



Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Guilherme Dias Aranha

Seda de Aranha na Cultura 3D: Aplicação da Seda de *Trichonephila clavipes* como *scaffold*

Spider Silk in 3D Culture: Applications of the Silk of *Trichonephila clavipes* as *Scaffold*

São José dos Campos - SP

2025

**Guilherme Dias Aranha**

**Seda de Aranha na Cultura 3D: Aplicação da Seda de *Trichonephila clavipes* como *scaffold***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos - SP

2025

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

Aranha, Guilherme Dias  
Seda de Aranha na Cultura 3D : Aplicação da seda de  
Trichonephila clavipes como scaffold / Guilherme Dias Aranha;  
orientadora, Cristina Pacheco Soares. - São José dos Campos, SP,  
2025.  
70 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do  
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

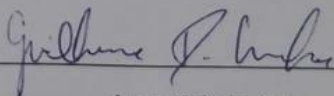
1. Engenharia Biomédica. 2. Trichonephila clavipes. 3.  
Biomaterial. 4. Cultura de Células. 5. Biofluorescência. I.  
Pacheco Soares, Cristina, orient. II. Universidade do Vale do  
Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III.  
Título.

Eu, Guilherme Dias Aranha, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em  
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o  
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado  
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de  
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e  
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 8 de Outubro de 2025.



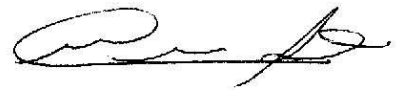

  
\_\_\_\_\_  
Autor(a) da Obra

Data da defesa: 29 / 08 / 2025

**GUILHERME DIAS ARANHA**

**“SEDA DE ARANHA NA CULTURA 3D: APLICAÇÃO DA SEDA DE *Trichonephila clavipes* COMO scaffold.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leandro José Raniero	
Prof.ª Dr.ª Cristina Pacheco Soares	
Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira Strixino	
Prof. Dr. Lucas de Paula Ramos - Unifal	

Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 29 de agosto de 2025.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por sempre guiar e abençoar todos os meus passos, tua sabedoria infinita e atemporal e presença constante em minha vida me mantiveram firme, mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço imensamente por ter criado estes animais tão belos e fascinantes que foram o foco do meu trabalho, as aranhas. Toda a tua criação é bela e perfeita, tudo evolui e todo o universo gira segundo tua vontade, é uma honra estar vivo para estudá-la e desvendar seus infinitos mistérios.

Agradeço aos meus pais, Gerson Aranha e Rosemary Rot Dias por me acompanharem a cada passo do caminho, me ajudando e incentivando a minha jornada na vida acadêmica, sempre presentes em todos os momentos da minha vida, dando conselhos, broncas necessárias e amor incondicional. Sua paciência, amor e a criação que me deram desde que eu nasci me trouxeram até aqui e me fizeram ser quem sou hoje. Todas as minhas conquistas e realizações são graças a vocês.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Cristina Pacheco Soares por ter me orientado e por ter acolhido o meu trabalho, por mais que inicialmente estivesse totalmente fora de sua linha de pesquisa. Aprendi lições muito importantes em seu laboratório e sob sua orientação que levarei pelo resto da vida. Obrigado por toda a paciência, ajuda e conselhos que me deu durante estes 2 anos de trabalho em conjunto.

Agradeço ao Dr. Antonio Domingos Brescovit e ao Instituto Butantan por terem permitido a visita técnica para a busca e coleta dos espécimes para a execução do trabalho.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço a minha namorada Nicole Paes de Carvalho, que conheci durante a minha pesquisa. Sua presença e seu apoio foram muito importantes para mim e tornaram os dias pesados e cansativos muito mais leves e divertidos. Sempre do meu lado, até durante as madrugadas, enquanto eu escrevia esta dissertação, me fazendo companhia.

## RESUMO

Os fios de seda produzidos pelas aranhas são um material que apresenta propriedades únicas como alta elasticidade e resistência a tensão, super-contração, fluorescência, entre outras, sendo então uma fonte de inspiração para a área de pesquisa e desenvolvimento, servindo tanto como matéria prima para trabalhos com o material, como meta para trabalhos que buscam produzir materiais artificiais com propriedades análogas ou superiores. Uma espécie de aranha amplamente utilizada em estudos envolvendo seda é a *Trichonephila clavipes*, que tece grandes teias orbiculares que apresentam uma coloração dourada e foi escolhida como foco principal deste trabalho. O presente estudo buscou avaliar a utilidade da seda produzida por essas aranhas para aplicação na cultura 3D de células de fibroblasto de camundongo como *scaffold* natural. Oito espécimes foram coletados da natureza e mantidos em laboratório para obtenção dos fios de seda, que durante o período de manutenção das aranhas, apresentou mudança de coloração de dourado para branco. Foram realizadas análises dos fios por microscopia eletrônica de varredura, EDS, microscopia de fluorescência, DSC e TG para avaliar essa variação. Após isso, células L929 foram cultivadas em meio contendo a seda esfoliada, objetivando a formação de esferoides, que foram avaliados no período de 5 dias e 10 dias para observar o impacto dessa interação. As culturas foram observadas pelos mesmos métodos de microscopia anteriormente aplicados aos fios. Como resultados, foi observada uma afinidade das células com os fragmentos de seda presentes no meio de cultura, com o material não só tendo as células aderidas a ele, mas sendo englobado e até certo ponto sendo absorvido pelos esferoides. Os esferoides, além de se ancorarem a seda, também incorporaram fluoróforos presentes no material, apresentando fluorescência ao serem observados sob o microscópio de fluorescência. Conclui-se que a seda de *T. clavipes* apresenta potencial como *scaffold* para a cultura de células bem como capacidade fluorescente que deve ser aplicada dentro da área de cultura de células e na área de engenharia biomédica.

**Palavras-chave:** *Trichonephila clavipes*, Seda de Aranha, Biomaterial, Cultura de Células, Engenharia Biomédica, Biofluorescência.

## ABSTRACT

The silk threads produced by spiders are a material with unique properties, such as high elasticity and tensile strength, supercontraction, fluorescence and others. As such, they serve as a source of inspiration for research and development, acting both as a raw material for direct experimentation and as a benchmark for the development of artificial materials with analogous or superior properties. One spider species widely used in silk-related studies is *Trichonephila clavipes*, which weaves large orb-shaped webs with a golden coloration and was chosen as the focus of this study. This study aimed to evaluate the usefulness of the silk produced by this species for application in the 3D culture of mouse fibroblast cells as a natural scaffold. Eight specimens were collected from the wild and maintained in the laboratory to obtain silk threads, which, during the maintenance period, exhibited a color change from gold to white. The threads were analyzed using scanning electron microscopy, EDS, fluorescence microscopy, DSC and TGA to assess this variation. Following this, L929 cells were cultured in a medium containing exfoliated silk, aiming to promote spheroid formation. These spheroids were evaluated after 5 and 10 days to assess the impact of the interaction. The cultures were examined using the same microscopy methods previously applied to the threads. As a result, the cells showed affinity for the silk fragments present in the culture medium, not only adhering to the material but also engulfing and, to some extent, absorbing it. In addition to anchoring onto the silk, the spheroids also incorporated fluorophores present in the material, displaying fluorescence when observed under a fluorescence microscope. It is concluded that *T. clavipes* silk presents strong potential as a scaffold for cell culture, as well as an inherent fluorescent capacity that should be further explored for application in both cell culture systems and biomedical engineering.

**Keywords:** *Trichonephila clavipes*, Spider Silk, Biomaterial, Cell Culture, Biomedical Engineering, Biofluorescence.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Trichonephila clavipes</i> durante alimentação. ....	18
Figura 2: Esquemática de tipos de seda de <i>Trichonephila clavipes</i> . ....	19
Figura 3: Ilustração da glândula ampulata maior. ....	20
Figura 4: Ilustração básica da composição da seda. ....	21
Figura 5: Ilustração das camadas da seda. ....	21
Figura 6: Quadro de aço inoxidável fiado com seda. ....	23
Figura 7: Ilustração do modelo de cultura com interface ar/líquido. ....	24
Figura 8: Esquema de semeadura de células com seda recombinante e formação em esferóides. ....	25
Figura 9: Diagrama de manutenção dos espécimes. ....	28
Figura 10: Diagrama de formação de esferóides com seda esfoliada. ....	32
Figura 11: Fotomicrografias de fluorescência da amostra dourada. A – Emissão em 528 nm; B – Emissão em 572 nm; C – Emissão em 461 nm; D – Sobreposição dos filtros com predominância da emissão verde. ....	35
Figura 12: Fotomicrografias de fluorescência da amostra branca. A – Emissão em 528 nm; B – Emissão em 572 nm; C – Emissão em 461 nm; D – Sobreposição dos filtros sem predominância específica. ....	36
Figura 13: Fotomicrografias de amostras de seda de <i>T. clavipes</i> . A – Amostra dourada, 1.65 K X; B – Amostra dourada, 580 X; C – Amostra branca, 1.65 K X; D – Amostra branca, 587 K X. ....	37
Figura 14: Espectros de FTIR das amostras dourada e branca. ....	39
Figura 15: Gráfico de TG da amostra dourada. ....	41
Figura 16: Gráfico de TG da amostra branca. ....	42
Figura 17: Gráfico de TG comparativo das sedas. ....	43
Figura 18: Gráfico de DSC da amostra dourada. ....	44
Figura 19: Gráfico de DSC da amostra branca. ....	45
Figura 20: Fotomicrografias obtidas por MEV mostrando os fragmentos de seda esfoliados. ....	46
Figura 21: Esferóides L929 Controle em 6 dias de incubação. ....	47
Figura 22: Esferóides L929 com seda esfoliada em 6 dias de incubação (Setas indicando filamentos). ....	48
Figura 23: Fotomicrografias de fluorescência esferoide-seda. A - Emissão em 528 nm; B – Emissão em 572 nm; C – Emissão em 461 nm; D – Sobreposição mostrando os filamentos dentro do esferoide. ....	49
Figura 24: Fotomicrografias de fluorescência esferoide-seda sobreposições. ....	50

- Figura 25: Fotomicrografias de fluorescência esferoide-seda integrados. A e B – Esferoides sem filtro; C e D – Esferoides com sobreposição.....51
- Figura 26: Fotomicrografia eletrônica dos esferoides grupo controle. A – 5 dias com magnificação 182 X; B – 5 dias com magnificação 959 X; C – 10 dias com magnificação 176 X; D – 10 dias com magnificação 786 X.....52
- Figura 27: Fotomicrografia eletrônica do grupo esferoides-seda. A – 5 dias com magnificação 967 X; B – 5 dias com magnificação 1.30 K X; C – 10 dias com magnificação 847 X; D – 10 dias com magnificação 1.23 K X.....53
- Figura 28: Comparação de tamanho dos grupos controle e esferoides-seda com magnificação em torno de 1 K X. A – Controle 5 dias (1.05 KX); B – Controle 10 dias (819 X); C – Esferoides-seda 5 dias (967 X); D – Esferoides-seda 10 dias (1.00 K X).....54
- Figura 29: Incorporação da seda pelos esferoides. A – Magnificação de 4.66 K X; B – Magnificação de 400 X.....55
- Figura 30: Interação das células com extensão de membranas sobre os fragmentos de seda. ....56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*T. clavipes*: *Trichonephila clavipes*

IP&D: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS: Espectroscopia por Energia Dispersiva

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

TG: Termogravimetria

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial

L929: Linhagem de Células de Fibroblastos de Camundongo

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

SFB: Soro Fetal Bovino

PBS: Solução Salina Tampão Fosfato

HMDS: Hexametildisilazano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
3.1	ESPÉCIE: <i>Trichonephila clavipes</i> E SUA SEDA	17
3.2	PROPRIEDADES DA SEDA DE ARANHA	22
3.3	APLICAÇÕES DA SEDA COMO BIOMATERIAL	22
3.4	MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE CULTURA CELULAR	24
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	27
4.1	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES	27
4.2	MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES	27
4.3	OBTENÇÃO DOS FIOS	28
4.4	ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS FIOS	29
4.5	ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	29
4.6	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DOS FIOS	29
4.7	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	30
4.8	ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	30
4.9	ESFOLIAÇÃO DOS FIOS	31
4.10	LINHAGEM CELULAR L929	31
4.11	PRODUÇÃO DE ESFERÓIDES	31
4.12	INTERAÇÃO CÉLULAS-TEIA	32
4.13	ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA CÉLULAS-TEIA	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	34
5.1	ANÁLISE DOS FIOS	34
5.1.1	Microscopia de fluorescência dos fios	34
5.1.2	Microscopia eletrônica de varredura dos fios	37

<b>5.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva dos fios</b> .....	38
<b>5.1.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier</b> .....	38
<b>5.1.5 Termogravimetria</b> .....	40
<b>5.1.6 Calorimetria exploratória diferencial</b> .....	43
<b>5.2 DESENVOLVIMENTO ESFERÓIDES-SEDA</b> .....	45
<b>5.2.1 Seda esfoliada</b> .....	45
<b>5.2.2 Esferóides controle</b> .....	46
<b>5.2.3 Esferóides-seda</b> .....	47
<b>5.3 ANÁLISE ESFERÓIDES-SEDA</b> .....	48
<b>5.3.1 Microscopia de fluorescência esferóides-seda</b> .....	48
<b>5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura esferóides-seda</b> .....	51
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63
<b>APÊNDICE A - COLETA DOS ESPÉCIMES E COMPORTAMENTO EM LABORATÓRIO</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Há séculos a seda produzida por aranhas vem sendo extensamente aplicada para o tratamento de doenças e ferimentos, tendo relatos de sua utilização pelos Gregos e Romanos antigos que a utilizavam para tratar diversos males, desde sua colocação em feridas abertas para acelerar a regeneração, remoção de verrugas envolvendo-as com seda e ateando fogo, tratamento de dentes cariados inserindo casulos, até mesmo para tratar dermatomicose e lepra (Newman; Newman, 1995). O material começou a ser estudado formalmente, com publicações científicas, por volta de 1710, quando suas propriedades biomédicas hemostáticas e cicatrizantes, além de suas características físicas relacionadas à resistência, já eram reconhecidas (Bon, 1710). Além disso, no século XVIII, a teia de aranha foi utilizada em oncologia cutânea para manter o medicamento fixado sobre lesões cancerosas (Newman; Newman, 1995). Na natureza, a seda produzida pelas aranhas é aplicada para diversos fins, como por exemplo para tecer suas teias, enrolar e aprisionar suas presas, proteger sua prole e até mesmo como uma linha salva-vidas para escapar de predadores e facilitar sua locomoção. Essa variedade de usos é muito maior do que a de outros animais que produzem seda como o bicho da seda (*Bombyx mori*) que utiliza sua seda para fazer casulos. A aranha possui diversas glândulas especializadas em seu abdômen para produzir uma grande variedade de fios que ela aplica em diferentes ocasiões (Römer; Scheibel, 2008). Aranhas que tecem teias orbiculares, que incluem os gêneros *Trichonephila* e *Araneus*, possuem sete tipos de glândulas produtoras de seda, glândula ampulata maior, ampulata menor, flageliforme, piriforme, cilíndrica, aciniforme e agregada (Bergmann *et al.*, 2022). A seda produzida por esses aracnídeos possui propriedades mecânicas únicas, tendo como exemplo sua resistência a tração maior que a do aço de médio carbono e igual ou maior que a do aço de alto carbono, além de elasticidade comparável à da borracha. Essas propriedades juntas tornam a seda de aranha um material natural com tenacidade duas a três vezes maior que a de materiais sintéticos como Nylon e Kevlar (Römer; Scheibel, 2008). Outra característica única desse material é sua capacidade de super-contracção, podendo se contrair até 60% de seu comprimento total ao ser molhado

como resultado do aumento da umidade relativa do ambiente, sendo este um processo reversível. Este processo ocorre por conta de três fenômenos: dissociação de ligações de hidrogênio intermoleculares induzida pela água, perda da orientação das cadeias ao ocorrer transição de um estado cristalino para borracha e o entumescimento devido a penetração das moléculas de água para dentro da seda (Cohen *et al.*, 2021).

As aranhas do gênero *Trichonephila*, vulgarmente conhecidas como aranhas-do-fio-de-ouro, são especialmente conhecidas por produzirem uma seda de coloração dourada e pelo dimorfismo sexual extremo onde as fêmeas adultas são maiores, com tamanho 11 vezes maior e peso 100 vezes maior do que os machos. Essas aranhas são encontradas por todo o mundo em regiões tropicais e subtropicais. As teias deste gênero de aranhas são muito resistentes e podem ser vistas capturando de grandes insetos até pequenos pássaros e morcegos (Platnick *et al.*, 2020).

As aranhas possuem vários compostos em sua hemolinfa chamados de fluoróforos, que permite que seu exoesqueleto e cerdas emitam fluorescência ao serem expostos a diferentes tipos de emissão de luz, emitindo em ondas diferentes da luz incidente. Esta propriedade está presente na maioria das espécies, que apresentam tipos específicos de fluoróforos cada (Andrews *et al.*, 2007). A fluorescência das aranhas é um fenômeno conhecido, mas pouco explorado, tendo-se registros de 1925 que relatam não só a fluorescência desses animais, mas também das teias que tecem, sendo observados sob a luz ultravioleta de uma lâmpada a vapor de quartzo-mercúrio, emitindo colorações variadas de espécie para espécie, de amarelo pálido, a verde e até azul (Lourenço *et al.*, 1988).

As técnicas de cultura de células aplicadas atualmente são principalmente divididas entre culturas 2D e 3D. A cultura 2D segue com um substrato bidimensional que permite às células crescerem e interagirem lateralmente, sendo boa para a cultura de células eucarióticas. No entanto, não simula a forma em que essas células se encontram dentro de um organismo vivo, interagindo com outras células num ambiente tridimensional. A cultura de células 3D providencia espaço para que as células cresçam de forma mais natural e permite adquirir resultados mais apropriados, como os esferóides.

Os esferóides, que constituem culturas celulares desenvolvidas em placas de baixa adesão, facilitam a formação de estruturas celulares que se agregam de forma coesa, alcançando assim uma morfologia esferoidal. Consequentemente, é imperativo

utilizar os modelos que correspondam de forma ideal aos requisitos de cultura de cada tipo específico de célula para produzir modelos que produzam resultados que reflitam com precisão seus análogos *in vivo* (Kumar *et al.*, 2023; Källén *et al.*, 2025). Uma linha celular frequentemente empregada é o clone NCTC 929 (L929), reconhecido por suas características vantajosas para a cultura, exibindo alta sensibilidade e é utilizado para ensaios de citotoxicidade, respostas antigênicas e adesão celular, além de demonstrar comportamento previsível e reprodutível. Essas linhas celulares são amplamente aplicadas no domínio da engenharia de tecidos para avaliar adesão, proliferação e biocompatibilidade. Na área médica, estudos vêm sendo feitos para utilizar os fios da seda da aranha como fios de sutura. Foi observado que, ao trançar os fios de diferentes formas, é possível obter diferentes curvas de estresse quando aplicado tração, que ao comparar com fios de sutura atualmente utilizados, apresenta maior capacidade de resistir a esforço contínuo, sendo então uma ótima alternativa para suturar tendões, que estão constantemente sob tensão (Hennecke *et al.*, 2013). Esses fios de seda apresentam a capacidade de estimular a regeneração celular, fenômeno observado ao utilizar o material como enxerto artificial reconectando nervos periféricos com lesões extensas. Após certo período, houve sinais de reparação nervosa, com axônios regenerados e bem mielinizados por células de Schwann endógenas, o que indica uma regeneração neural similar a um transplante de nervo autólogo (Radtke *et al.*, 2011).

Seguindo esse contexto, o presente trabalho procurou estudar a viabilidade da seda de aranha da espécie *Trichonephila clavipes* como *scaffold* em culturas 3D, utilizando esferoides de células da linhagem L929 de fibroblastos de camundongo. Desta forma podendo avaliar as interações dos esferoides com o material e analisar sua viabilidade como *scaffold* e outras propriedades que possam afetar a cultura e seu desenvolvimento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a utilização da seda de aranhas da espécie *Trichonephila clavipes* em cultura de células 3D e verificar seu potencial como biomaterial para ser aplicado em organismos vivos, observando seu impacto na cultura celular da linhagem L929.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter espécimes de *Trichonephila clavipes* na natureza e coletar suas teias *in situ* (produzidas no local de coleta/ na natureza);
- Coletar as teias *ex situ* (produzidas no laboratório/nos viveiros);
- Avaliar e comparar as diferenças entre as amostras de seda *in situ* (amostras douradas) e *ex situ* (amostras brancas) através de métodos de análise;
- Observar a propriedade fluorescente das sedas através da microscopia de fluorescência
- Realizar a análise estrutural das sedas através da microscopia eletrônica de varredura;
- Analisar a composição elementar das sedas através da espectroscopia por energia dispersiva;
- Analisar as ligações químicas das sedas através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier;
- Analisar a degradação térmica das sedas através da termogravimetria;
- Analisar a estabilidade térmica das sedas por meio da calorimetria exploratória diferencial;
- Processar as amostras de seda para serem introduzidas no meio de cultura celular;
- Introduzir a seda processada em culturas 3D na linha celular L929;
- Avaliar o impacto da interação células-seda na cultura de células L929 entre os períodos de 5 a 10 dias de cultura;
- Observar a interação células-seda através da microscopia de fluorescência;

- Observar a interação células-seda por meio da microscopia eletrônica de varredura.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

Este tópico apresenta a revisão bibliográfica em que este estudo se baseou, a fim de enfatizar a aplicabilidade da seda de aranha na cultura de células 3D e introduzir suas propriedades.

#### 3.1 ESPÉCIE: *Trichonephila clavipes* E SUA SEDA

O gênero *Trichonephila* está presente em quase todos os continentes, contendo mais de 20 espécies e sendo uma espécie de aranha presente principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Elas possuem algumas características únicas como sua seda de coloração dourada e o dimorfismo sexual extremo, onde em alguns casos as fêmeas são 11 vezes maiores e 100 vezes mais pesadas que os machos, com as fêmeas alcançando até 40 mm de comprimento do corpo. Suas teias são orbiculares e grandes, tendo sua porção de captura por volta de 1m de diâmetro com sedas de ancoragem ainda mais longas. Essas aranhas repousam no centro de suas teias esperando por presas serem interceptadas e fazem manutenção constante dela, sendo chamadas de teia semipermanente, onde as aranhas constroem a teia e ao longo do tempo reparam as partes que se deterioram (Platnick *et al.*, 2020).

A espécie *Trichonephila clavipes* (Fig. 1), é uma espécie presente por praticamente todo o continente americano, tendo populações da Argentina até os Estados Unidos da América (Bergmann *et al.*, 2022).

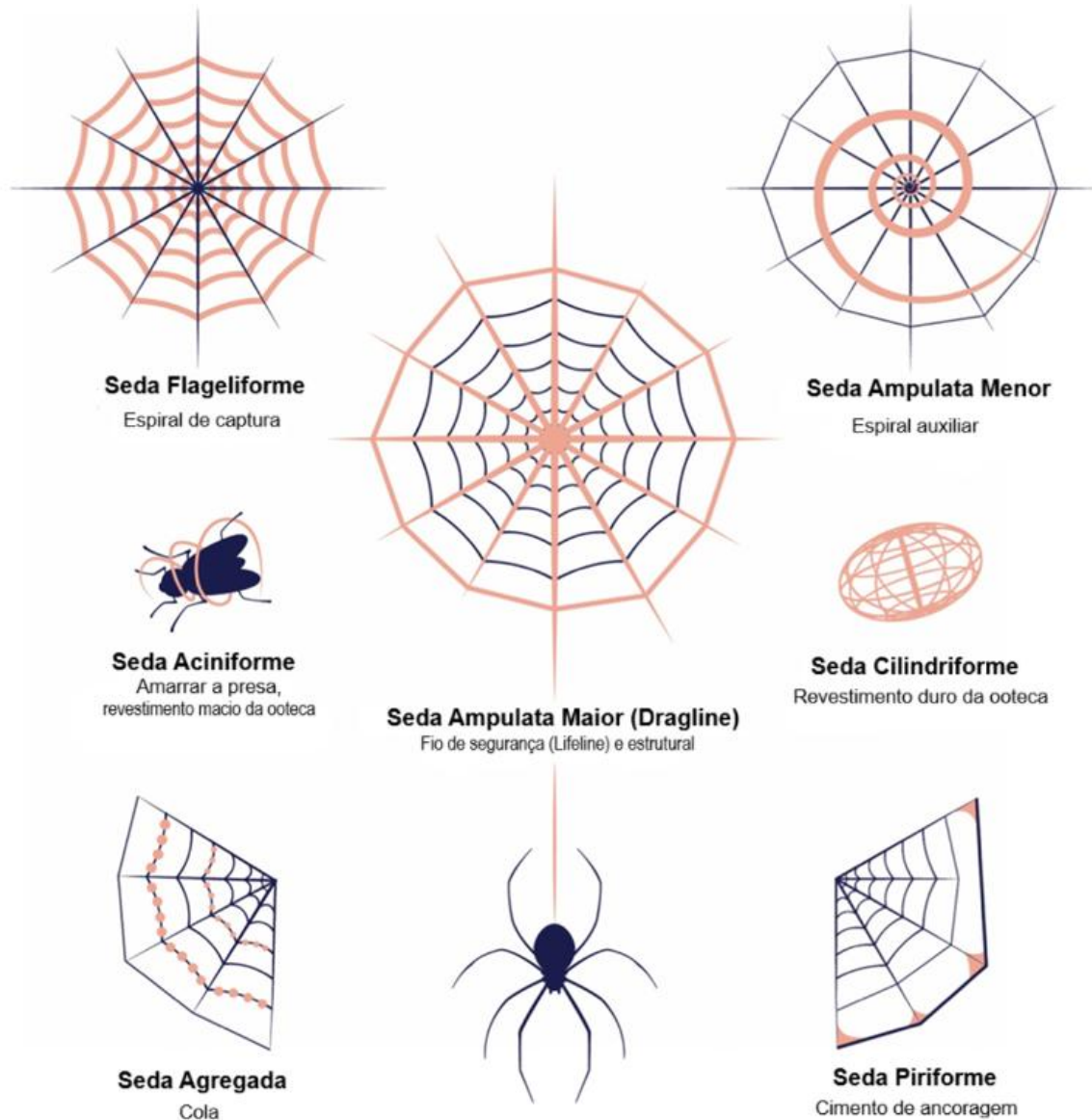
Figura 1: *Trichonephila clavipes* durante alimentação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo de produção da seda dessas aranhas ainda não é completamente compreendido, mas começa dentro de suas glândulas, das quais existem 7 e são utilizadas para diferentes fins (Fig. 2). Acredita-se que a formação nos dutos de seda ocorra devido a indução de tensão, mudanças de pH e gradiente iônico. As proteínas que compõem a seda são conhecidas como espidroínas e foram identificados 28 genes que codificam para uma diversa gama dessas proteínas (Bergmann *et al.*, 2022).

Figura 2: Esquemática de tipos de seda de *Trichonephila clavipes*.

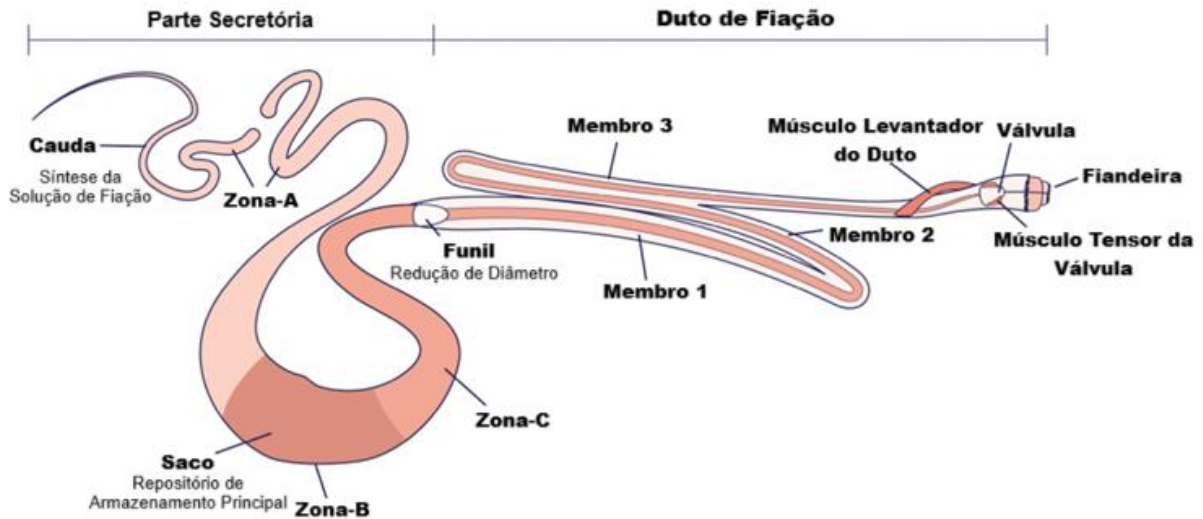


Fonte: Adaptado de *Bergmann et al. (2022)*.

A produção da seda começa na parte distal da cauda da glândula (Fig. 3), chamada de parte secretória, onde é produzida uma solução aquosa altamente viscosa rica em espidroínas. Essa solução é então secretada dentro do saco onde é armazenada em forma de uma solução cristalina altamente concentrada até o momento de serem tecidas, quando formam agregados moleculares longos e complexos durante seu fluxo lento através do saco. Após esse processo inicial, essa solução passa pelo resto do ducto recebendo outras camadas enquanto se

solidificam. Essas estruturas são ricas em folhas beta pregueadas, que têm sua formação favorecida por acidificação e alta tensão (Bergmann *et al.*, 2022).

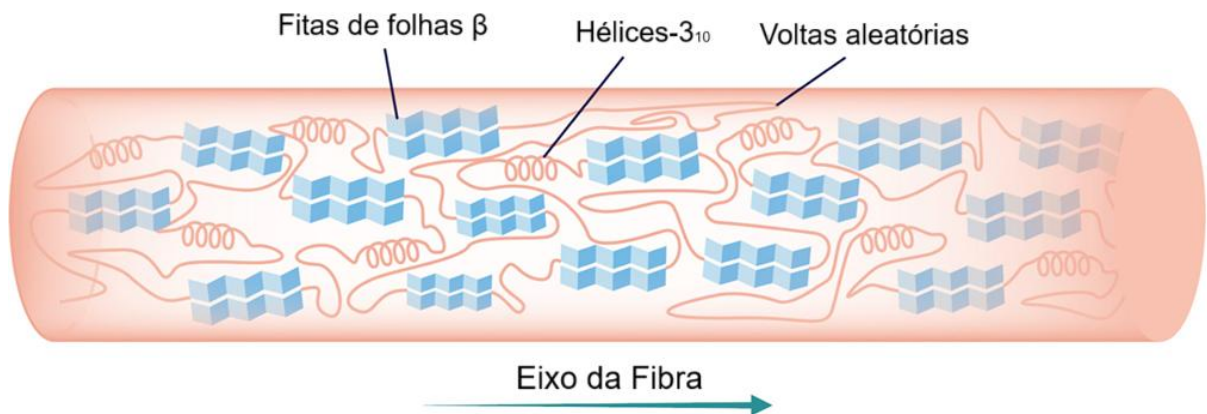
Figura 3: Ilustração da glândula ampulata maior.



Fonte: Adaptado de Bergmann *et al.*, (2022).

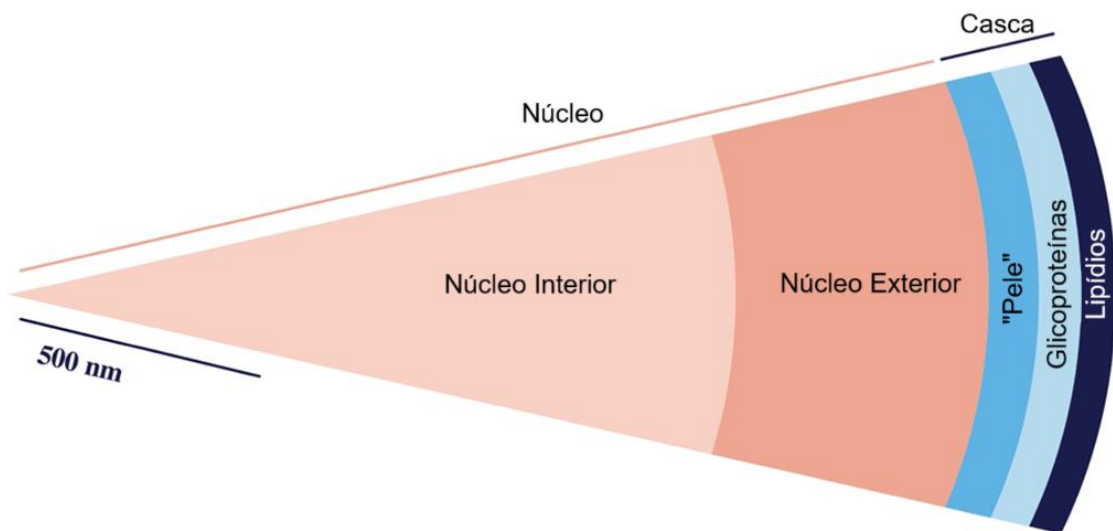
As proteínas que compõem o principal tipo de seda utilizada pelas aranhas são as espidroínas ampulatas maiores 1, 2, 3, 4 e 5 (MaSp1, 2, 3, 4 e 5), espidroínas ampulatas menores (MiSp) e flageliformes, que são compostas por cadeias de aminoácidos repetitivos, tendo as MaSp composta principalmente por trechos de polialanina (A)<sub>n</sub>, sequências repetidas de glicina-alanina (GA)<sub>n</sub>, partes ricas em glicina (GGX) onde o X pode ser ocupado por alanina, glutamina (Q), leucina (L) ou tirosina (Y) e a MaSp2 ainda introduz a presença de prolina (P). Essas sequências de (A)<sub>n</sub> e (GA)<sub>n</sub> formam aglomerados de fitas de folhas beta antiparalelas, as sequências repetidas de aminoácidos GGX formam estruturas Helicoidais-3<sub>10</sub> e as repetições de GPGXX ricas em prolina compõem regiões de dobras beta elásticas (Fig. 4). Assim sendo compostas as camadas internas da seda, sendo essas o núcleo interior e exterior, que então são recobertos por uma camada de “pele” composta por proteínas similares a espidroína ampulata menor (MiSp), seguida por uma camada de glicoproteínas e uma última exterior composta por lipídios (Fig. 5) (Bergmann *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2025).

Figura 4: Ilustração básica da composição da seda.



Fonte: Adaptado de *Bergmann et al. (2022)*.

Figura 5: Ilustração das camadas da seda.



Fonte: Adaptado de *Bergmann et al. (2022)*.

Em relação a fluorescência nas aranhas e de sua seda, não foram encontrados estudos anteriores que diretamente avaliassem essa propriedade em espécimes de *Trichonephila clavipes*, mas os estudos encontrados descrevem a fluorescência corporal em membros dentro da mesma família e gênero que pertencem. Sendo a família Araneidae com representantes: *Araneus diadematus*, *Araniella cucurbitina* e *Singa hamata*, além de um exemplar dentro do mesmo gênero, *Trichonephila madagascariensis*. Todos os exemplares mencionados apresentam fluorescência corporal e uma grande variedade de fluoróforos, além de a maioria apresentar

fluorescência na seda de suas ootecas. Todas essas espécies são próximas da *T. clavipes* e segundo os estudos, muitas outras espécies de aranhas apresentam fluorescência corporal, além dessa fluorescência ter evoluído separadamente em várias dessas espécies (Andrews *et al.*, 2007; Lourenço *et al.*, 1988).

### 3.2 PROPRIEDADES DA SEDA DE ARANHA

A seda que as aranhas tecem para produzir suas teias é um material que apresenta grande versatilidade e altamente desejáveis em materiais produzidos artificialmente para o uso em diversas áreas do conhecimento. Suas propriedades mecânicas permitem que tipos diferentes de seda apresentem características diferentes, como a seda flageliforme, que possui alta elasticidade podendo dissipar perfeitamente a energia de impacto de uma presa (Römer e Scheibel, 2008). Ao receber impacto de insetos voadores, a seda de aranha consegue transformar 65% da força cinética resultante em calor, minimizando o rebote e impedindo que a presa seja catapultada para longe (Bergmann *et al.*, 2022). A seda de aranha possui alta resistência térmica, conseguindo manter sua estabilidade até por volta de 230°C e se degradando progressivamente conforme o aumento de temperatura (Cunniff *et al.*, 1994). Outra propriedade importante do material é sua longevidade no ambiente natural. Através da limitação de acesso ao nitrogênio, a seda consegue prevenir o crescimento bacteriano em sua superfície, tendo um efeito bacteriostático que a permite persistir por muito mais tempo sem ser degradada na natureza (Zhang *et al.*, 2019).

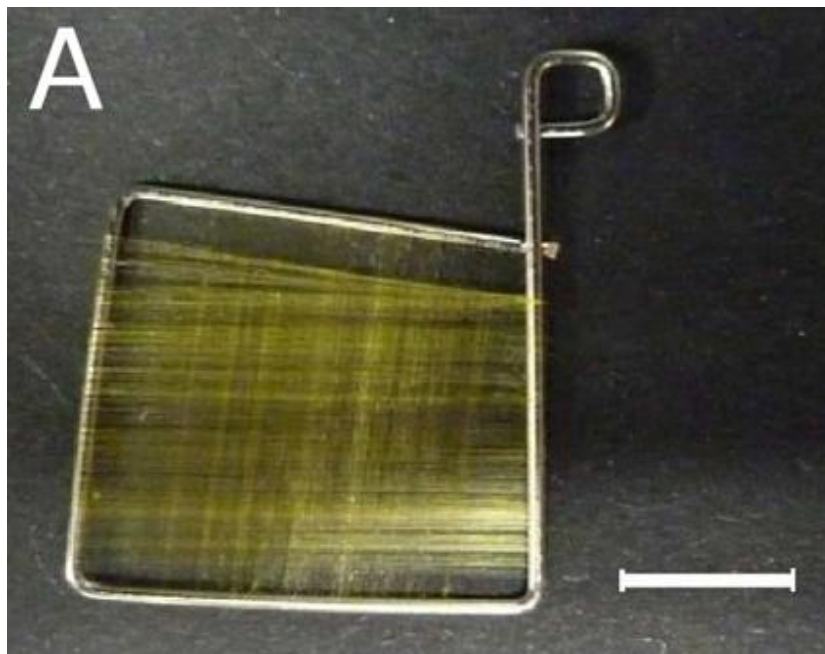
### 3.3 APLICAÇÕES DA SEDA COMO BIOMATERIAL

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de aplicar a seda de aranha como biomaterial, principalmente em enxertos (Allmeling *et al.*, 2006; Wendt *et al.*, 2011; Radtke *et al.*, 2011; Salehi *et al.* 2020; Kornfeld *et al.*, 2021). Por exemplo, um estudo utilizou seda de aranha para confeccionar um enxerto de nervo. Foram empregadas vênulas descelularizadas de porco, preenchidas com seda de aranha, nas quais foi injetada uma suspensão de células de Schwann humanas. As amostras foram cultivadas por uma semana para avaliação da viabilidade. Buscaram observar

a aderência das células à seda e as taxas de crescimento, além de possíveis efeitos tóxicos (Allmeling *et al.*, 2006).

Outra aplicação é como *scaffold*, um estudo utilizou a seda fiada diretamente das aranhas e envolveu de forma cruzada um quadro de aço inoxidável para observar o crescimento fibroblastos NIH/3T3 (Fig. 6). A parte do quadro de aço com seda foi totalmente submergida e buscaram analisar o crescimento das células e sua aderência na seda, tendo como pontos chave para observação o período de 3, 10 e 20 dias de incubação (Kuhbier *et al.*, 2010).

Figura 6: Quadro de aço inoxidável fiado com seda.

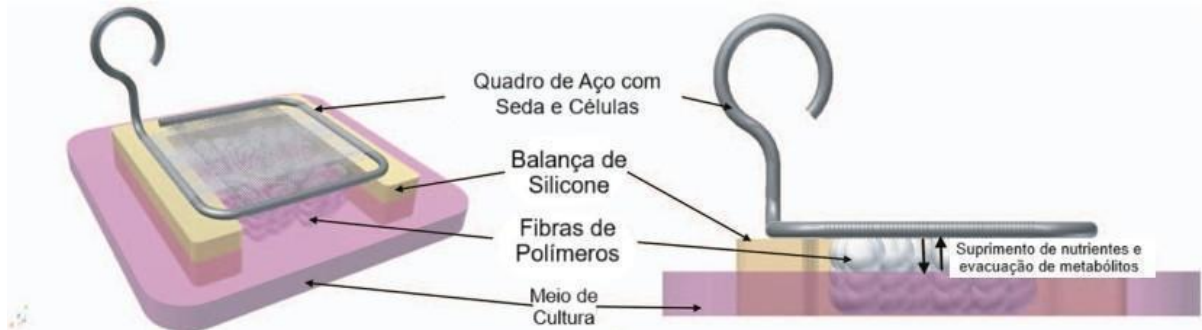


Fonte: Kuhbier *et al.* (2010).

O modelo anterior foi aperfeiçoado em outro estudo seguinte que utilizou o mesmo tipo de quadro de aço para a produção de pele artificial com dois tipos de linhagens de células diferentes e com exposição dupla ao meio e ao ar (Fig. 7). Esse modelo buscou permitir o suprimento de nutrientes e a eliminação de metabólitos através de difusão, e essa exposição dupla procurando estabelecer a formação de duas camadas distintas de pele, primeiro introduzindo as células MEF (derme) e depois introduzindo as células HaCaT (epiderme). Cada tipo celular se desenvolve em períodos diferentes, então buscaram aplicá-las de forma que crescessem igualmente

para atingir a estratificação. Planejaram introduzir o segundo tipo celular (HaCaT) após duas semanas do primeiro (MEF) e aguardar a confluência para avaliar o nível de estratificação (Wendt *et al.*, 2011).

Figura 7: Ilustração do modelo de cultura com interface ar/líquido.



Fonte: Adaptado de Wendt *et al.* (2011).

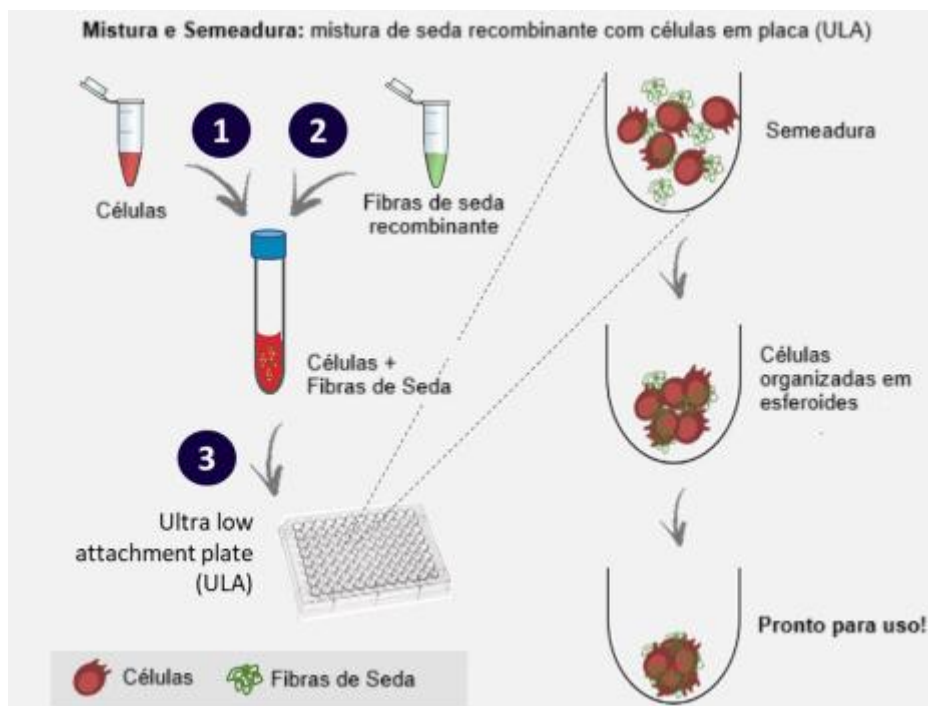
O efeito de super-contração, que ocorre quando a seda é exposta a líquido, costuma causar efeitos variados e indesejados nas culturas, mas através deste modelo a seda pôde ser fixada, impedida de se contrair pela ação do quadro de aço (Wendt *et al.*, 2011).

Estudos utilizando enxerto de seda de aranha, antecedido pelo estudo de Allmeling *et al.* em 2006, foram continuados e aplicados em ovelhas. Um trecho de 6 cm do nervo tibial de ovelhas foi cortado para avaliar a aplicabilidade e biocompatibilidade do enxerto de seda e seu desempenho em comparação ao padrão cirúrgico da época. Com esse estudo, foi observado o desenvolvimento dos axônios através do enxerto de seda de aranha e buscaram analisar o desenvolvimento do implante. Os enxertos foram observados para encontrar a presença de células de Schwann endógenas e a formação de nódulos de Ranvier. Os doze animais transplantados tiveram sua saúde testada ao longo nos períodos de 2 meses para avaliar a sensibilidade em relação ao grupo controle e nos períodos de 6 a 10 meses, onde ao final dos 10 meses, os enxertos foram retirados para análise e observação do desenvolvimento e efeitos adversos como efeitos inflamatórios (Radtke *et al.*, 2011).

### 3.4 MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE CULTURA CELULAR

O uso de fibras de seda de aranha recombinante em busca de aplicá-las em culturas de células 3D para a formação de esferóides. Três tipos celulares foram utilizados: Hepatócitos primários de rato, células tronco humanas derivadas de tecido adiposo (hMSC) e fibroblastos de camundongo (L929). Esse trabalho utilizou uma seda recombinante anteriormente desenvolvida que pode se auto montar em *scaffolds* de tamanho celular. Uma solução contendo células, seda e meio de cultura foi semeada em placas de poços *ultra low attachment* (Fig. 8) para a formação dos esferóides (Stern-Tal *et al.*, 2021).

Figura 8: Esquema de semeadura de células com seda recombinante e formação em esferóides.



Fonte: adaptado de Stern-Tal *et al.* (2021).

Em outro estudo, foi utilizada proteína de seda recombinante para a formação de microesferas projetadas para melhorar a adesão celular. As microesferas foram formadas em meio aquoso a partir de um processo utilizando ácido hialurônico para controlar a automontagem, influenciando o tamanho e uniformidade das esferas. Células tronco derivadas de medula óssea humana foram cultivadas em meio contendo essas esferas com o intuito de formação de esferóides integrados às microesferas de proteína recombinante (Ornithopoulou *et al.*, 2023).

A seda de aranha recombinante funcionalizada de fibronectina em forma de rede foi utilizada como *scaffold* para a cultura de esferóides. Estas redes foram criadas com a introdução de bolhas de ar na solução, o que ocasionou na formação de uma fina camada de seda em volta da espuma resultante. Com o tempo, essas membranas estouraram e formaram uma rede tridimensional, mimetizando as fibras intersticiais da matriz extracelular com proporções e mecânicas similares. Com esta formação da estrutura, foi possível integrar células aderentes na rede introduzindo uma suspensão celular antes de espumar a solução de seda, proporcionando uma dispersão homogênea das células pelo *scaffold*. Da mesma forma, este método permite adicionar outros componentes da matriz extracelular à rede, aplicando suas capacidades ao *scaffold* (Källén *et al.*, 2025).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

A espécie principal utilizada neste trabalho foi selecionada dentre as aranhas da subordem *Araneomorphae*, com o nome científico *Trichonephila clavipes* e de nome vulgar aranha-do-fio-de-ouro. A manipulação e coleta da espécie foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) com número de protocolo 93283-1. Para a coleta dos espécimes foi obtido o auxílio do Dr. Antônio Domingos Brescovit (Instituto Butantan), que ajudou com informações importantes sobre a espécie, local (23°33 '56.2 "S 46°43' 07.1"W) e procedimento de coleta.

Foram coletados oito espécimes fêmeas localizadas em suas teias construídas em diversos locais entre a flora local. Após a coleta, os espécimes foram separados individualmente em potes contendo algodão umedecido, que permitiu manter uma umidade mais apropriada durante o transporte. O transporte do local de coleta até o laboratório dentro do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da UNIVAP em São José dos Campos (23°12'36.7"S 45°57'24.1"W) levou cerca de 6 horas e após chegar no local, os espécimes foram imediatamente transferidos para seus respectivos viveiros.

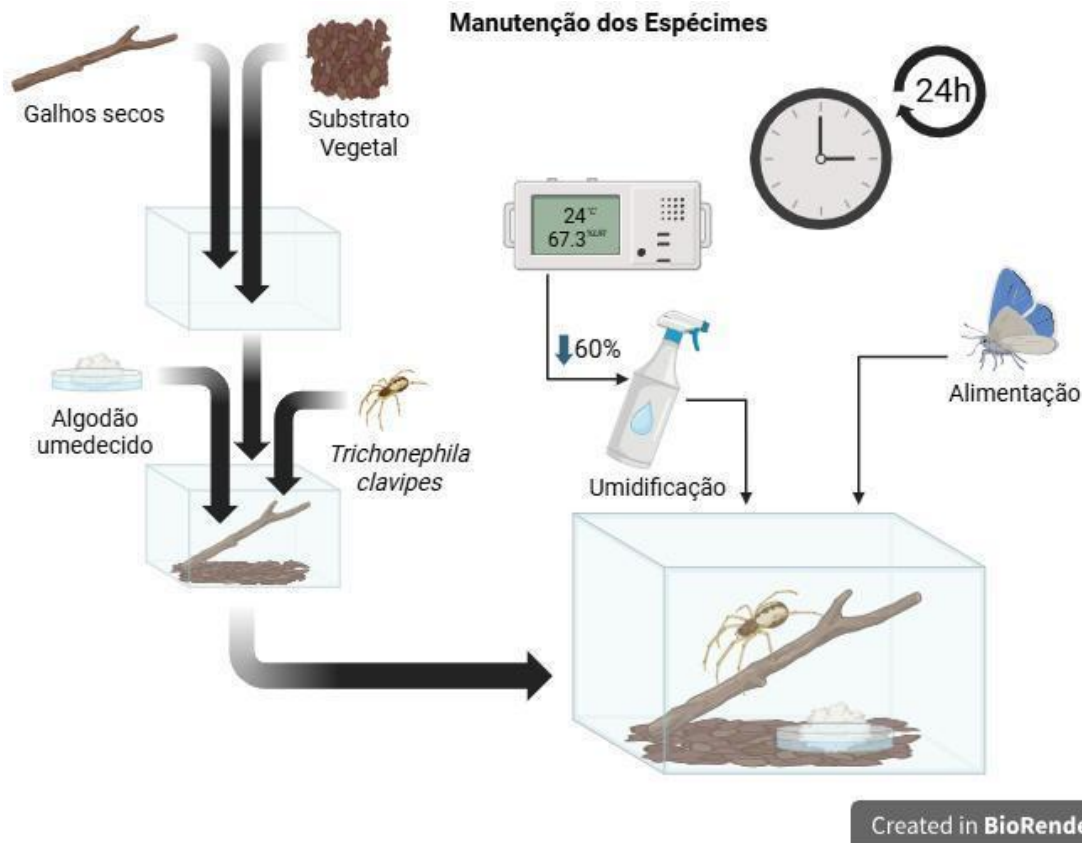
### 4.2 MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para a manutenção dos espécimes, 8 aquários de vidro com medidas de 25 x 12 x 17 cm foram utilizados. Cada aquário teve o fundo forrado com substrato vegetal em natura e preenchido com galhos coletados próximo ao IP&D para permitir a confecção das teias. Recipientes com algodão umedecido foram dispostos dentro dos aquários para manter a umidade. Para controlar a temperatura e a umidade do local onde se encontravam os viveiros, foi utilizado um relógio de mesa Lelong LE-8129 com medidor de temperatura e umidade, além de um borrifador de água para umedecer o ambiente dentro dos viveiros diariamente (Fig. 9).

A temperatura dos viveiros não foi monitorada diariamente, já que a temperatura regional se adequa aos requerimentos da espécie, flutuando entre 20 °C

e 28 °C durante o período de contenção. A umidade foi monitorada e controlada diariamente para que atingisse um mínimo de 60% e um máximo de 80%. Os espécimes foram alimentados diariamente com borboletas de diversas espécies coletadas da fauna local próximo ao IP&D da UNIVAP (Fig. 7).

Figura 9: Diagrama de manutenção dos espécimes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 OBTENÇÃO DOS FIOS

A coleta da seda de *T. clavipes* foi efetuada de duas formas, coleta *in situ* e coleta *ex situ*, onde a seda coletada *in situ* foi retirada das teias construídas pelos espécimes na natureza durante a coleta no Instituto Butantan e que apresentam uma coloração dourada (denominada de amostra dourada) e a seda coletada *ex situ* foi retirada das teias construídas nos viveiros dos espécimes após o falecimento de cada um (denominada de amostra branca).

Todas as amostras de seda coletadas foram separadas e armazenadas em tubos de ensaio tipo Falcon protegidos da exposição ao sol e em temperatura ambiente. Após o armazenamento, todas as amostras que foram utilizadas durante o trabalho para fazer as análises e os experimentos foram submetidas ao processo de esterilização em autoclave, sendo colocadas em tubos de ensaio de 15ml e seguindo o protocolo padrão, com o procedimento durando 15 minutos e atingindo a temperatura de 121°C a 1 atmosfera.

#### 4.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS FIOS

Todas as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência, utilizando um microscópio Leica DMIL LED com câmera acoplada Leica DFC 310 FX e software de captura de imagem LAS (V4.6). As amostras foram dispostas cada uma em uma lâmina própria e recobertas com lamínulas para exposição aos filtros e observação da fluorescência. Foram utilizados 3 filtros diferentes para analisar as amostras: L5/azul (excitação BP 480/40 nm), N2.1/verde (excitação BP 515 – 560 nm) e D/UV + violeta (excitação BP 355 – 425 nm).

#### 4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para verificar as diferenças estruturais das amostras de teia obtidas, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss – EVO MA 10. As amostras foram separadas e coladas em stubs com fita de carbono e metalizadas com ouro em uma metalizadora EMITECH – K550X para análise e comparação das imagens com o intuito de identificar o motivo da diferença de cor entre as amostras.

#### 4.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DOS FIOS

Além da análise estrutural através das imagens, foi efetuada a espectroscopia por energia dispersiva (EDS) das amostras para comparação de suas composições químicas. Esta análise consiste em obter a composição elementar da seda através da análise das ondas de raio-x emitidas pelo material após sua exposição ao feixe de elétrons do microscópio eletrônico de varredura. Ela foi feita imediatamente após o

MEV, então o ouro presente nas amostras foi omitido dos resultados através do software.

#### 4.7 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A análise com espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi feita com o espectrômetro PERKIN-ELMER Spectrum Two IR. Esta técnica foi utilizada para analisar a composição das diferentes amostras de seda e avaliar se havia alguma diferença que explicasse a mudança de coloração. As amostras secas foram enoveladas e prensadas para então serem colocadas diretamente no equipamento para execução do FTIR. A análise consiste na irradiação de radiação infravermelha em um material com o intuito de captar as vibrações geradas pelos grupos funcionais de suas moléculas ao serem expostas. Assim, o FTIR mede quais comprimentos de onda do infravermelho são absorvidos pela amostra e gera um espectro característico do material. Esse espectro gerado é calculado pelo software através de um algoritmo de transformada de Fourier.

#### 4.8 ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

Estas análises são dependentes uma da outra, tendo sido feita a termogravimetria (TG) primeiramente e depois a calorimetria exploratória diferencial (DSC). O TG consiste em avaliar a perda de massa em relação à temperatura até a degradação completa do material. Este teste foi feito utilizando um analisador termogravimétrico NETZSCH STA 449F3, iniciando a análise em 0°C e aquecendo até 1000°C. O DSC consiste na exposição controlada do material à temperaturas elevadas para observar alterações no padrão de absorção de calor do material, este teste é feito em mais de um ciclo. Para este teste foi utilizado o calorímetro diferencial de varredura DSC Q20 V24.11 Build 124 e foram feitos dois ciclos para cada amostra entre as temperaturas de 0 a 250 °C dentro de uma panela de alumínio Tzero. A faixa de temperatura foi escolhida devido ao TG que observou o início da degradação por

volta dos 250 °C. As análises foram feitas em ambiente de gás nitrogênio 50,0 ml/minuto, com rampa de aquecimento de 10°C/minuto.

#### 4.9 ESFOLIAÇÃO DOS FIOS

Para efetuar a esfoliação dos fios, foi seguido o procedimento feito por Perera D. *et al.* (2023). Sessenta mililitros de água deionizada foram adicionados a 3,4 mg de seda e a solução foi exposta a pulsos ultrassônicos no aparelho Elma S 10H Elmasonic, a temperatura controlada de 50 °C. A configuração de pulsos foi de 10 segundos de duração seguidos por pausas de 10 segundos executados durante 135 minutos.

#### 4.10 LINHAGEM CELULAR L929

A linhagem celular utilizada no trabalho foi a NCTC clone 929 (L-929, Fibroblastos de Camundongo), obtida do banco de células do Rio de Janeiro. As células, inicialmente congeladas no laboratório, foram descongeladas em banho maria e logo após, suspensas em 3 ml de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para ser centrifugado em uma centrífuga Fanem Excelsa Baby I 206 durante 5 minutos.

Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspensão em 1 ml de meio para distribuição nos poços.

#### 4.11 PRODUÇÃO DE ESFERÓIDES

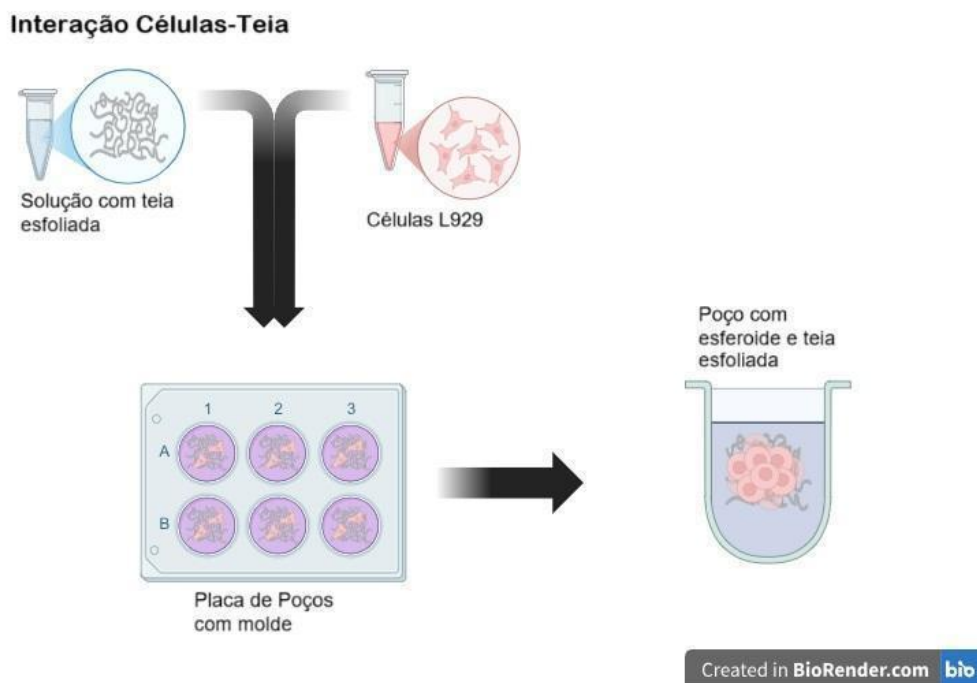
A produção dos esferóides foi realizada em moldes de agarose com o carimbo de impressão 3D da BioEdTech em placas de cultura TTP de 6 poços. O carimbo possui estruturas que formam micro poços onde podem se formar mais esferóides e se encaixa dentro dos poços para pressionar o molde no formato desses poços. Os esferóides, após o descongelamento da linhagem celular e distribuição nos poços, foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), ambos da marca ThermoFisher Scientific, 100 U/ml de penicilina-0,1 mg/ml, estreptomicina-0,25 µg/ml e 25 µg/mL anfotericina B. A cada 4 dias, metade do meio

de cultura era substituído dentro de cada poço por meio de cultura fresco. As placas foram mantidas em uma incubadora de CO<sub>2</sub> 5% Panasonic MCO-170AICUVL.

#### 4.12 INTERAÇÃO CÉLULAS-TEIA

A interação entre as células de linhagem L929 e da teia ocorreu por meio da adição da solução de seda esfoliada através de sua pipetagem no meio de cultura (Fig. 10) num procedimento adaptado de Stern-Tal *et al.*, 2021. As células foram divididas em quatro grupos, dois contendo a seda esfoliada e dois grupos controle, sendo observados e retirados para análise entre os períodos de 5 dias e 10 dias.

Figura 10: Diagrama de formação de esferoides com seda esfoliada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.13 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA CÉLULAS-TEIA

Para analisar as amostras de cultura de esferoides L929, foram utilizadas: a microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente as amostras foram observadas sob o microscópio de fluorescência

Leica DMIL LED entre o período de 5 e 10 dias para observar a presença dos filamentos de seda no meio de cultura e avaliar a adesão dos esferóides ao material. Foram utilizados os filtros: L5/azul (excitação BP 480/40 nm), N2.1/verde (excitação BP 515 – 560 nm) e D/UV + violeta (Excitação BP 355 – 425 nm).

Após o término dos respectivos dias de cultura de cada amostra (5 dias e 10 dias), foi preparada para o MEV. As amostras foram secas e fixadas da seguinte forma:

- 10 minutos de exposição ao fixador paraformaldeído (PA) 4% em Solução Salina Tampão Fosfato (PBS);
- Remoção do fixador através de 3 lavagens com PBS;
- Desidratação seriada com etanol 50% a 100% com exposição de 10 minutos cada;
- Exposição a Hexametildisilazano (HMDS) com etanol 100% duas vezes de 10 minutos;
- Finalização do processo de desidratação com exposição a HMDS puro durante 10 minutos.

Ao final da desidratação, as amostras foram coladas em stubs com fita de carbono e metalizadas com ouro em metalizadora EMITECH – K550X, para então serem analisadas com o MEV Zeiss – EVO MA 10.

## 5 RESULTADOS

A partir do momento da coleta dos espécimes, até a preparação e execução dos experimentos, todos os resultados obtidos através da metodologia descrita são apresentados dentro desta seção.

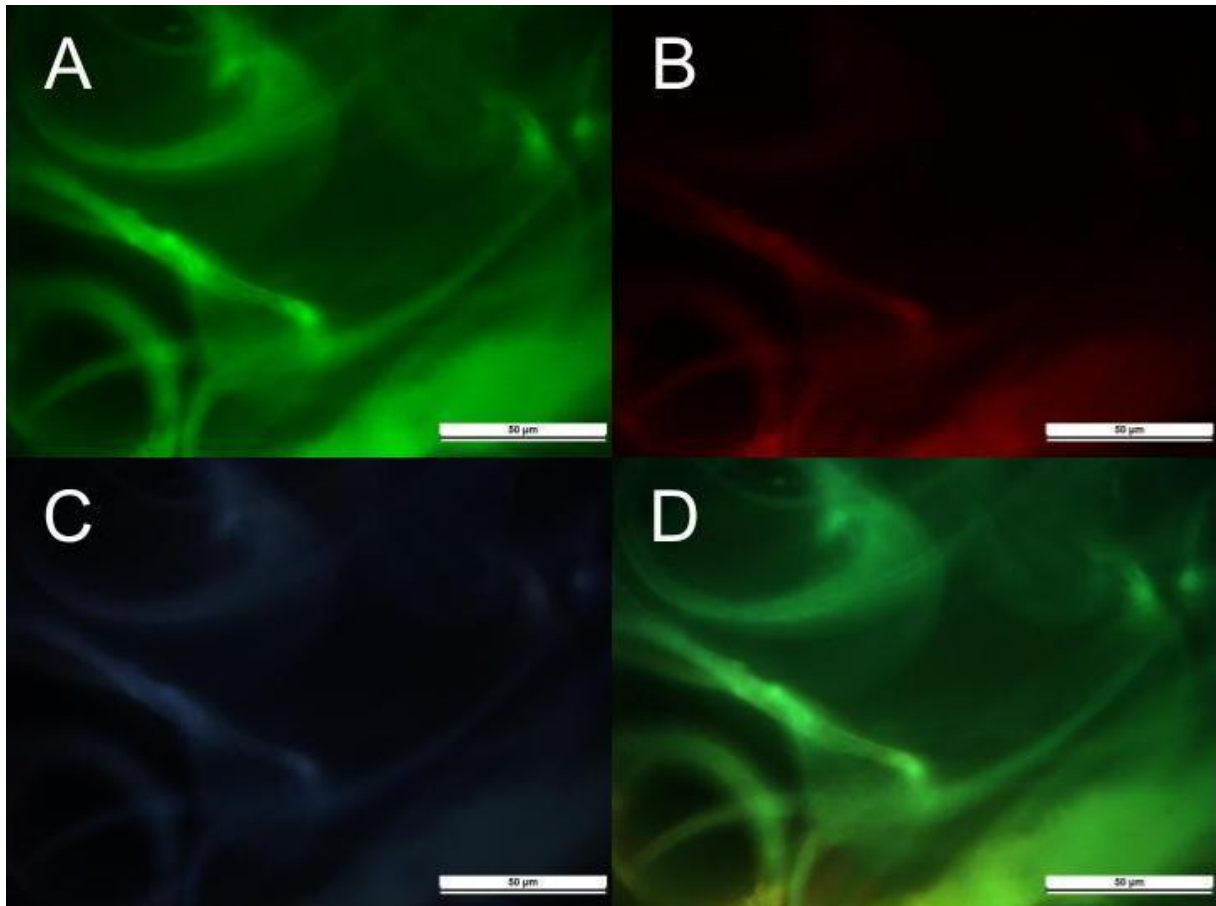
### 5.1 ANÁLISE DOS FIOS

As amostras de seda coletadas apresentam duas colorações distintas, uma de cor dourada que é denominada como amostra dourada e foi coletada *in situ* e outra de cor branca denominada amostra branca, que foi coletada em laboratório. Ambos os tipos de seda foram submetidos a diferentes análises para verificar possíveis causas dessa variação e se elas poderiam afetar os experimentos.

#### 5.1.1 Microscopia de fluorescência dos fios

Observando as amostras por microscopia de fluorescência, foi possível identificar uma resposta de emissão fluorescente através de todos os filtros. A exposição com o filtro L5/azul excitando a 503 nm obteve emissões das amostras com comprimento de onda de 528 nm, resultando em uma coloração verde (Fig. 11A e 12A). Sob o filtro N2.1/verde, excitando a 547 nm, as amostras emitiram uma coloração vermelha com 572 nm (Fig. 11B e 12B). Ao utilizar o filtro D/UV + violeta excitando em 358 nm, as emissões registradas foram de 461 nm, com coloração azul (Fig. 11C e 12C). Por último, as imagens foram sobrepostas para identificar a emissão predominante de cada amostra (Fig. 11D e 12D).

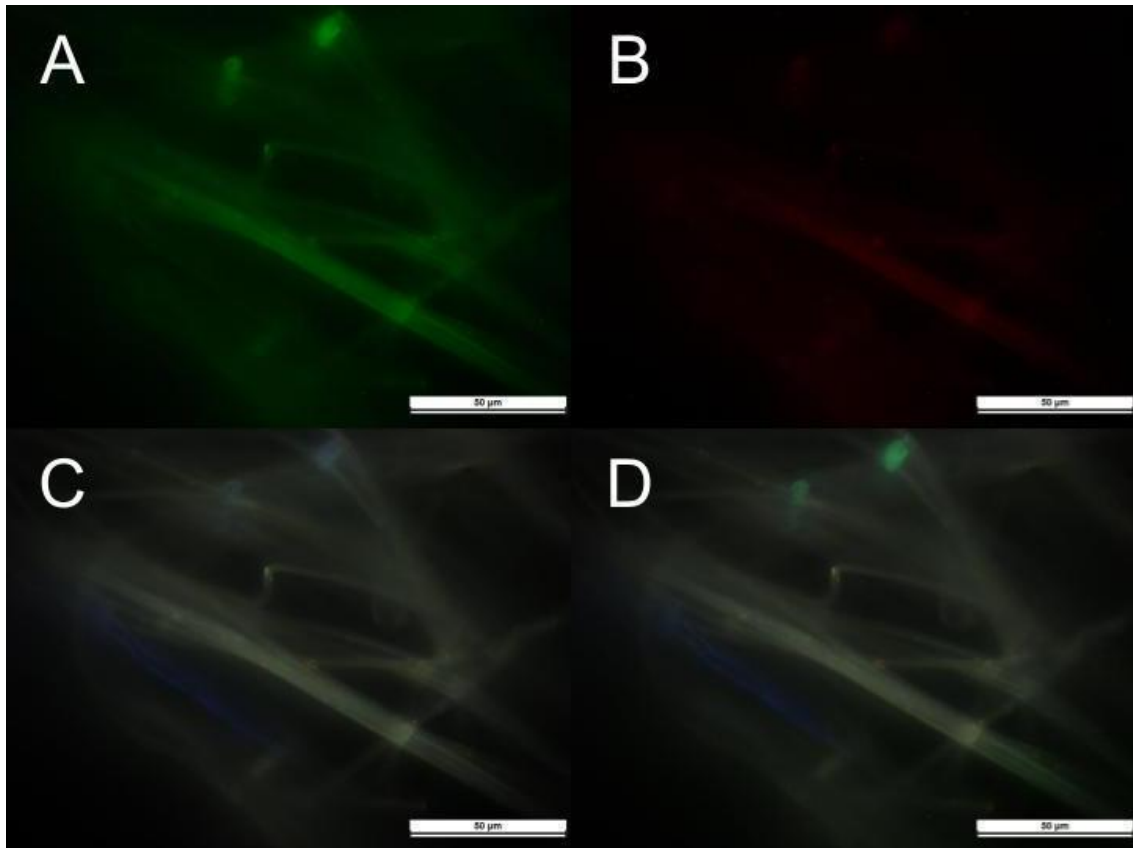
Figura 11: Fotomicrografias de fluorescência da amostra dourada. A – Emissão em 528 nm; B – Emissão em 572 nm; C – Emissão em 461 nm; D – Sobreposição dos filtros com predominância da emissão verde.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No exame da amostra dourada (Fig. 11), uma predominância pronunciada da luminescência verde foi observada quando em camadas (Fig. 11D), com as emissões vermelha e azul exibindo intensidade significativamente menor em comparação, quase desaparecendo na sobreposição, mas alterando a tonalidade verde. Na parte inferior da figura, foi possível observar uma região laranja (verde + vermelho), onde a emissão vermelha exibe maior intensidade, enquanto as outras partes exibem uma coloração tendendo para o branco, em que todas as três emissões se manifestam simultaneamente.

Figura 12: Fotomicrografias de fluorescência da amostra branca. A – Emissão em 528 nm; B – Emissão em 572 nm; C – Emissão em 461 nm; D – Sobreposição dos filtros sem predominância específica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

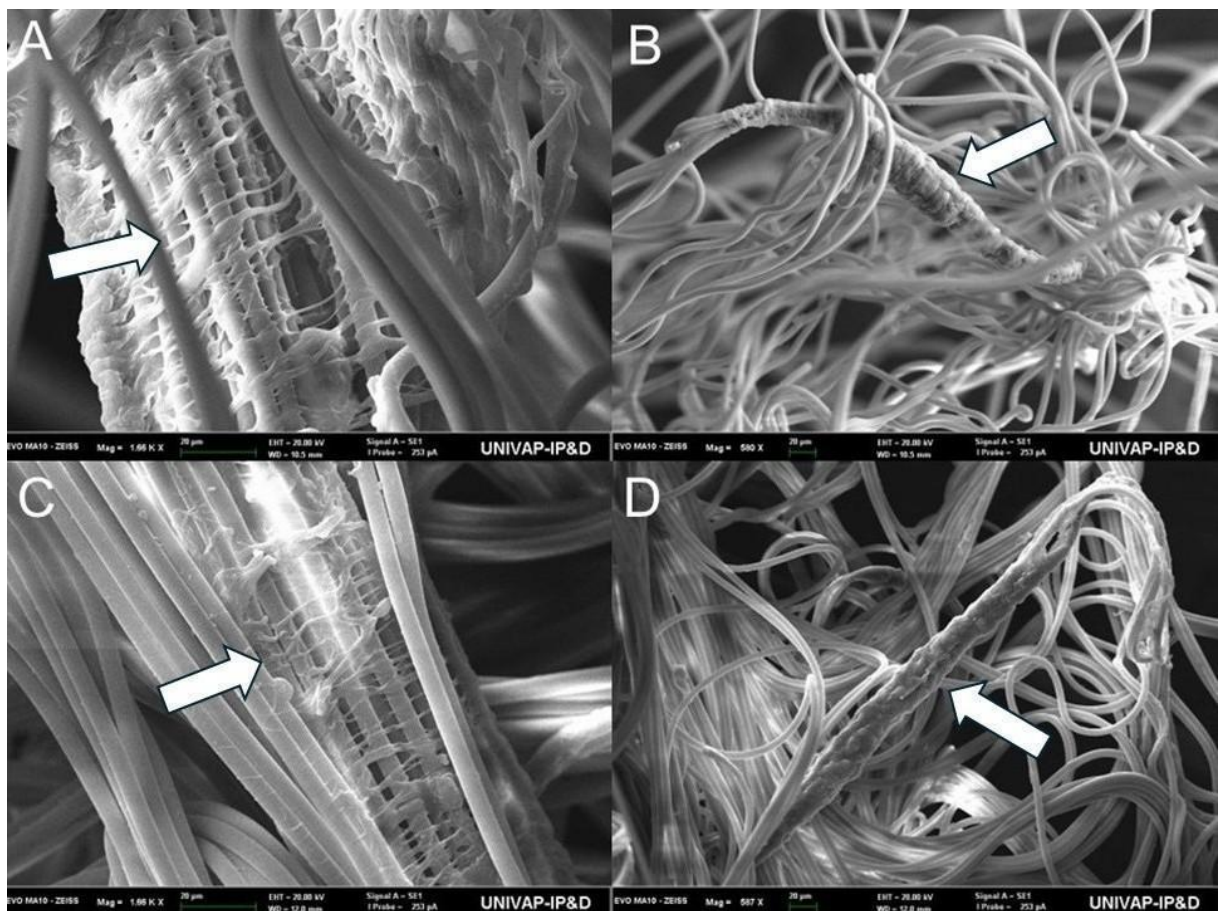
Ao analisar a fotomicrografia da amostra branca (Fig. 12), aparece, assim como na Figura 11D, não é observada uma predominância específica na sobreposição (Fig. 12D). A emissão vermelha dessa amostra é fraca (Fig. 12B) e a fluorescência azul é clara (Fig. 12C).

Como resultado da análise de fluorescência das duas amostras, pôde-se observar poucas diferenças entre elas. Sendo assim, as duas são similares na coloração de suas fluorescências com alteração na intensidade delas, tendo a amostra dourada uma fluorescência mais intensa que a da amostra branca.

### 5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura dos fios

Durante a microscopia eletrônica de varredura, foram avaliadas as estruturas morfológicas presentes nas duas amostras de seda em busca de diferenças físicas que pudessem ser relacionadas à variação de cor.

Figura 13: Fotomicrografias de amostras de seda de *T. clavipes*. A – Amostra dourada, 1.65 K X; B – Amostra dourada, 580 X; C – Amostra branca, 1.65 K X; D – Amostra branca, 587 K X.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao analisar as fotomicrografias obtidas, pode-se notar que as estruturas se mantêm iguais entre as diferentes amostras (Fig. 13). Ao comparar as fotomicrografias na Figura 13A e 13C, encontra-se a mesma estrutura filamentosa envolvendo os fios principais da teia e ao comparar as imagens na Figura 13B e 13D, observa-se também a presença da mesma estrutura. Não foram encontradas diferenças estruturais com a análise por MEV.

### 5.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva dos fios

Logo após a observação através do MEV, foi utilizado o EDS acoplado para caracterizar a composição química das amostras.

Tabela 1: Composição elementar das amostras.

Elemento	Seda Dourada (%)	Seda Branca (%)
C	74.15	72.10
O	24.52	26.89
Na	-----	0.05
Al	0.13	0.33
Si	0.16	0.03
P	0.21	0.05
S	0.26	0.12
Cl	0.12	0.33
K	0.28	0.09
Ca	0.11	0.02
Fe	0.07	-----
Au	Removido	Removido

Fonte: Elaborado pelo autor.

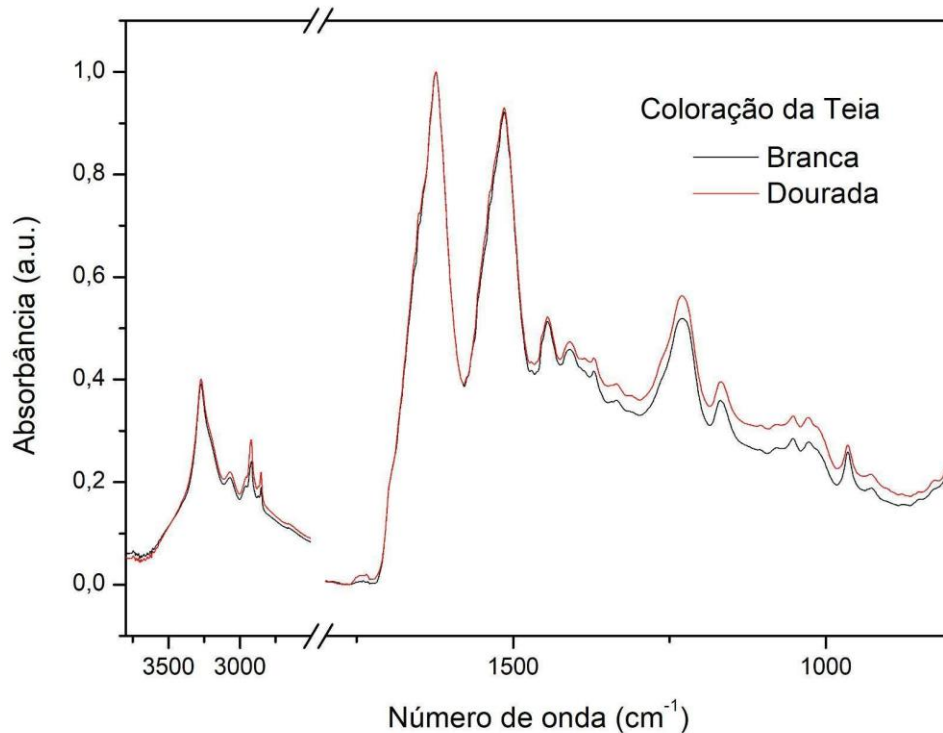
Os espectros de caracterização das amostras apresentam uma composição predominante de Carbono e Oxigênio como pode-se observar na Tabela 1. Outros elementos presentes estão em quantidades pequenas. Essas impurezas estão mais presentes na amostra dourada que foi colhida na natureza do que na amostra branca, que foi colhida em laboratório.

### 5.1.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A análise de FTIR permitiu verificar as diferenças dos modos vibracionais associados aos grupos moleculares de cada amostra de teia, como apresentado na

Figura 14, que foram sobrepostos para comparar a presença dos compostos e ligações presentes nos materiais.

Figura 14: Espectros de FTIR das amostras dourada e branca.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros demonstram 6 bandas principais (Tabela 1), com grupos funcionais Amida A, estiramento C-H alifático, Amida – I, II e III e deformação angular do CH<sub>2</sub>. Como pode ser observado no gráfico, ambas amostras de seda apresentam padrão semelhante, no entanto foi possível notar diferenças nas intensidades de absorção da banda das Amidas – III que pode indicar uma quantidade menor na amostra branca.

Tabela 2: Descrição dos picos de FTIR

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição principal	Descrição	Referência
3272	Amida A (ν N–H, H-ligado)	Estiramento N–H de peptídeo; sensível a ligações de H. Indica β-folha (3350 ~ 2250 cm <sup>-1</sup> )	Lorenz-Fonfria (2020)
2918	ν C–H alifático (CH <sub>2</sub> )	Contribuições de metileno/metila das cadeias laterais (alanina, etc.). (3000 ~ 2800 cm <sup>-1</sup> )	Vora <i>et al.</i> (2019)
1623	Amida I – β-folha (ν C=O)	Típico de β-folha antiparalela em seda (1630 ~ 1620 cm <sup>-1</sup> ). Forte indicador de cristalinidade.	Jafari <i>et al.</i> (2023)
1514	Amida II (δ N–H + ν C–N) + Tyr	Amida II em β-folha (1600 ~ 1500 cm <sup>-1</sup> ); 1515 também coincide com anel aromático de Tirosina.	Chatterley <i>et al.</i> (2022)
1445	δ CH <sub>2</sub> ( <i>scissoring</i> )	Deformação de metileno; comum em proteínas (1465 ~ 1440 cm <sup>-1</sup> ).	Grace <i>et al.</i> (2020)
1229	Amida III – β-folha (ν C–N + δ N–H)	Região (1245 ~ 1225 cm <sup>-1</sup> ) indica β-folha; reforça leitura de alta cristalinidade.	Wang <i>et al.</i> (2022)

Legenda: ν - Estiramento vibracional; δ - Deformação angular.

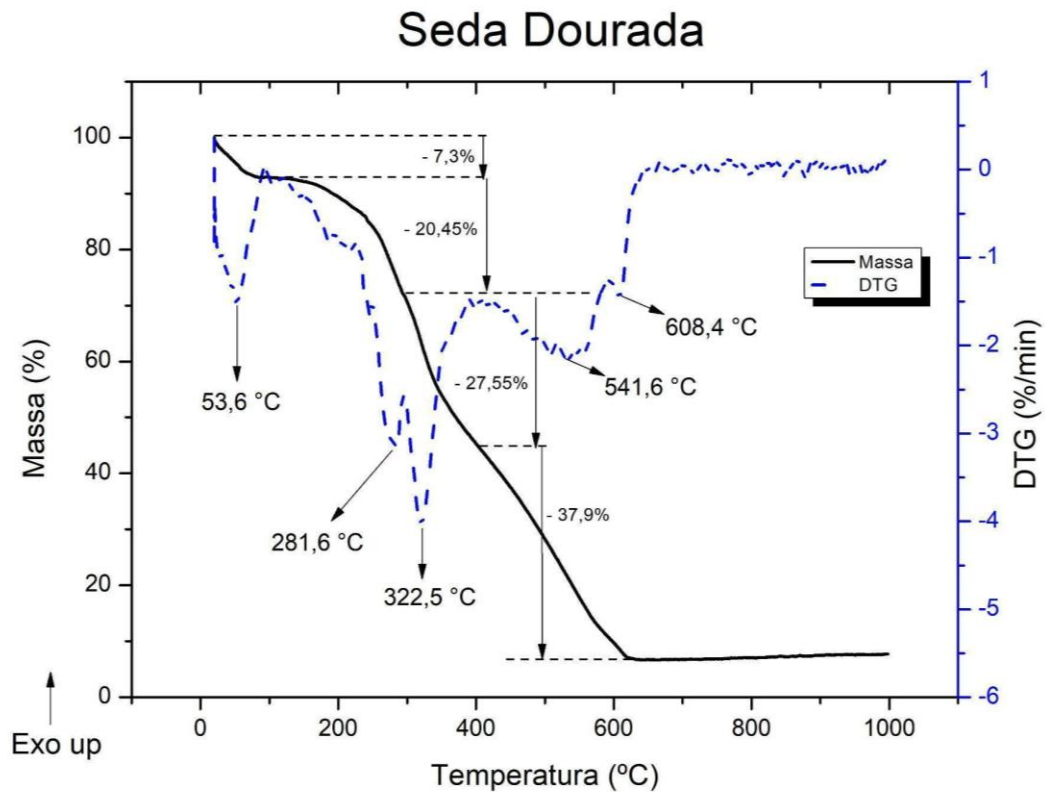
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.5 Termogravimetria

A Termogravimetria foi feita para avaliar a degradação das amostras de seda e os estágios em que ocorrem essas degradações, podendo ser observados através da correlação da degradação com a curva de DTG que representa os eventos térmicos que afetam o material.

Na figura 15 pode-se observar o TG da seda dourada, onde o material inicialmente apresenta uma perda de água devido a umidade contida nos filamentos, que representa a perda de 7,3% de massa com o evento ocorrendo por volta de 53°C. A partir dessa evaporação inicial de água, a degradação do material ocorre em três estágios, começando com uma perda de massa de 20,45%, logo em seguida uma perda de 27,55% e por último uma perda final de 37,9% de massa sendo estas perdas centradas por volta de 281°C, 322°C e 541°C respectivamente, com a última sendo a carbonização do material.

Figura 15: Gráfico de TG da amostra dourada.

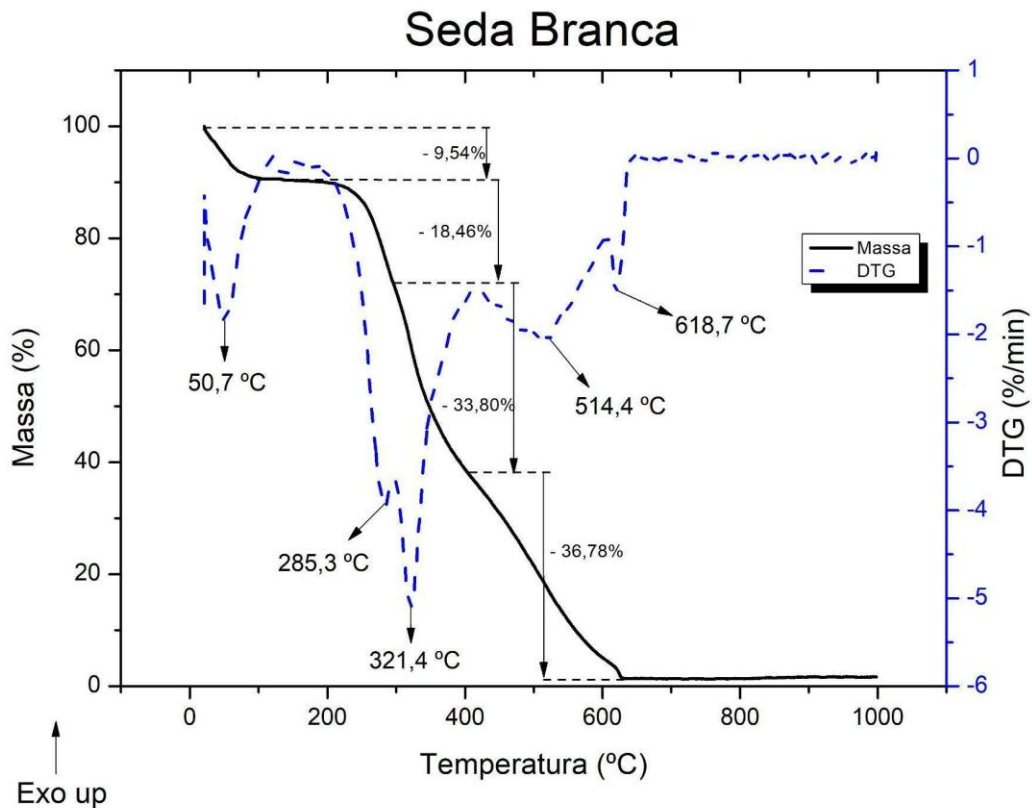


Fonte: elaborado pelo autor.

Na figura 16 nota-se que o TG da seda branca assume um perfil idêntico ao da seda dourada, apenas com algumas pequenas diferenças. A evaporação inicial de água foi um pouco maior, representando uma perda de 9,54% da massa total, ocorrendo por volta de 50°C. Os três estágios de degradação também estão presentes em proporções similares, com o primeiro estágio representando uma perda de 18,46% de massa em 285°C, o segundo estágio tendo uma perda de 33,8% de massa em 321°C e o último estágio de degradação apresentando uma perda de 36,78% de massa em 514°C.

Após o estágio final de degradação das duas amostras, pode-se notar os restos da queima das amostras. Da amostra dourada sobrou 6,8% de massa residual, enquanto da amostra branca sobrou 1,42% de massa residual.

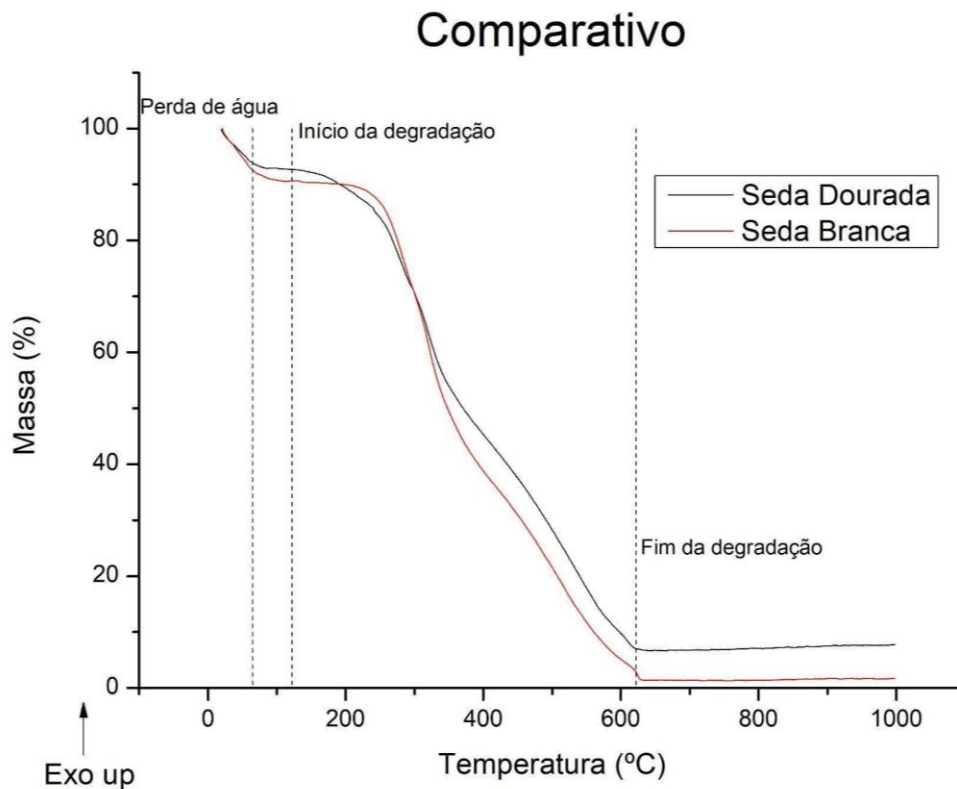
Figura 16: Gráfico de TG da amostra branca.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com os gráficos sobrepostos (Fig. 17), é possível observar o perfil semelhante das duas curvas. Uma diferença ocorre durante a perda de água, que é maior na amostra branca, com ambas ocorrendo até os 100°C. Outra diferença é que a amostra branca também persiste mais a elevação na temperatura antes de iniciar o primeiro estágio de degradação, mas durante o segundo e terceiro estágios de degradação, a amostra branca deteriora antes da amostra dourada. Neste gráfico, também pode-se observar mais claramente a diferença de massa residual entre a amostra dourada, que apresenta maior quantidade, em comparação com a amostra branca. Esta quantidade maior de massa residual da amostra dourada indica a presença maior de minerais nesse tipo de seda. A deterioração total de ambas as amostras ocorre aproximadamente na mesma temperatura, em torno de 613,55 °C.

Figura 17: Gráfico de TG comparativo das sedas.

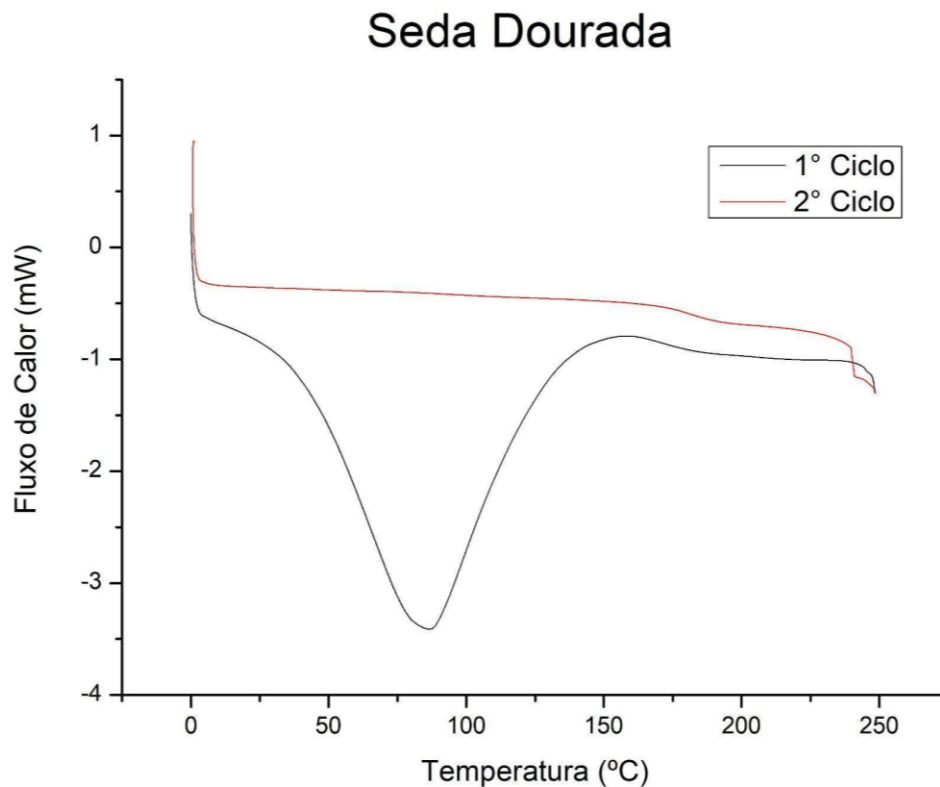


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.6 Calorimetria exploratória diferencial

A análise de DSC apresenta de forma direta a relação entre o fluxo de calor interagindo com o material em relação à temperatura, ocorrendo em 2 ciclos consecutivos. Para a amostra dourada (Fig. 18), o primeiro ciclo apresenta uma queda no nível do fluxo de calor próximo aos 100 °C e então retorna ao nível anterior e se mantém até o final do primeiro ciclo, terminando com uma pequena queda no fluxo de calor. Durante o segundo ciclo, o fluxo de calor é maior em comparação com o primeiro, mas não há uma queda no nível, se mantendo estável até o final do ciclo, quando cai para o mesmo nível em que o primeiro ciclo termina.

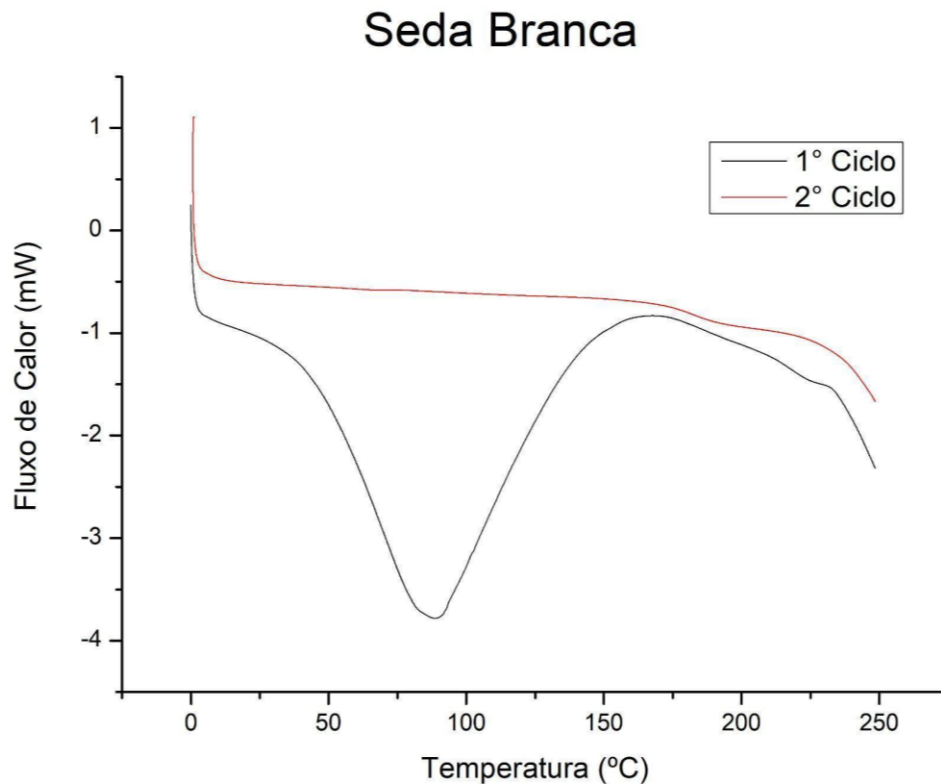
Figura 18: Gráfico de DSC da amostra dourada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 19, o gráfico da amostra branca apresenta um perfil similar ao do gráfico anterior (Fig. 18). O primeiro ciclo da amostra branca apresenta uma queda no nível de fluxo de calor próximo dos 100 °C e depois sobe para um nível maior que o inicial. Ao final do primeiro ciclo ocorre mais uma queda antes de terminar nos 250 °C. O segundo ciclo não apresenta queda em seu nível de fluxo de calor próximo aos 100 °C e assim como o primeiro ciclo, apresenta uma queda final próxima dos 250 °C.

Figura 19: Gráfico de DSC da amostra branca.



Fonte Elaborado pelo autor.

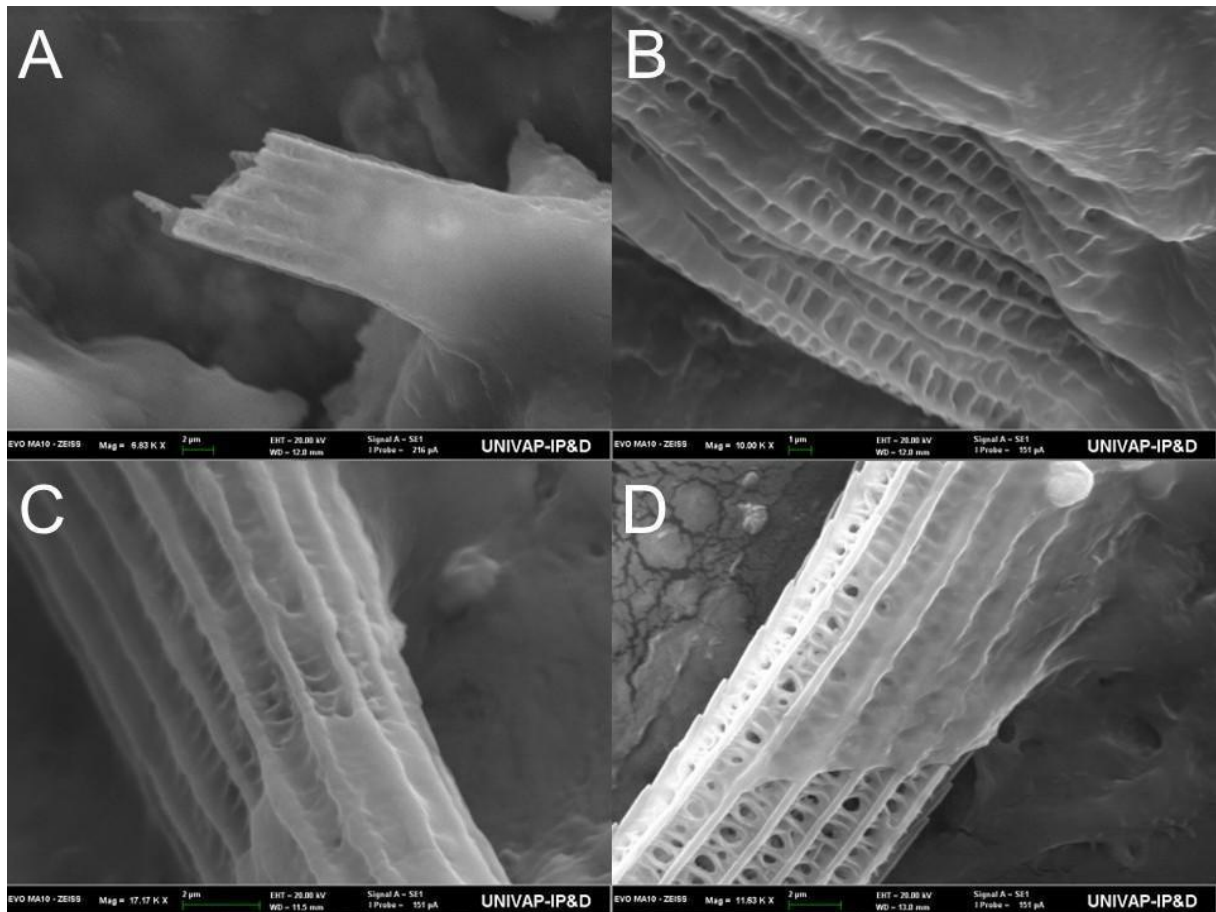
## 5.2 DESENVOLVIMENTO ESFERÓIDES-SEDA

Após a análise e avaliação das amostras, sem encontrar diferenças significativas que possam afetar o desenvolvimento das culturas, a amostra branca foi utilizada para a esfoliação e introdução nas culturas devido a procedência laboratorial.

### 5.2.1 Seda esfoliada

O processo de esfoliação da seda fragmentou o material e modificou sua superfície, deixando-a com aspecto poroso, como é possível observar nas fotomicrografias obtidas com o MEV (Fig. 20).

Figura 20: Fotomicrografias obtidas por MEV mostrando os fragmentos de seda esfoliados.

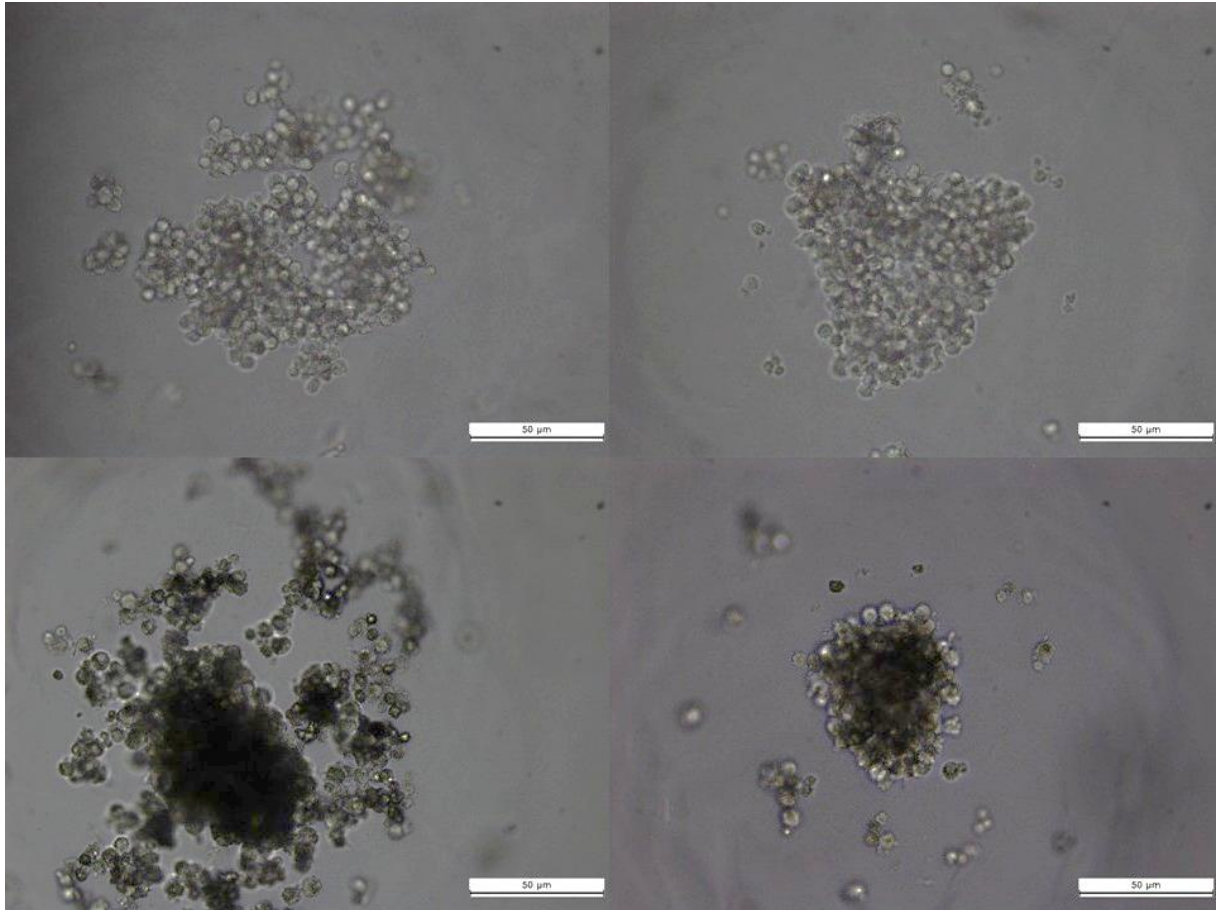


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.2 Esferóides controle

As culturas de esferóides sem os fragmentos de seda no meio de cultura foram observadas sob microscópio para verificar o crescimento das amostras. Ao analisá-las durante o seu período de desenvolvimento, sendo observadas a cada 3 dias após início da cultura, notou-se o crescimento normal das células L929, assim formando os esferóides (Fig. 21).

Figura 21: Esferóides L929 Controle em 6 dias de incubação.

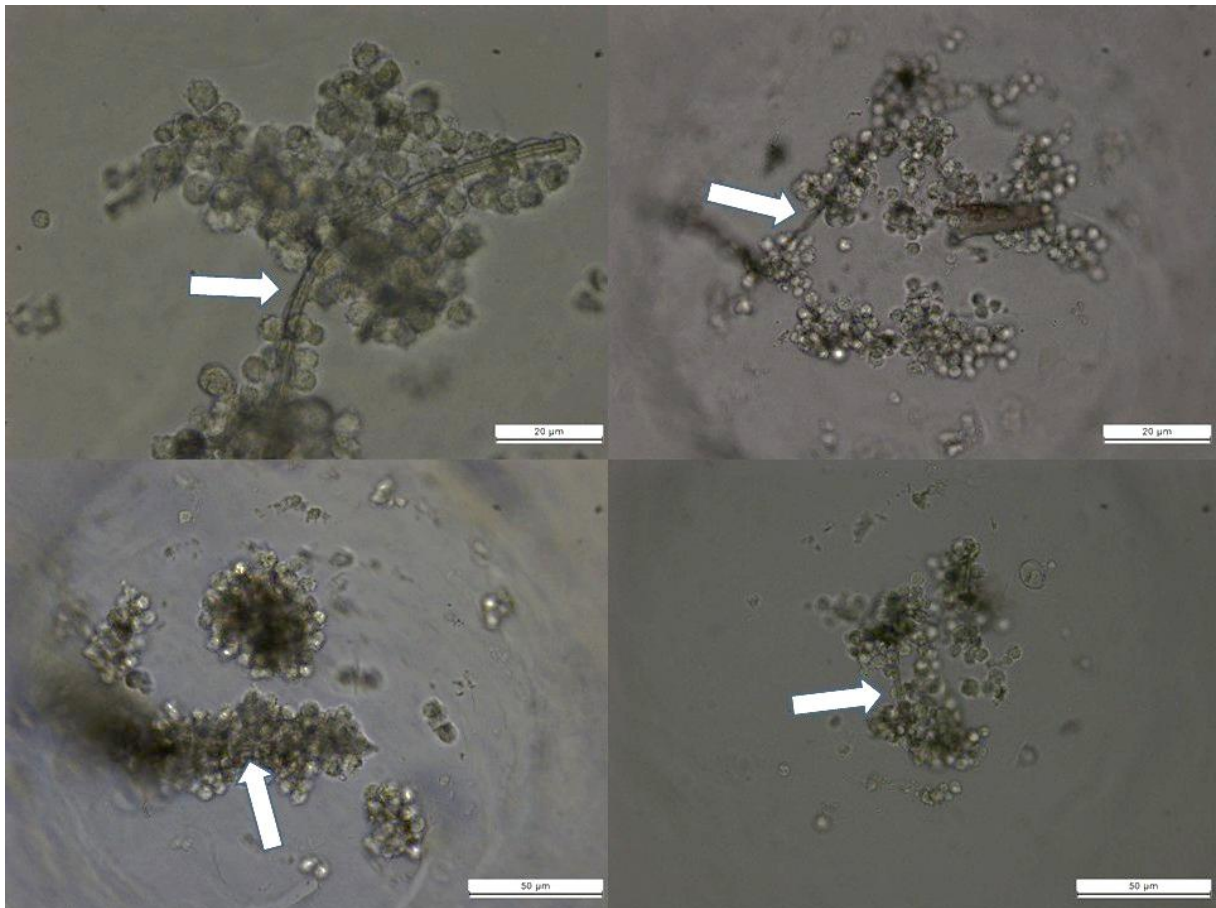


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.3 Esferóides-seda

Observando o crescimento das amostras de células contendo a solução de seda esfoliada, notou-se a tendência das células se aderirem aos filamentos suspensos no meio, formando os esferóides em torno dos fios de seda (Fig. 22). Nestas amostras, os esferóides apresentam preferência a se formar aderidos aos filamentos de seda, os envolvendo. Assim, o formato dos esferóides fica modificado, acompanhando a curvatura dos fios de seda esfoliados presentes no meio.

Figura 22: Esferóides L929 com seda esfoliada em 6 dias de incubação (Setas indicando filamentos).



Fonte: Elaborado pelo autor.

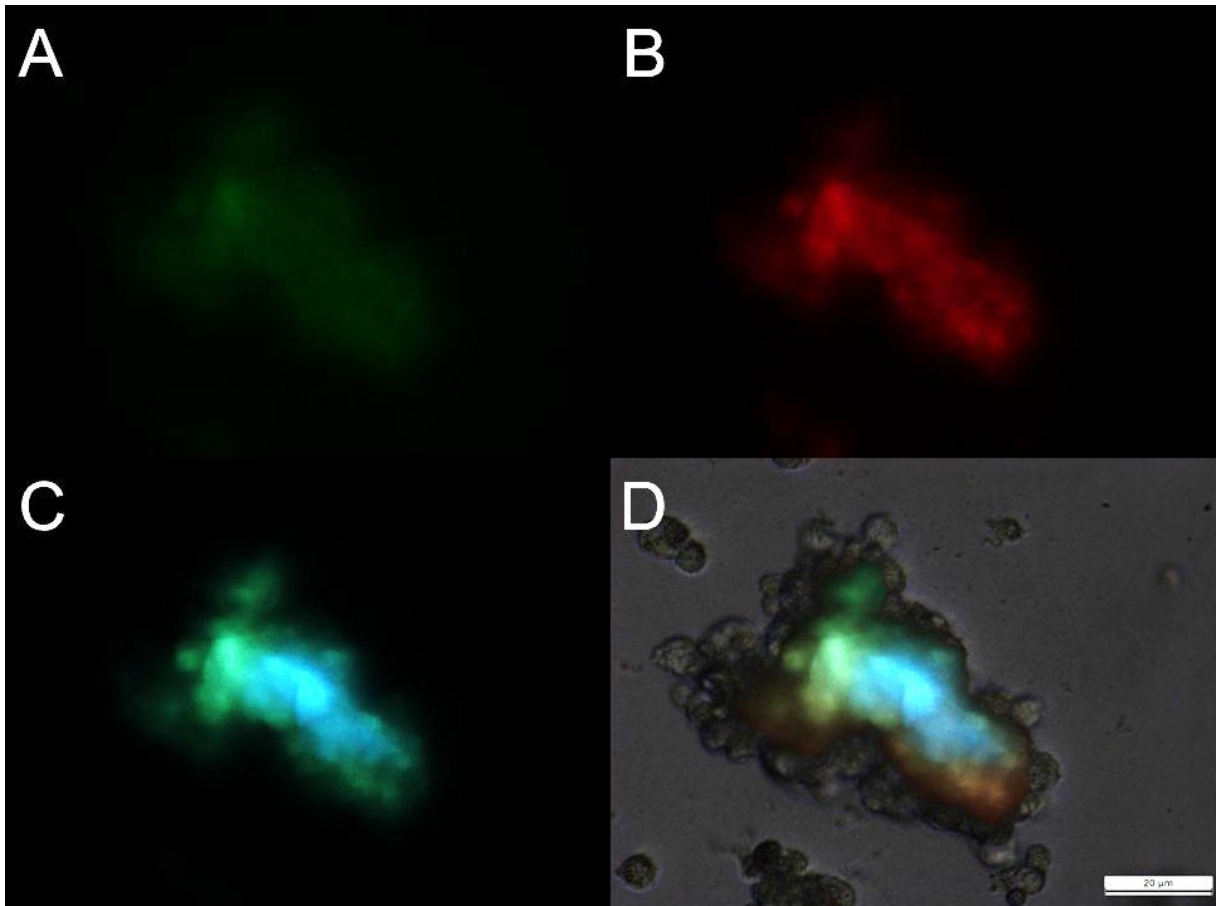
### 5.3 ANÁLISE ESFERÓIDES-SEDA

Ao submeter as amostras a microscopia de fluorescência e a MEV, foi possível analisar de forma precisa o nível de integração dos esferóides com a seda esfoliada. As diferenças observadas nestes resultados, demonstram o caráter das interações presentes nas amostras de esferóides-seda.

#### 5.3.1 Microscopia de fluorescência esferóides-seda

Através da microscopia de fluorescência e aproveitando a propriedade fluorescente da seda de aranha, foi possível visualizar a presença e localização dos filamentos dentro dos esferóides.

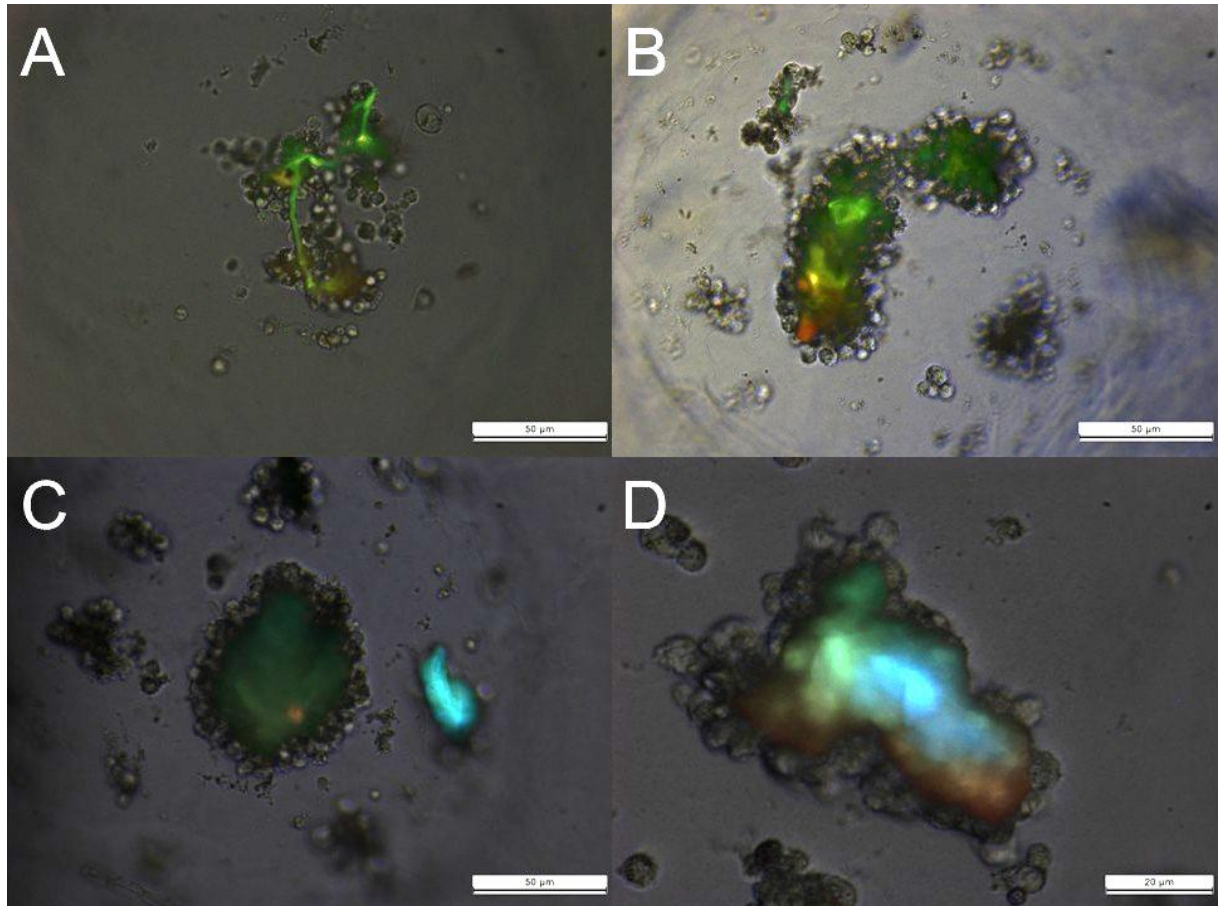
Figura 23: Fotomicrografias de fluorescência esferoide-seda. A - Emissão em 528 nm; B – Emissão em 572 nm; C – Emissão em 461 nm; D – Sobreposição mostrando os filamentos dentro do esferoide.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando o mesmo método de análise com filtros feito nas amostras de teia, notou-se diferentes intensidades fluorescentes dentro dos esferóides (Fig. 23), evidenciando a presença da seda esfoliada em meio às células. Assim, comparando as Figuras 22 e 23, pode-se notar que a microscopia de fluorescência permite identificar a presença da seda dentro de aglomerados de células que não aparentam ter inicialmente uma morfologia alterada pela adesão aos fios.

Figura 24: Fotomicrografias de fluorescência esferoide-seda sobreposições.

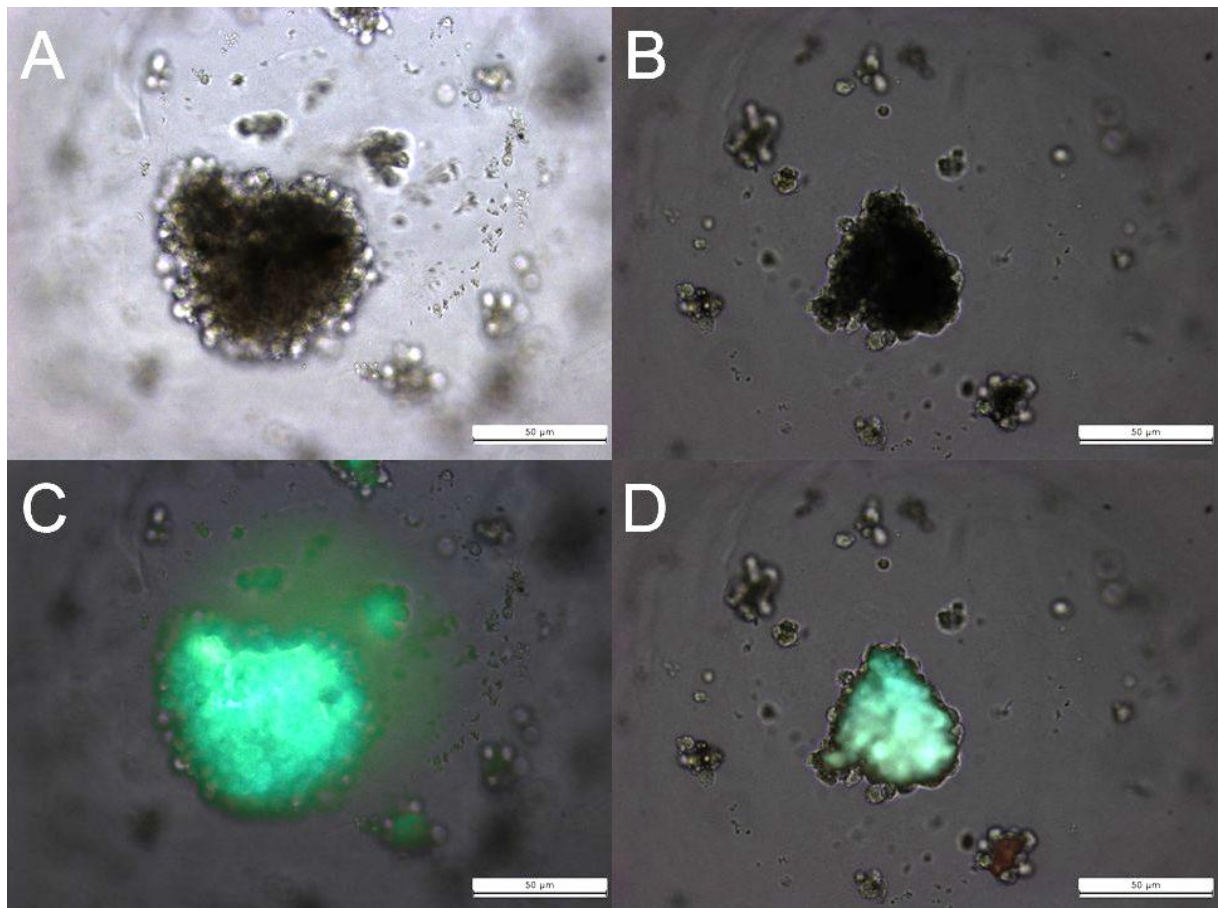


Fonte: Elaborado pelo autor.

Em todas as amostras foi identificada a presença central dos filamentos dentro dos esferoides, sendo evidente a preferência das células de aderir-se ao material e englobá-lo (Fig. 24), em alguns casos alterando a forma normalmente observada dos esferoides (Fig. 24A e 24B).

Algumas amostras apresentam uma fluorescência contida e visualmente acompanhando o delineado do filamento (Fig. 24A e 24B), enquanto outras contêm uma fluorescência espalhada e menos concentrada em uma forma definida (Fig. 24C e 24D), indicando uma desconstrução da estrutura do filamento dentro dos esferoides.

Figura 25: Fotomicrografias de fluorescência esferoide-seda integrados. A e B – Esferoides sem filtro; C e D – Esferoides com sobreposição.



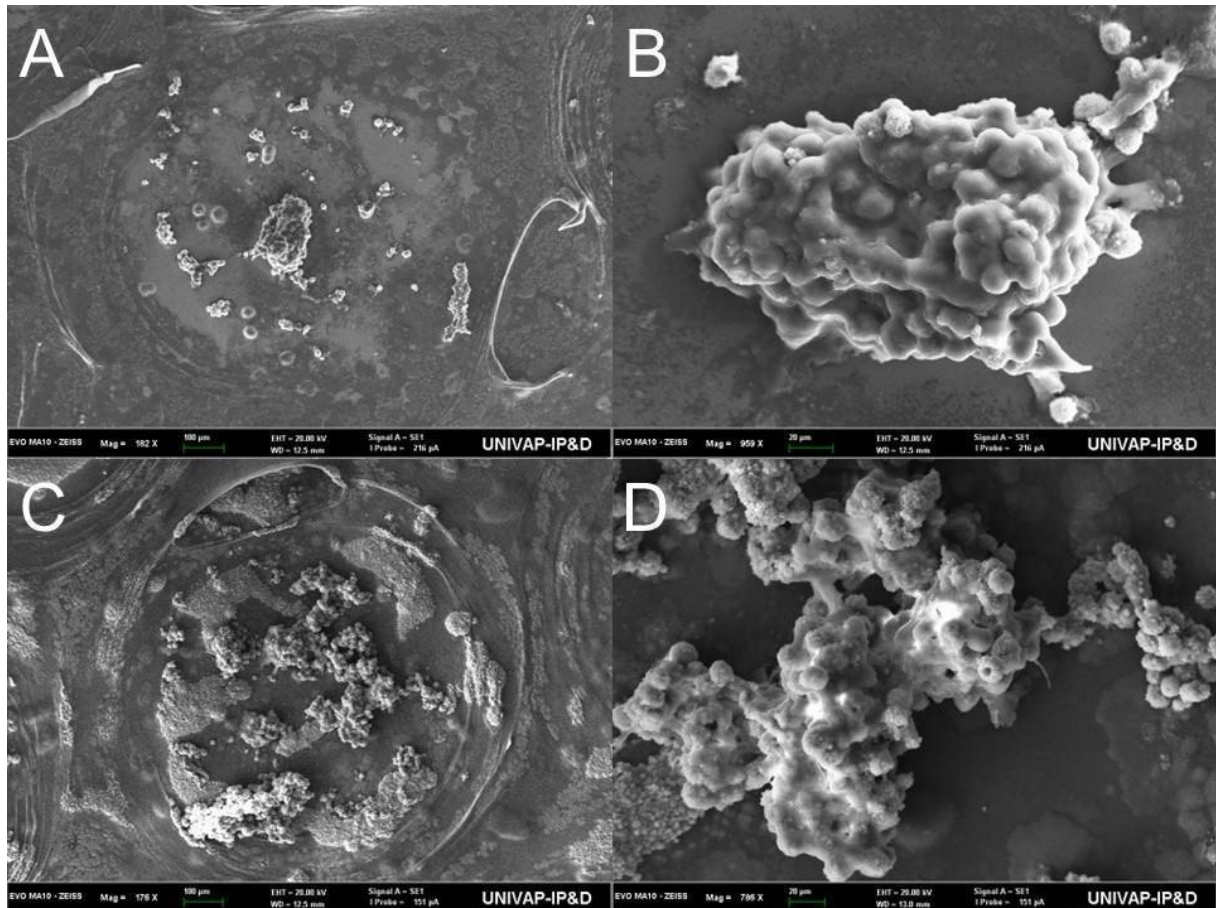
Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentro das amostras, foram encontrados esferoides que inicialmente aparentavam não conter filamentos em seu interior, aparentando uma formação parecida com os grupos controle (Fig. 25A e 25B). No entanto, uma fluorescência generalizada foi encontrada nesses esferoides, dificultando a distinção do filamento internalizado (Fig. 25C e 25D). Este espalhamento do fenômeno fluorescente indica a degradação dos filamentos pelas células com possível absorção desses elementos.

### 5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura esferóides-seda

Utilizando o MEV, foram analisados a estrutura e crescimento dos esferoides cultivados após 5 dias e 10 dias de crescimento, permitindo visualizar o desenvolvimento das amostras ao longo do período de cultura.

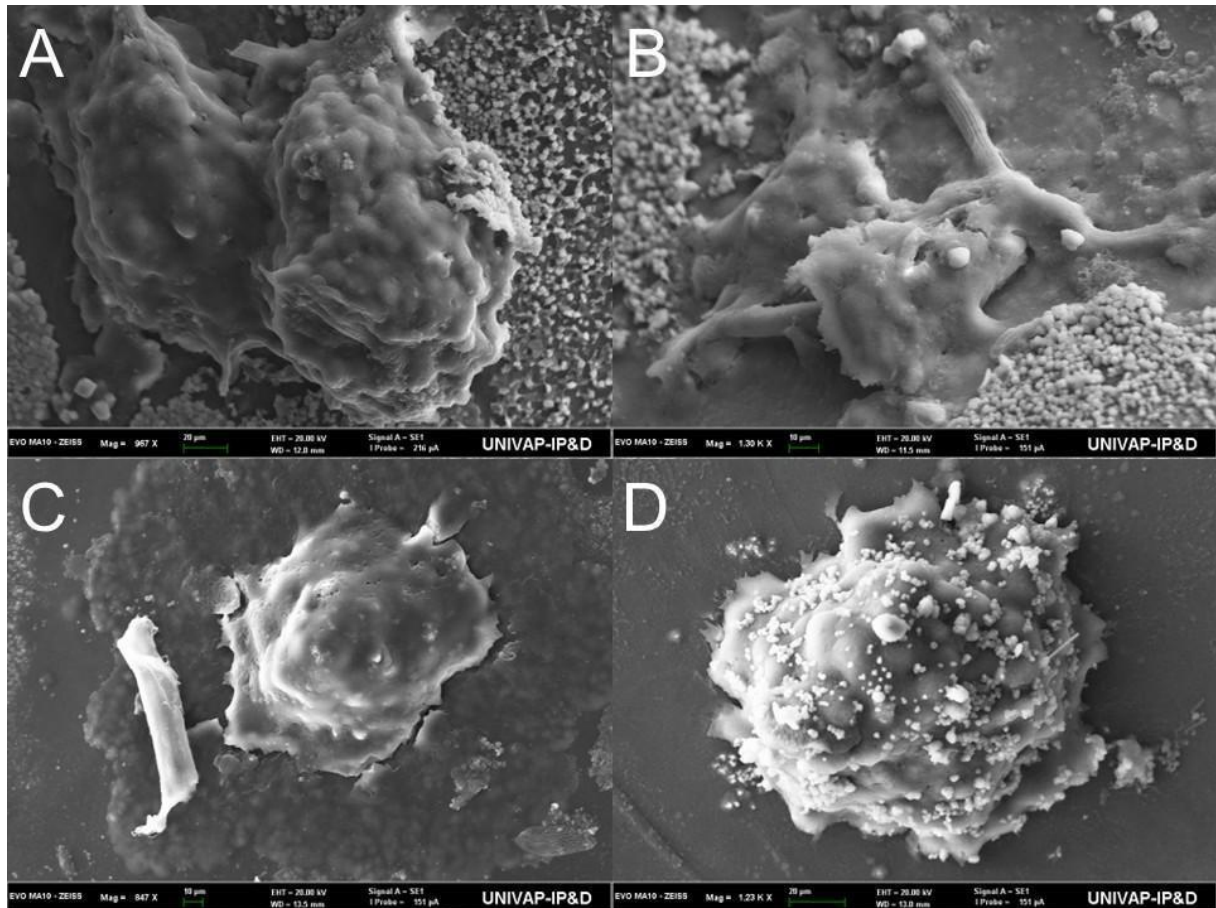
Figura 26: Fotomicrografia eletrônica dos esferoides grupo controle. A – 5 dias com magnificação 182 X; B – 5 dias com magnificação 959 X; C – 10 dias com magnificação 176 X; D – 10 dias com magnificação 786 X.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As fotomicrografias eletrônicas das amostras do grupo controle (Fig. 26) mostram a formação dos esferoides nos primeiros 5 dias (Fig. 26A e 26B). Comparando essas amostras com o crescimento em 10 dias (Fig. 26C e 26D), é possível notar o agrupamento de mais células, formando esferoides maiores e evidenciando a formação de esferoides saudáveis.

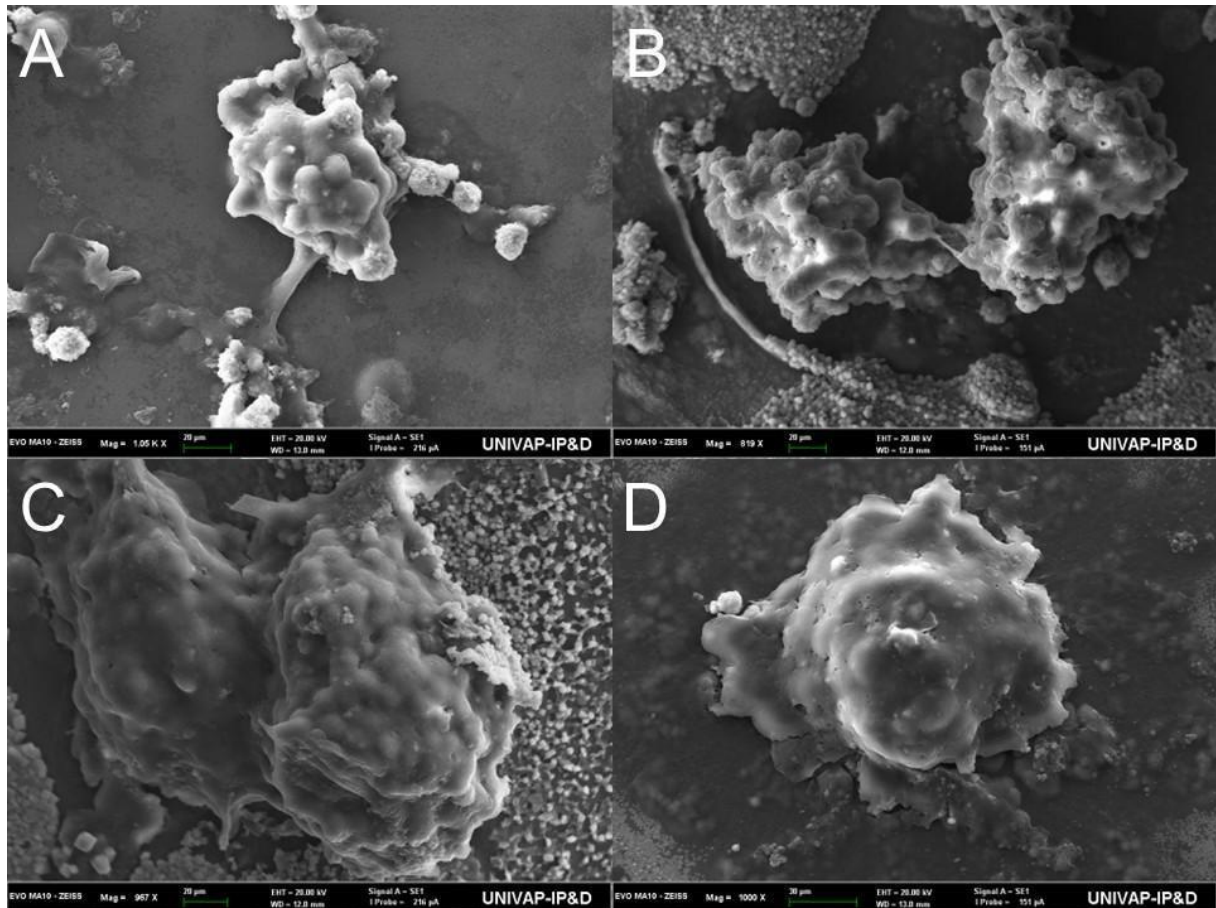
Figura 27: Fotomicrografia eletrônica do grupo esferoides-seda. A – 5 dias com magnificação 967 X; B – 5 dias com magnificação 1.30 K X; C – 10 dias com magnificação 847 X; D – 10 dias com magnificação 1.23 K X.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As fotomicrografias eletrônicas do grupo esferoide-seda mostram, assim como indicado pelas fotomicrografias de fluorescência (Fig. 24), filamentos de seda envoltos pelas células dos esferoides (Fig. 27). O crescimento das amostras condiz com o período de cultura de cada, com as amostras de 5 dias (Fig. 27A e 27B) sendo menores do que as amostras de 10 dias (Fig. 27C e 27D), exibindo mais partes dos filamentos de seda esfoliada (Fig. 27B).

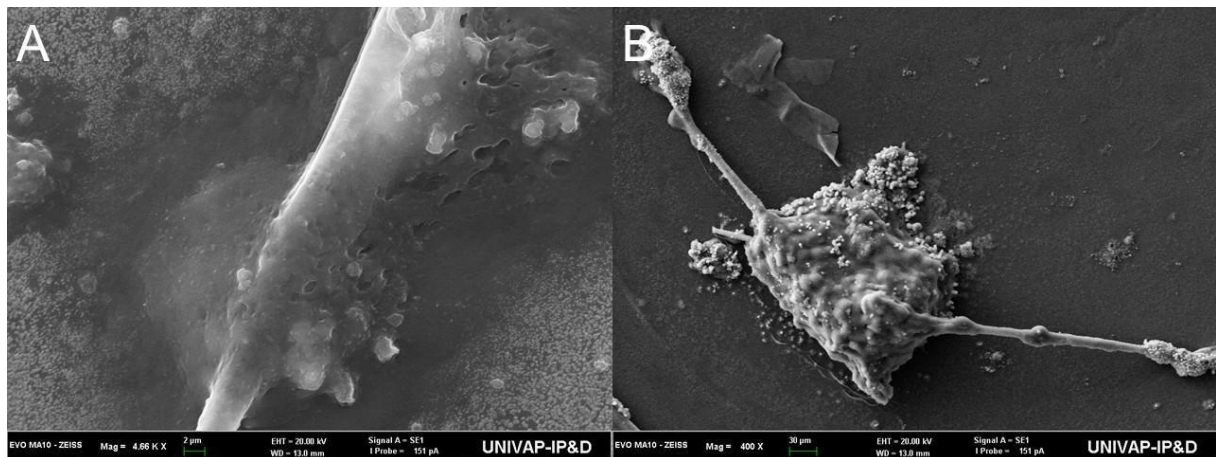
Figura 28: Comparação de tamanho dos grupos controle e esferoides-seda com magnificação em torno de 1 K X. A – Controle 5 dias (1.05 KX); B – Controle 10 dias (819 X); C – Esferoides-seda 5 dias (967 X); D – Esferoides-seda 10 dias (1.00 K X).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando todas as amostras em magnificações próximas, não apareceram mudanças relevantes em relação ao tamanho dos esferoides (Fig. 28).

Figura 29: Incorporação da seda pelos esferoides. A – Magnificação de 4.66 K X; B – Magnificação de 400 X.

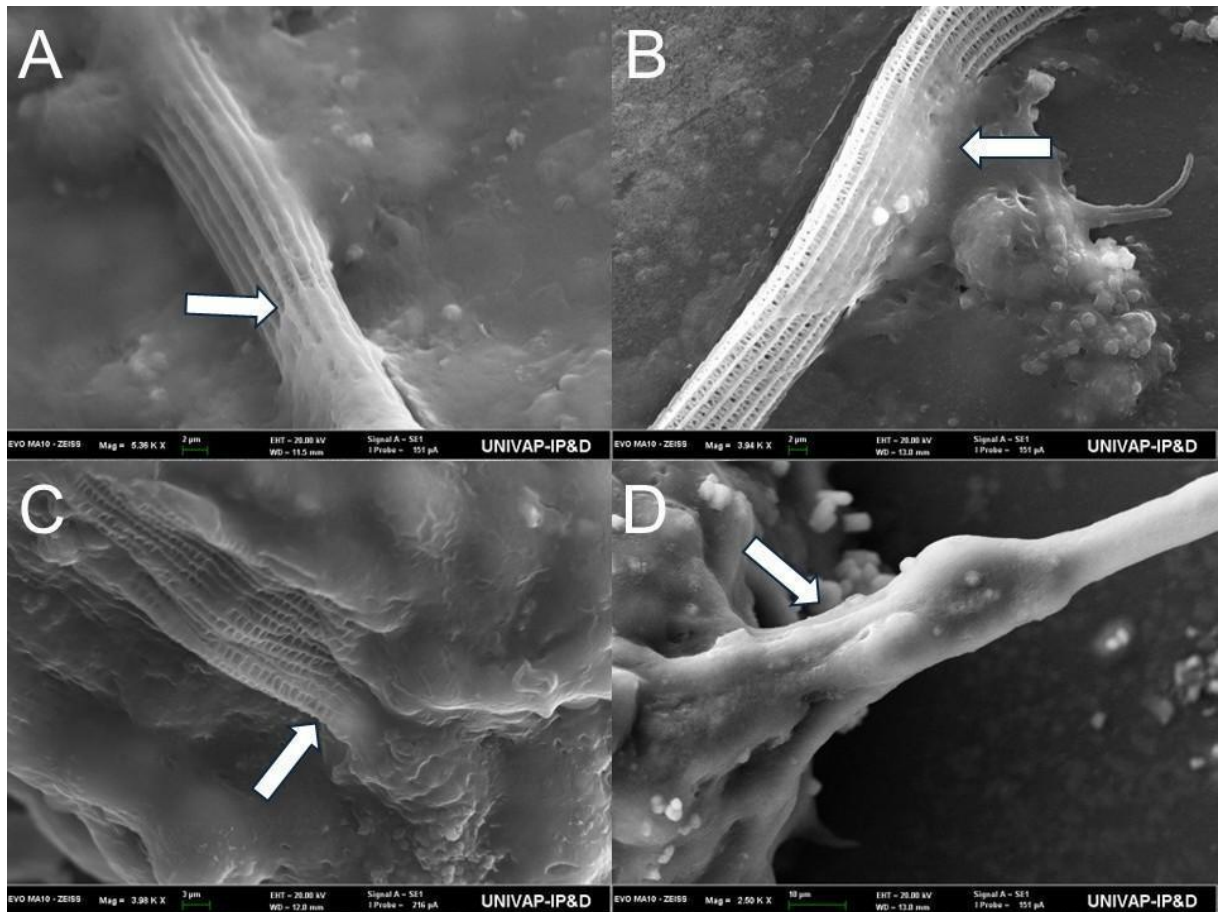


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os esferoides com a seda incorporada apresentam alto grau de adesão aos filamentos (Fig. 29), acompanhando o contorno dos fragmentos de seda, assim como foi observado nas imagens de microscopia (Fig. 29).

É possível observar a afinidade das células com o material por conta da extensão de suas membranas plasmáticas, que podem ser vistas estendendo-se sobre a seda esfoliada (Fig. 30).

Figura 30: Interação das células com extensão de membranas sobre os fragmentos de seda.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados apresentados mostram que há uma afinidade das células com a seda de aranha. A internalização dos fragmentos pelos esferoides observados na microscopia de fluorescência e a adesão da membrana plasmática vista no MEV, indicam uma compatibilidade entre eles. Além disso, o crescimento normal das células com a presença dos fragmentos indica que não há detrimento na introdução da seda esfoliada ao meio de cultura e que o material foi considerado adequado pelas células como substrato.

## 6 DISCUSSÃO

A mudança abrupta na coloração da seda das aranhas *T. clavipes* de dourado para branco ao serem trazidas para o laboratório pode ser causada por diversos fatores, mas ao refletir sobre todas as condições do momento de captura até o período de manutenção dos espécimes em laboratório, conseguimos afunilar as possíveis causas.

Primeiramente, o estresse causado durante o transporte e realocação dos espécimes poderia ter afetado o processo de excreção da seda, causando a alteração na cor. Contudo, após o período inicial de adaptação ao viveiro, as aranhas apresentaram comportamento calmo, então se o estresse fosse um fator principal, a produção da seda dourada teria sido retomada nas semanas subsequentes. Da mesma forma, o ambiente mantido nos viveiros estava de acordo com as condições em que se encontram na natureza, com a umidade controlada para mimetizar o habitat natural e a temperatura local sendo adequada já que a espécie é nativa das américas, habitando quase todo o continente.

Dois grandes fatores que poderiam ter influenciado na mudança de cor são a alimentação e disponibilidade de espaço, sendo estas possíveis por conta do impacto na saúde dos animais e alterar a forma como constroem suas teias. A alimentação foi um fator inicialmente cogitado, no entanto a diversidade dos alimentos e frequência em que as aranhas eram alimentadas nos fez descartar essa ideia, que também foi descartada por Putthanarat *et al.* (2004) que testaram a diferença de coloração por meio da fiação forçada dos fios e relataram que nem a alimentação nem o ambiente são fatores determinantes, assim apontando que outros fatores devem influenciar a decisão das aranhas sobre qual cor de seda será tecida, já que segundo eles, ambas as sedas dourada e branca estão presentes nas glândulas, mas a alimentação pode influenciar outras características da seda, afetando sua qualidade. Nossas observações indicam que possivelmente o espaço disponível para a construção de suas teias possa influenciar na decisão de qual coloração de fio usar, já que nas condições de laboratório o espaço disponível era muito menor do que na natureza, onde as aranhas constroem teias muito maiores para poder capturar suas presas.

A análise por MEV da estrutura das amostras de seda junto com a análise por EDS não apresentam nenhuma mudança significativa na estrutura física dos fios,

possibilitando descartar uma possível relação entre coloração e estrutura da seda, fato que é corroborado pelos estudos de Putthanarat *et al.* (2004), apresentando resultados similares ao estudar amostras que apresentavam as mesmas variações e relatando que ambas as amostras douradas e brancas apresentavam morfologia superficial e resistência similares. Além disso, o EDS mostrou que além dos elementos principais, o carbono e o oxigênio que compõem mais de 98% das amostras, haviam impurezas presentes que compunham os outros 2% restantes. Essas impurezas podem ter sido introduzidas de duas formas, contaminação por poluição e manipulação.

O fenômeno da fluorescência natural da seda de aranha é pouco descrito na literatura, estando presente em alguns trabalhos antigos como o de Lourenço *et al.* (1988) e outros em suas referências. Em nossos resultados, as amostras não demonstraram diferenças significativas nas emissões de fluorescência observadas, tendo as mesmas colorações, sendo apenas a intensidade de emissão das amostras brancas menor em comparação com as douradas e a predominância final das sobreposições sendo diferentes provavelmente devido a presença dos diferentes tipos de fios na mesma amostra. Essa fluorescência pode ter origem na hemolinfa das aranhas, que segundo Andrews *et al.* (2007) apresenta fluoróforos normalmente sequestrados para o exoesqueleto e cerdas presentes no corpo das aranhas. Da mesma forma, esses fluoróforos podem ser possivelmente sequestrados para as glândulas produtoras de seda e transmitidas para a seda. A pigmentação dourada não está relacionada diretamente aos fluoróforos e a capacidade fluorescente dos fios, já que as amostras de seda branca apresentam as mesmas emissões da dourada e isso corrobora com os relatos de Lourenço *et al.* (1988) que descreve a presença de fluorescência nas teias de outras aranhas que apresentam seda exclusivamente branca. Contudo, a diferença nas intensidades de fluorescência da amostra dourada em comparação com a branca, sendo a dourada mais forte, pode indicar que nesta espécie a pigmentação dourada contém uma concentração maior de compostos que também estão presentes na seda branca, mas em menor quantidade, o que poderia conferir a falta da coloração amarela nas amostras brancas. Estes compostos também podem apresentar uma relação indireta a fluorescência, não conferindo a capacidade total de fluorescência, mas contribuindo para o fenômeno, possivelmente explicando a predominância da fluorescência verde na sobreposição da seda dourada (Fig. 11D).

Ao analisar os espectros de FTIR, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras; contudo, a banda de Amida III ( $\sim 1225 - 1245 \text{ cm}^{-1}$ ) apresentou menor intensidade relativa na amostra branca. Como as bandas de Amida III e Amida I ( $\sim 1620 - 1630 \text{ cm}^{-1}$ ) se associam ao conteúdo de folhas- $\beta$ /cristalinidade da fibroína, essa redução pode indicar fração cristalina ligeiramente menor.

Analisando as três fases de degradação principais das amostras de seda obtidas no TG, devido a estrutura complexa da seda de aranha que é composta por diversos aminoácidos, proteínas e camadas, é possível correlacionar que cada uma dessas fases representa a degradação de proteínas ou camadas específicas, como as espidroínas ampulatas maiores, que compõem as camadas interior e exterior do núcleo. As diferenças nos gráficos podem indicar uma variação na estabilidade dessas proteínas devido a mudança de cor, já que ocorre mais rapidamente na seda branca. No entanto, por conta da seda não ser de um único tipo de fio, por exemplo apenas ampulata maior, mas sim um enovelado de todos os tipos de filamento, a taxa de perda de massa e massa residual podem ter sofrido a alteração devido a proporção desigual do material. Outra possibilidade seria que as camadas possuam diferentes espessuras de acordo com a coloração da seda (Bergmann *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2025). Da mesma forma, as pequenas variações no DSC podem ser explicadas pela distribuição desigual. Em relação a queda do fluxo de calor no primeiro ciclo dos gráficos de DSC, isto pode ser explicado pela evaporação da umidade presente na seda, refletindo o primeiro fenômeno de degradação presente nos gráficos de TG. O segundo ciclo corrobora com esta ideia, já que não apresenta a mesma queda de taxa nas mesmas condições, indicando que houve a liberação espontânea de energia próximo aos  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura em que a água evapora.

Com relação às células e a absorção do componente fluorescente presente na seda, pode-se afirmar com certeza a interação entre as duas, não só com os filamentos servindo de substrato para adesão, mas também do material sendo consumido e internalizado pelas células. Os estudos feitos por Kuhbier *et al.* (2010) também relatam essa adesão celular, mostrando a adesão em nível intracelular. Outro aspecto relatado é que a seda não necessita de modificação química para ser utilizada como biomaterial e pode ser utilizada pura, assim corroborando com os nossos resultados.

A fluorescência incorporada pelas células representa um possível problema no uso da seda como biomaterial já que pode interferir com métodos de análise que se baseiam na utilização de pigmentos fluorescentes e isto é advertido pelos estudos de Neo *et al.* (2015) explicando o fenômeno da autofluorescência em seda de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e seu impacto em análises por imagem a base de fluorescência, mas também apresenta uma solução para tal problema através de um tratamento com o corante Preto de Sudan B para inibir a fluorescência indesejada. Contudo, por mais que a fluorescência natural da seda de aranha possa interferir em primeira instância por ser absorvida e incorporada pelas células, esse mesmo fato permite a possibilidade de aplicação dessa fluorescência como pigmento para as mesmas análises com imagem.

Além da fluorescência, as imagens por MEV foram essenciais para observar diretamente a ancoragem dos esteroides nos fragmentos de seda esfoliada, mostrando as extensões de membrana envolvendo os filamentos e o volume de células acumulado em volta do material. Essa afinidade das células com a seda apresenta as capacidades dela como biomaterial e mostra as características da seda de aranha como uma ótima alternativa para *scaffold* em cultura de células. A utilidade e afinidade de células com a seda de aranha é relatada pelos estudos de Allmeling *et al.* (2006) e Radtke *et al.* (2011) que utilizam o material como enxerto para guiar a regeneração de axônios. Eles observaram, transplantando esses enxertos em nervos danificados de ovelhas, que as células de Schwann aderiram e migraram para o enxerto, tendo assim a regeneração axonal com remielinização e preservação dessas estruturas após 10 meses de estudo. Wendt *et al.* (2011) obtiveram resultados que corroboram com o nosso estudo ao apresentar a adesão celular de queratinócitos e fibroblastos embrionários de camundongos em molduras de aço tecidas com seda de aranha.

Um fator que pode amplificar a aderência celular à seda é a esfoliação feita no material. Ao observar a superfície da seda esfoliada através do MEV, é possível notar que o material se torna poroso, aumentando a superfície de contato e permitindo com que as células tenham acesso às camadas mais internas do material, melhorando a fixação. Um efeito secundário que pode ter influenciado na absorção da fluorescência pelas células, é o acesso às camadas internas da seda e seus componentes que ficam expostos devido a quebra da casca superficial (Bergmann *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2025).

São necessários mais estudos para avaliar quais camadas especificamente contêm a coloração da seda e apresentam os fluoróforos.

## 7 CONCLUSÃO

A causa da mudança de coloração da seda de aranha ainda não pôde ser apontada com exatidão, mas com nossos estudos foi possível concluir que a mudança pode estar atrelada a disponibilidade de espaço sendo um fator na decisão de qual teia os espécimes teciam. Outra conclusão é a de que a mudança em coloração não apresenta grandes diferenças no aspecto físico do material, mantendo as mesmas propriedades independente da coloração e por mais que os gráficos de FTIR, TG e DSC indiquem uma certa variação entre as duas, as variáveis presentes não permitem apontar uma diferença muito grande, já que há a presença de quantidades desiguais de tipos de filamento e mesmo assim os gráficos continuaram apresentando o mesmo perfil nas curvas.

O processo de incorporação de fluorescência pelas células apresenta grande potencial e requer estudos para aprofundar o entendimento dos impactos que podem gerar. Acima disso, a absorção da fluorescência da teia permite abrir novas portas para a possível criação de um novo pigmento para utilização em análises de imagem por meio de marcação por fluorescência.

Em relação a ancoragem dos esferoides na seda esfoliada, conclui-se que o material apresenta grande capacidade para utilização como *scaffold* em cultura 3D, permitindo que as células adiram em sua superfície, principalmente com o tratamento de esfoliação da seda, e formem os esferoides, que demonstram preferência a aderir ao material. A maior superfície de contato gerada pela esfoliação e segmentação dos fios também oferece maior disponibilidade de área para as células se proliferarem. Possivelmente, podemos correlacionar a absorção da propriedade fluorescente pelas células como um consumo do material, através da absorção direta e do acesso ao núcleo dos filamentos, atestando assim o potencial de não só servir como substrato para a formação dos esferoides, mas também como material bioabsorvível, podendo potencialmente ser aplicado como sutura bioabsorvível e servindo de *scaffold* para a adesão das células novas que fecham o ferimento.

Após observar as capacidades biocompatíveis da seda de aranha, é possível concluir que suas utilizações são extensas, abrindo muitas portas para novas pesquisas e que demanda uma observação mais atenta e aprofundada para explorar o potencial completo desse material.

## REFERÊNCIAS

- ALLMELING, C. *et al.* Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 770–777, jul. 2006.
- ANDREWS, K.; REED, S. M.; MASTA, S. E. Spiders fluoresce variably across many taxa. **Biology Letters**, v. 3, n. 3, p. 265–267, 3 abr. 2007.
- BERGMANN, F. *et al.* The properties of native *Trichonephila dragline* silk and its biomedical applications. **Biomaterials Advances**, v. 140, p. 213089, 1 set. 2022.
- BON, F. X. I. A discourse upon the usefulness of the silk of spiders. by Monsieur Bon, President of the Court of Accounts, Aydes and Finances, and President of the Royal Society of Science at Montpellier. Communicated by the Author. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 27, n. 325, p. 2–16, 31 dez. 1710.
- CHATTERLEY, A. S. *et al.* Broadband Multidimensional Spectroscopy Identifies the Amide II Vibrations in Silkworm Films. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6275, 1 jan. 2022.
- COHEN, N.; LEVIN, M.; EISENBACH, C. D. On the Origin of Supercontraction in Spider Silk. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 2, p. 993–1000, 22 jan. 2021.
- CUNNIFF, P. M. *et al.* Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 5, n. 8, p. 401–410, ago. 1994.
- DOBLHOFER, E.; HEIDEBRECHT, A.; SCHEIBEL, T. To spin or not to spin: spider silk fibers and more. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9361–9380, 11 set. 2015.
- GRACE, C. *et al.* Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 224, p. 117382–117382, 1 jan. 2020.
- HENNECKE, K. *et al.* Bundles of Spider Silk, Braided into Sutures, Resist Basic Cyclic Tests: Potential Use for Flexor Tendon Repair. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61100, 17 abr. 2013.
- HU, S. *et al.* Structure, production and application of spider silks. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 309, p. 142939, 8 abr. 2025.
- JAFARI, M. J. *et al.* Force-Induced Structural Changes in Spider Silk Fibers Introduced by ATR-FTIR Spectroscopy. **ACS applied polymer materials**, v. 5, n. 11, p. 9433–9444, 30 out. 2023.
- KÄLLÉN, A. *et al.* 3D Culture in Functionalized FN-Silk Networks Facilitate Proliferation, Differentiation and Phenotypic Stability of Mature Human Primary Cells

and Stem Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 122, n. 9, p. 2522–2534, 17 jun. 2025.

KISELEVA, A. P.; KRIVOSHAPKIN, P. V.; KRIVOSHAPKINA, E. F. Recent Advances in Development of Functional Spider Silk-Based Hybrid Materials. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 30 jun. 2020.

KORNFELD, T. *et al.* Spider silk nerve graft promotes axonal regeneration on long distance nerve defect in a sheep model. **Biomaterials**, v. 271, p. 120692, abr. 2021.

KUHBIER, J. W. *et al.* Interactions between Spider Silk and Cells – NIH/3T3 Fibroblasts Seeded on Miniature Weaving Frames. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12032, 9 ago. 2010.

KUMAR, P.; ANA JIMENEZ FRANCO; ZHAO, X. 3D culture of fibroblasts and neuronal cells on microfabricated free-floating carriers. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 227, p. 113350–113350, 1 jul. 2023.

KUMARI, S. *et al.* Engineered spider silk-based 2D and 3D materials prevent microbial infestation. **Materials Today**, v. 41, p. 21–33, dez. 2020.

LEPORE, E. *et al.* **Silk reinforced with graphene or carbon nanotubes spun by spiders.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1504/1504.06751.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2023.

LIU, Y.; SHAO, Z.; VOLLRATH, F. Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk. **Nature Materials**, v. 4, n. 12, p. 901–905, 20 nov. 2005.

LORENZ-FONFRIA, V. A. Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 7, p. 3466–3576, 23 mar. 2020.

LOURENÇO, W.; KOVOOR, J.; CUEVAS, A. Observations on Spiders in Ultraviolet Light. **XI. Europäisches Arachnologisches Colloquium**. Technische Universität Berlin. (TUB-Dokumentation Kongresse und Tagungen, Heft 38), 1988. p. 342-349. Disponível em: [https://www.european-arachnology.org/esa/wp-content/uploads/2015/08/342\\_Lourenco.pdf](https://www.european-arachnology.org/esa/wp-content/uploads/2015/08/342_Lourenco.pdf).

NEO, P. Y. *et al.* Enhancing Analysis of Cells and Proteins by Fluorescence Imaging on Silk-Based Biomaterials: Modulating the Autofluorescence of Silk. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 21, n. 2, p. 218–228, fev. 2015.

NEWMAN, J.; NEWMAN, C. Oh what a tangled web: the medicinal uses of spider silk. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 290–292, abr. 1995.

ORNITHOPOULOU, E. *et al.* Self-Assembly of RGD-Functionalized Recombinant Spider Silk Protein into Microspheres in Physiological Buffer and in the Presence of Hyaluronic Acid. **ACS Applied Bio Materials**, v. 6, n. 9, p. 3696–3705, 14 ago. 2023.

PERERA, D. *et al.* Natural spider silk nanofibrils produced by assembling molecules or disassembling fibers. **Acta Biomaterialia**, v. 168, p. 323–332, 15 set. 2023.

PÉREZ-RIGUEIRO, J.; ELICES, M.; GUINEA, G. V. Controlled supercontraction tailors the tensile behaviour of spider silk. **Polymer**, v. 44, n. 13, p. 3733–3736, jun. 2003.

PLATNICK, N. I. *et al.* **Spiders of the world: a natural history**. Princeton, Nj: Princeton University Press, 2020.

PUTTHANARAT, S. *et al.* The color of dragline silk produced in captivity by the spider *Nephila clavipes*. **Polymer**, v. 45, n. 6, p. 1933–1937, mar. 2004.

RADTKE, C. *et al.* Spider Silk Constructs Enhance Axonal Regeneration and Remyelination in Long Nerve Defects in Sheep. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16990, 25 fev. 2011.

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. 154–61, 2008.

SALEHI, S.; KOECK, K.; SCHEIBEL, T. Spider Silk for Tissue Engineering Applications. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 737, 1 jan. 2020.

STERN-TAL, D.; ITTAH, S.; SKLAN, E. A new cell-sized support for 3D cell cultures based on recombinant spider silk fibers. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 10, p. 1748–1757, 2 set. 2021.

VORA, D. *et al.* Development of 1,2,4-Triazole-5-Thione Derivatives as Potential Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) in Tuberculosis. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v.18, n. 4, p. 1742–1758, 2019.

WANG, Q. *et al.* Protein secondary structure in spider silk nanofibrils. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4329, 28 jul. 2022.

WENDT, H. *et al.* Artificial Skin – Culturing of Different Skin Cell Lines for Generating an Artificial Skin Substitute on Cross-Weaved Spider Silk Fibres. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21833, 26 jul. 2011.

WRIGHT, S.; GOODACRE, S. L. Evidence for antimicrobial activity associated with common house spider silk. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, 25 jun. 2012.

ZHANG, S. *et al.* Nitrogen unavailability helps to protect spider silk from bacterial growth. **Journal of Experimental Biology**, 1 jan. 2019.

## APÊNDICE A - COLETA DOS ESPÉCIMES E COMPORTAMENTO EM LABORATÓRIO

### Coleta

Durante a expedição de coleta dos espécimes de *T. clavipes* dentro da área de conservação do Instituto Butantan, todos foram encontrados em bioma de Mata Atlântica (Fig. 31A), tendo sido coletados 8 fêmeas adultas. Todas foram encontradas em suas teias de coloração dourada (Fig. 31B e 31C). A coleta foi efetuada no início de abril, final da época de reprodução e havia diversos machos presentes na teia das fêmeas (Fig. 31C), característica comum da espécie. A coleta dos espécimes ocorreu de forma rápida e precisa, sem danos aos animais e minimizando o estresse causado pela transferência da teia ao pote de coleta (Fig. 31D).

Figura 31: Fotos tiradas durante a coleta. A – Teia (indicada com seta) em meio a flora local; B – Fêmea localizada em sua teia; C – Fêmea com macho da espécie (indicado pela seta); D – Espécime em pote de coleta.



Fonte: o autor.

Dentro do pote de coleta, cada espécime teceu uma pequena teia de sustentação na tampa após um período inicial de acuação (Fig. 31D). Dos 8 espécimes coletados, 6 tinham tamanho corporal de aproximadamente 20 mm e 2 menores tinham tamanho aproximado de 15 mm.

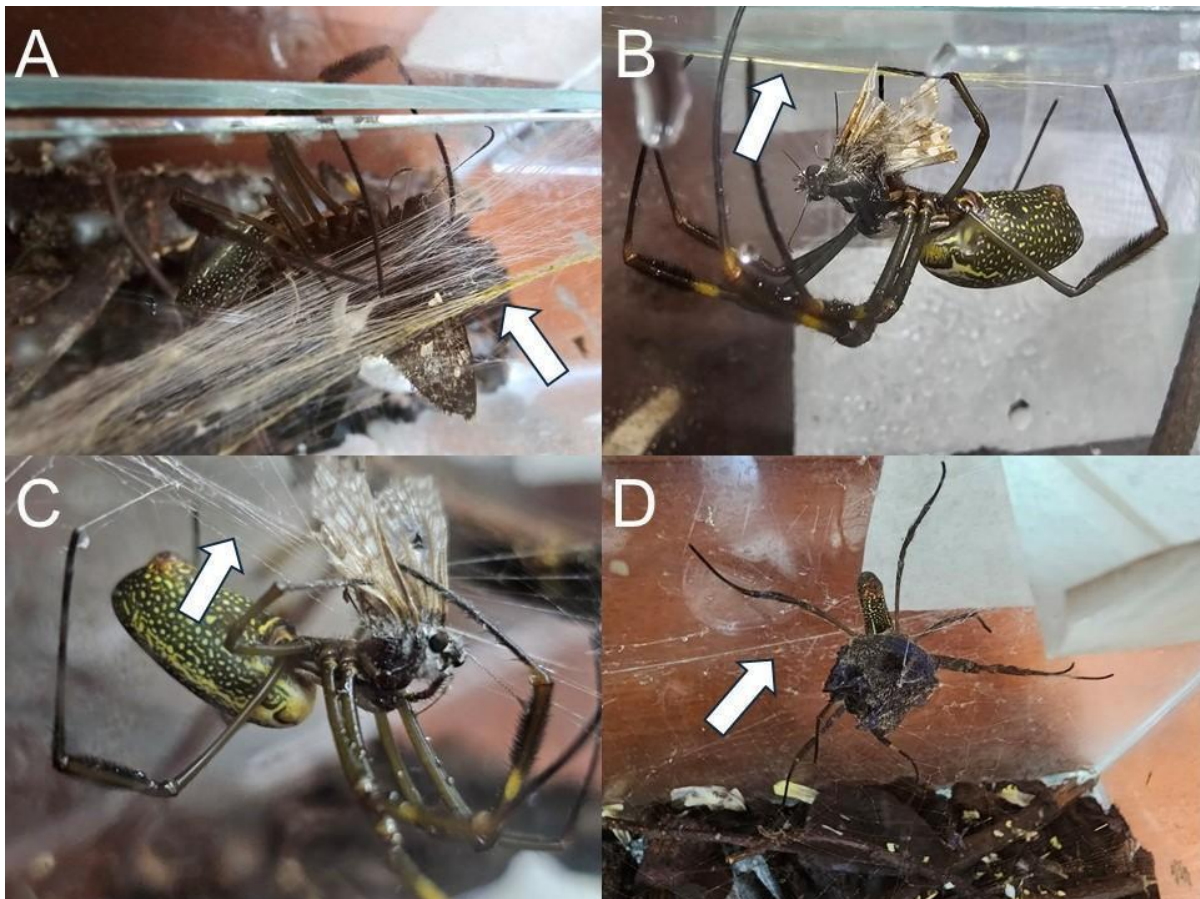
Após a coleta dos espécimes, a teia em que se encontravam foi colhida para análise e experimentação no laboratório. As teias tinham tamanhos diversos e variavam entre 50cm e 1m de diâmetro, sem levar em conta as linhas de ancoragem, que na maior teia chegavam a medir mais de 3 m de ponta a ponta.

A coleta levou cerca de 5 horas, o transporte do local até o IP&D levou cerca de 6 horas e todos os 8 espécimes chegaram vivos e intactos no laboratório.

### Comportamento em laboratório

As aranhas foram transferidas para seus respectivos viveiros e inicialmente, durante os primeiros dias, apresentaram dificuldade para tecer suas teias devido ao estresse da mudança de ambiente. Após o período inicial de adaptação ao novo ambiente, os espécimes começaram a tecer teias para locomoção no viveiro, com preferência a construir próximo ao topo, na tampa (Fig. 32A). Contudo, a coloração da seda que teceram era branca (Fig. 32C), diferindo da coloração dourada das teias encontradas na natureza. Essa mudança de coloração foi abrupta, mas dentro dos primeiros dias ainda podiam se observar fios de seda dourada dentro dos viveiros (Fig. 32A e 32B). Após a primeira semana, quando já podia ser observada a construção da teia de captura, toda a seda tecida pelos espécimes foi de coloração branca (Fig. 32D).

Figura 32: Espécimes em alimentação com variação na coloração das teias. A – Coloração mista da seda nas primeiras semanas (visão superior); B – Coloração dourada da seda na primeira semana; C – Coloração branca da seda nas semanas subseqüentes; D – Teia de captura com seda branca.



Fonte: o autor.

Os espécimes eram alimentados regularmente, reagindo rapidamente e ativamente às presas. Essa atividade, juntamente com duas das 8 aranhas passarem

pelo processo de ecdise, indicava que todos os indivíduos coletados estavam saudáveis e confortáveis em seus habitats.

Após a primeira semana, o primeiro espécime morreu de causas naturais devido ao tempo de vida curto desta espécie após a época de reprodução. As outras aranhas também morreram por idade de forma subsequente até o final de junho, quando a última faleceu. Assim, as teias eram coletadas conforme cada indivíduo perecia.