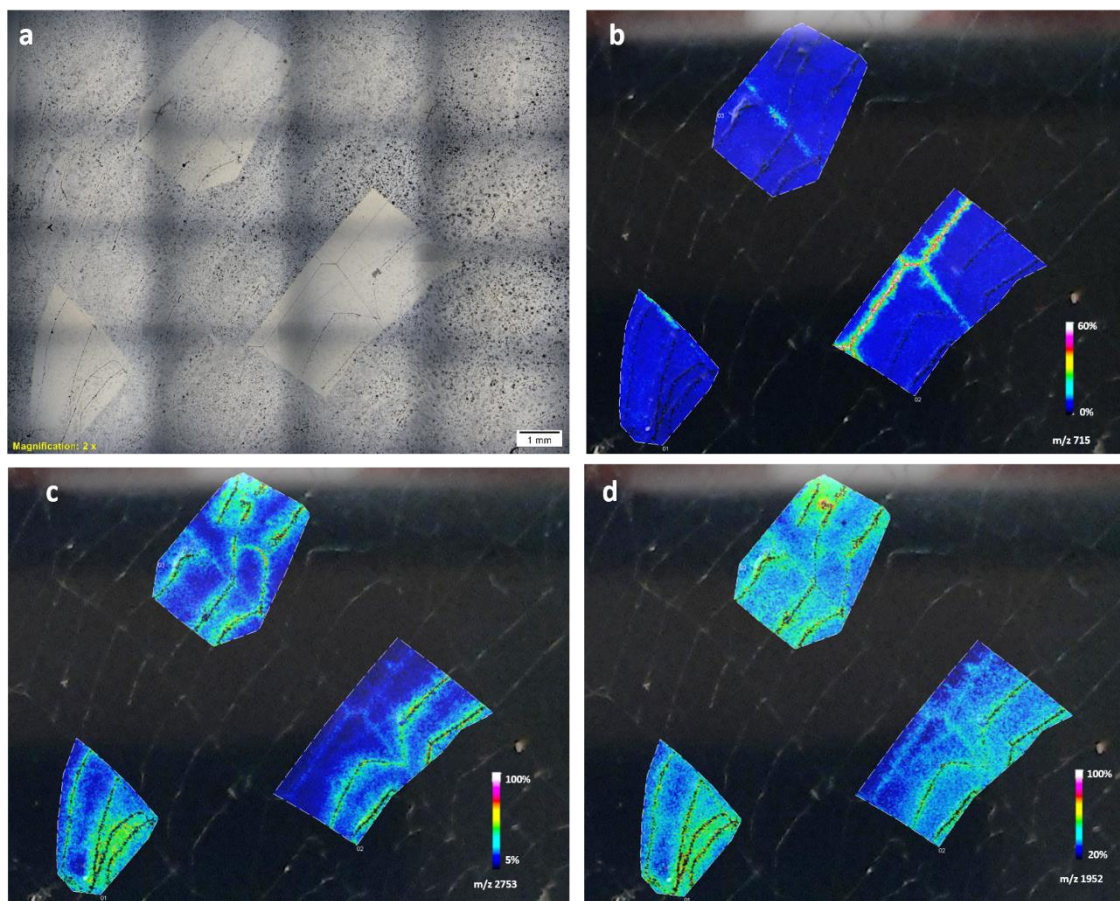
Através das fotomicrografias da teia da aranha *T. plumipes* foi observado a presença de diversas gotículas distribuídas ao longo dos fios da teia; as mesmas apresentaram morfologia globular, com tamanhos de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $\Phi$ ), distribuídas em intervalos regulares ao longo do fio da teia (Figura 53c-d). A figura 53b possibilita a visualização apenas das fibras do fio.



**Figura 54.** **a)** Imagem obtida por microscopia invertida da seda da teia em uma lâmina de vidro evidenciando as gotículas tocando umas às outras. **b)** Esquema representativo das gotículas se tocando umas às outras (feito à partir da figura “a”). **c)** Área da teia selecionada, evidenciando os fios de seda analisados por MALDI-Imaging. **d)** Imagem da distribuição do peptídeo de valor de  $m/z$  2717 a forma  $([M+H]^+)$  detectado na seda da teia de *T. plumipes*. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto.

Considerando-se que a manutenção das gotículas depositadas nos fios da teia ocorre regularmente, esperava-se que o conteúdo de peptídeo também fosse

distribuído de maneira uniforme. Porém, o primeiro fato a ser notado em nossos resultados foi que a imagem gerada pela técnica de MALDI-Imaging revelou que a distribuição dos peptídeos na teia não ocorre de forma homogênea. Diferentes valores de massas são distribuídos de forma heterogênea pelos fios da teia (Figura 55).



**Figura 55. Distribuição heterogênea de peptídeos sobre os fios da teia.** a) área da teia selecionada para realizar análise de MALDI-Imaging. Imagem da distribuição do peptídeo com valor de  $m/z$  715 (b),  $m/z$  2753 (c) e  $m/z$  1952 (d) detectado nos fios da teia da *T. plumipes*. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de  $m/z$  de cada molécula na forma  $([M+H]^+)$ .

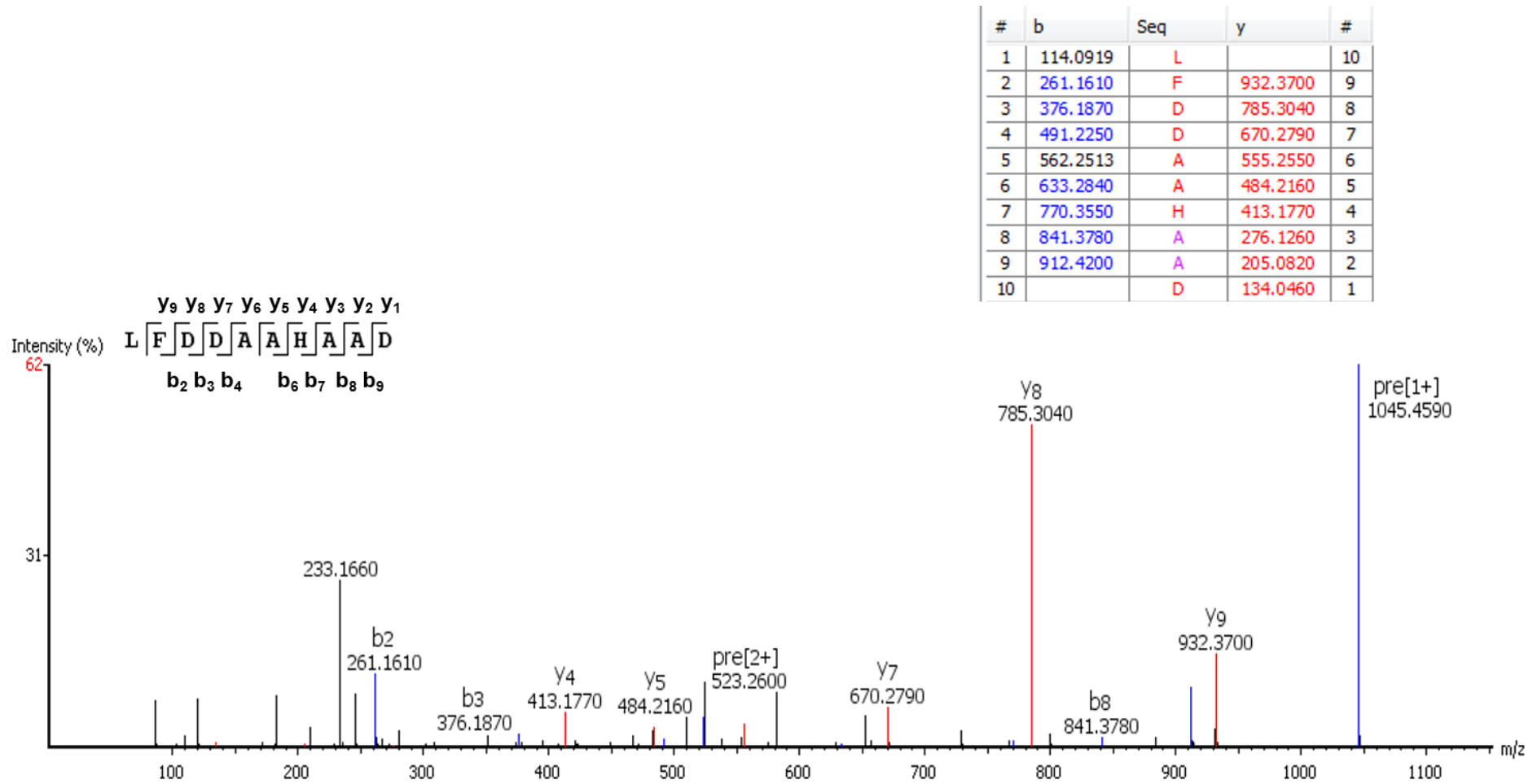
Esta foi a primeira vez que a análise MALDI-Imaging da seda da teia foi realizada, portanto, não há dados na literatura que possam ser comparados com o presente estudo. Apesar disso, algumas questões foram levantadas sobre a possível distribuição heterogênea de peptídeos nos fios da teia.

Existe um padrão para a distribuição desses peptídeos, ou seja, a aranha de alguma forma controla a deposição do conteúdo de peptídeo no momento da fiação da teia e/ou quando ocorre a manutenção das gotículas da teia? Ou os peptídeos são simplesmente depositados aleatoriamente? Se isso não ocorre de forma aleatória, qual seria a importância ecológica disso para aranha? Sabe-se que a aranha controla

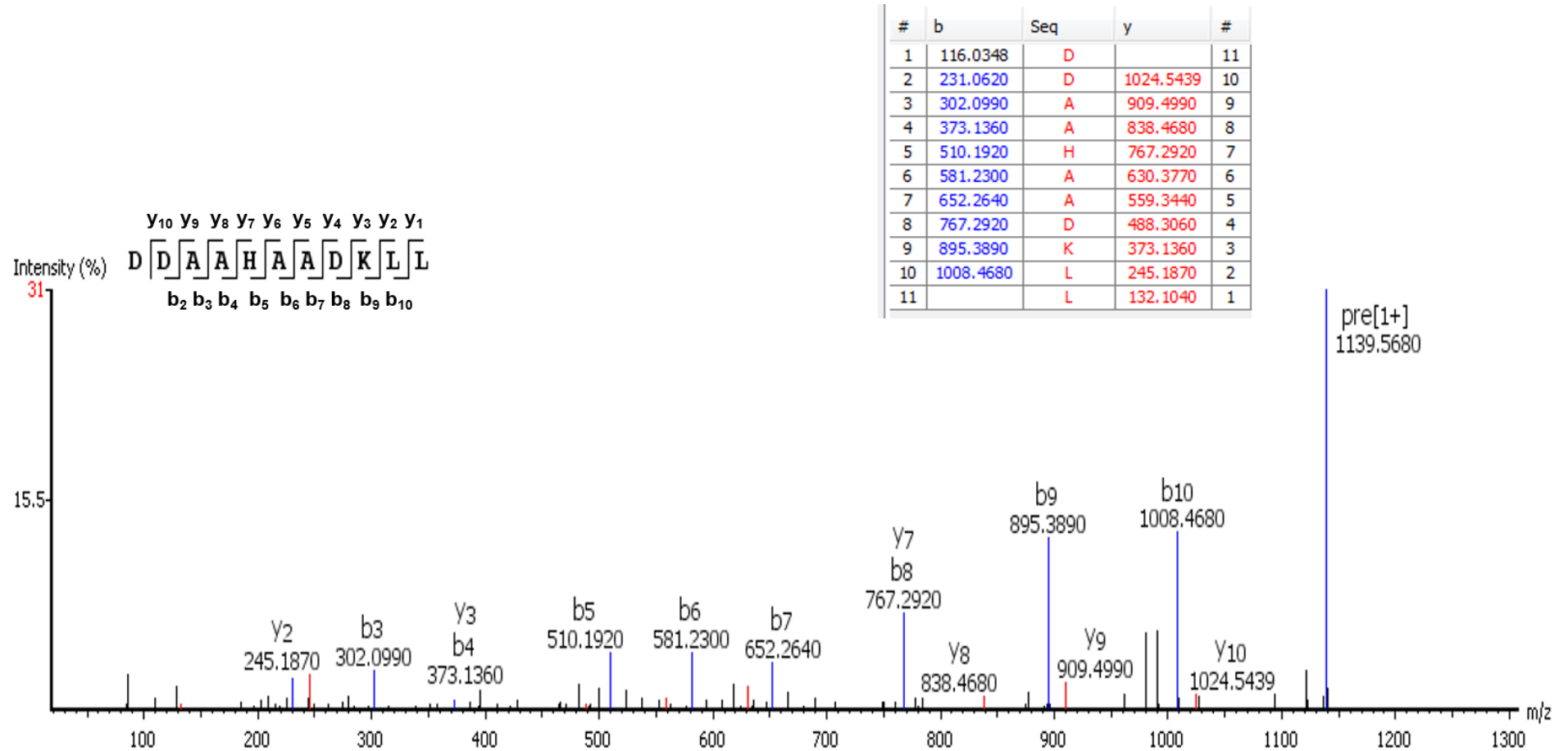
a altura da construção da teia, tamanho, geometria e até o espaçamento entre os fios de seda de acordo com a disponibilidade de presa no ambiente. Talvez da mesma forma, a distribuição heterogênea do conteúdo de peptídeo pode ser uma estratégia mais eficiente e econômica para captura de presas pela teia.

A análise de sequenciamento *de novo* da seda da teia da aranha *T. plumipes* também foi realizada, a fim de, combinar a massa de peptídeos obtidos por esta análise com a massa correspondente, identificada na análise MALDI-Imaging e, conseqüentemente, obter a seqüência do peptídeo (tabela 14). Após a determinação das seqüências peptídicas, estas foram comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados (seqüência de proteínas não redundante) por meio da ferramenta de busca de alinhamento local básica - BLASTp: (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A comparação com seqüências depositadas em bancos de dados nos ajudou inicialmente na classificação e identificação das seqüências peptídicas oriundas da amostra da teia da aranha *T. plumipes*.

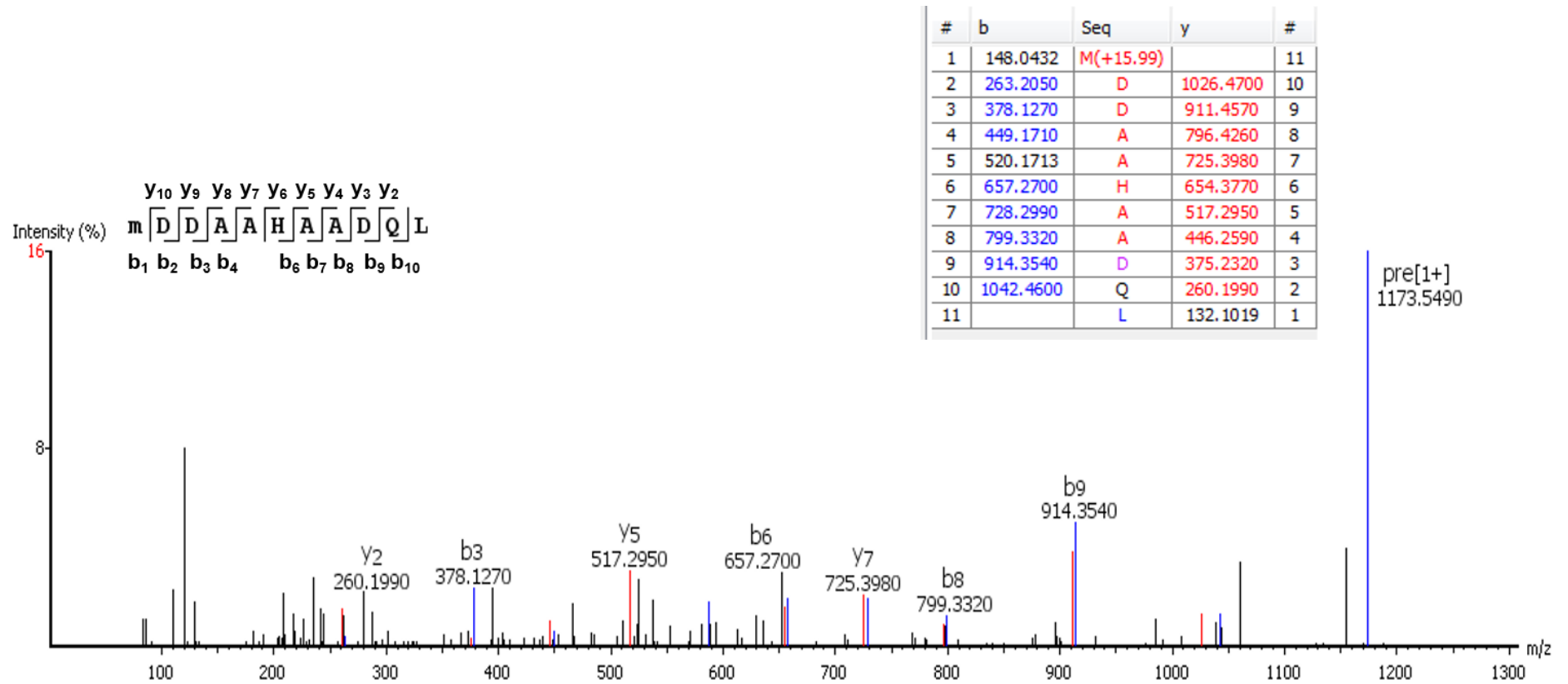
Como exemplos, serão mostrados somente alguns espectros CID de algumas seqüências peptídicas. É importante mencionar que nos espectros de massas apresentados abaixo estão evidenciados os íons fragmentos da série  $-b$  e  $-y$ , mas também foram considerados íons fragmentos de outras séries para a realização do sequenciamento dos peptídeos identificados (Figuras 56-60).



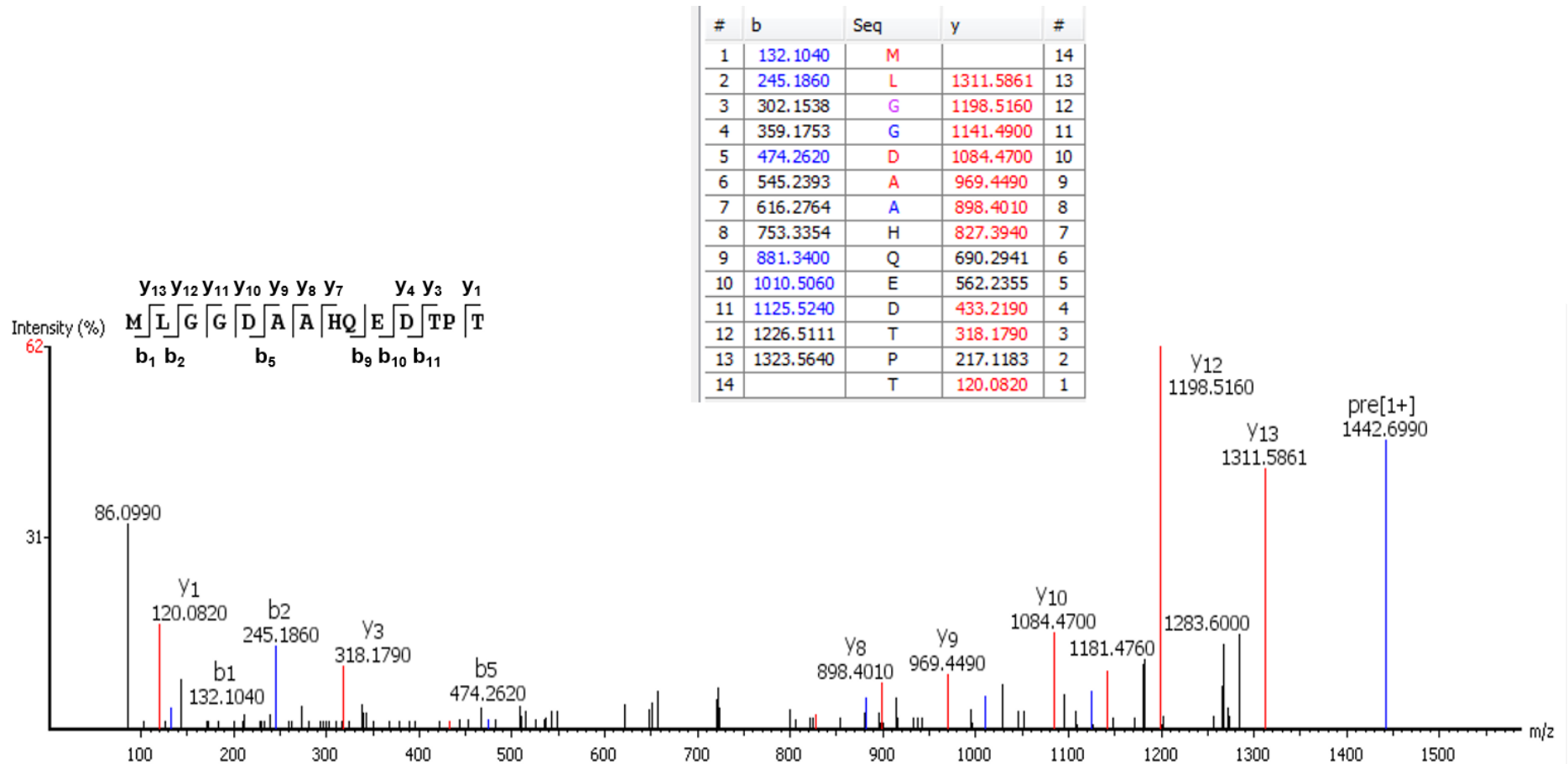
**Figura 56.** Espectro CID representativo do peptídeo natural LFDDAAHAAD-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  523.2342  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha *T. plumipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme* (código de acesso: WP\_146864660.1), nos bancos de dados NCBI nr – Tabela 14.



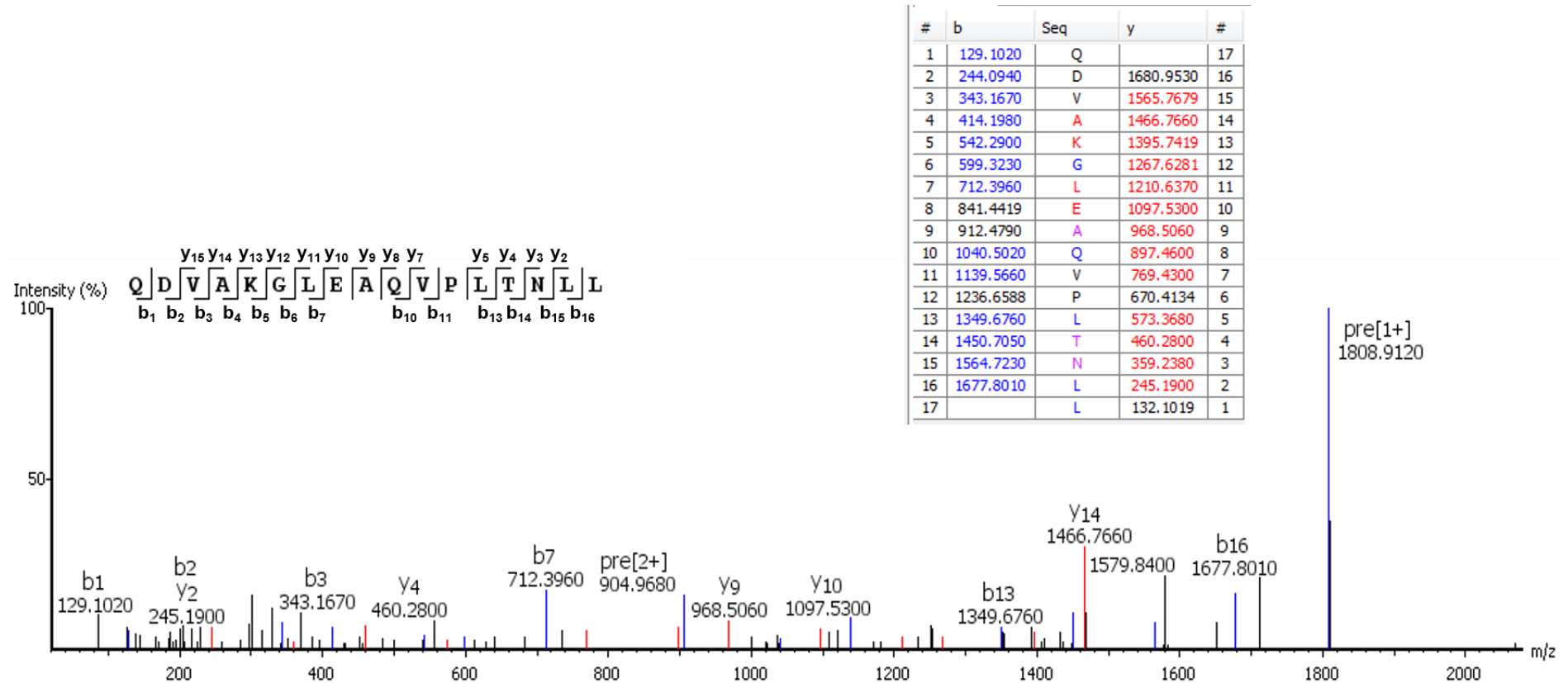
**Figura 57.** Espectro CID representativo do peptídeo natural DDAHAADKLL-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  570.2897  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha *T. plumipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *hypothetical protein NCL1\_13025* (código de acesso: MAE71440.1), nos bancos de dados NCBIInr – Tabela 14.



**Figura 58.** Espectro CID representativo do peptídeo natural mDDAAHAADQL-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  587.2802  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo #13 está presente na seda da teia da aranha *T. plumipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *hypothetical protein* (código de acesso: MAE71440.1), nos bancos de dados NCBI nr – Tabela 14.



**Figura 59.** Espectro CID representativo do peptídeo natural MLGGDAAHQEDTPT-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  721.8485  $[M + 2H]^{2+}$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha *T. plumipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *hypothetical protein*, nos bancos de dados NCBI - Tabela 14.



**Figura 60.** Espectro CID representativo do peptídeo natural QDVAKGLEAQVPLTNLL-OH, selecionando-se o íon de  $m/z$  1019.5385  $[M + 1H]^+$ , como precursor; evidenciados apenas os íons-fragmentos do tipo -b e -y. Esse peptídeo está presente na seda da teia da aranha *T. plumipes* e foi identificado como semelhante à uma sequência parcial da proteína *hypothetical protein AVEN\_85707\_1*, nos bancos de dados NCBI nr – Tabela 14.

**Tabela 14.** Sequências de peptídeos identificadas na teia de seda da aranha *T. plumipes*, usando análise de sequenciamento *de novo*. Nome: Nome dado a sequência peptídica; Sequência: sequência peptídica; Nome da potencial proteína de origem: nome da proteína obtido usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST); Mm: Massa molecular; Amostra: amostra onde a sequência foi identificada.

Nome	Sequência	Nome da potencial proteína de origem	Mm (Da)	Amostra
Trichonephiline-14	KALVGLL	hypothetical protein AVEN_255074_1	712.484	web silk
Trichonephiline-15	MLNDASC	hypothetical protein AVEN_125692_1	752.283	web silk
Trichonephiline-16	SLFDDAAAH	trypsin-like serine protease	945.419	web silk
Trichonephiline-17	LFDDAAHAAD	aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme	1044.415	web silk
Trichonephiline-18	YNDNALGVGPT	hypothetical protein	1119.519	web silk
Trichonephiline-19	DDAAHAADKLL	hypothetical protein NCL1_13025	1138.561	web silk
Trichonephiline-20	MDDAAHAADQL	hypothetical protein	1172.476	web silk
Trichonephiline-21	MLGGDAAHQEDTPT	hypothetical protein	1441.715	web silk
Trichonephiline-22	KPVAQLGNSQLVGSK	uncharacterized protein LOC107442173	1524.862	web silk
Trichonephiline-23	QDVAKGLEAQVPLTNLL	hypothetical protein AVEN_85707_1	1808.004	web silk

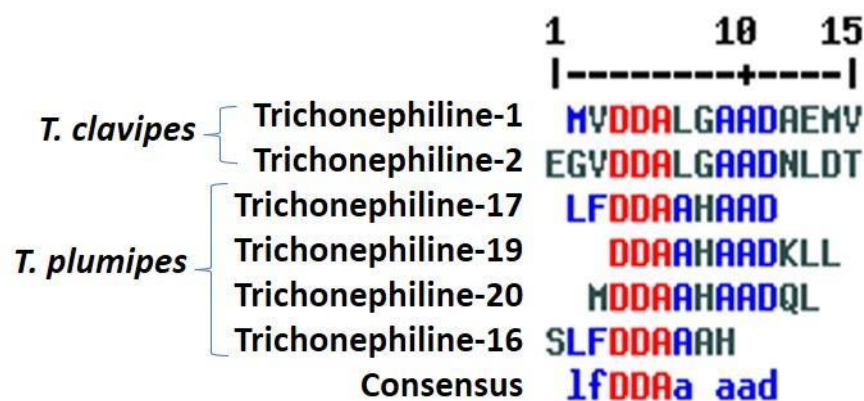
Trichonephiline-24	PQPTYDTGESVQSAQDARSQDNP	hypothetical protein AVEN_206132_1	2490.089	web silk
--------------------	-------------------------	---------------------------------------	----------	----------

Nos resultados do presente estudo, a sequência peptídica designada como Trichonephiline-16 (tabela 14) é semelhante à *trypsin-like serine protease* - código de acesso: WP\_101402806.1. A *trypsin-like serine protease* (Triptase) é um membro da família das serinas proteases (Jin et al., 2002; Dora et al., 2007; Yuan et al., 2012). As serinas proteases são os principais componentes do veneno de serpentes e têm como alvo vários estágios do sistema de coagulação do sangue em vítimas e presas (Vaiyapuri et al., 2011).

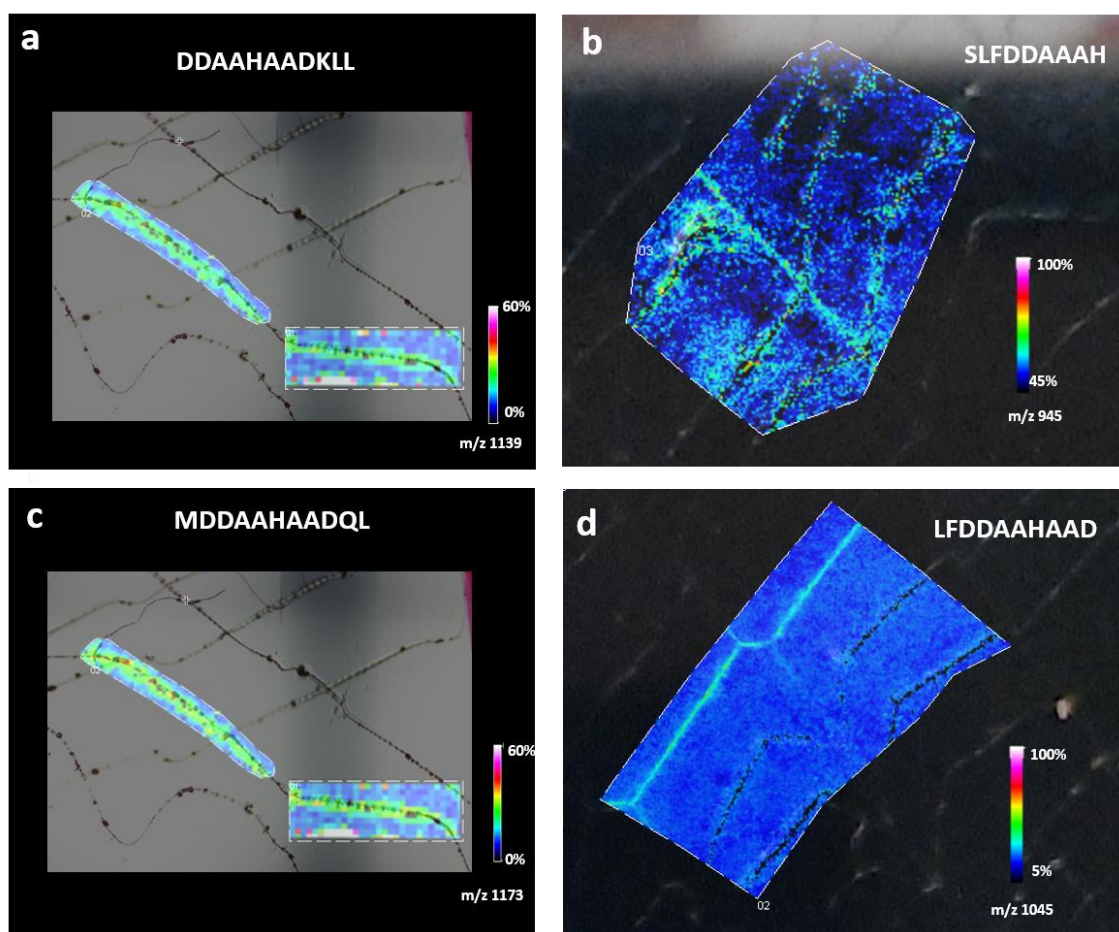
A sequência peptídica designada como Trichonephiline-17 (tabela 14) é semelhante à identificação da *aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme* - código de acesso: WP\_146864660.1. A aminotransferase foi encontrada associada a secreções venenosas da vespa ectoparasitóide *Nasonia vitripennis*. (Graaf et al., 2010). Duas aminotransferases pertencem ao subgrupo quinurenina aminotransferase, foram relatadas no veneno da vespa solitária, e as mesmas estão envolvidas na transaminação da quinurenina em  $\alpha$ -cetoácido (Graaf et al., 2010).

Embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. plumipes* sejam conservadas a uma pequena região de uma proteína já caracterizada em venenos de animais, isso não significa que esses peptídeos exercerão a função dessas mesmas proteínas (Tabela 14). No futuro será necessário realizar ensaios de inseto-toxicidade para avaliar se essas sequências de peptídeos apresentarão efeito tóxico.

Posteriormente foram comparadas as sequências peptídicas obtidas da teia da aranha *T. plumipes* com sequências peptídicas já identificadas na teia da aranha *T. clavipes*. A figura 61 mostra o alinhamento entre as sequências peptídicas oriundas da teia de aranha *T. plumipes* (Trichonephiline-16, -17, -19 e -20, tabela 14) com as sequências de 2 peptídeos oriundos da teia de aranha *T. clavipes* (Trichonephiline-1 e -2, tabela 4), os quais foram previamente identificados como “semelhantes a toxinas”, além de causarem paralisia quando injetados em abelhas *Apis mellifera* (resultados apresentados no capítulo 2). A figura 62 mostra a distribuição dessas sequências peptídicas sobre os fios de seda da aranha *T. plumipes*.



**Figura 61.** Alinhamento entre as seqüências de peptídeo oriundos da teia de aranha *T. plumipes* (Trichonephiline-16, -17, -19 e -20 da tabela 14) com as seqüências de 2 peptídeos “semelhantes a toxinas” previamente identificados na teia de aranha *T. clavipes* (Trichonephiline-1 e -2 da tabela 4). Cor vermelha: alto consenso (> 90%); cor azul: baixo consenso (> 50%).



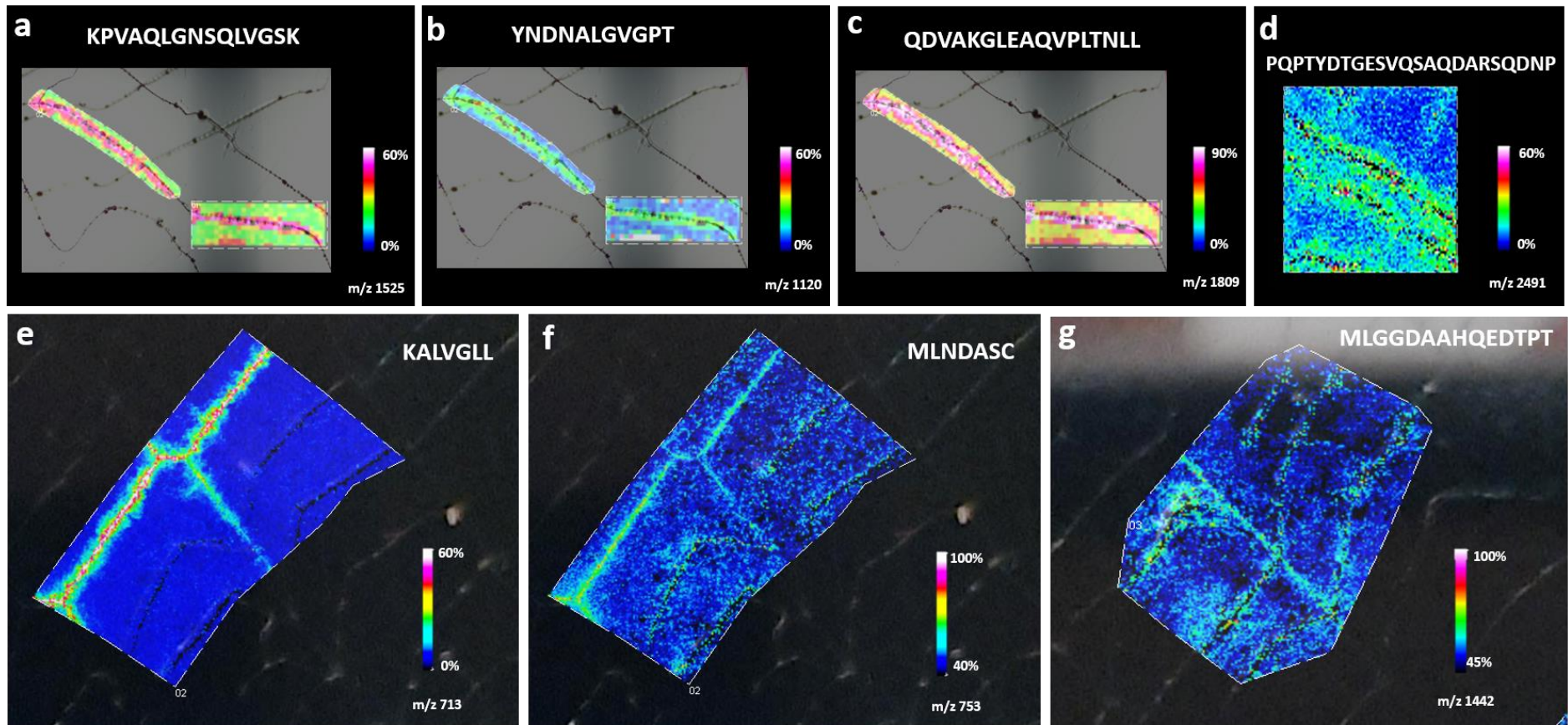
**Figura 62.** Sequências de peptídeos oriundos da teia da aranha *T. plumipes* que se apresentaram semelhantes a peptídeos previamente identificados como tóxicos na teia da aranha *T. clavipes*. Imagem da distribuição do peptídeo **a)**Trichonephiline-19: DDAHAADKLL, m/z: 1139; **b)**Trichonephiline-16: SLFDDAAAH, m/z: 945; **c)**Trichonephiline-20: MDDAAHAADQL, m/z: 1172 e **d)**Trichonephiline-17: LFDDAAHAAD, m/z: 1044. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma  $([M+H]^+)$ .

Da mesma forma, embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. plumipes* sejam conservadas a as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. clavipes*, isso não significa que esses peptídeos exercerão a mesma função. Portanto, no futuro será necessário realizar ensaios de inseto-toxicidade para avaliar se essas sequências de peptídeos apresentarão efeito tóxico.

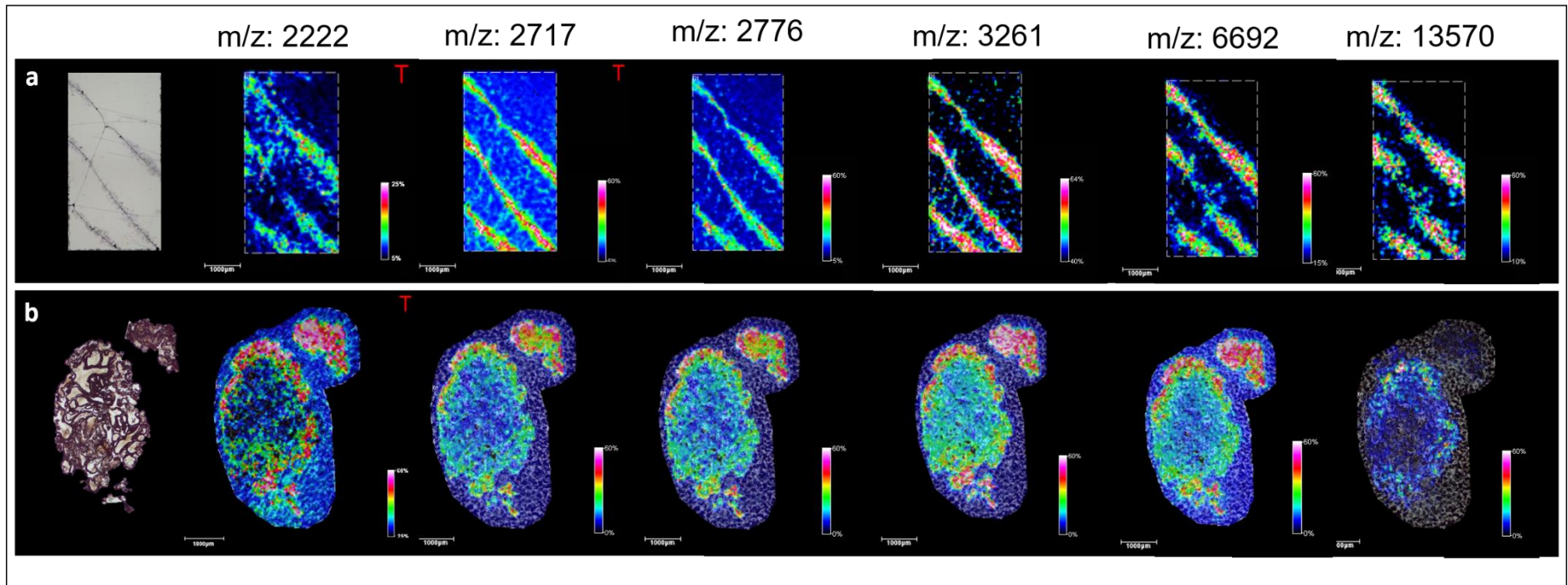
A maioria das identificações obtidas por blast foram proteínas hipotéticas ou não caracterizadas (Trichonephiline-14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 - tabela 14); a distribuição destes peptídeos ao longo dos fios da teia estão representados na figura 63.

Por fim, a figura 64 mostra 7 valores de m/z que estão presentes na glândula agregada, e também na seda da teia. Esses resultados estão evidenciando que esses peptídeos são produzidos por essa glândula e posteriormente secretados na seda da teia; eles são: m/z: 2222, m/z: 2717, m/z: 2776, m/z: 3261, m/z: 6692 e m/z: 13570.

Finalmente foi também comparado os valores m/z (carga +1) oriundos da aranha *T. plumipes*, com os valores de massas de peptídeos identificadas na seda da teia ou glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes* (resultados obtidos no capítulo 2). Dessa forma, foi encontrada a sequência peptídica STGGYGGKAGAGGGGLGGYGGGAANDHG com massa de 2221 Da, previamente obtida na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* e identificada por *Blast* como *major ampullate spidroin 1, partial* (código de acesso: ADE74592.1). Esta sequência é oriunda da análise de peptídeos entre 3-10 kDa os quais foram submetidos a digestão por tripsina).



**Figura 63. Sequências peptídicas não caracterizadas identificadas na seda da teia da aranha *T. plumipes*.** Imagem da distribuição do peptídeo **a)** Trichonephiline-22: KPVAQLGNSQLVGSK, m/z: 1525; **b)** Trichonephiline-18: YNDNALGVGPT, m/z: 1120; **c)** Trichonephiline-23 QDVAKGLEAQVPLTNLL, m/z: 1809; **d)** Trichonephiline-24: PQPTYDTGESVQSAQDARSQDNP, m/z: 2491; **e)** Trichonephiline-14: KALVGLL, m/z: 713; **f)** Trichonephiline-15: MLNDASC, m/z: 753 e **g)** Trichonephiline-21: MLGGDAAHQEDTPT, m/z: 1442. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pelas cores azul/preto. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma  $[M+H]^+$ .



**Figura 64.** Valores de m/z das sequências de peptídeos que foram detectados na seda da teia (a) e também na glândula agregada da aranha *T. plumipes* (b), evidenciando que são produzidos por esta glândula e subsequentemente secretados na teia de seda. A alta intensidade é representada pelas cores vermelho/rosa; e a baixa intensidade representada pela cor azul/preta. Essas imagens foram geradas a partir da seleção dos valores de m/z de cada molécula na forma  $([M+H]^+)$ .

## 5. CONCLUSÃO

Esta foi a primeira vez que foi realizada a análise MALDI-Imaging da seda da teia da aranha *Trichonephila plumipes*, a qual evidenciou que a distribuição dos peptídeos na teia ocorre de forma heterogênea. Foram investigadas as distribuições de 20 peptídeos sobre os fios de seda e também em cortes da glândula agregada, sendo que 6 peptídeos foram compartilhados por essas amostras.

Além disso, através de análise de sequenciamento *de novo* foi possível determinar 11 sequências primárias dos 20 peptídeos detectados. Por fim, quatro sequências peptídicas denominadas de Trichonephiline-16, -17, -19 e -20 oriundas da teia da aranha *T. plumipes* que se mostraram similares a duas sequências dos peptídeos Trichonephiline-1 e -2 previamente identificados como “semelhantes a toxinas” na teia de aranha de *T. clavipes*. Embora as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. plumipes* sejam conservadas as sequências de peptídeos da seda da teia da *T. clavipes*, isso não significa que esses peptídeos exercerão a mesma função. Em estudos futuros será necessário sintetizar as sequências primárias desses peptídeos oriundos da seda da *T. plumipes* e realizar ensaios de inseto-toxicidade para avaliar o efeito tóxico dos mesmos.

Portanto, os resultados deste capítulo contribuíram para um melhor entendimento sobre a distribuição espacial de alguns peptídeos nas gotículas depositadas sobre a teia; além de também corroborar com a hipótese de que a teia não é apenas uma ferramenta simples e passiva para a captura mecânica de presas, mas sim uma arquitetura naturalmente sofisticada que desempenha um papel ativo durante a captura de suas presas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. E. et al. Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. **J. Comp. Physiol.** v. 164, n.3, 1989.

ADAMS, M.E. et al. Novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 861–867, 1990.

ADAMS, M. E. Agatoxins: Ion channel specific toxins from the american funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 509–525, 2004.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos Da Biologia Celular**. 3. ed. Porto Alegre, 2012.

ALMAAYTAH A AND ALBALAS Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**. v. 51, p. 35-45, 2014.

ALMEIDA, M. L. DE. Estabilidade de emulsões de água-em-óleo na presença de campo elétrico externo. **Ufrj**, p. 103, 2014.

ATKINSON, P. W.; BROWN, W. V.; GILBY, A. R. Phenolic compounds from insect cuticle: Identification of some lipid antioxidants. **Insect Biochemistry**, v. 3, n. 11, p. 309–315, 1973.

BAE, N. et al. Peptide toxin glacontryphan-M is present in the wings of the butterfly *Hebomoia glaucippe* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 44, p. 17920–17924, 2012.

BAI, S. et al. Biocatalytic Self-Assembly of Nanostructured Peptide Microparticles using Droplet Microfluidics. **Small**, v. 10, p. 285–293, 2014.

BATISTA, C.M. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43 p. 167-178, 2007.

BECKWITT, R. AND ARCIDIACONO, S. Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (spidroin) from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). **J Biol Chem**, v. 9, p. 6661-6663, 1994.

BELEBONI, R. et al. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. **Eur J Pharmacol**, v. 493(1-3). p. 1-17, 2004.

BENDE, N. S. et al. A distinct sodium channel voltage-sensor locus determines insect selectivity of the spider toxin Dc1a. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

BENDE, N. S. et al. A distinct sodium channel voltage-sensor locus determines insect selectivity of the spider toxin Dc1a. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

BETTINI, S. **Arthropod Venoms**. 1.ed. New York. p. 87-98, 1978.

- BINFORD, G.J. et al. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. **Mol. Biol. Evol.**, v. 26, p. 547-566, 2009.
- BILLEN, J.; NOLL, F. B. Morphology of Richards' gland in the wasp *Metapolybia docilis*. *Sociobiology*, v. 58, n. 1, p. 251–256, 2011.
- BITTENCOURT, D. et al. Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 2360–2380, 2012.
- BLACKLEDGE, T.A., et al. Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, n. 13, p. 5229–5234, 2009.
- BLAMIRE, J. S. et al. Physicochemical Property Variation in Spider Silk: Ecology, Evolution, and Synthetic Production. **Annu. Rev. Entomol.** v.62, p.443–60, 2017.
- BLIGH, E.G. AND DYER, W. J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 1959.
- BOBRIE, A. et al. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. **Traffic**, v. 12, n. 12, p. 1659–1668, 2011.
- BOSMANS, F. et al. Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. **Mol. Pharmacol.** v. 69, p. 419–429, 2006.
- BRECI, L.A. et al. Cleavage N-Terminal to Proline: Analysis of a Database of Peptide Tandem Mass Spectra. **Anal. Chem.**, United States, v. 75, p. 1963-1971, 2003.
- CAI, H. et al. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. **Dev. Cell.** v. 12, p. 671–682, 2007.
- CANDIDO-FERREIRA, I. L. et al. Evidence of an antimicrobial peptide signature encrypted in HECT E3 ubiquitin ligases. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–14, 2017.
- 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.
- CAPRIOLI R.M. et al. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Anal Chem.** v. 69, p. 4751–4760, 1997.
- CARDOSO, F.C. et al. Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels. **Toxicon**. v. 41, p. 755–763, 2003.
- CASEWELL, N.R. et al. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends. Ecol. Evol.**, v. 28, p. 219-229, 2013.

- CHEN, Q. et al. Silk nanofibers as robust and versatile emulsifiers. **Applied materials and interfaces**. v.9, p. 35693-25700, 2017.
- CHIA, B. S. et al. Advances in exosome quantification techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 93–106, 2017.
- COCUCCI, E. et al. Shedding macrovesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol.**, v. 19, p. 43-51, 2009.
- COMSTOCK, J. H. **The spider book**. 4<sup>a</sup> ed., London, Cornell University Press, 1975.
- CORDEIRO MDo, N. et al. Purification and amino acid sequences of six tx3 type neurotoxins from the venom of the brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (keys). **Toxicon**. v. 31, p. 35–42, 1993.
- CORZO, G. et al. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Letters**, v. 547, n. 1–3, p. 43–50, 2003.
- COSTA, P. P. *Gibellula* spp. Associadas a aranhas da mata do paraíso, Viçosa-MG. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- DE OLIVEIRA, K. M. et al. Perspectives for the application of voltage-dependent calcium channels blockers conotoxin in spinal cord injury. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 501–509, 2014.
- DE SOUZA, C. L. **Perfilagem fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da aranha *Nephila clavipes***. [s.l.] UNESP, 2021.
- DOLEY, R. et al. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. **BMC Evol Biol.**, v. 9, p. 146, 2009.
- DONG, Z. et al. Comparative Proteomics Reveal Diverse Functions and Dynamic Changes of *Bombyx mori* Silk Proteins Spun from Different Development Stages. **J. Proteome Res.** v. 12, p. 5213–5222, 2013.
- 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.

EISNER, T. et al. Secretions of Opiliones, whip-scorpions and pseudoscorpions. In **Arthropod Venoms**; Bettini, S., Ed.; Spriner-Verlag: Berlin, Germany, p 972, 1978.

ELICES, M. et al. The hidden link between supercontraction and mechanical behavior of spider silks. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, v. 4, p. 658–669, 2011.

ESPINOSA, L.; FRANCO, S.; CHAUZAT, M. P. Could *Vespa velutina nigrithorax* be included in the World Organisation for Animal Health list of diseases, infections and infestations? **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 38, n. 3, p. 851–862, 2019.

ESTEVEES, F. G. et al. Using a proteometabolomic approach to investigate the role of Dufour's gland in pheromone biosynthesis in the social wasp *Polybia paulista*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 122–130, 2017.

ESTEVEES, F. G. et al. Revealing the Venomous Secrets of the Spider's Web. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 8, p. 3044–3059, 2020.

ESTEVEES, 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.

FALKNER, J. A. et al. Validated MALDI-TOF/TOF Mass Spectra for Protein Standards. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 5, p. 850–855, 2007.

Fletcher P. L. et al. Vesicle associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **J. Biol. Chem.** v.5, p. 7405-16, 2010.

FLORCZAK, A. et al. Functionalized spider silk spheres as drug carriers for targeted cancer therapy. **BioMaccromolecules**, v. 15(8), p. 2971-2981, 2014.

FOONG, C. P. et al. A marine photosynthetic microbial cell factory as a platform for spider silk production. *Communications Biology*, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2020.

FRY, B.G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584-588, 2006.

GREMSKI L.H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91-120, 2014.

HANEY, R.A. et al. Dramatic expansion of the black widow toxin arsenal uncovered by multi-tissue transcriptomics and venom proteomics. **BMC Genomics**, v. 15, p. 366, 2014.

HARRIS F. et al. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Curr. Protein Pept. Sci.** v. 10, p. 585–606, 2009.

HARVEY J. A. et al. Methylenedioxyamphetamine: neurotoxic effects on serotonergic projections to brainstem nuclei in the rat. **Brain Res**, v. 619 (1-2), p. 1-14, 1993.

HARVEY, M. S.; AUSTIN, A. D.; ADAMS, M. The systematics and biology of the spider genus *Nephila* (Araneae:Nephilidae) in the Australasian region. **Invertebrate Systematics**, v. 21, n. 5, p. 407–451, 2007.

HERZIG, V. et al. Arachno Server 2.0, an updated online resource for spidertoxin sequences and structures. **Nucleic Acids Res**, v. 39, p. 653–657, 2011.

HIGGINS, L. E. et al. Variation in the chemical composition of orb webs built by the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae). **Journal of Arachnology**, v. 29, n. 1, p. 82–94, 2001.

HOU, Y. et al. Studies on middle and posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*) using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 37, p. 486-496, 2007.

HUMENIK, M.; SCHEIBEL, T.; SMITH, A. **Spider silk: Understanding the structure-function relationship of a natural fiber**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 103

JAIN, D. et al. Composition and Function of Spider Glues Maintained during the Evolution of Cobwebs. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 10, p. 3373–3380, 2015.

JOHNSON, D. et al. Systematics and evolution of the genus *Torrubiela* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycological Research*, v. 113: p. 279–289, 2009.

JIA, S.-H. et al. Proteomic Analysis of Silk Gland Programmed Cell Death during Metamorphosis of the Silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 3003-3010, 2007.

JIANG, L. et al. Molecular diversification based on analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. **Toxicon** v. 51, p. 1479–1489, 2008.

JIN, L. et al. An insecticidal toxin from *Nephila clavata* spider venom. **Amino Acids**, v. 49, n. 7, p. 1237–1245, 2017.

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.

KALIA, J. et al. From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function **J. Mol. Biol.** v. 427, p. 158–175, 2014.

KAMADA, A. et al. Controlled self-assembly of plant proteins into high-performance multifunctional nanostructured films. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021.

KANZOK, S. M. ET al. Substitution of the thioredoxin system for the glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 291, p. 643–646, 2001.

KEERTHIKUMAR, S. et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 688–692, 2016.

KLINT, J. K. et al. Seven novel modulators of the analgesic target NaV1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 10, p. 2445–2458, 2015.

KLUGE, J. A. et al. Spider silks and their applications. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 244–251, 2008.

KING, G.F. et al. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. **Annu. Rev. Entomol.** v. 58, p. 475–496, 2013.

KUNTNER, M. et al. Phylogeny of extant nephilid orb-weaving spiders (Araneae, Nephilidae): Testing morphological and ethological homologies. **Cladistics**, v. 24, n. 2, p. 147–217, 2008.

KUNTNER, M. et al. Golden Orbweavers Ignore Biological Rules: Phylogenomic and Comparative Analyses Unravel a Complex Evolution of Sexual Size Dimorphism. **Systematic Biology**, v. 68, n. 4, p. 555–572, 2019.

LANGELLOTTO, G. A. et al. Responses of invertebrate natural enemies to complex-structured habitats: a meta-analytical synthesis. **Oecologia**. v. 139, p. 1–10, 2004.

LEE, S. S. et al. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p. 641–49, 1981.

LEWIS, R.J. et al. Novel  $\omega$ -conotoxins from conus catus discriminate among neuronal calcium channel subtypes. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 35335–35344, 2000.

LEWIS, R.J. et al. Conus venom peptide pharmacology. **Pharmacol. Rev.** v. 64, p. 259–298, 2012.

LEFEVRE, T. et al. Malaria Plasmodium agent induces alteration in the head proteome of their Anopheles mosquito host. **Proteomics**, v. 7, n. 11, p. 1908–1915, 2007.

LI, R. et al. Combined proteomics and transcriptomics identifies sting-related toxins of jellyfish *Cyanea nozakii*. **Journal of Proteomics**, v. 148, p. 57–64, 2016.

LISTA, S. et al. Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 101–102, n. 1, p. 1–17, 2013.

MANZOLI-PALMA, M.F.; GOBBI, N.; PALMA, M.S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 9(2):174-185, 2003.

MARQUES, M. R. et al. Structure determination of a tetrahydro- $\beta$ -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.

MARTIN, J. F. Secondary metabolites. In: KIGHORN, J. R.; TURNER, G. (Ed.). Applied molecular genetics of filamentous fungi. London: Blackie Academic and Professional, p. 214-252, 1992.

MIKESH, L. M. et al. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 12, p. 1811–1822, 2006.

MITCHELL WELLS, J.; MCLUCKEY, S. A. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. **Methods in Enzymology**, v. 402, n. 1993, p. 148–185, 2005.

MÜNCHBACH, M. et al. Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 1, p. 39–48, 1999.

MOURAO, C.B. et al. Characterization of a novel peptide toxin from *Acanthoscurria paulensis* spider venom: a distinct cysteine assignment to the HWTX-II family. **Biochemistry**, v. 52., p. 2440–2452, 2013.

MOZAFARI, M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v.10, p.711-719, 2005.

MORGENSTERN D. et al. The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. **Toxicon**, v. 57, p. 695–703, 2011.

MUKHERJEE, A. K. et al. Orally active acaricidal peptide toxins from spider venom. **Toxicon**, v. 47, n. 2, p. 182–187, 2006.

MURRAY, J. K. et al. Engineering potent and selective analogues of GpTx-1, a tarantula venom peptide antagonist of the NaV1.7 sodium channel. **J. Med. Chem.** v. 58, p. 2299–2314, 2015.

NEWCOMB, R. et al. Selective peptide antagonist of the class e calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. **Biochemistry**, v. 37, p. 15353–15362, 1998.

OLIVEIRA, A. K. Análise dos elementos estruturais de metaloproteínas das classes P-I e P-III do veneno de *Bothrops jararaca* importantes para suas interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular. 2009.

OLIVEIRA, L. C. et al. Beta/delta-prit1, a highly insecticidal toxin from the venom of the brazilian spider *Phoneutria reidyi* (f.O. Pickard-cambridge, 1897). **Toxicon**, v. 104, p. 73–82, 2015.

ONO, S. et al. Characterization of voltage-dependent calcium channel blocking peptides from the venom of the tarantula *Grammostola rosea*. **Toxicon** v. 58, p. 265–276, 2011.

PAIVA, A. L. et al. Differential effects of the recombinant toxin pntx4(5–5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. **Biochimie**, v. 121, p. 326–335, 2016.

PALMA, M. S. and NAKAJIMA, T. A Natural Combinatorial Chemistry Strategy in Acylpolyamine Toxins From Nephilinae Orb-Web Spiders. **Toxin Rev.**, v. 24, p. 209–234, 2005.

PATHAN, M. et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**, v. 15, n. 15, p. 2597–2601, 2015.

PLATNICK, N. I. The world spider catalog., version 11.0. American Museum of Natural History. Disponível em:  
<<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/COUNTS.html>>. Acessado em: 4 dez. 2014.

PENG, K. et al. Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. **J. Biol. Chem.** v. 277, p.47564–47571, 2002.

RAO, S. K. et al. Identification of snares involved in synaptotagmin vii-regulated lysosomal exocytosis. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 20471–20479, 2004.

RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RICHARDSON, M. et al. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 173–187, 2006.

RISING, A. et al. Spider silk proteins mechanical property and gene sequence. **Zoolog. Sci.**, v. 22, p. 273-81, 2005.

RISING, A. et al. Major ampullate spidroins from *euprosthenops australis*: multiplicity at protein, mRNA and gene levels. **Insect Mol Biol.**, v. 16, p. 551-561, 2007.

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.

SAHNI, V.; BLACKLEDGE, T. A.; DHINOJWALA, A. Changes in the adhesive properties of spider aggregate glue during the evolution of cobwebs. **Scientific Reports**, v. 1, p. 1–8, 2011.

SACHKOVA, M.Y. et al. Structure of the yellow sac spider *Cheiracanthium punctorium* genes provides clues to evolution of insecticidal two-domain knottin toxins. **Insect Molecular Biology**, v. 23, p. 527-538, 2014.

SAIDEMBERG, D. M. Análise comparativa do secretoma de componentes de baixas massas moleculares dos venenos de vespas sociais pela abordagem de “footprinting”. Relatório FAPESP Pós-Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

SAHNI, V.; BLACKLEDGE, T. A.; DHINOJWALA, A. Changes in the adhesive properties of spider aggregate glue during the evolution of cobwebs. **Scientific Reports**, v. 1, p. 1–8, 2011.

SALLES, H. C. Estratégias químicas da teia de aranha *Nephila clavipes* (LINNAEUS, 1767) usadas para captura de presas. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

SALLES, H. C. et al. The venomous secrets of the web droplets from the viscid spiral of the orb-weaver spider *Nephila clavipes* (araneau, tetragnatidae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 3, n. 7, p. 727–741, 2006.

SANGGAARD, K. W. et al. Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. **Nature Communications**, v. 5, n. May, 2014.

SAVINA, A. et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. **Traffic**. v. 6, p. 131–143, 2005.

SCHAUER, N., et al. Discrimination of aerobic endospore-forming bacteria via electrospray ionization mass spectrometry of whole cell suspensions. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 4134–4144, 2001.

SCHULZ-KNAPPE, P., et al. Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. **J Chromatogr. A**, Netherlands, v. 776, p. 125-132, 1977.

SCHMALHOFER, W. A. et al. ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. **Mol. Pharmacol.** v. 74, p. 1476–1484, 2008.

SCHROEDER C.I. et al. Chemical synthesis, 3D structure, and ASIC binding site of the toxin mambalgins-2. **Angew. Chem. Int. Ed.** v. 53, p. 1017–1020, 2014.

SCHULZ, S. Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*. **Lipids**, v. 36, n. 6, p. 637–647, 2001.

SELDEN, P. A.; SHEAR, W. A.; SUTTON, M. D. Fossil evidence for the origin of spider spinnerets, and a proposed arachnid order. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 52, p. 20781–20785, 2008.

- SENSENG, A.; AGNARSSON, I.; BLACKLEDGE, T. A. Behavioural and biomaterial coevolution in spider orb webs. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, n. 9, p. 1839–1856, 2010.
- SFORÇA, M. L. et al. How C-Terminal Carboxyamidation Alters the Biological Activity of Peptides from the Venom of the Eumenine Solitary Wasp. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5608–5617, 2004.
- SHCHERBATKO, A. et al. Engineering highly potent and selective microproteins against Nav1.7 sodium channel for treatment of pain. **J. Biol. Chem.** v. 291, p. 13974–13986, 2016.
- SOUSA S. R. et al. Venom Peptides as a Rich Source of Cav2.2 Channel Blockers **Toxins**, v. 5, p. 286-314, 2013.
- SPONNER, A. et al. Characterization of the protein components of Nephila clavipes dragline silk. **Biochemistry**, v. 44, p. 4727- 4736, 2005.
- SUN, B. et al. Metabonomics study of the effects of pretreatment with glycyrrhetic acid on mesaconitine-induced toxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 839–846, 2014.
- SYKA, J. E. P. et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, United States, v. 101, p. 9528–9533, 2004.
- TAN, N. H.; Ponnudurai, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comp Biochem Physiol C**. v.103(2), p.299-302, 1992.
- TERBORGH, J., et al. Ecological meltdown in predator-free forest fragments. **Science**, v. 294, p. 1923–1926, 2001.
- TEULÉ, F. et al. Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 3, p. 923–928, 2012.
- UEBERHEIDE B.M. et al. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. **PNAS**, 106(17):6910-6915, 2009.
- VADER, P. et al. Extracellular vesicles: Emerging targets for cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**. v. 20:7 p. 385–393, 2014.
- VASANTHAVADA, K. et al. Spider glue roteins have distinct architectures compared with traditional spidroin family members. **J. Biol. Chem.** v. 287, p. 35986–35999, 2012.

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

VASSILEVSKI, A. A. et al. Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. **FEBS J**, v. 280. p. 6247–6261, 2013.

VIANNA, J. F. et al. Processo químico industrial de extração de óleo vegetal: um experimento de química geral. **Química Nova**, v. 22, 1999.

VETTER, I. et al. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids**, v. 40, p.15–28, 2011.

VIÊGAS, C. V. Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. Dissertação de Mestrado, p. 73, 2010.

VIEIRA, L.B. et al. Leftward shift in the voltage-dependence for Ca<sup>2+</sup> currents activation induced by a new toxin from *Phoneutria reidyi* (Araneae, Ctenidae) venom. **Cell. Mol. Neurobiol.** v. 27, p. 129–146, 2007.

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

VOLLRATH, F.; SELDEN, P. The role of behavior in the evolution of spiders, silks, and webs. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, p. 819–846, 2007.

VON MÜHLEN, C. et al. Nomenclatura na língua Portuguesa em cromatografia multidimensional abrangente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 682–687, 2007.

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.

WALTER A, et al. Characterisation of protein families in spider digestive fluids and their role in extra-oral digestion. **BMC Genomics**, v. 18, p. 600, 2017.

Walker, A. A. et al. Missiles of Mass Disruption: Composition and Glandular Origin of Venom Used as a Projectile Defensive Weapon by the Assassin Bug *Platymeris rhadamanthus*. **Toxins**, v. 11, p. 673, 2019.

WAN, H. et al. Molecular cloning and characterization of two peptide toxins from the spider *Araneus ventricosus*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, n. 1, p. 81–86, 2013.

WANG et al. The Spider Venom Peptide Lycosin-II Has Potent Antimicrobial Activity against Clinically Isolated Bacteria. **Toxins**, v. 8, p. 119, 2016.

- WANT, E. J., et al. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. **Anal. Chem.** v. 78, p. 743-752, 2006.
- WHAITE, A. D. et al. Major ampullate silk gland transcriptomes and fibre proteomes of the golden orbweavers, *Nephila plumipes* and *Nephila pilipes* (Araneae: Nephilidae). **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–22, 2018.
- WINDLEY, M.J. et al. Spider venom peptides as bioinsectides. **Toxins**, v. 4, p. 191-227, 2012.
- YAN, L. et al. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 2059-2066, 1998.
- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**. v. 4 p. 1–60, 2015.
- YARNOLD, J. E. et al. High resolution spatial mapping of brominated pyrrole-2-aminoimidazole alkaloids distributions in the marine sponge *Stylissa flabellata* via MALDI-mass spectrometry imaging. **Mol. Biosyst.** v. 8, p. 49–59, 2012.
- YAZAWA, K. et al. <sup>13</sup>C solid state NMR study of the <sup>13</sup>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(6), p. 347-54, 2011.
- YI, Q. et al. Shotgun proteomic analysis of the *Bombix mori* anterior silk gland: An insight into the biosynthetic fiber spinning process. **Proteomics**. v. 13(17), p. 2657-63, 2013.
- XU, D.; WANG, X. Transcriptome analysis to understand the toxicity of *Latrodectus tredecimguttatus* eggs. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 1–23, 2016.
- ZHANG, P. F. et al. Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. **Toxicon**, v. 42, p. 15–20, 2003.
- ZHANG, P.B. et al. Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. **Proteomics** v. 6, p. 2586-2599, 2006.
- ZHANG, S. et al. A novel property of spider silk: chemical defence against ants. **Proc. R. Soc. B.**, v. 279, p. 1824–1830, 2011.
- ZHANG, S. et al. A novel property of spider silk: Chemical defence against ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, p. 1824–1830, 2012.
- ZHAO, Y. J. et al. Analysis of transcriptomes of three orb-web spider species reveals gene profiles involved in silk and toxin. **Insect Science**, v. 21, n. 6, p. 687–698, 2014.

ZHONG, Y. et al. A novel neurotoxin from venom of the Spider, *Brachypelma albopilosum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 2–7, 2014.

ZLOTKIN, E. et al. An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. **Arch. Biochem. Biophys.**, United States, v. 240, p. 877–887, 1985.