

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE FIBRAS  
DE SEDA RECOMBINANTE DE ARANHA: UMA REVISÃO  
BIBLIOGRÁFICA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**GABRIELA CANDIDO**

**PORTO ALEGRE, RS  
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE FIBRAS  
DE SEDA RECOMBINANTE DE ARANHA: UMA REVISÃO  
BIBLIOGRÁFICA**

**GABRIELA CANDIDO**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Químico.

**Orientador:**  
**Prof. Débora Jung Luvizetto Faccin, D.Sc.**

**PORTO ALEGRE, RS  
2024**

Candido, G.

Métodos de produção e características de fibras de seda recombinante de aranha: uma revisão bibliográfica / Gabriela Candido. -- 2024.

52 f.

Orientador: Débora Jung Luvizetto Faccin, D.Sc.

Trabalho (Conclusão de curso) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

proteína recombinante de seda, engenharia genética, fibra de seda de aranha, biopolímeros, materiais de engenharia, expressão proteica I. Faccin, D. J. L., orient. II. Título.

# Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Vanderli e Zaire, por todo o suporte que me ofereceram durante esse período acadêmico. Muitos foram os momentos de dificuldade ao longo desses anos, muitas questões de saúde, mas com todas as adversidades, nos mantivemos firmes e seguimos juntos para chegar até a conclusão desse objetivo. À minha irmã Mariane, que sempre se fez presente mesmo de longe, prestando apoio emocional, ou compartilhando os fortuitos momentos da vida. Ainda, aos meus dindos, Vânia e Jorge, que sempre me acolheram e me cuidaram das mais variadas formas, sendo minha segunda casa em Porto Alegre, me oferecendo casa nos momentos necessários, me suportando nos momentos delicados de saúde, e sempre se fazendo presente.

Aos amigos que fiz ao longo da faculdade, agradeço pelos momentos compartilhados, felizes, ou frustrantes, pelas longas horas de aula, de ônibus, e de festas que passamos juntos; espero que eu possa ter contribuído a vocês tanto quanto vocês contribuíram na minha vida, não só àqueles que continuam, mas também àqueles cujos caminhos se desentrelaçaram. E, também, aos amigos que eu não conheci através da faculdade, agradeço à todos os momentos compartilhados, à paciência, suporte e compreensão, muitas vezes pela necessidade de ausência ao longo desses anos.

Agradeço, também, a todos os profissionais de saúde cujo caminho encontrei, pois minha saúde teve um impacto muito grande durante essa trajetória e o encontro de profissionais corretos me permitiram continuar até o final.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Débora, por ter topado a tratar desse assunto comigo, não discutido na universidade, que ainda se apresenta como um grande caminho a ser percorrido, mas que, futuramente, pode causar um grande impacto.



# Resumo

Este estudo explora a fascinante estrutura da seda de aranha, cujas teias, apesar da finura e leveza, intrigantemente capturam insetos em pleno voo. O objetivo principal é compreender tanto o processo natural de produção da seda quanto os métodos de produção recombinante. Busca-se analisar esses métodos e comparar as propriedades entre a seda de aranha natural, a seda de aranha recombinante, Nylon 6,6 e Kevlar 49. O desenvolvimento foi realizado a partir de um levantamento bibliográfico, abordando aspectos qualitativos e quantitativos, concentrando-se na produção da proteína recombinante que formadora da variedade *dragline silk* da espécie *Nephila clavipes*. A análise compreende métodos de produção, propriedades resultantes e a identificação da tecnologia, que atualmente, demonstra maior potencial para ser aplicada em larga escala. Identificou-se que a *Escherichia Coli* tem sido amplamente utilizada para a produção da seda recombinante pelos objetos de pesquisa e pelas empresas que atuam a fabricam. Ainda, identificou-se que o caminho mais promissor para a produção em larga escala é a produção de proteínas menores, com posterior polimerização motivada por autoclivagem. As fibras obtidas a partir da proteína recombinante apresentaram propriedades significativas, sendo possível a substituição do Nylon 6,6 em suas aplicações, mas ainda não é possível a simples substituição do Kevlar 49. Para o futuro, são necessários mais estudos com o objetivo de entender as relações entre composição e propriedades da fibra, otimizando o design do polímero de interesse, bem como a construção do seu processo de produção.

**Palavras-chave:** proteína recombinante de seda, engenharia genética, fibra de seda de aranha, biopolímeros, materiais de engenharia, expressão proteica





# Abstract

This study explores the fascinating structure of spider silk, whose webs, despite their thinness and lightness, intriguingly capture insects in mid-flight. The main objective is to understand both the natural silk production process and recombinant production methods. It seeks to analyze these methods and compare the properties between natural spider silk, recombinant spider silk, Nylon 6,6, and Kevlar 49. The development was carried out through a bibliographic survey, addressing qualitative and quantitative aspects, focusing on the production of recombinant protein forming the variety dragline silk of the species *Nephila clavipes*. The analysis comprises production methods, resulting properties, and the identification of technology that currently demonstrates the greatest potential for large-scale application. It was identified that *Escherichia coli* has been widely used for the production of recombinant silk by research entities and companies engaged in manufacturing. Furthermore, it was identified that the most promising path for large-scale production is the production of smaller proteins, with subsequent polymerization driven by autocleavage. Fibers obtained from recombinant protein showed significant properties, making it possible to replace Nylon 6,6 in its applications, but simple substitution of Kevlar 49 is not yet possible. For the future, more studies are needed to understand the relationships between fiber composition and properties, optimizing the design of the polymer of interest, as well as the construction of its production process.

**Keywords:** recombinant silk protein, genetic engineering, spider silk fiber, biopolymers, engineering materials, protein expression



# Sumário

<b>Lista de Figuras</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Símbolos</b>	<b>xii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Conceitos Fundamentais</b>	<b>3</b>
2.1 Conceitos acerca de proteínas . . . . .	3
2.1.1 Aminoácidos . . . . .	3
2.1.2 Proteínas . . . . .	3
2.1.3 Síntese proteica . . . . .	4
2.1.4 Proteína recombinante . . . . .	5
2.1.5 Conformações da proteína . . . . .	6
2.2 Variedades e propriedades da seda de aranha natural . . . . .	7
2.2.1 <i>Major Ampullate Silk/ Dragline Silk</i> . . . . .	7
2.2.2 <i>Minor Ampullate Silk</i> . . . . .	8
2.2.3 <i>Flagelliform Silk</i> . . . . .	9
2.2.4 <i>Pyriiform Silk</i> . . . . .	9
2.2.5 <i>Aggregated Silk</i> . . . . .	10
2.2.6 <i>Cylindriiform/Tubuliform Silk</i> . . . . .	10
2.2.7 <i>Aciniiform Silk</i> . . . . .	11
2.2.8 Propriedades . . . . .	11
2.3 Conceitos acerca de polímeros . . . . .	14
2.3.1 Plásticos . . . . .	15
2.3.2 Fibras . . . . .	16
<b>3 Metodologia</b>	<b>19</b>
<b>4 Revisão Bibliográfica</b>	<b>21</b>
<b>5 Discussão e inferências</b>	<b>29</b>
<b>6 Considerações Finais</b>	<b>33</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>35</b>

# Lista de Figuras

Figura 2.1	Cadeia molecular de um aminoácido genérico. (ALBERTS, 2017) . . .	3
Figura 2.2	Exemplos de aminoácidos. (ALBERTS, 2017) . . . . .	4
Figura 2.3	Síntese proteica simplificada. . . . .	5
Figura 2.4	Fluxograma simplificado da síntese proteica. Fonte: O Autor. . . . .	5
Figura 2.5	Representação da teia de aranha construída com as sete variedades de seda. Adaptado de: (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022) . . . . .	8
Figura 2.6	Unidade repetitiva do Nylon®6,6. Em vermelho, grupo amida destacado. Adaptado de: (HASHEMI; SMITH W., 2012). . . . .	16
Figura 2.7	Unidade repetitiva de poliamida aromáticas. Fonte: (HASHEMI; SMITH W., 2012). . . . .	17
Figura 4.1	Glândula <i>Major Ampullate</i> da espécie <i>N. clavipes</i> . Traduzido de: (LIN et al., 2015) . . . . .	22

# Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Propriedades de seda estudadas em diferentes artigos. Adaptado de: (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022) . . . . .	12
Tabela 5.1	Propriedades de diferentes materiais, com adaptações de: (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022), (BOWEN et al., 2018), (HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013), respectivamente. . . . .	31



# Capítulo 1

## Introdução

Em 1972, Paul Berg e seus colaboradores demonstraram que era possível cortar *in vitro* moléculas de DNA de diferentes origens, e ligar os fragmentos resultantes entre eles, obtendo assim moléculas híbridas de DNA, inexistentes na natureza. (BORZANI et al., 2001). Desde então, proteínas, até então produzidas por organismos biológicos, vêm sendo estudadas com o objetivo de sintetizá-las artificialmente, produzindo proteínas recombinantes.

A seda de aranha atraiu a atenção dos pesquisadores devido às estruturas que as aranhas produzem para capturar insetos em voo (HUMENIK et al., 2011). Há sete variedades de seda de aranha e são compostas por proteínas, genericamente chamadas de espidroínas. Cada variedade é denominada pelo nome da glândula que a produz seguido do termo *silk*, então a seda *Minor Ampullate Silk* é a seda produzida pela glândula *Minor Ampullate*.

Algumas variedades da seda são superiores ao Kevlar® e ao aço quando comparadas a combinação das propriedades mecânicas – resistência, elasticidade, e densidade. Por exemplo, a *Major Ampullate silk* é cinco vezes mais resistente que o aço, por peso, e comparável a fibras sintéticas, como o Kevlar®49, que, por mais que seja mais forte que a seda, possui uma capacidade de extensão oito vezes menor, conferindo, assim, uma menor resistência. (SCHEIBEL, 2004). A produção natural dessa fibra é impraticável em escala industrial, pois devido às características canibal e territorial das aranhas, não é possível criá-las em cativeiro ((FOX, 1975)). Além disso, é importante ressaltar que, mesmo na hipótese de viabilidade, é necessário explorar alternativas para a produção de produtos de origem animal, visando mitigar a explo-

ração animal.

Sendo assim, a seda está dentre os muitos materiais estudados, e suas excepcionais propriedades têm resultado em uma longa lista de áreas de aplicações: têxtil, materiais de engenharia – fibras e compósitos –, cosmética, médica – fios cirúrgicos –, farmacêutica – dispositivos de liberação controlada de medicamentos –, eletrônica – componentes flexíveis e sensores –, entre outras.

Este estudo tem como objetivo entender o processo de produção natural da seda de aranha, entender os métodos de produção de seda recombinante e propor caminhos para melhorias desse processo, bem como comparar as propriedades entre a seda de aranha natural, a seda de aranha recombinante e os materiais aos quais são propostas como alternativa.



# Capítulo 2

## Conceitos Fundamentais

### 2.1 Conceitos acerca de proteínas

#### 2.1.1 Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades fundamentais que compõem as proteínas. São moléculas orgânicas que contêm um grupo amina ( $-NH_2$ ), um grupo carboxila ( $-COOH$ ), um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (também chamada de grupo R), que varia entre os diferentes aminoácidos. Existem 20 aminoácidos padrão que são comumente encontrados em proteínas como, por exemplo: glicina (G), alanina (A), prolina (P), cisteína (C), valina (V), leucina (L) (ALBERTS, 2017).

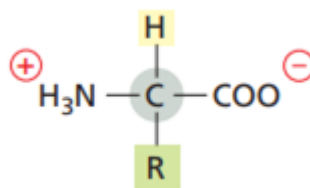


FIGURA 2.1. Cadeia molecular de um aminoácido genérico. (ALBERTS, 2017)

#### 2.1.2 Proteínas

Proteína é uma macromolécula biológica e é constituída por uma extensa cadeia linear de aminoácidos, sendo que esses estão conectados uns aos outros por meio de

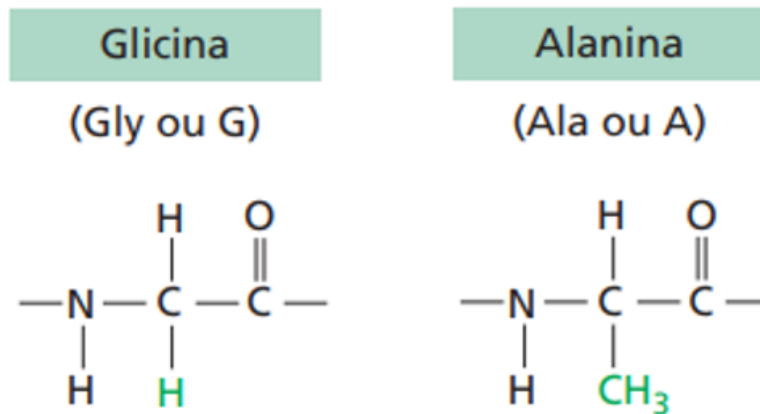


FIGURA 2.2. Exemplos de aminoácidos. (ALBERTS, 2017)

ligações, chamadas de ligações peptídicas. Essas ocorrem entre o grupo amino de um aminoácido com o grupo carboxila de outro. Cada categoria de proteína apresenta uma sequência única de aminoácidos, e em uma única célula, podem ser encontradas milhares de proteínas distintas (ZAHA et al., 2014).

As duas extremidades da proteína são quimicamente distintas: a extremidade que apresenta um grupo amino livre ( $\text{NH}_3^+$ , também representado como  $\text{NH}_2$ ) é a terminação aminoterminal, ou N-terminal, e a que apresenta o grupo carboxila livre ( $\text{COO}^-$ , também representado como  $\text{COOH}$ ) é a terminação carboxilterminal ou C-terminal. A sequência de aminoácidos de uma proteína é sempre apresentada na direção N para C-terminal, lendo-se da esquerda para a direita (ALBERTS, 2017).

### 2.1.3 Síntese proteica

A síntese de uma proteína ocorre no ribossomo, uma organela celular. Simplificadamente, a construção da proteína inicia-se com a transcrição, um processo em que uma região específica do DNA forma o RNA mensageiro (RNAm), região essa constituinte da informação necessária à produção. Munido da especificação sequencial de aminoácidos, o RNAm leva ao ribossomo a receita da proteína a ser produzida. Com isso, o ribossomo seleciona os aminoácidos presentes no meio celular transportados pelo RNA transportador (RNAt) para a formação da proteína através do processo denominado tradução ZAHA et al..

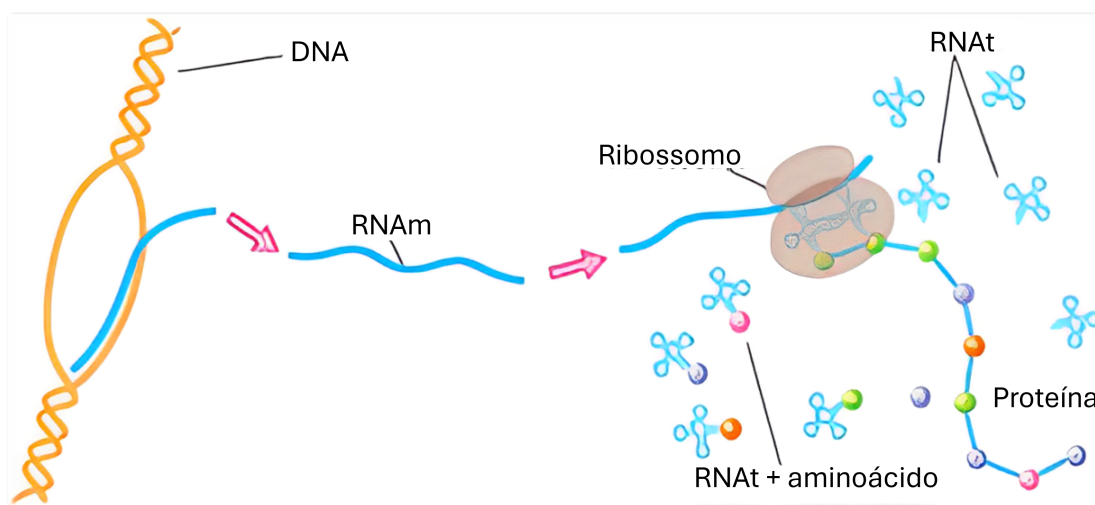


FIGURA 2.3. Síntese proteica simplificada.

Blog do Enem. Disponível em [blogdoenem.com.br/sintese-proteica-biologia-enem/](http://blogdoenem.com.br/sintese-proteica-biologia-enem/).  
Acesso em: 12 de janeiro de 2024.

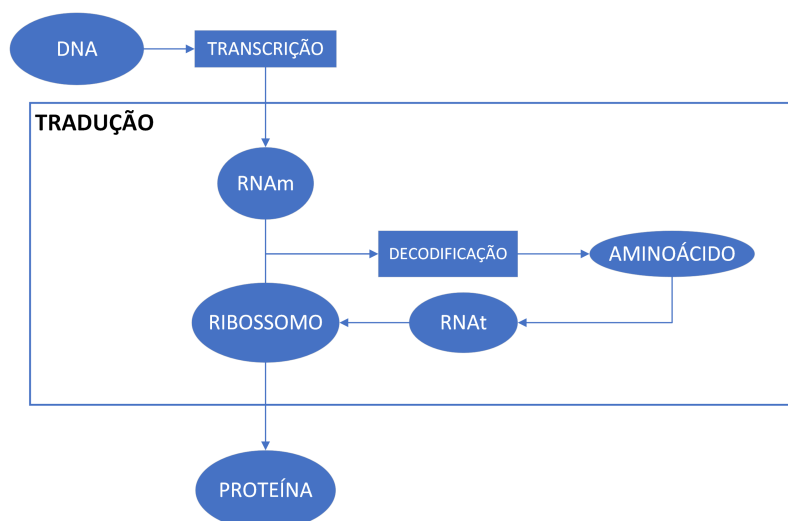


FIGURA 2.4. Fluxograma simplificado da síntese proteica. Fonte: O Autor.

### 2.1.4 Proteína recombinante

Proteína recombinante é uma proteína produzida através da técnica de DNA recombinante. Nesse processo, um gene que codifica uma determinada proteína é inserido em um microrganismo através da clonagem do gene. A clonagem envolve a amplificação de sequências específicas de DNA, permitindo a produção ilimitada da molécula de interesse (ZAHA et al., 2014).

Após a clonagem, o fragmento de DNA é isolado, amplificado e suas propriedades caracterizadas. Esse é introduzido em um vetor, como um plasmídeo, que serve como veículo para transferir o gene para um organismo hospedeiro, como uma bactéria, onde o gene possa se manifestar. Essa é uma das etapas mais delicadas devido a inúmeros problemas que o DNA recombinante terá que enfrentar no interior da célula viva, pois ele precisará ser mantido ao longo das divisões celulares da célula originalmente transformada, transcrito e traduzido na proteína que codifica, e a depender do contexto, pode sofrer passos adicionais de processamento pós-traducional na célula hospedeira (ALBERTS, 2017).

A engenharia genética possibilita a criação de novas combinações gênicas, contrariando a recombinação genética natural entre organismos relacionados, possibilitando a criação de novos DNAs não existentes na natureza (BORZANI et al., 2001).

### 2.1.5 Conformações da proteína

*alpha*-hélice e *beta*-sheet são padrões estruturais de enovelamento da proteína. Esses resultam da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos N-H e C=O na cadeia principal polipeptídica, sem envolver as cadeias laterais dos aminoácidos (ALBERTS, 2017).

Uma *alpha*-hélice é formada quando uma única cadeia polipeptídica enrola-se sobre si mesma para formar um cilindro rígido. Uma ligação de hidrogênio é formada a cada quatro ligações peptídicas, ligando o C=O de uma ligação peptídica ao N-H de outra. Isso dá origem a uma hélice regular com voltas completas a cada 3,6 resíduos de aminoácidos (ALBERTS, 2017).

As *beta*-sheets podem se formar entre segmentos adjacentes de uma cadeia principal polipeptídica em uma mesma orientação (cadeias paralelas), ou em orientação oposta aos seus segmentos adjacentes (cadeias antiparalelas). Ambos os tipos de *beta*-sheet produzem estruturas bastante rígidas, mantidas por ligações de hidrogênio que interligam as ligações peptídicas de cadeias vizinhas (ALBERTS, 2017).

Além do enovelamento padrão, há o enovelamento do domínio proteico, como

N-terminal (NTD), ou C-terminal (CTD), uma subestrutura gerada em qualquer parte da cadeia polipeptídica e que pode se enovelar independentemente do resto da proteína em uma estrutura compacta e estável (ALBERTS, 2017).

## 2.2 Variedades e propriedades da seda de aranha natural

Macroscopicamente, as teias de aranhas não aparentam ter diferenças entre si, além das formas geométricas que assumem. Porém, a seda usada no tecimento das teias tem propriedades diferentes conforme a funcionalidade do fio e a espécie desse aracnídeo. Uma aranha pode chegar a produzir sete tipos de seda.

Os fios de seda têm funções diferentes, podendo ser usados para capturar presas, para formar a estrutura da teia, para grudar a teia nas extremidades, entre outras. Cada fio é secretado por glândulas de função especificada, sendo cada tipo de seda nomeada antecedida pelo nome da glândula que a produziu.

Na Figura 2.5, é possível observar esquematicamente cada variedade seda e seu papel genérico.

### 2.2.1 Major Ampullate Silk/Dragline Silk

*Dragline silk* é um tipo de seda produzida na glândula *Major Ampullate* (MA), e é usada para formar a estrutura da teia de aranha, além de formar o *lifeline*<sup>1</sup>. Esse é usado frequentemente pela aranha ao se locomover, evitando quedas e possibilitando o retorno ao ponto inicial, enquanto ela explora o ambiente (HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

A *dragline silk* é composta por proteínas estruturais chamadas espidroína, sendo essa dividida, principalmente, em dois subtipos – MaSp1 e MaSp2. Ambos os subtipos têm sequência macroscópica similar, compostas por regiões altamente repetitivas, alternando entre polialanina (poli-A) e múltiplos padrões ricos em glicina (G), interca-

<sup>1</sup>Fio usado como corda de segurança para aranha se movimentar enquanto constrói a teia.

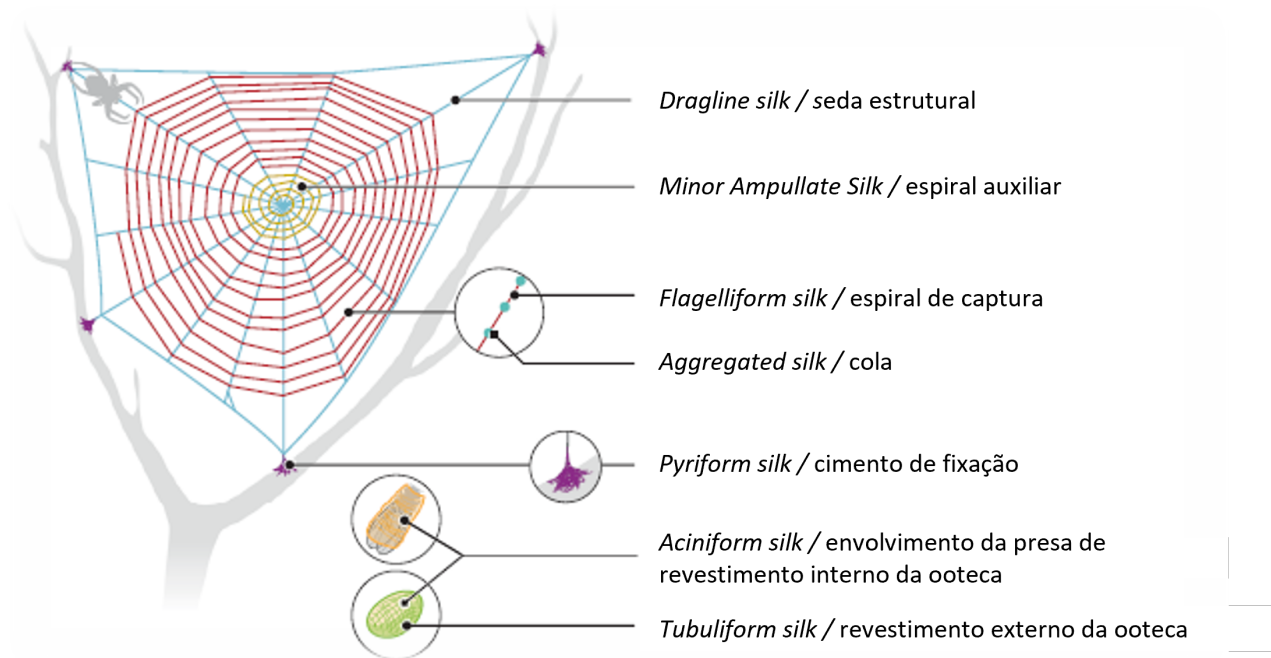


FIGURA 2.5. Representação da teia de aranha construída com as sete variedades de seda. Adaptado de: (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022)

ladas por NTD, ou CTD. A principal diferença entre as proteínas está na poliglicina, sendo esta majoritariamente formada por GX e GGX: para MaSp1, os aminoácidos glutamina (Q), alanina (A) e leucina (L) são frequentemente encontrados; e, para MaSp2, há maior incidência dos aminoácidos prolina (P), no formato GPG, e diglutamina (QQ) (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022).

### 2.2.2 *Minor Ampullate Silk*

*Minor Ampullate silk* é um tipo de seda produzida na glândula *Minor Ampullate* (MI), e é utilizada como uma espécie de andaime para a construção da teia. Essa tem papel fundamental na estabilidade da teia (HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

Essa seda é composta, principalmente, pelas proteínas MiSp1 e MiSp2. Em algumas espécies, torna-se quase impossível diferenciar esse tipo de seda da *MA silk*, sendo que a principal característica que as diferencia é que na *MI silk* não há presença de prolina, motivo esse que impede essa seda de sofrer supercontração ao entrar em contato com a água (HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

### 2.2.3 *Flagelliform Silk*

Essa variedade de seda é usada como rede de captura, pois ao capturar a presa, absorve grande quantidade de energia cinética resultante do impacto dessa. Não é uma seda tão resistente quanto a *dragline silk*, mas ela é múltiplas vezes mais elástica. Essa fibra pode ser esticada até 250% (GOSLINE et al., 1999) e dissipa a energia do impacto da presa.

Constituída, principalmente, de uma proteína, cujo peso molar é de, aproximadamente, 500kDa, e contém prolina e valina como resíduos, sendo o conteúdo de alanina reduzido comparado à composição de *MA silk* e *MI silk* (ANDERSEN, 1970 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013). A *Flagelliform silk* da espécie *N. clavipes* tem, em sua proteína, blocos de (GGX)<sub>n</sub> e GPGXX, que formam 3<sub>1</sub>-hélices<sup>2</sup> e espirais  $\beta$ -turn, respectivamente. Essa estrutura secundária é responsável pela alta elasticidade e flexibilidade desse tipo de seda (BROOKS et al., 2005; LIU et al., 2008; OHGO et al., 2006 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

A sequência (GPGGX)<sub>2</sub>, sendo X serina, ou tirosina, forma  $\beta$ -turn, assemelhando a estrutura a uma mola (HAYASHI et al., 1999 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL). Desde que a seda flageliforme tem mais de 40  $\beta$ -turns ligadas às espirais estilo mola, é provável que essa estrutura contribuía para a extraordinária elasticidade da fibra (HAYASHI; LEWIS, 1998 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

### 2.2.4 *Pyriiform Silk*

*Pyriiform silk* é usada pela aranha para juntar de forma segura as fibras individuais de *MA silk*, *MI silk* e *Flagelliform silk* umas às outras, bem como a substratos, como a árvores, ou paredes (HAJER; REHAKOVA, 2003; KOVOOR; ZYLBERBERG, 1980 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL). A *Pyriiform silk* da espécie *Araneus diadematus* tem uma estrutura enrolada aleatória, pois contém baixa quantidade de aminoácidos apolares e uma quantidade significativa de aminoácidos polares, que são importantes para o

---

<sup>2</sup>Cada volta da  $\alpha$ -hélice é formada por 3,1 radicais de aminoácidos.

*physical cross-linking*<sup>3</sup> (ANDERSEN, 1970 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

Essa variedade forma discos de fixação usados como cimento pelas aranhas (Figura 2.5). Os componentes dessa seda são fibras secas e cola úmida, ambas produzidas pela mesma glândula. A cola seca imediatamente e forma um disco endurecido, sendo utilizada pelas aranhas para unir diferentes fibras ou fixar a linha de arrasto em superfícies (GEURTS et al., 2010; WOLFF et al., 2015 apud RAMEZANIAGHDAM et al., 2022). Esta seda é composta por duas proteínas: PySp1, com massa molar de 400 kDa, e PySp2 (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022).

### 2.2.5 *Aggregated Silk*

*Aggregated Silk* é uma mistura de glicoproteínas adesivas e pequenos peptídeos altamente higroscópicos, usada para cobrir a espiral de captura, e contém baixa quantidade de aminoácidos apolares pequenos e uma quantidade significativa de resíduos de prolina e de aminoácidos polares HEIDEBRECHT; SCHEIBEL.

Essa seda atua como uma espécie de cola para auxiliar na captura de presas (Figura 2.5). A cola é composta por duas proteínas, AgSp1 e AgSp2, que são membros modificados da família das espidroínas, mas não são transformadas em fibras (COLLIN et al., 2016 apud RAMEZANIAGHDAM et al., 2022). A massa prevista é de 450 a 1400 kDa (TILLINGHAST et al., 1993 apud RAMEZANIAGHDAM et al., 2022).

### 2.2.6 *Cylindriform/Tubuliform Silk*

Essa variedade é composta por blocos de poli-A em combinação com sequências de (GGX)<sub>n</sub> (X = alanina, leucina, glutamina ou tirosina), que formam pilhas de  $\beta$ -sheet, semelhantes à *MA silk* da *N. clavipes* (BARGHOUT et al., 1999 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013), conferindo às fibras uma alta resistência. Elas são adequadas para serem usadas pela aranha como uma resistente ooteca<sup>4</sup> para proteger sua prole (BIT-

<sup>3</sup>Entrelaçamento ou ligação física entre as moléculas de um material, sem a necessidade de reações químicas, podendo incluir interações como pontes de hidrogênio, interações iônicas, van der Waals, forças de empacotamento molecular, entre outras.

<sup>4</sup>Invólucro rígido que protege os ovos da aranha.



TENCOURT et al., 2007; GARB; HAYASHI, 2005; HUANG et al., 2006; HU et al., 2005, 2006; HU et al., 2005; HU et al., 2006; KOHLER et al., 2005; RISING et al., 2006 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

A *Tubuliform silk* forma a casca externa da ooteca (Figura 2.5). Esta é a única seda produzida durante um período específico da vida da aranha fêmea, o período reprodutivo (TIAN; LEWIS, 2006 apud RAMEZANIAGHDAM et al., 2022). Esta seda é robusta e capaz de proteger a prole de predadores, flutuações de temperatura e invasão por parasitoides. A proteína TuSp1 é prevista ter uma massa molar de 180 kDa (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022).

### 2.2.7 *Aciniform Silk*

*Aciniform silk* é usada como revestimento interno da ooteca, além de reforçar o envolvimento da presa e a fixação da *Pyriiform silk* (BLACKLEDGE; HAYASHI, 2006; HAYASHI et al., 2004; MATTINA et al., 2008; VASANTHAVADA et al., 2007 apud HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013), sendo uma das mais resistentes RAMEZANIAGHDAM et al.. Mesmo a proteína constituinte dessa variedade (AcSp) possa chegar a altas massas molares, como 300kDa, elas diferem consideravelmente de outras proteínas constituintes de outras variedades de seda (HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013).

A proteína da *Aciniform silk*, AcSp1, possui uma massa calculada de ~330 kDa com 3445 aminoácidos para a espécie *Araneus ventricosus* (WEN et al., 2018 apud RAMEZANIAGHDAM et al., 2022).

### 2.2.8 *Propriedades*

Nas subseções acima, foram apresentadas as variedades de seda de aranha, observando-se que suas propriedades variam não apenas de acordo com o tipo de seda, mas também conforme a espécie de aranha responsável pela produção. Nesse contexto, a Tabela 2.1 apresenta as propriedades estudadas por diferentes artigos, contemplando diversas variedades de seda e espécies de aranhas.

**Tabela 2.1.** Propriedades de seda estudadas em diferentes artigos. Adaptado de: (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022)

Seda	Espécie	Módulo de Young (GPa)	Resistência (MPa)	Ductilidade (%)	Tenacidade (MJ/m <sup>3</sup> )	Referência
<i>Dragline Silk</i>	<i>Araneus vetricosus</i>	–	906,9 ±	19,55 ± 5,02	84,28 ± 31,91	Kono et. al. (2019)
	<i>Araneus diadematus</i>	8,3 ± 0,54	–	–	141,2 ± 0,77	Swanson et al. (2006a)
	<i>Argiope trifasciata</i>	9,3	1290 ± 29	22	145	Hayashi et al. (2004)
	<i>Nephila pilipes</i>	3,4 – 11,5	1030 ± 176	25 – 35	149 ± 25	Kerr et al. (2018)
	<i>Nephila plumipes</i>	–	1030 ± 206	–	73,22 ± 7,60	Kerr et al. (2018)
	<i>Nephila clavipes</i>	13,8 ± 3,6	1215 ± 233	–	11,2 ± 30	Swanson et al. (2006b)
	<i>Latrodectus hesperus</i>	10,2 ± 0,75	–	–	108,9 ± 11,19	Swanson et al. (2006a)
	<i>Minor Ampullate</i>	<i>Argiope trifasciata</i>	8,5	342	54	148
<i>Latrodectus hesperus</i>		3,9 ± 2,9	245,4 ± 120,5	0,57 ± 0,02	66,7 ± 46,4	Vienneau-Hathaway et al. (2017)
<i>Latrodectus geometricus</i>		2,6 ± 1,3	174,4 ± 17,6	0,54 ± 0,02	57,3 ± 20,7	Vienneau-Hathaway et al. (2017)
<i>Steatoda grossa</i>		2,1 ± 0,7	251,3 ± 106,2	0,74 ± 0,02	57,3 ± 20,7	Vienneau-Hathaway et al. (2017)
<i>Flageliform</i>	<i>Araneus diadematus</i>	0,003	500	270	150	Gosline et al. (1999)

Continua na próxima página

Tabela 2.1 – Continuação da página anterior

Seda	Espécie	Módulo de Young (GPa)	Resistência (MPa)	Ductilidade (%)	Tenacidade (MJ/m <sup>3</sup> )	Referência
	<i>Argiope trifasciata</i>	0,012 – 0,08	800 ± 100	≥ 200	–	Perea et al. (2013)
<i>Pyriiform</i>	<i>Cupiennius salei</i>	0,2 ± 0,1	100 ± 40	50 – 80	61 ± 47	Greco et al. (2020)
<i>Aciniform</i>	<i>Argiope trifasciata</i>	9,6	687	86	367	Hayashi et al. (2004)
<i>Cylindriform</i>	<i>Argiope bruennichi</i>	9,1	390	40	128	Zhao et al. (2006)
	<i>Araneus diadematus</i>	8,7 ± 0,9	400 ± 50	5 – 20	–	Nimmen et al. (2005)

As propriedades avaliadas incluem o módulo de elasticidade, a resistência à tração, a ductilidade, e a tenacidade. Abaixo, é dada uma breve explicação sobre cada uma, conforme Callister, Rethwisch, 2016:

- **Módulo de elasticidade:** mensura a rigidez do material e sua capacidade de resistir à deformação elástica sob carga, e quanto maior for o módulo, mais rígido será o material, ou menor será a deformação elástica resultante da aplicação de uma dada tensão; a deformação elástica não é permanente; isso significa que, quando a carga aplicada é liberada, a peça retorna à sua forma original;
- **Resistência à tração:** indica a capacidade do material de suportar cargas sem romper; o limite de resistência à tração é a tensão no ponto máximo da curva tensão-deformação de engenharia. Esse ponto corresponde à tensão máxima suportada por um material sob tração. Se essa tensão for aplicada e mantida, ocorrerá fratura;
- **Ductilidade:** capacidade do material ser deformado plasticamente sem fraturar, sendo a deformação plástica permanente, ou seja, quando a carga é removida, o material não retorna à forma original. Um material que sofre uma deformação plástica muito pequena, ou mesmo nenhuma deformação plástica até a fratura, é denominado frágil;
- **Tenacidade:** propriedade indicativa da resistência de um material à fratura quando uma trinca (ou outro defeito concentrador de tensões) está presente. Outra maneira de definir tenacidade é como a habilidade de um material absorver energia e se deformar plasticamente antes de fraturar.

## 2.3 Conceitos acerca de polímeros

Um polímero é uma substância macromolecular constituída por unidades estruturais repetidas (monômeros) que estão ligadas covalentemente umas às outras. Essas unidades repetidas formam longas cadeias, proporcionando propriedades físicas e químicas distintas, como flexibilidade, resistência e variedade de aplicações (HASHEMI; SMITH W., 2012).

Existem muitos tipos diferentes de materiais poliméricos que nos são familiares e para os quais existe uma grande variedade de aplicações; de fato, uma maneira de classificar esses materiais é de acordo com sua aplicação final. Dentro desse esquema, os vários tipos de polímeros compreendem os plásticos, os elastômeros (ou borrachas), as fibras, os revestimentos, os adesivos, as espumas e os filmes. Dependendo de suas propriedades, um polímero específico pode ser usado em duas ou mais dessas categorias de aplicação. Por exemplo, plásticos podem ser usados como fibras poliméricas se estiverem estirados em filamentos em determinada proporção. (CALLISTER; RETHWISCH, 2016)

### 2.3.1 Plásticos

Os plásticos são materiais poliméricos e podem ser divididos em termoplásticos e termofixos. Os termoplásticos requerem calor para serem moldados, sendo que eles podem ser reaquecidos e moldados novamente em novas formas, em número sucessivo de vezes, sem troca significativa nas suas propriedades mecânicas. Já os termofixos são desenvolvidos em formas permanentes, não podendo ser refundidos, ou remoldados, pois se degradam ou se decompõem quando aquecidos a temperaturas muito altas. Sendo assim, esses não podem ser reprocessados (HASHEMI; SMITH W., 2012).

As poliamidas, ou nylons, são um exemplo de polímeros termoplásticos, e há várias unidades de repetição divergentes, que formam diferentes poliamidas, porém seu acoplamento comum é o grupo amida, conforme destacado na Figura 2.6. Dentre as propriedades de interesse, estão: alta resistência, alta temperatura de deflexão de calor, boa resistência química, baixo atrito de superfície e boa resistência ao desgaste; como desvantagem, apresenta absorção de água, resultando em alterações dimensionais com aumento da umidade do componente. (HASHEMI; SMITH W., 2012). O Nylon®6,6 é o membro mais importante dessa família, sendo sua estrutura apresentada na Figura 2.6. Tem aplicações semelhantes ao Kevlar®49, porém é um material de custo menor, e é usado nas aplicações cujas propriedades necessárias são inferiores às do Kevlar®49.

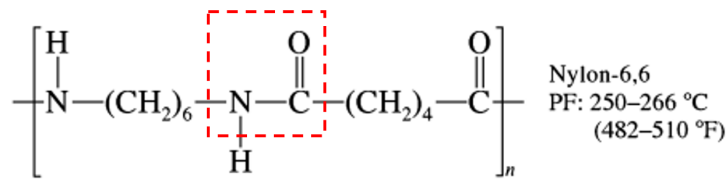


FIGURA 2.6. Unidade repetitiva do Nylon®6,6. Em vermelho, grupo amida destacado. Adaptado de: (HASHEMI; SMITH W., 2012).

### 2.3.2 Fibras

Os polímeros destinados à produção de fibras têm a capacidade de serem estirados em longos filamentos, com uma relação entre o comprimento e o diâmetro de pelo menos 100:1. Durante o uso, essas fibras podem ser submetidas a diversas deformações mecânicas, como estiramento, torção, cisalhamento e abrasão. Portanto, é essencial que elas apresentem um elevado limite de resistência à tração ao longo de uma ampla faixa de temperaturas, bem como um alto módulo de elasticidade e resistência à abrasão. Estas propriedades são influenciadas pela estrutura química das cadeias poliméricas e pelo processo de estiramento das fibras CALLISTER; RETHWISCH.

Os pesos molares dos materiais que compõem as fibras devem ser relativamente elevados para garantir que o material fundido seja suficientemente resistente e não se quebre durante o processo de estiramento. Adicionalmente, as fibras poliméricas devem exibir estabilidade química em diversos ambientes, incluindo meios ácidos e básicos, agentes alvejantes, solventes utilizados em lavagem a seco e exposição à luz solar. Elas também devem ser relativamente não inflamáveis e suscetíveis à secagem CALLISTER; RETHWISCH.

Um exemplo notável de fibra é o Kevlar®49, composto por unidades de repetição de poliamidas aromáticas (Figura 2.7), introduzido pela Du Pont em 1972. O Kevlar®49 é caracterizado por sua resistência mecânica e módulo de elasticidade elevados, juntamente com baixa densidade. Essas propriedades tornam seu uso apropriado para aplicações de alta exigência, especialmente em setores como aeroespacial, marítimo, automotivo, entre outros, onde são necessários baixo peso, grande resistência mecânica, rigidez e resistência à deterioração HASHEMI; SMITH W.. Segundo a Dupont®, tem aplicações em cabos de fibra óptica, processamento têxtil, reforço de

plástico, cordas, cabos e compostos para artigos esportivos marinhos e aplicações aeroespaciais.

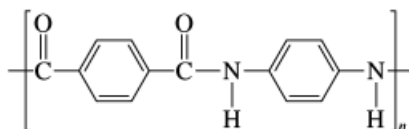


FIGURA 2.7. Unidade repetitiva de poliamida aromáticas. Fonte: (HASHEMI; SMITH W., 2012).





# Capítulo 3

## Metodologia

O presente estudo é um levantamento bibliográfico de natureza qualitativa e quantitativa, e se dará por avaliar artigos que englobam a produção de seda recombinante de aranha, inspirada na variedade *dragline silk* da espécie *Nephila clavipes*. Esse direcionamento é realizado devido às evidências previamente apresentadas na Tabela 2.1, destacando as propriedades mecânicas superiores para essa combinação específica frente às outras evidenciadas.

Os valores de interesse das propriedades variam conforme as aplicações para as quais a proteína será usada. Dado o foco na avaliação para aplicações em materiais de engenharia, é crucial buscar elevada resistência mecânica e rigidez. Nesse contexto, os maiores valores são observados para a variedade *dragline Silk* da espécie *N. clavipes*, conforme apresentados na Tabela 2.1. Dessa forma, serão revisados os métodos de produção, bem como as propriedades resultantes desses. Tem-se por intuito identificar a tecnologia com maior potencial para aplicação em escala industrial, levando em consideração aspectos de produção e viabilidade técnica, além de comparar a fibra obtida para uso alternativo a outras já disponíveis no mercado.

A busca por artigos foi conduzida na plataforma de publicações científicas Science Direct ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), entre os dias 10 de julho e 26 de dezembro de 2023. Como a pesquisa foi previamente direcionada, o termo "production of recombinant *dragline silk* by *N. clavipes*" foi pesquisado, restringindo a busca entre os anos de 2014 a 2023, sendo encontrados um total de 109 artigos.

Para a seleção dos artigos, foi avaliado o escopo do trabalho pelo abstract dis-

ponível na página, bem como lido separadamente alguns artigos que pareceram relevantes ao texto, e encontrados um total de 10 artigos compatíveis com a revisão desse trabalho, sendo que 2 desses – BOWEN et al., 2018, e BHATTACHARYYA et al., 2021 – exploram a produção, especificamente.

Reitera-se que, ao longo do processo de produção desse trabalho de conclusão de curso, foram procuradas patentes nos sites do governo estadunidense e brasileiro com as palavras-chaves que remetiam a produção de seda recombinante, entretanto com tantas aplicações a serem empregadas, a busca por patentes envolvendo a produção da proteína e posterior obtenção da fibra se mostrou inviável o afunilamento para suas considerações. Isso, porque muitas patentes não têm relação ao escopo do tema, necessitando uma busca por aplicação específica, sendo que na maioria dos casos a obtenção de fibras está voltada para aplicações têxteis. Sendo assim, optou-se por avaliar apenas a literatura científica para o desenvolvimento do presente trabalho.

# Capítulo 4

## Revisão Bibliográfica

A qualidade da seda de aranha está intimamente ligada a diversos fatores relacionados à vida da aranha como nutrição (MALAY et al., 2022; LIN et al., 2015), estresse ambiental (LIN et al., 2015), temperatura corporal da aranha, que influencia a produção de seda e a expressão em determinadas regiões específicas do genoma, além de que a aranha tem a capacidade de modular os parâmetros diretamente através do sistema nervoso, conforme a necessidade (BABU, 2019). Todos esses fatores influenciam nas propriedades finais do fio produzido, podendo gerar diferentes composições da mesma variedade de seda para a mesma espécie. Ainda, há pouco conhecimento sobre os papéis de resíduos de aminoácidos na estrutura e função da *dragline silk* (MALAY et al., 2021).

Alterando a composição da seda, há alterações em suas propriedades: os segmentos de poli-A formam domínios cristalinos de *beta-sheets* (BABU, 2019), e estudos de produção recombinante indicaram que um aumento na proporção dessas sequências resulta em maior rigidez e resistência do material (BRESLAUER; KAPLAN, 2016; KO; WAN, 2018), e em uma diminuição da solubilidade aquosa (BRESLAUER; KAPLAN, 2016). Por outro lado, as regiões ricas em glicina adotam estruturas de  $3_1$ -hélices e *beta-turns*<sup>1</sup>, conectando os domínios cristalinos (BABU, 2019), e contribuem para a ductilidade e flexibilidade da fibra (KO; WAN, 2018). Além disso, as propriedades mecânicas das fibras de seda são resultado direto do tamanho e orientação dos domínios de *beta-sheets*, da conectividade desses domínios aos domínios amorfos e das interfaces, ou transições, entre os domínios amorfos e cristalinos.

---

<sup>1</sup>Região curta na qual a cadeia polipeptídica muda de direção, geralmente formando uma curva de 180°.

A glândula MA, conforme representada na Figura 4.1, possui três regiões distintas: cauda, ampola e duto de fiação. A síntese de proteínas ocorre na cauda, o armazenamento na ampola, e o duto participa da conversão da mistura solubilizada em uma fibra sólida. O NTD atua como sensor de pH, promovendo automontagem e agregação de proteínas ao longo do duto de fiação. Modelagem molecular e estudos *in vitro* com espidroínas recombinantes que incorporam o NTD apoiam sua função como sensor de pH ativo quando o pH diminui de 7,0 para 6,3 ao longo do duto de fiação (LIN et al., 2015).



FIGURA 4.1. Glândula *Major Ampullate* da espécie *N. clavipes*. Traduzido de: (LIN et al., 2015)

Apesar da alta viscosidade devido à concentração elevada de proteínas, o material secretado flui como um líquido nos dutos de fiação antes da conversão em fibras insolúveis. À medida que o fluido migra, alterações na geometria interna dos dutos facilitam uma reorientação progressiva das cadeias da proteína, aumentando o número de contatos intermoleculares e removendo água em excesso para produzir a fibra de seda nativa, hierarquicamente estruturada. A transformação em fibras insolúveis ocorre devido a gradientes de pH, íons e forças de extensão e cisalhamento durante a migração pelos dutos de fiação, resultando em mudanças na estrutura e propriedades (MALAY et al., 2021).

No que diz respeito à estrutura da seda, é consensual que ela passa por uma transição de uma *alpha*-hélice solúvel em água para uma *beta-sheet* antiparalela du-

rante o processo de fiação, tornando-se insolúvel em água e conectada por ligações de hidrogênio (BRESLAUER; KAPLAN, 2016). Evidências indicam que as aranhas exercem controle ativo sobre a tensão da fibra durante o processo de fiação, com uma velocidade geralmente aceita de aproximadamente 1 cm/s, sendo essa velocidade frequentemente utilizada no processo artificial de enrolamento da seda (BRESLAUER; KAPLAN, 2016). Esta e o estiramento pós-fiação são características cruciais que contribuem para o desenvolvimento de fibras com propriedades mecânicas extraordinárias (LIN et al., 2015). O aumento da velocidade diminui a ductilidade, e aumenta a resistência à tração e o módulo de elasticidade (BABU, 2019).

Embora muitas fibras sintéticas apresentem alta resistência ou alta elasticidade, é a combinação única dessas propriedades que torna a seda de aranha tão especial (BABU, 2019). Esse desempenho superior não se deve apenas às propriedades, mas também decorre da resposta não linear dos fios de seda à deformação, apresentando estruturas orientadas, anisotrópicas e compostas (KAPLAN; SCHEIBEL, 2017; KO; WAN, 2018).

A resistência dessa seda é comparável a fibras sintéticas de alto desempenho, como o Kevlar®. Surpreendentemente, a alongação na ruptura da *dragline silk* pode atingir até 35%, muito superior à do Kevlar®, que é apenas 5%. Além disso, a energia necessária para a quebra pode ser mais de três vezes a do Kevlar® e outras fibras industriais (KO; WAN, 2018). Ainda, ao contrário das superfibras sintéticas modernas, como o Kevlar®, que envolvem processamento petroquímico e utilização de ácido sulfúrico concentrado, a produção da seda de aranha é totalmente ecológica (BABU, 2019). Submersas em nitrogênio líquido, sedas de MA apresentam maior resistência à tração após tratamento criogênico. A umidade também induz mudanças estruturais, incluindo supercontração em algumas espécies de aranhas (LIN et al., 2015).

Algumas dificuldades são encontradas para a obtenção de propriedades como o tamanho do diâmetro que é inferior a 4µm (KO; WAN, 2018), além de que a literatura científica revela variabilidade nos valores de resistência à tração, módulo de elasticidade, ductilidade e tenacidade, que pode ser justificada devido às diferentes metodologias de coleta e condições de teste adotadas por laboratórios ao redor do mundo, incluindo alterações na velocidade ou força de enrolamento durante a coleta da fibra,

impactando os dados mecânicos (LIN et al., 2015).

Para criar uma seda de aranha artificial que se assemelhe à natural, seria necessário reproduzir fielmente a complexidade do sistema *in vivo*, tanto em termos de componentes proteicos quanto nas etapas de processamento para a formação da fibra. Uma construção biomimética de espidroína recombinante deve conter os três domínios funcionais, NTD, regiões repetitivas, e CTD, adotando uma dobra semelhante à nativa para ser considerada estritamente biomimética (MALAY et al., 2021). O DNA repetitivo, rico em guanina e citosina, traz dificuldades para sua replicação (LIN et al., 2015; BRESLAUER; KAPLAN, 2016), e a clonagem de segmentos do DNA, que não incluem a sequência do NTD, resulta em proteínas recombinantes instáveis em solução aquosa, e carentes das propriedades mecânicas presentes na produção natural (BRESLAUER; KAPLAN, 2016). Estudos usando construções de espidroína recombinante sem domínios terminais completos observaram dificuldades em manter a solubilidade em tampões aquosos ou uma propensão à formação prematura de fibras em pH neutro, geralmente requerendo acidificação (MALAY et al., 2021).

A maioria dos estudos utiliza o processo de fiação a úmido, no qual o extrato de seda concentrado é extrudido por um orifício de cerca de 100µm de diâmetro em um banho de coagulação. Após a fiação, a fibra passa por um estiramento, permitindo que ela seque ou coagule ainda mais. Taxas elevadas de coagulação geralmente resultam em materiais porosos com uma seção transversal circular, enquanto taxas baixas produzem materiais mais densos com uma seção transversal potencialmente não circular. Vários pesquisadores têm explorado o uso de dispositivos microfluídicos para biomimetizar o processo nativo de fiação, facilitando uma difusão lenta de íons ao longo do fluxo (BRESLAUER; KAPLAN, 2016). O desenvolvimento de novos protocolos com solventes aquosos para a fiação é um desafio, uma vez que hexafluoro-2 propanol (HFIP) e ácido fórmico, atualmente utilizados, muitas vezes resultam em produtos inferiores. Solventes baseados em água que imitem a fiação fisiológica precisam ser desenvolvidos considerando o efeito da plasticização pela água, que afeta a mobilidade molecular e a cristalização durante a formação das fibras (LIN et al., 2015).

Whittall et al. (2021) revisaram diversos sistemas hospedeiros para a expressão de espidroínas recombinantes, visando orientar futuros estudos para o melhor aprovei-

tamento desses sistemas. A escolha do sistema hospedeiro tem impacto na eficiência de produção, propriedades mecânicas e comercialização de fibras de seda recombinante e espidroínas. A *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizada devido à facilidade de manipulação genética, curto tempo de geração, custo baixo e potencial industrial. Apesar dos problemas iniciais, a *E. coli* superou desafios, mas permanece limitada pela incapacidade de montar espidroínas em fibras e necessidade de extensiva purificação.

A levedura *Pichia pastoris* é otimizada para fermentação industrial, expressa genes maiores sem truncamento e pode secretar proteínas diretamente no meio de crescimento, minimizando etapas de purificação e maximizando o rendimento. Apesar de a *E. coli* ainda liderar em quantidade e tamanho de espidroínas, *P. pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* são opções atrativas.

A expressão em plantas oferece estabilidade genética, custo-benefício e capacidade de acumular proteínas em organelas específicas, simplificando a purificação, mas apresenta baixos rendimentos em comparação a sistemas microbianos. Sistemas como *E. coli* e leveduras, usados por empresas como Bolt Threads, Spiber Inc. e AMSilk, produzem maiores rendimentos e foram comercializados com sucesso.

A modelagem molecular iterativa, aliada ao conhecimento, possibilitará a otimização do design de espidroínas recombinantes. Embora os processos de fermentação sejam essenciais, a escolha do sistema hospedeiro deve considerar a estrutura da espidroína, a escala de produção e a função desejada, promovendo avanços na produção especializada e identificação de novos hospedeiros adaptados à automontagem.

Werten et al. (2019) oferece uma visão geral da produção de polímeros baseados em proteínas em *P. pastoris*, o segundo sistema mais utilizado após a *E. coli*. Desafios incluem baixos rendimentos em culturas agitadas, exigindo biorreatores, degradação proteolítica e autoassociação *in vivo*. A capacidade de *P. pastoris* para produção secretora eficiente é destacada como uma razão significativa para sua escolha. Em 1997, foi relatado o primeiro uso dessa levedura para a produção intracelular de análogos de MaSp1, permitindo a expressão de genes com mais de 3000 códons sem síntese truncada. O uso efetivo de *P. pastoris* requer biorreatores bem controlados para alta produção de biomassa, com controle preciso de alimentação, níveis de oxigênio e ajuste contínuo de pH. A integração estável de genes repetitivos no genoma da levedura,

sem pressão seletiva, possibilita a produção bem-sucedida de polímeros de proteínas secretadas, embora sedas de aranha sejam eficientemente produzidas apenas intracelularmente.

Bhattacharyya et. al. (2021) concentrou-se na fabricação de fibras utilizando proteína recombinante inspirada nas variedades *dragline silk* e *flagelliform silk* da espécie *N. clavipes*, com a *E. coli* sendo empregada como hospedeira. A escolha dessas variedades teve como propósito a combinação da elasticidade da *flagelliform silk* com a resistência da *dragline silk*.

A alta demanda por glicina e prolina indicou a necessidade de estratégias para aumentar a disponibilidade de tRNA desses aminoácidos, sendo estratégias de clonagem empregadas para maximizar a tradução do gene transcrito. A maior eficiência foi demonstrada utilizando-se o sistema de duplo vetor (pET19KT e p4GPP) para o fornecimento de tRNAGly e tRNAPro. O aumento desses tRNAs e dos níveis de glicina mostrou efeitos benéficos em proteínas semelhantes à seda quimérica<sup>2</sup>, mas pode ser prejudicial, ou tóxico, em outras expressões de proteínas de seda, como MaSp1.

Sequências de genes sintéticos maiores e mais complexas apresentaram menores rendimentos de proteínas. Durante a síntese de proteínas de seda em *E. coli*, observou-se um aumento de proteínas de resposta ao estresse. Para manter o plasmídeo na *E. coli*, a pressão do antibiótico foi crucial, sendo necessária a adição durante a expressão para evitar a perda do plasmídeo e redução da expressão proteica, especialmente em altas densidades celulares. A melhor expressão foi observada em torno de OD600 de 80 e a máxima acumulação ocorreu entre 2 e 4 horas após a indução a 25 °C, sem aumentos significativos após esse período.

A expressão de células de *E. coli* em temperaturas mais baixas mostrou-se benéfica para a expressão solúvel e a redução de proteínas truncadas<sup>3</sup>. A produção ocorreu em reatores por bateladas, experimentando a utilização de glicose e glicerol como fontes de carbono. A glicose é, frequentemente, preferida devido à sua facilidade de medição ao longo do processo. As proteínas produzidas formaram fibras em condições orgânicas e aquosas por extrusão. Tentativas de aprimorar as propriedades mecânicas

---

<sup>2</sup>Seda resultante da combinação de duas ou mais variedades de seda.

<sup>3</sup>Proteínas cuja tradução foi interrompida prematuramente.



dessas fibras foram realizadas, variando parâmetros como concentração de proteínas e banhos de estiramento.

O estudo realizado por Bowen et. al. (2018) concentrou-se na produção de fibras utilizando proteína recombinante inspirada nas variedades de seda dragline (MaSp1) da espécie *N. clavipes*, utilizando a *E. coli* como hospedeira. O objetivo principal do trabalho foi replicar integralmente as propriedades mecânicas da seda de aranha natural, incluindo alta resistência, módulo, ductilidade e tenacidade. Segundo os autores, essa pesquisa representa a primeira vez em que uma fibra produzida a partir de proteínas sintéticas replicou completamente o desempenho mecânico dos equivalentes naturais, em termos das propriedades anteriormente citadas.

Trabalhos anteriores demonstraram uma clara correlação entre peso molar e resistência para as fibras recombinantes de *dragline silk* da *N. clavipes*, onde a maior espidroína (96-mer<sup>4</sup>, 285 kDa) resultou na fibra recombinante mais resistente relatada até o momento ( $\sigma \approx 550$  MPa). No entanto, ainda não está claro o limite superior para a relação entre resistência e peso molar em espidroínas, e a produção de espidroínas maiores que 96-mer, 285 kDa em quantidades suficientes para testes de fibras tem sido extremamente desafiadora. Diversos obstáculos foram identificados, incluindo instabilidade genética de sequências de DNA longas e altamente repetitivas, inibição da tradução por estruturas secundárias complexas de mRNA, alta demanda por tRNAs de glicina e alanina, e carga metabólica causada pela superexpressão<sup>5</sup> de espidroínas.

Para superar essas dificuldades, foi desenvolvido um método de montagem padronizada da proteína final. As maiores espidroínas que podem ser expressas de forma estável em *E. coli* modificadas são as de 96-mer, e a abordagem usada para a produção de proteínas maiores foi o uso de enzimas inteínas, que catalisam reações de clivagem<sup>6</sup> espontânea entre proteínas expressas separadamente, ligando-as covalentemente via uma ligação peptídica e deixando apenas alguns resíduos ( $\leq 6$ ) no local de ligação, os quais não impactam as propriedades da proteína final. Assim, duas proteínas de 96-mer foram produzidas separadamente, uma ligada a C-inteína e a outra ligada a N-inteína, resultando em uma proteína final de 192-mer, ou 556 kDa, após a autocliva-

<sup>4</sup>Para esse estudo, 1-mer = 35 aminoácidos que constituem a unidade de repetição da espidroína.

<sup>5</sup>Produção em grande quantidade de uma proteína específica em um organismo, geralmente utilizando técnicas de engenharia genética

<sup>6</sup>Quebra da cadeia polipeptídica em fragmentos menores.

gem.

O cultivo foi realizado em biorreatores por alimentação contínua, utilizando glicose como fonte de carbono. Considerando a sensibilidade das espidroínas ao sal e ao pH, os autores testaram várias concentrações de sal, temperaturas e valores de pH para otimizar as condições de ligação das espidroínas, alcançando maiores rendimentos a 37°C, 300mM de NaCl, pH 7, resultando em 62% de eficiência de ligação para proteínas de 192-mer.

Os produtos de ligação foram inicialmente separados das proteínas celulares por precipitação seletiva com sulfato de amônio e posteriormente purificados por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), alcançando uma pureza final do produto  $\geq$  90%. Como referência para propriedades mecânicas, uma espidroína de 96-mer sem SIs também foi expressa e purificada seguindo os mesmos procedimentos. O líquido de fiação foi preparado a partir do pó liofilizado de cada proteína purificada e as fibras foram fiadas e testadas mecanicamente conforme protocolos de fiação úmida.

Ao comparar as fibras finais de 96-mer e 192-mer, os testes mecânicos revelaram aumentos significativos, quase duas vezes maiores, tanto na resistência à tração, quanto no módulo. Embora a resistência média tenha aumentado ligeiramente e a deformação na ruptura tenha diminuído, nenhuma dessas mudanças foi estatisticamente significativa, em parte devido às variações entre as fibras. Essas variações, comuns em amostras de fibras de seda de aranha naturais e sintéticas, persistem mesmo em estudos dedicados a reduzi-las.

As fibras de 128-mer demonstraram um desempenho intermediário em relação às fibras de 96- e 192-mer, sugerindo uma correlação positiva persistente entre o tamanho da espidroína e a resistência e módulo da fibra, até uma massa molecular da espidroína de pelo menos 556 kDa. Os resultados também confirmaram pela primeira vez que uma espidroína recombinante, sintetizada microbianamente de 192-mer da fibra de arrasto de *N. clavipes*, reproduziu completamente as principais propriedades mecânicas desejadas de sua contraparte natural.

# Capítulo 5

## Discussão e inferências

A partir da revisão bibliográfica, evidencia-se que o processo linear de replicação de DNA e tradução de proteínas enfrenta desafios práticos. Embora seja possível criar um procedimento genérico para a expressão de proteínas, cada método deve ser ajustado de acordo com particularidades identificadas e estudadas na prática, visando a otimização da produção e dos resultados.

A replicação da seda *in natura* revela-se desafiadora devido à complexidade na caracterização de uma seda uniforme. Diversos fatores, tanto internos quanto externos, influenciam a composição do fio, enquanto a capacidade da aranha de exercer um controle direto adiciona uma camada de complexidade à sua composição. Logo, a compreensão de como a composição impacta nas propriedades finais do fio é crucial e, futuramente, permitirá simular o *design* da proteína com as propriedades desejadas, e, conseqüentemente, direcionar a produção para obtenção do material específico. Adicionalmente, a implementação de etapas posteriores, como estiramento ou banhos de nitrogênio, pode ser considerada para aprimorar as propriedades do material.

Também, foram examinadas as disparidades entre os sistemas hospedeiros, destacando-se a levedura *P. pastoris* e a bactéria *E. coli* como os organismos que demonstraram maior viabilidade entre os utilizados até o momento. Ambas apresentam vantagens e desvantagens, sendo que, atualmente, a *E. coli* é o organismo mais amplamente empregado na produção de seda recombinante, embora exija etapas adicionais de purificação devido à produção intracelular. Observa-se que um método de produção em plantas geneticamente modificadas seria atrativo para contornar algumas etapas industriais, além de que para a cultura de bactérias e leveduras, é necessária

uma fonte de carbono como alimento que, muitas vezes, são processadas oriundas de plantações.

No estudo de Bhattacharyya et. al. (2021) a adoção de um sistema de duplo vetor para ampliar a disponibilidade de RNAs transportadores sugere uma necessidade específica de suprir a alta demanda pelos dois aminoácidos glicina e prolina, provável consequência da produção da seda quimérica. Por outro lado, no trabalho de Bowen et. al. (2018) não foi mencionada a utilização de uma estratégia distinta para lidar com a elevada necessidade de glicina e alanina, possivelmente não sendo necessária em tal estudo, pois não misturou variedades de seda diferentes e o material genético está preparado para prover tais demandas.

Ambos os estudos, Bhattacharyya et. al. (2021) e Bowen et. al. (2018), destacaram como obstáculos para o rendimento das proteínas as sequências mais extensas e complexas de genes, resultando em maior produção de proteínas truncadas, cuja síntese é interrompida antes de completar a sequência proteica. Para superar esse desafio, Bowen et. al. (2018) desenvolveu um método que envolve a expressão separada das proteínas, seguida pela sua unificação. Essa abordagem possibilitou a obtenção de propriedades equivalentes as da fibra de seda natural.

Em resumo, observa-se que ambas as pesquisas com foco em produção se complementam com contribuições específicas, tais como:

- Desenvolvimento de um método que utilize diferentes vetores para a expressão dos RNAs transportadores necessários para cada aminoácido, visando um controle mais preciso da disponibilidade desses elementos no meio;
- Utilização de antibióticos para manter o plasmídeo na célula, garantindo a estabilidade genética;
- Emprego de temperaturas mais baixas para a expressão em *E. coli*, beneficiando a solubilidade e reduzindo a produção de proteínas truncadas;
- Adoção da expressão separada das proteínas, utilizando enzimas inteínas para a posterior catálise e ligação das proteínas, resultando em proteínas de comprimentos superiores;

- Utilização da técnica de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) para a separação eficiente de proteínas.

A Tabela 5.1 exibe os dados relevantes para a comparação das propriedades entre a seda natural, a seda recombinante, o Kevlar®49 e o Nylon®6,6. O estudo de Bhattacharyya et. al. (2021) apresentou as propriedades separadamente para a seda flageliforme e dragline, não incluindo informações específicas sobre a seda quimérica; portanto, não foi possível compará-los.

TABELA 5.1. Propriedades de diferentes materiais, com adaptações de: (RAMEZANIAGHDAM et al., 2022), (BOWEN et al., 2018), (HEIDEBRECHT; SCHEIBEL, 2013), respectivamente.

Material	Módulo de Young (GPa)	Resistência (MPa)	Ductilidade (%)	Tenacidade (MJ/m <sup>3</sup> )
<i>Dragline Silk N. clavipes</i>	13,8 ± 3,6	1215 ± 233	–	11,2 ± 30
Fibra (192-mer) recombinante	13,7 ± 3	1031 ± 111	18 ± 6	114 ± 51
Nylon®6,6	5	950	18	80
Kevlar®49	130	3600	2,7	50

Com base nos resultados obtidos por Bowen et. al. (2018) destaca-se que a seda de 192-mer permitiu a replicação completa das propriedades da seda de aranha natural. Ao comparar com outros materiais, nota-se que o Kevlar®49 apresenta um módulo de elasticidade significativamente superior em comparação com os demais, indicando maior rigidez, enquanto o Nylon®6,6 é o material menos rígido, e as sedas exibem valores intermediários.

A resistência à tração do Kevlar®49 é notavelmente alta em comparação com os outros materiais. As sedas exibem uma resistência alta, mas ainda, aproximadamente, 3 vezes menor que o kevlar®49, seguida pelo Nylon®6,6.

A ductilidade mostra a capacidade do material de se deformar antes de falhar. Nylon®6,6 e a fibra recombinante possuem valores semelhantes, enquanto estas podem apresentar valores ligeiramente maiores, diferentemente do Kevlar®49, que se mostra pouco extensível. Por fim, a tenacidade mede a capacidade do material de ab-

sorver energia antes da ruptura, sendo as sedas com maiores valores, seguidas pelo nylon®e, posteriormente, o Kevlar®49.

As propriedades evidenciam que a principal atratividade da seda reside na combinação de suas características. Nenhum dos artigos abordados neste texto discute a possibilidade de igualar os valores de módulo de elasticidade e resistência da seda aos do Kevlar®49. Portanto, destaca-se a importância de avaliar as propriedades necessárias para cada aplicação, a fim de verificar se a substituição pode ocorrer sem prejuízo.

Por fim, não se pode afirmar de maneira conclusiva que a seda pode meramente substituir o Kevlar®49, pois tal decisão dependerá das exigências específicas de cada aplicação. No entanto, destaca-se que, quando a substituição é viável, o material apresenta maior atratividade devido à sua leveza, sustentabilidade ambiental e propriedades superiores de elasticidade e tenacidade. Já, a substituição do Nylon®6,6 pela seda é completamente viável.

# Capítulo 6

## Considerações Finais

Neste estudo, foram abordadas diversas etapas que compõem o processo de fabricação de fios de seda através da tecnologia recombinante. Cada fase, desde a caracterização da seda a ser produzida, a clonagem do fragmento de DNA, a seleção do hospedeiro até o método de fiação, revelou-se ter alto impacto nas propriedades finais da fibra.

A partir da revisão bibliográfica foi possível entender o processo de produção natural da seda de aranha, bem como entender os métodos de produção de seda recombinante, além de entender a grande variedade de rotas produtivas, tornando cada processo produtivo singular. Também, foi possível identificar melhorias para os processos, desde questões envolvendo expressão da proteína até a promoção de alteração das propriedades pós-fiação. Trabalhos futuros devem concentrar seus esforços em *design* das proteínas para posterior obtenção de materiais com propriedade melhores.

Não foi possível concluir, a partir de dados, se os processos atendem à escala industrial, mas considerando que, diversas empresas já vêm produzindo produtos a partir dessas rotas de produção, conclui-se que é tecnicamente viável. Entretanto, a viabilidade financeira dos métodos ainda não está clara nos artigos.

Atualmente, diversas empresas já comercializam esse produto, embora sua aplicabilidade em materiais de engenharia ainda esteja em desenvolvimento, evidenciando um extenso campo de estudo para alcançar as propriedades necessárias que o tornariam uma alternativa viável.





# Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B. *Biologia molecular da célula*. [S.l.]: Artmed, 2017. v. 6. ISBN 9788582714232.
- ANDERSEN, S. O. Amino acid composition of spider silks. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 35, p. 705–711, 1970.
- BABU, K. M. Spider silks and their applications. *Silk*, v. 2, 2019. ISSN 9780081025406.
- BARGHOUT, J. Y.; THIEL, B. L.; VINEY, C. Spider (*Araneus diadematus*) cocoon silk: a case of non-periodic lattice crystals with a twist? *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 24, p. 211–217, 1999.
- BHATTACHARYYA, G.; OLIVEIRA, P.; KRISHNAJI, S. T.; CHEN, D.; HINMAN, M.; BELL, B.; HARRIS, T. I.; GHAZITABATABAEI, A.; LEWIS, R. V.; JONES, J. A. Large scale production of synthetic spider silk proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2021.
- BITTENCOURT, D.; SOUTO, B. M.; VERZA, N. C.; VINECK, F.; DITTMAR, K.; SILVA, P. I.; AL. et. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: nephilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry Molecular Biology*, v. 147, p. 597–606, 2007.
- BLACKLEDGE, T. A.; HAYASHI, C. Y. Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). *Journal of Experimental Biology*, v. 209, p. 2452–2461, 2006.
- BORZANI, W.; SCHMIDELLA, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial- Fundamentos*. Sao Paulo, SP: E. Blücher, 2001. ISBN 9788521202783.
- BOWEN, C. H.; DAI, B.; SARGENT, C. J.; BAI, W.; LADIWALA, P.; FENG, H.; W., H.; KAPLAN, D. L.; GALAZKA, J. M.; ZHANG, F. Recombinant spidroins fully replicate primary mechanical properties of natural spider silk. *Biomacromolecules*, p. 3853–3860, 2018.
- BRESLAUER, D.; KAPLAN, D. Silks. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2016. ISSN 9780128035818.
- BROOKS, A. E.; STEINKRAUS, H. B.; NELSON, S. R.; LEWIS, R. V. An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from *Nephila clavipes* and *Argiope aurantia*. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 3095–3099, 2005.

- CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. *Ciência e engenharia de materiais : uma introdução*. [S.l.]: LTC, 2016. v. 9. ISBN 9788521631033.
- COLLIN, M. A.; CLARKE, T. H.; AYOUB, N. A.; HAYASHI, C. Y. Evidence From Multiple Species That Spider Silk Glue Component ASG2 is a Spidroin. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.
- DUPONT. Acessado em: 08 de fevereiro de 2024. Disponível em: <<https://www.dupont.com.br/>>.
- FOX, L. R. Cannibalism in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 6, p. 87–106, 1975.
- GARB, J. E.; HAYASHI, C. Y. Modular evolution of egg case silk genes across orb-weaving spider superfamilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 11379–11384, 2005.
- GEURTS, P.; ZHAO, L.; HSIA, Y.; GNESE, E.; TANG, S.; JEFFERY, F.; AL. et. Synthetic spider silk fibers spun from pyriform spidroin 2, A glue silk protein discovered in orb-weaving spider attachment discs. *Biomacromolecules*, v. 11, 2010.
- GOSLINE, J. M.; GUERETTE, P. A.; ORTLEPP, C. S.; SAVAGE, K. N. The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *Journal of Experimental Biology*, v. 202, 1999.
- HAJER, J.; REHAKOVA, D. Spinning activity of the spider *Trogloneta granulum* (Araneae, Mysmenidae): web, cocoon, cocoon handling behaviour, draglines and attachment discs. *Zoology*, v. 106, p. 223–231, 2003.
- HASHEMI, J.; SMITH W., F. *Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais*. [S.l.]: AMGH, 2012. ISBN 9788580551150.
- HAYASHI, C. Y.; BLACKLEDGE, T. A.; LEWIS, R. V. Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, p. 1950–1959, 2004.
- HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *Journal of Molecular Biology*, v. 275, p. 773–784, 1998.
- HAYASHI, C. Y.; SHIPLEY, N. H.; LEWIS, R. V. 24. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 1999, p. 271–275, 1999.
- HEIDEBRECHT, A.; SCHEIBEL. Recombinant production of spider silk proteins. p. 115–153, 2013.
- HU, X.; VASANTHAVADA, K.; KOHLER, K.; MCNARY, S.; MOORE, A. M.; VIERRA, C. A. Molecular mechanisms of spider silk. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, p. 1986–1999, 2006.

- HU, X. Y.; KOHLER, K.; FALICK, A. M.; MOORE, A. M.; JONES, P. R.; SPARKMAN, O. D.; AL. et. Egg case protein-1-A new class of silk proteins with fibroin-like properties from the spider *Latrodectus hesperus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 21220–21230, 2005.
- HU, X. Y.; LAWRENCE, B.; KOHLER, K.; FALICK, A. M.; MOORE, A. M.; MCMULLEN, E.; AL. et. Araneoid egg case silk: a fibroin with novel ensemble repeat units from the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry*, v. 44, p. 10020–10027, 2005.
- HUANG, W.; LIN, Z.; SIN, Y. M.; LI, D.; GONG, Z.; YANG, D. Characterization and expression of a cDNA encoding a tubuliform silk protein of the golden web spider *Nephila antipodiana*. *Biochimie*, v. 88, p. 849–858, 2006.
- HUMENIK, M.; SCHEIBEL, T.; SMITH, A. Spider silk: Understanding the structure-function relationship of a natural fiber. *Progress in Molecular Biology and Translational Science - vol 103*, p. 131–185, 2011.
- KAPLAN, D.; SCHEIBEL, T. Recombinant silk production in bacteria. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2017.
- KO, F. K.; WAN, L. Y. Engineering properties of spider silk. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018.
- KOHLER, K.; THAYER, W.; LE, T.; SEMBHI, A.; VASANTHAVADA, K.; MOORE, A. M. F.; AL. et. Characterization of a novel class II bHLH transcription factor from the black widow spider, *Latrodectus hesperus*, with silk gland restricted patterns of expression. *DNA and Cell Biology*, v. 24, p. 371–380, 2005.
- KOVOOR, J.; ZYLBERBERG, L. Fine structural aspects of silk secretion in a spider (*Araneus diadematus*). I. Elaboration in the pyriform glands. *Tissue Cell*, v. 12, p. 547–556, 1980.
- LIN, A.; CHUANG, T.; PHAM, T.; HO, C.; HSIA, Y.; BLASINGAME, E.; VIERRA, C. Advances in understanding the properties of spider silk. *Advances in Silk Science and Technology*, 2015.
- LIU, Y.; SHAO, Z.; VOLLRATH, F. Elasticity of spider silks. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 1782–1786, 2008.
- MALAY, A. D.; CRAIG, H. C.; CHEN, J.; OKTAVIANI, N. A.; NUMATA, K. Complexity of spider dragline silk. *Biomacromolecules*, 2021. ISSN 15264602.
- MATTINA, C. L.; REZA, R.; HU, X.; FALICK, A. M.; VASANTHAVADA, K.; MCNARY, S.; AL. et. Spider minor ampullate silk proteins are constituents of prey wrapping silk in the cob weaver *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry*, v. 47, p. 4692–4700, 2008.
- OHGO, K.; KAWASE, T.; ASHIDA, J.; ASAKURA, T. Solid-state NMR analysis of a peptide (Gly-Pro-Gly-Gly Ala)(6)-Gly derived from a flagelliform silk sequence of *Nephila clavipes*. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 1210–1214, 2006.

- RAMEZANIAGHDAM, M.; NAHDI, N. D.; RESKI, R. Recombinant spider silk: Promises and bottlenecks. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, 2022. ISSN 22964185.
- RISING, A.; HJALM, G.; ENGSTROM, W.; JOHANSSON, J. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 3120–3124, 2006.
- SCHEIBEL, T. Spider silks: Recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial Cell Factories*, v. 3, 2004. ISSN 14752859.
- TIAN, M.; LEWIS, R. V. Tubuliform silk protein: A protein with unique molecular characteristics and mechanical properties in the spider silk fibroin family. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, v. 82, p. 265–273, 2006.
- TILLINGHAST, E. K.; TOWNLEY, M. A.; WIGHT, T. N.; UHLENBRUCK, G.; JANSSEN, E. Adhesive glycoprotein of the ORB web of *Argiope Aurantia* (Araneae, Araneidae). *Materials Research Society Symposium Proceedings*, v. 292, p. 9–23, 1993.
- VASANTHAVADA, K.; HU, X.; FALICK, A. M.; MATTINA, C. L.; MOORE, A. M.; JONES, P. R.; AL. et. Aciniform spidroin, a constituent of egg case sacs and wrapping silk fibers from the black widow spider *Latrodectus hesperus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 35088–35097, 2007.
- WEN, R.; WANG, K.; LIU, X.; LI, X.; MI, J.; MENG, Q. Molecular cloning and analysis of the full-length aciniform spidroin gene from *Araneus ventricosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 117, p. 1352–1360, 2018.
- WERTEN, M. W.; EGGINK, G.; STUART, M. A. C.; WOLF, F. A. Production of protein-based polymers in *pichia pastoris*. *Biotechnology Advances*, v. 37, 2019. ISSN 07349750.
- WHITTALL, D. R.; V., B. K.; BREITLING, R.; TAKANO, E. Host systems for the production of recombinant spider silk. *Trends in Biotechnology*, v. 39, 2021. ISSN 18793096.
- WOLFF, J. O.; GRAWE, I.; WIRTH, M.; KARSTEDT, A.; GORB, S. N. Spider's superglue: Thread anchors are composite adhesives with synergistic hierarchical organization. *Soft Matter*, v. 11, p. 2394–2403, 2015.
- ZAHA, A. A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Basica*. Sao Paulo, SP: Artmed, 2014. ISBN 9788582710586.

---

(WHITTALL et al., 2021) (WERTEN et al., 2019) (DUPONT, Acessado em: 08 de fevereiro de 2024)