



INVESTIGAÇÕES ESTRUTURAIS DE FIBRAS SINTÉTICAS DE ARANHA  
PRODUZIDAS POR MEIO DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE

GABRIELA MATSUNAGA MENEZES

Orientador: Elibio L. Rech Filho

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós – Graduação em  
Biologia Molecular da Universidade  
como requisito parcial para obtenção  
do Título de Mestre.

Brasília – DF

Dezembro de 2010

## Dedicatória

---

Dedico este trabalho ao meu primo Leonardo, que segue sempre iluminando o meu caminho. Que a sua coragem e a sua graça sejam inspiradoras e façam a diferença.  
Que sejam capazes de fazer do mundo um lugar um pouco mais justo.

## Agradecimentos

---

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Edna e Frederico, por todo o amor e cuidado, pelo incentivo e pela confiança em mim. Agradeço pelos princípios morais, pelas lições de vida e pelos exemplos que me permitiram estar onde estou. Obrigada por me apoiarem sempre e por sorrirem comigo a cada conquista. Amo muito vocês.

Agradeço à minha irmã Nicole, pelo amor, pela amizade e pelo jeito de ser inspirador.

Às pessoas amadas que participam da minha rotina, Luciana, Patrícia, Renata, Mário. Obrigada pela paciência, pelo carinho e pelas risadas de sempre... Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Aos amigos da faculdade, que trilharam ou não caminhos diferentes do meu, mas que compartilharam comigo um aprendizado de vida. Agradecimento especial à Raquel, às Lianas, ao Miguel, ao Jadson e ao Marcus, pela amizade e pela oportunidade de conhecê-los.

Ao meu orientador, Dr. Elíbio Rech, pelo incentivo, pela oportunidade, pelo entusiasmo e por acreditar sempre no meu potencial.

Ao Dr. Luciano Paulino, pelo conhecimento compartilhado, pelas idéias trocadas, pelos conselhos, pelas discussões, pela tranquilidade, pela amizade e por não me deixar ter um ataque de nervos a cada momento de dificuldade.

Ao Dr. Giovanni Vianna e ao Nicolau, parceiros de todas as horas, por me ajudarem sempre, pelo aprendizado, pelas risadas, por se fazerem presentes, pelas conversas e pela amizade.

À Dra. Florence Teulé e ao Dr. Randolph Lewis, da Universidade de Wyoming, EUA, pela cooperação e por terem nos cedido o material para realizar este trabalho.

À minha amiga Paula, que mesmo longe esteve perto. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, pela participação na minha vida, tanto dentro como fora do laboratório... Obrigada por iluminar os dias com seu jeito de ser.

A todos os amigos do Laboratório de Transferência de Genes, em especial André, Thaina e Cristiano pela convivência, pelas boas risadas, pelas idéias discutidas... Obrigada à Elsa e à Andrea, por serem sempre atenciosas e estarem prontas para me ajudar a resolver os problemas, e à Luisa e Natália, que já trilharam novos caminhos, mas deixam saudades.

Ao laboratório de nanobiotecnologia pela oportunidade de realizar as análises e por contribuir para o êxito das minhas apresentações de qualificação e defesa.

Às Dras. Beatriz Simas Magalhães e Sônia Maria de Freitas e ao Dr. André Melro Murad por aceitarem participar da minha banca examinadora.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo local e pelo fornecimento dos materiais e equipamentos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular pela oportunidade de aprendizado e pela possibilidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos.

## Lista de Figuras

---

**Figura 1.** Funções das teias produzidas pelas glândulas sericígenas de diversas aranhas tecedoras de teias orbitais, como a aranha de jardim européia *A. diadematus*.

**Figura 2.** Sequências parciais de resíduos de aminoácidos referentes às regiões consenso repetitivas das proteínas produzidas pela glândula ampolada maior (MaSp 1 e 2) e pela glândula flageliforme (Flag) de várias aranhas tecedoras de teias orbitais.

**Figura 3.** Representação esquemática da seda da linha de segurança.

**Figura 4.** Visão esquemática do processo de polimerização das fibras de aranha de acordo com as transformações físico-químicas a que são submetidas.

**Figura 5.** Diferenças entre os módulos básicos das proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> e os respectivos mecanismos de formação das fibras.

**Figura 6.** A) Princípio básico de operação do microscópio de força atômica (modo contato). B) Modo contato intermitente (dinâmico).

**Figura 7.** Modelo de curva de força relativa à distância entre a ponteira e a superfície analisada durante experimentos de nanoindentação por meio de MFA.

**Figura 8.** Imagens da superfície das fibras A1S8<sub>20</sub> pertencentes ao grupo não tratado adquiridas por meio de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura.

**Figura 9.** Imagens de superfície da fibra MA, tratada com metanol e estirada 1,5x.

**Figura 10.** Imagens de superfície da fibra MB, tratada com metanol, água e estirada 1,5x.

**Figura 11.** Imagens de superfície das fibras pertencentes ao grupo IA, tratadas com isopropanol e estiradas 1,5x.

**Figura 12.** Imagens de superfície das fibras pertencentes ao grupo IB, tratadas com isopropanol, estiradas 1,5x, tratadas com água e estiradas 1,5x novamente.

**Figura 13.** Análise de rugosidade das fibras A1S8<sub>20</sub> por meio de MFA. Os parâmetros analisados estão dispostos no eixo Y de cada gráfico.

**Figura 14.** Curvas de força-separação representativas dos 5 grupos A1S8<sub>20</sub> analisados.

**Figura 15.** Módulo de elasticidade das fibras A1S8<sub>20</sub> obtido por meio de nanoindentação.

**Figura 16.** Forças relativas às fibras A1S8<sub>20</sub> medidas durante os experimentos de nanoindentação.

**Figura 17.** Medições de distância (perfuração) relativas às fibras A1S8<sub>20</sub> obtidas durante os experimentos de nanoindentação.

**Figura 18.** Imagens da superfície das fibras controle Y1S8<sub>20</sub> obtidas por meio de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura.

**Figura 19.** Imagens da superfície de três das fibras Y1S8<sub>20</sub> tratadas.

**Figura 20.** Imagens da superfície de duas das fibras Y1S8<sub>20</sub> tratadas.

**Figura 21.** Análise de rugosidade das fibras Y1S8<sub>20</sub> por meio de MFA. Os parâmetros analisados estão dispostos no eixo Y de cada gráfico.

**Figura 22.** Curvas de força-separação representativas dos 2 grupos Y1S8<sub>20</sub> analisados.

**Figura 23.** Módulo de elasticidade das fibras Y1S8<sub>20</sub> obtido por nanoindentação.

**Figura 24.** Forças relativas às fibras Y1S8<sub>20</sub> medidas durante os experimentos de nanoindentação.

**Figura 25.** Medições de distância (profundidade de perfuração) das fibras Y1S8<sub>20</sub> durante os experimentos de nanoindentação.

**Figura 26.** Rugosidade média comparativa entre os grupos controle das proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>.

**Figura 27.** Módulos de elasticidade correspondentes aos grupos controle das fibras geradas a partir das proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>

**Figura 28.** Forças relativas aos grupos controle das fibras A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> medidas durante os experimentos de nanoindentação.

**Figura 29.** Medições de distância (profundidade de perfuração) relativas aos grupos controle das fibras A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> durante os experimentos de nanoindentação.

## **Lista de Tabelas**

---

**Tabela 1** Propriedades mecânicas comparativas entre diferentes materiais.

**Tabela 2** Propriedades mecânicas exibidas por fibras de seis espécies de aranhas.

## Lista de siglas e abreviaturas

A1S8 <sub>20</sub>	Fibras produzidas a partir de proteínas com sequência repetitiva, em que os módulos básicos (A1 e S8) encontram-se repetidos 20x.
Y1S8 <sub>20</sub>	Fibras produzidas a partir de proteínas com sequência repetitiva, em que os módulos básicos (Y1 e S8) encontram-se repetidos 20x.
FF	Fibras obtidas por fiação forçada
GF	Fibras obtidas por meio da gravidade
Grupo A1S8C	Grupo C A1S8 <sub>20</sub>
Grupo C	Controle fibras A1S8 <sub>20</sub>
Grupo IA	A1S8 <sub>20</sub> tratadas com isopropanol e estiradas
Grupo IB	A1S8 <sub>20</sub> tratadas com isopropanol, estiradas, tratadas com água, estiradas
Grupo MA	A1S8 <sub>20</sub> tratadas com metanol e estiradas
Grupo MB	A1S8 <sub>20</sub> tratadas com metanol, água e estiradas
Grupo YA	Y1S8 <sub>20</sub> tratadas com água e estiradas
Grupo YC	Controle fibras Y1S8 <sub>20</sub>
Grupo Y1S8C	Grupo YC Y1S8 <sub>20</sub>
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
MaSp1	“Major Spidroin” 1. Espidroína 1 produzida pela glândula ampolada maior
MaSp2	“Major Spidroin” 2 Espidroína 2 produzida pela glândula ampolada maior
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MFA	Microscopia de Força Atômica
ORB	Fibras constituintes das teias orbitais
Ra	Rugosidade média aritmética
Rq	Rugosidade quadrática media
Rzjis	Rugosidade média de 10 pontos
Rp	Altura média
Rv	Profundidade média
Rz	Altura máxima
SNC	Fibras suporte de teias não orbitais

## Lista de fórmulas

---

Fórmula 1

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx$$

Fórmula 2

$$Rz = \frac{|Yp1 + Yp2 + Yp3 + Yp4 + Yp5| + |Yv1 + Yv2 + Yv3 + Yv4 + Yv5|}{5}$$

Fórmula 3

$$F = -\delta c \times kc$$

Fórmula 4

$$Rms = \sqrt{\frac{\sum (Yi - Y)^2}{N}}$$

Fórmula 5

$$D = Z - (\delta c + \delta s)$$

Fórmula 6

$$Fad = 0$$

Fórmula 7

$$a = \sqrt[3]{\frac{RF}{K}}$$

Fórmula 8

$$a0 = 0$$

Fórmula 9

$$\delta = \frac{a^2}{R} = \frac{F}{Ka}$$

Fórmula 10

$$P(x) = \frac{3Ka\sqrt{1-x^2}}{2\pi R} = \frac{3F\sqrt{1-x^2}}{2\pi a^2}$$

Fórmula 11

$$\frac{1}{K} = \frac{3}{4} \left( \frac{1-v^2}{E} + \frac{1-v_i^2}{E_i} \right)$$

Fórmula 12

$$F = \left[ (a^2 + R^2) \ln \left( \frac{R+a}{R-a} \right) - 2aR \right] \frac{3}{8}$$

Fórmula 13

$$\delta = \frac{1}{2} a \ln \left( \frac{R+a}{R-a} \right)$$

Fórmula 14

$$\delta = \int_0^1 \frac{f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx$$

Fórmula 15

$$F = \frac{3}{2} Ka \int_0^1 \frac{x^2 f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx$$

Fórmula 16

$$F_{att} = \delta c \times kc$$

## Lista de símbolos

---

L	Comprimento referência para cálculo de rugosidade
$Yp_n$	Valores dos picos mais altos relativos à rugosidade de superfície
$Yv_n$	Valores dos vales mais baixos relativos à rugosidade de superfície
Rms	Raiz quadrática média
Y	Altura Y
$Y_i$	Altura Y no ponto i
N	Número de pontos ao longo da área varrida
Ka	Módulo do raio de contato a (no caso se refere à ponteira)
$k_c$	Constante elástica do cantilever
$\delta_c$	Deflexão no cantilever
Z	Distância entre a amostra e a posição de parada do cantilever
$\delta_s$	Deformação da amostra
$F_{ad}$	Força de adesão
a	Raio de contato entre uma esfera e uma superfície plana
$a_0$	Raio de contato de carga zero
F	Força aplicada
R	Raio da esfera
P	Pressão
E	Módulo de Young da amostra
$E_i$	Módulo de Young do indentador (ponteira)
$\nu$	Coefficiente de Poisson da amostra
$\nu_i$	Coefficiente de Poisson da ponteira
$F_{att}$	Força atrativa

As sedas de aranhas combinam biocompatibilidade e biodegradabilidade e são conhecidas pelas suas propriedades mecânicas, o que as torna visadas para aplicações médicas, militares e têxteis. Acredita-se que características como força e extensibilidade resultem de motivos de proteína específicos e várias tentativas para sua produção *in vitro* têm sido feitas, mas as características das fibras sintéticas ainda não são comparáveis às exibidas pelas fibras nativas. A microscopia de força atômica (MFA) foi escolhida para descrever a estrutura da superfície e o comportamento mecânico de 19 fibras sintéticas de aranha, e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterização em dimensões maiores. As seqüências de DNA sintéticas foram construídas combinando motivos de força e extensibilidade, e duas proteínas foram produzidas em *Escherichia coli*, consistindo as variações em dois resíduos de aminoácidos na seqüência repetitiva de cada proteína (A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>). Grupos controle foram mantidos e algumas das fibras foram submetidas a diferentes tratamentos, que incluem testes de tensão e banhos de metanol, isopropanol e /ou água. Imagens da superfície (MEV) e imagens de topografia e fase (MFA) foram adquiridas. Seis parâmetros de rugosidade foram analisados e medidas de espectroscopia de força foram realizadas para a obtenção da mecânica local das fibras. Tratamentos distintos resultaram em diferenças significativas e as fibras sintéticas apresentaram-se heterogêneas, com irregularidades de superfície na maioria dos casos. As diferenças na rugosidade e nos parâmetros mecânicos medidos evidenciam importantes distinções entre as fibras resultantes da proteína A1S8<sub>20</sub> e da Y1S8<sub>20</sub>. Mostra-se, portanto, que a seqüência primária das proteínas é fundamental para as propriedades mecânicas das fibras. Os resultados mostram ainda uma melhoria das propriedades verificadas para o os grupos A1S8<sub>20</sub> tratados com isopropanol e para o grupo Y1S8<sub>20</sub> tratado com água. Este estudo avaliou as fibras sintéticas qualitativa e quantitativamente, apontando MFA e MEV como técnicas capazes de descrever de forma única os detalhes particulares da estrutura de superfície das fibras sintéticas de aranha.

*Palavras-chave:* Microscopia de Força Atômica, Microscopia Eletrônica de Varredura, fibra de aranha sintética, topografia, viscoelasticidade, rugosidade, propriedades mecânicas.

## Abstract

---

Spider silks combine biocompatibility and biodegradability and are well known for their mechanical properties, what makes them suitable for medical, military and textile purposes. Characteristics such as strength and extensibility are believed to result from specific protein motifs and various attempts on spider silk *in vitro* production have been made, but synthetic fibers' characteristics are still not comparable to the properties exhibited by native fibers. Atomic force microscopy (AFM) has been chosen to describe the surface structure and the mechanical behavior of 19 synthetic spider fibers and scanning electron microscopy (SEM) has been used for characterization in higher dimensions. The synthetic DNA sequence was engineered combining strength and extensibility motifs and two synthetic proteins were produced in *Escherichia coli*. Variations consisted on two amino acid residues on the repetitive sequence of each protein (A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>). Control groups were maintained and the some of the fibers were submitted to different types of treatments, which include tensile tests and methanol, isopropanol and/or water bath. Surface images (SEM) and topography and phase images (AFM) were obtained. Six roughness parameters were analyzed and force spectroscopy measurements were also performed in order to verify fibers local mechanics. Distinct treatments resulted on significant differences and the synthetic fibers appeared very heterogeneous, with surface irregularities in most cases. Differences in roughness could also be noticed and the mechanical parameters measured evidence important distinctions among the A1S8<sub>20</sub> and the Y1S8<sub>20</sub> fibers. Therefore, it has been shown that the primary sequence of the proteins is fundamental for the mechanical properties of the fibers. Moreover, the results show an improvement of the material properties measured for the A1S8<sub>20</sub> isopropanol treated groups and the Y1S8<sub>20</sub> water treated group. This study was able to evaluate synthetic fibers qualitatively and quantitatively, pointing AFM and SEM as techniques able to describe uniquely particular details of synthetic spider fibers surface structure.

**Keywords:** Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, synthetic spider silk, topography, viscoelasticity, roughness, mechanical properties.

# Sumário

<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>REVISÃO DE LITERATURA</u></b>	<b>2</b>
2.1	AS SEDAS	2
2.2	SEDAS COMO BIOMATERIAIS	7
2.3	DO DNA À FIBRA DE ARANHA	9
2.3.1	A IMPORTÂNCIA DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	10
2.3.2	A POLIMERIZAÇÃO DAS FIBRAS	15
2.4	CARACTERIZAÇÃO DE SEDAS UTILIZANDO MICROSCOPIA	19
2.4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPALHAMENTO DE RAIOS-X	19
2.4.2	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	22
<b>3</b>	<b><u>HIPÓTESES</u></b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b><u>JUSTIFICATIVA</u></b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b><u>OBJETIVO GERAL</u></b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b><u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u></b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b><u>MATERIAL E MÉTODOS</u></b>	<b>32</b>
7.1	FIBRAS A1S8 <sub>20</sub>	32
7.2	FIBRAS Y1S8 <sub>20</sub>	33
7.3	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA - AQUISIÇÃO DE IMAGENS	34
7.4	ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA DE FORÇA	36
7.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	42
7.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
<b>8</b>	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	<b>42</b>
8.1	FIBRAS A1S8 <sub>20</sub>	42
8.1.1	AQUISIÇÃO DE IMAGENS	42
8.1.2	MEDIÇÕES DE RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE	53
8.1.3	ESPECTROSCOPIA DE FORÇA	57
8.2	FIBRAS Y1S8 <sub>20</sub>	70
8.2.1	AQUISIÇÃO DE IMAGENS	70
8.2.2	MEDIÇÕES DE RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE	75
8.2.3	ESPECTROSCOPIA DE FORÇA	76
8.3	COMPARAÇÕES ENTRE AS FIBRAS A1S8 <sub>20</sub> E Y1S8 <sub>20</sub>	82

8.3.1	RUGOSIDADE MÉDIA RA .....	83
8.3.2	MÓDULO DE YOUNG .....	84
<b>9</b>	<b><u>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</u></b> .....	<b>89</b>
<b>10</b>	<b><u>PLANO DE PUBLICAÇÃO</u></b> .....	<b>91</b>
10.1	TÍTULO PROVISÓRIO .....	91
<b>11</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	<b>92</b>

# 1 Introdução

A humanidade tem se utilizado da seda produzida por uma série de insetos há milhares de anos e suas propriedades estruturais e mecânicas peculiares fizeram com que fossem aplicadas na confecção de uma série de materiais, com finalidades distintas. Algumas sedas, suas aplicações na natureza e suas perspectivas de uso como biomateriais serão discutidas ao longo deste trabalho.

As fibras das aranhas ganharam atenção particular, principalmente por apresentarem características como dureza e ductilidade (capacidade de deformação plástica), mas também por não despertar nenhuma resposta alergênica ou inflamatória quando em contato com tecidos vivos (Romer e Scheibel, 2008). Tais propriedades fazem das sedas de aranha um ramo de interesse na ciência de materiais, que busca desenvolver polímeros com características específicas de acordo com as aplicações pretendidas.

Na natureza, as aranhas produzem tipos diferentes de sedas, gerados a partir de proteínas modulares específicas conhecidas como espidroínas. Existe uma variabilidade de sequências gênicas, proteínas e conseqüentemente de fibras bastante expressiva entre espécies. Variações também são encontradas a nível intra-específico e de indivíduo. As diferenças observadas levaram ao desenvolvimento de diversos trabalhos que buscam elucidar os genes responsáveis pela tradução das proteínas da seda, suas estruturas secundárias e supersecundárias, a organização das espidroínas em fibras, a estrutura final do fio de seda sólido e as propriedades mecânicas resultantes deste complexo processo.

A inviabilidade da domesticação de aranhas e as pequenas quantidades de seda obtidas das próprias aranhas levaram à busca pelo desenvolvimento de fibras sintéticas em laboratório, de maneira a possibilitar a existência futura de uma escala de produção que supra as necessidades da indústria de biopolímeros. Para tanto, a produção heteróloga de proteínas da seda e tentativas de mimetização do processo de fiação das fibras ganharam espaço nos ambientes de pesquisa. As propriedades exibidas pelas fibras sintéticas, entretanto, ainda não alcançam as apresentadas

pelas fibras nativas, e diversas tentativas de melhoria de desempenho - que englobam todos os aspectos da produção de sedas - vêm sendo desenvolvidas.

A caracterização de sedas de aranha e de alguns insetos por meio de diversas metodologias já foi reportada em uma série de trabalhos e tem contribuído significativamente para o progresso das pesquisas na área, mas há ainda muito a ser revelado. Diante do exposto, a utilização de tecnologias que permitam uma caracterização mais aprofundada, acurada e detalhada é imprescindível para que os objetivos descritos sejam alcançados.

Desta forma, no presente estudo se propõe o uso da microscopia de força atômica, associada à microscopia eletrônica de varredura, para caracterização de fibras sintéticas de aranha sob o ponto de vista qualitativo, já descrito em alguns trabalhos, e sob o ponto de vista quantitativo, que é ainda pouco explorado. Esta caracterização visa a agregar novos conhecimentos à caracterização estrutural da produção de fibras em laboratório, além de revelar detalhes acerca das propriedades mecânicas exibidas por estas fibras.

## **2 Revisão de literatura**

### **2.1 As sedas**

As sedas geradas por aranhas e por algumas espécies de insetos, a exemplo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e da larva da abelha melífera (*Apis mellifera*), são facilmente encontradas na natureza e chamam atenção por suas propriedades mecânicas distintas. Características como a maciez e a alta estabilidade mecânica das fibras de aranha, além de seu diâmetro bastante reduzido, fazem com que estas fibras sobressaiam em relação a uma série de outros materiais disponíveis (Heim *et al.*, 2009). Além disso, tais sedas possuem os atributos de biocompatibilidade e biodegradabilidade (Fu *et al.*, 2009), o que as torna um objeto de estudo importante, principalmente pelas perspectivas de aplicação das fibras como biomateriais. Diversas finalidades podem ser atribuídas às fibras de alto desempenho obtidas a partir de proteínas específicas, que variam de acordo com o agente produtor e com

a função da seda produzida. As aranhas - que podem produzir até sete tipos diferentes de fibras - empregam suas sedas com finalidades variadas (Fu *et al.*, 2009) que vão desde a captura de presas à formação da linha de segurança, que as permite escapar dos predadores quando estão em situações de risco iminente (Hinman *et al.*, 2000; Romer e Scheibel, 2008). O bicho da seda e a larva da abelha melífera, por outro lado, produzem apenas um tipo de fibra, que é aplicada na confecção de casulos (Fu *et al.*, 2009; Weisman *et al.*, 2010). Propriedades como força, resistência e flexibilidade tornaram tais fibras objetos de estudo em uma série de trabalhos que têm por meta elucidar sua estrutura e a das proteínas que as formam, de maneira a possibilitar o uso da seda na confecção de diversos materiais, com aplicações variadas.

A ordem *Araneae* - que constitui o sétimo maior grupo dentre os artrópodes, contando com mais de 41000 espécies agrupadas em 109 famílias (Platnick, 2010) - ganha atenção particular por sua capacidade de produzir fibras de naturezas distintas. Com propriedades mecânicas peculiares, as sedas de aranhas combinam diferentes proteínas na formação das fibras de acordo com a finalidade pretendida.

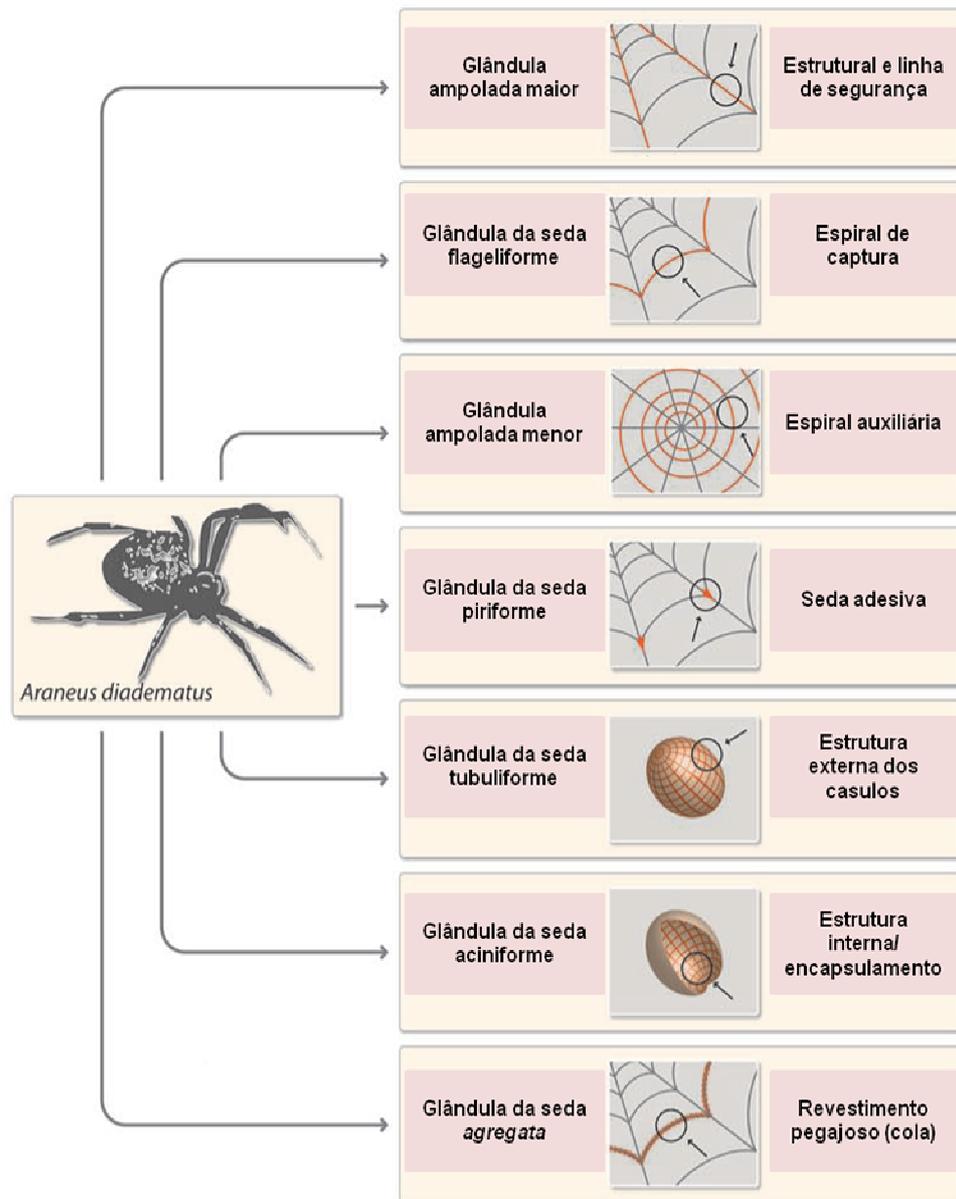
Existe variabilidade considerável entre as fibras, presente tanto em nível de indivíduo, como intra- e interespecificamente (Madsen *et al.*, 1999; Swanson *et al.*, 2006), o que indica que a caracterização de fibras de diversas aranhas, especialmente as de espécies diferentes, e o conhecimento relativo às suas aplicações na natureza podem permitir que uma grande variedade de sedas sejam disponibilizadas como biopolímeros futuramente, de acordo com as propriedades requeridas para o desenvolvimento de um determinado material.

Até sete glândulas diferentes estão envolvidas na produção das sedas de aranhas, sendo elas:

1 e 2) glândulas ampoladas ("*major ampullate*" e "*minor ampullate*"), envolvidas respectivamente na confecção da linha de segurança e das sedas que constituem a espiral auxiliar das teias orbitais. A seda produzida pela ampolada maior está relacionada ainda à manutenção da estabilidade e da forma da teia orbital;

3) flageliforme, responsável pela produção da teia espiral de captura;

- 4) piriforme, relacionada à produção de fibras adesivas, que promovem a associação entre dois tipos de fibras distintos;
- 5) tubuliforme, que produz seda utilizada na confecção de casulos para depósito dos ovos;
- 6) aciniforme, envolvida no encapsulamento de presas e;
- 7) glândula da seda *agregata*, relacionada à produção de uma camada aquosa e pegajosa, semelhante a uma cola, contendo moléculas orgânicas que podem exercer funções específicas na teia (Mukhopadhyay e Sakthivel, 2005; Romer e Scheibel, 2008; Heim *et al.*, 2009). Algumas aranhas podem usar as sedas de forma econômica, combinando tipos diferentes para realizar suas tarefas, como na confecção de armadilhas e casulos (Huemmerich *et al.*, 2004). As funções referentes a cada uma das teias produzidas pelas glândulas descritas estão representadas na fig. 1.



**Fig. 1** Funções das teias produzidas pelas glândulas sericígenas de diversas aranhas tecedoras de teias orbitais, como a aranha de jardim européia *A. diadematus*. Adaptado de Romer e Sheibel, 2008.

As sedas produzidas pela glândula “*major ampullate*”, isoladas das espécies *Nephila clavipes* e *Araneus diadematus* constituem o tipo de seda mais descrito até hoje (Sheibel, 2004), principalmente por combinarem alta força tensora (Work, 1976; Vollrath *et al.*, 2001; Lazaris *et al.*, 2002) a razoáveis viscoelasticidade e extensibilidade (Scheibel, 2004), quando a maior parte das fibras produzidas pelo homem exibe alta força tensora e dureza, ou alta extensibilidade e baixa força tensora (Schäfer *et al.*, 2008). A combinação destas características confere à seda da linha de segurança resistência extremamente alta, e uma robustez que supera a

dos tendões, a da seda produzida pelo bicho da seda, a da borracha sintética e até mesmo a do aço (Scheibel, 2004).

**Tabela 1** Propriedades mecânicas comparativas entre diferentes materiais. Adaptado de Romer e Scheibel, 2008.

Material	Força tensora $\sigma_{max}/\text{GPa}$	Extensibilidade $\epsilon_{max}$	Resistência $\text{MJm}^{-3}$
Seda de <i>B. mori</i>	0,6	0,18	70
Linha de segurança de <i>A. diadematus</i>	1,1	0,27	160
Seda flageliforme de <i>A. diadematus</i>	0,5	2,7	150
Nylon	0,95	0,18	80
Kevlar®	3,6	0,027	50
Aço de alta tensão	1,5	0,008	6

As propriedades elásticas das fibras produzidas pela glândula flageliforme também se tornaram foco de uma série de estudos que buscam relacionar a sequência protéica à estrutura da seda (Hayashi e Lewis, 1998; Heim *et al.*, 2010). A seda flageliforme é extremamente elástica, possuindo uma extensibilidade de até 300%, e tem por função dissipar a energia de impacto das presas que vão de encontro à teia (Romer e Scheibel, 2008). Suas características mecânicas, bem como as exibidas pela linha de segurança, tornaram estas sedas alvo de pesquisas que procuram descrevê-las do ponto de vista estrutural e reproduzi-las sinteticamente, na tentativa de desenvolver materiais que exibam propriedades semelhantes.

Existem ainda alguns trabalhos de investigação acerca das características estruturais e propriedades mecânicas de outros tipos de sedas, como a produzida

pela glândula ampolada menor, que executa um papel estrutural na teia. Estas fibras possuem força tensora alta similarmente à linha de segurança, mas são muito menos elásticas, deformando-se de forma irreversível quando estiradas (Colgin e Lewis, 1998). A seda tubuliforme, que tem propriedades mecânicas semelhantes às apresentadas pela seda produzida pela ampolada menor, é produzida apenas na estação reprodutiva e constitui a estrutura externa dos casulos (Tian e Lewis, 2005). A seda aciniforme, envolvida no encapsulamento de presas e constituinte dos casulos para reprodução, chega a ser mais resistente que a linha de segurança por apresentar extensibilidade ainda mais elevada, conjugada a uma força tensora razoável (Hayashi *et al.*, 2004). A seda da glândula *agregata*, por sua vez, funciona como uma espécie de cola molhada contendo moléculas orgânicas, sais, ácidos-graxos e glicoproteínas. Sugere-se que essa camada adesiva seja importante para a manutenção da elasticidade das fibras, na proteção da teia, possuindo inclusive função antimicrobiana, além de contribuir para a captura de presas, ao dificultar seu desprendimento quando em contato com a teia (Vollrath e Tillinghast, 1991; Romer e Sheibel, 2008). Há ainda a glândula piriforme, responsável pela produção de discos de aderência (Blasingame *et al.*, 2009). Sugere-se que esses discos estejam envolvidos na junção entre tipos distintos de sedas (Romer e Sheibel, 2008), bem como na adesão da linha de segurança a superfícies sólidas (Blasingame *et al.*, 2009).

## **2.2 Sedas como biomateriais**

A humanidade tem utilizado a seda de aranha como biomaterial há milhares de anos, muito antes de seu surgimento como objeto de pesquisas científicas. Na Grécia Antiga, utilizava-se a fibra de aranha em curativos de feridas, para estancar o sangue, e na Australásia, fibras de aranhas ou até mesmo teias inteiras eram utilizadas em atividades pesqueiras. A utilização destas fibras em artefatos militares também já foi descrita. Até a II Guerra Mundial, fibras oriundas de teias de aranhas eram utilizadas na confecção de equipamentos com finalidade óptica, tais como microscópios, telescópios, visores de armas e sistemas guia de bombas (Lewis, 1996; Heim *et al.*, 2009).

Atualmente, fibras produzidas por aranhas são cotadas para aplicações têxteis, na confecção de colas e de telas super leves. A aplicação na confecção de materiais compostos e de fibras de alto desempenho também é estudada (Arcidiacono *et al.*, 2002). As sedas poderão ser utilizadas ainda como matéria-prima leve para a construção de componentes de aviões, na confecção de cordas e redes de pesca especiais, pára-quedas, produtos esportivos e em aplicações balísticas, como coletes à prova de balas (Scheibel, 2004).

A aplicabilidade na área biomédica chama atenção pela possibilidade de uso de compostos inorgânicos de seda para regular as interações interfaciais célula-material, para o controle da adesão aos tecidos e para a modulação dos perfis de degradação (Kluge *et al.*, 2008), além da aplicação no desenvolvimento de ligamentos artificiais, tendões, cápsulas de endereçamento de drogas, curativos e micro-suturas (Teulé *et al.*, 2007). Existem também perspectivas de que a formação de redes otimizadas de fibras em escalas nano ou micrométrica possa permitir ainda a participação dessas fibras em uma série de processos físicos, químicos e biológicos como reações enzimáticas, catálise química, propagação eletrônica de sinais, filtragem, entre outros. (Scheibel, 2004).

As várias aplicações em potencial da teia de aranha na confecção de diversos materiais tornam necessária sua produção em escala industrial, entretanto, o isolamento de grandes quantidades de fibras a partir da produção das próprias aranhas não é viável (Wen *et al.*, 2010), pois, ao contrário do bicho da seda - que é facilmente domesticável - as aranhas exibem um comportamento canibal, o que encarece em muito o processo (Romer e Scheibel, 2008), tornando-o de certa forma inviável. Além disso, enquanto o rendimento do casulo de *B. mori* corresponde de 600 a 900 metros de fibra, apenas ~137 metros de fibra podem ser retirados da glândula ampolada de uma aranha, e ~ 12 metros de fibra são encontrados em uma teia completa (Lewis, 1996). Tais observações, portanto, evidenciam a necessidade da produção de fibras de aranha em escala laboratorial e posteriormente industrial, que pode ser atingida por meio da engenharia genética.

Desta forma, diversas tentativas de produção de fibras de aranha *in vitro* foram realizadas, utilizando-se sistemas heterólogos para a expressão das proteínas da seda. Os sistemas incluem *Escherichia coli* (Fahnestock e Irwin, 1997; Teulé *et*

*al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2008), *Pichia pastoris* (Fahnestock e Bedzyk, 1997; Fahnestock *et al.*, 2000), *Bombyx mori* (Wen *et al.*, 2010), células do inseto *Spodoptera frugiperda* (Huemmerich *et al.*, 2004), células de mamíferos (Lazaris *et al.*, 2002), animais transgênicos (Xu *et al.*, 2007), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e batata (*Solanum tuberosum*) (Scheller *et al.*, 2001; Scheller e Conrad, 2005). Variações nos processos de extrusão das fibras também já foram relatadas (Sheibel, 2004), mas as características ultra-estruturais, nanoestruturais e mecânicas das fibras sintéticas ainda não são comparáveis às propriedades exibidas por fibras nativas.

Um dos problemas encontrados reside no fato de que partir da informação genética à formação de um fio de seda sólido é um processo muito complexo e ainda não totalmente compreendido. A complexidade do processo *in vivo* dificulta análises detalhadas do mecanismo de montagem das proteínas e sua organização em fibras, e a modelagem *in vitro* tem sido dificultada em razão das baixas quantidades de proteínas de seda aranha altamente purificadas disponíveis (Rammensee *et al.*, 2008). Outro obstáculo para a produção de seda sintética é o fato de que as proteínas de seda de aranha enfrentam uma série de mudanças no ambiente ao deixarem as glândulas produtoras da seda e passarem pelo canal de fiação. Estas mudanças compreendem quesitos como a taxa de fiação, a temperatura, a mudança de pH e o efeito de íons metálicos, que acabam por refletir em suas estruturas secundárias e super-secundárias (Chen *et al.*, 2006) e, portanto, nas características das sedas de aranha. Estes processos tornam difícil compreender e reproduzir tais condições de forma a gerar fibras que igualem as originais em estrutura e propriedades mecânicas.

### **2.3 Do DNA à fibra de aranha**

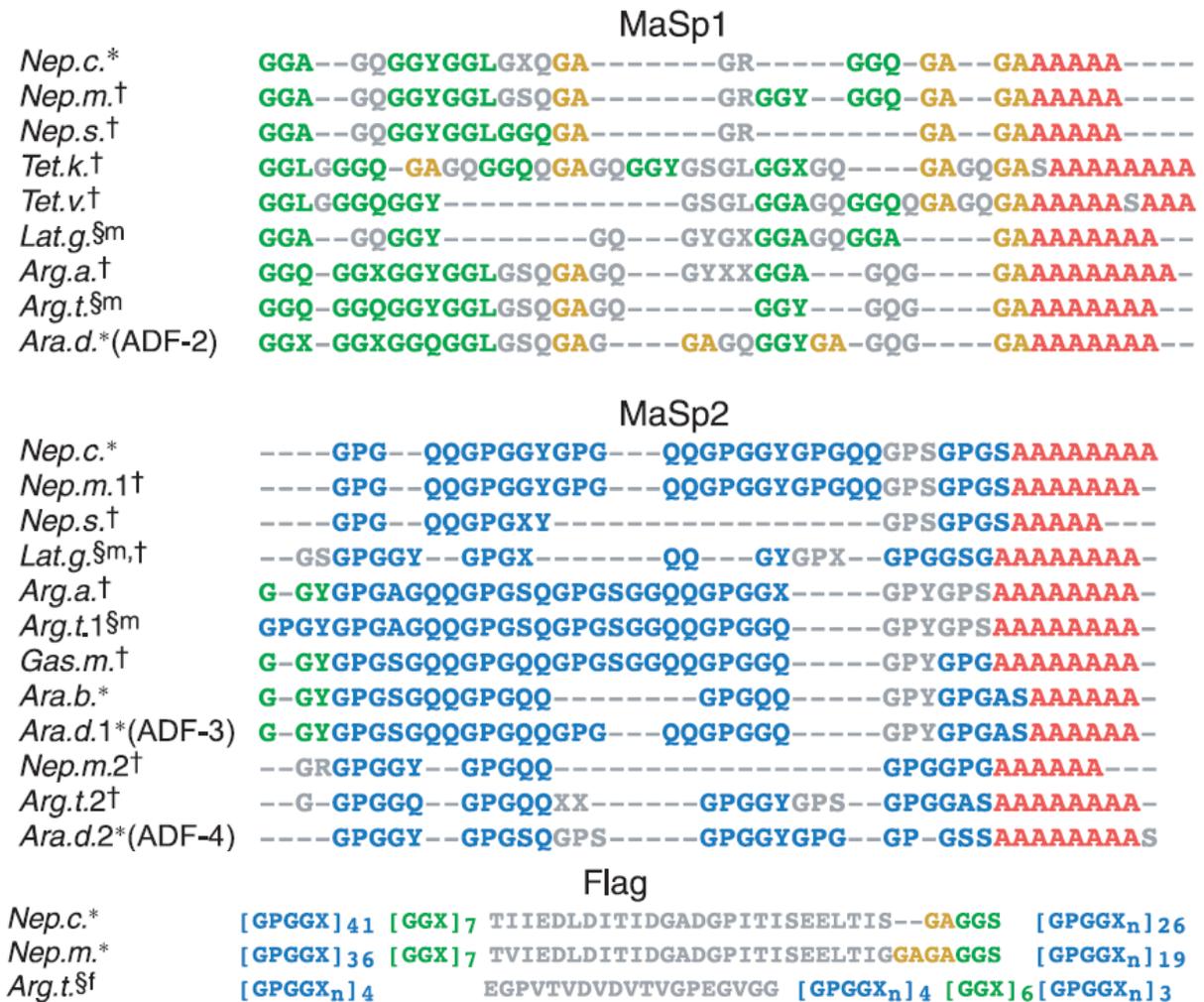
Na tentativa de elucidar todo o processo de produção de sedas, não apenas as fibras de aranha, mas os genes que codificam para as proteínas formadoras das teias - as espidroínas - têm sido estudados ao longo de muitos anos, objetivando entender os módulos formadores das fibras, a automontagem das proteínas

constituintes e os processos de fiação que levam à formação de sedas com propriedades tão distintas. Na década de 1950, a seda de aranha - a da linha de segurança em particular - tornou-se foco da ciência de materiais em razão de sua força e extensibilidade (Heim *et al.*, 2009). A partir de então, uma série de trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na produção da linha de segurança, bem como de outros tipos de seda.

As proteínas das sedas de aranha são codificadas por um conjunto variado de genes e quase todos eles pertencem a uma única família (Garb *et al.*, 2006; Ayoub *et al.*, 2007). Os membros desta família possuem muitas características similares, como uma sequência altamente repetitiva composta por regiões consenso em tandem flanqueadas por duas regiões terminais não repetitivas. A organização dos *loci*, entretanto, pode diferir consideravelmente, como o observado para os diferentes tipos de espidroínas (Heim *et al.*, 2009).

### **2.3.1 A importância da sequência de aminoácidos**

Com base em análises de sequência de DNA e em comparações das regiões consenso de várias proteínas da seda, pode-se afirmar que todas as proteínas constituintes das sedas de aranhas descritas até o momento são formadas por unidades peptídicas repetitivas. Estas podem ser agrupadas em quatro grupos principais: (1) GPGXX (onde X frequentemente representa Q); (2) sequências ricas em alanina ( $An$  ou  $(GA)n$ ); (3) GGX (onde  $X = A, Y, L$  ou  $Q$ ); e (4) as regiões espaçadoras, compostas por resíduos de aminoácidos que não pertencem à composição típica de sedas de aranhas. Algumas das referidas sequências podem ser observadas na fig.2.

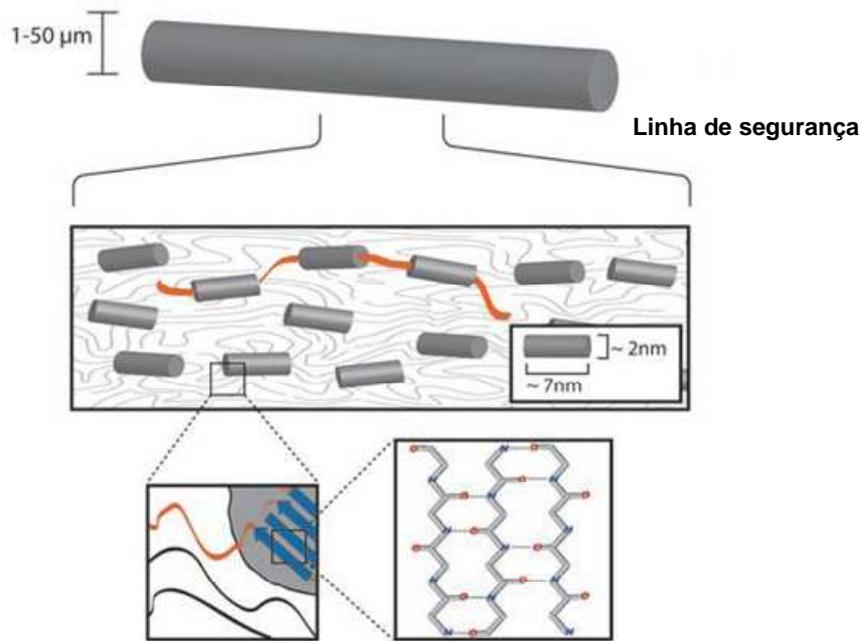


**Fig. 2** Sequências parciais de resíduos de aminoácidos referentes às regiões consenso repetitivas das proteínas produzidas pela glândula ampolada maior (MaSp 1 e 2) e pela glândula flageliforme (Flag) de várias aranhas tecedoras de teias orbitais. (-) Indica resíduos não presentes em relação a outras sequências. Os motivos GGX, GA, A<sub>n</sub> e GPGXX estão representados respectivamente em verde, amarelo, vermelho e azul. Espécies de aranhas: *Nep.c.*, *Nephila clavipes*; *Nep.m.*, *Nephila madagascariensis*; *Nep.s.*, *Nephila senegalensis*; *Lat.g.*, *Lactrodectus geometricus*; *Arg.t.*, *Argiope trifasciata*; *Arg.a.*, *Argiope aurantia*; *Gas.m.*, *Gasteracantha mammosa*; *Ara.b.*, *Araneus bicentenarius*; *Ara.d.*, *Araneus diadematus*; *Tet.k.*, *Tetragnatha kanaiensis*; *Tet.v.*, *Tetragnatha versicolor*. Os símbolos indicam: \*, sequência previamente publicada, †, clone de PCR/genômico, §m, cDNA de glândulas ampoladas maiores e §f cDNA de glândulas flageliformes. Adaptado de Gatesy *et al.*, 2001, Lewis, 2006.

As regiões não repetitivas presentes nas extremidades N- e C-terminais das proteínas constituem normalmente cadeias formadas por 100 ou mais resíduos de aminoácidos (Hinman e Lewis, 1992; Colgin e Lewis, 1998; Hayashi *et al.*, 1999;

Oroudjev *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2004). A maior parte das unidades repetitivas descritas é apontada como responsável pelas propriedades estruturais específicas apresentadas pela sedas, entretanto não se sabe ainda a função dos espaçadores na constituição destas fibras (Hayashi e Lewis, 1998; Bini *et al.*, 2004; Scheibel, 2004). Os domínios N-terminais, que constituem uma característica comum a todas as fibras de aranha descritas na literatura, parecem estar envolvidos no mecanismo de secreção celular (Motriuk-Smith *et al.*, 2005). Os domínios C-terminais, por sua vez, estariam envolvidos na montagem da seda (Sponner *et al.*, 2004; Sponner *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007). Sugere-se então que estas regiões, apesar de variarem um pouco entre tipos de seda distintos, sejam responsáveis por propriedades e funções similares para todos eles (Challis *et al.*, 2006).

A linha de segurança, produzida por algumas espécies de aranhas, é constituída basicamente por duas espidroínas conhecidas como MaSp1 e MaSp2, que possuem massas moleculares que podem chegar a algumas centenas de kDa (estima-se que variem entre 200 e 350 kDa) (Winkler e Kaplan, 2000, Hayashi *et al.*, 1999). A MaSp1 é formada principalmente por regiões ricas em resíduos de alanina e por unidades de GGX. Tais motivos estão associados, respectivamente, à formação de folhas  $\beta$  cristalinas, responsáveis pela alta força tensora (Hayashi *et al.*, 1999; Hinman e Lewis, 1992), e a hélices  $3_{10}$  ricas em resíduos de glicina envolvidas na formação de uma matriz constituída por agregados amorfos, que confere propriedades elásticas (Bram *et al.*, 1997; Van Beek *et al.*, 2002). A MaSp 2, por sua vez, conjuga o motivo rico em resíduos de alanina ao motivo GPGXX, repetido no máximo 9 vezes em cada unidade (Hayashi e Lewis, 1998). Tal motivo está relacionado à formação de voltas- $\beta$ , possivelmente associadas à elasticidade (Lewis *et al.*, 1996; Vandijk *et al.*, 1997), estando também envolvido na constituição de folhas- $\beta$  cristalinas formadas nas regiões poli-alanina (Hayashi *et al.*, 1999; Hinman *et al.*, 2000). Curiosamente, as fibras flageliformes - conhecidas por sua notável elasticidade - não apresentam o motivo rico em resíduos de alanina, mas conjugam motivos GGX a motivos GPGXX, presentes pelo menos 43 vezes em cada unidade repetitiva (Scheibel, 2004), o que pode explicar suas propriedades elásticas bastante superiores às exibidas por todos os outros tipos de fibras de aranha, bem como sua menor dureza e rigidez. A estrutura correspondente a alguns dos motivos descritos está representada na fig.3.



**Fig. 3** Representação esquemática da seda da linha de segurança. A fibra é composta por pequenas subunidades ricas em folhas- $\beta$  (detalhes) espalhadas em uma estrutura amorfa. As duas partes estão conectadas covalentemente, o que assegura a existência de propriedades como força e ductilidade. Os diâmetros das fibras são variáveis de acordo com uma série de fatores, como espécie, idade e estado de saúde da aranha. Adaptado de Romer e Sheibel, 2008.

A conservação dos motivos consenso - e das terminações, em menor grau - e a quantidade pouco comum de resíduos de aminoácidos não-polares e polares, associada ao baixo conteúdo de resíduos de aminoácidos ácidos e básicos carregados, o que diferencia as espidroínas de várias outras proteínas, levam à conclusão de que as estruturas primárias das proteínas são fundamentais para as propriedades exibidas pelas fibras, podendo também influenciar intimamente a formação de estruturas secundárias e o processo de montagem dessas proteínas em fibras. A quantidade extremamente baixa de resíduos carregados e a abundância de resíduos de glutamina diferenciam ainda mais as proteínas da seda de outras proteínas extracelulares e estruturais, como o colágeno (Heim *et al.*, 2009).

No caso da linha de segurança, a estrutura secundária das espidroínas assemelha-se à estrutura de proteínas desdobradas, consistindo principalmente de

*random-coil* e hélices ricas em resíduos de prolina (Lefèvre *et al.*, 2007). Sugere-se que as hélices ricas em resíduos de prolina sejam possivelmente responsáveis pela manutenção das proteínas em estado solúvel (Hijirida *et al.*, 1996). Estas estruturas podem se transformar rapidamente em folhas- $\beta$ , mecanismo fundamental para o processo de fiação e para a constituição final da fibra, o que foi sugerido de acordo com as estruturas secundárias verificadas por meio de Espectroscopia Raman Confocal, Dicroísmo Circular Vibracional e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. A natureza estendida das hélices poliprolina dificulta ligações de hidrogênio intracadeia, sendo a estrutura estabilizada pelas ligações formadas com as moléculas de água, o que estaria relacionado à solubilidade inicial das proteínas da seda. Sugere-se ainda que os ângulos diedrais dessas hélices estejam bem próximos aos verificados para fitas- $\beta$ , o que facilitaria sua conversão em folhas- $\beta$  durante o processo de polimerização das fibras (Lefèvre *et al.*, 2007).

Análises por dicroísmo circular de proteínas sintéticas da seda de aranha reforçam a importância da sequência de aminoácidos na estruturação final da fibra (Teulé, *et al.*, 2007). As diferenças na sequência de duas proteínas (A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>) consistiram unicamente em dois resíduos dos seus motivos básicos de repetição (dois resíduos de alanina para a primeira e um resíduo de serina e outro de tirosina para a segunda). Os módulos - baseados em sequências nativas encontradas para a seda flageliforme - implicaram às proteínas sintéticas comportamentos consideravelmente distintos diante dos experimentos de dicroísmo. Sob a temperatura de 0°, as referidas análises apontaram um maior desordenamento das estruturas secundárias da proteína A1S8<sub>20</sub>, que apresentou uma proporção significativamente maior de *random-coils* em relação à proteína Y1S8<sub>20</sub>. As diferenças se tornaram ainda mais substanciais com o aumento da temperatura, que promoveu a formação irreversível de folhas e voltas  $\beta$  por meio do estabelecimento de ligações de hidrogênio estáveis nas fibras Y1S8<sub>20</sub>. A formação destas estruturas também foi observada para as fibras A1S8<sub>20</sub>, mas em menor grau, e em estado reversível. Os resultados obtidos indicam que os resíduos de tirosina e serina que constituem a proteína Y1S8<sub>20</sub> podem ser responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio intra-moleculares que estabilizam as voltas- $\beta$  da proteína, o que permitiria o alcance de um dobramento correto e possibilitaria a auto-organização dessas proteínas (Teulé *et al.*, 2007).

### 2.3.2 A polimerização das fibras

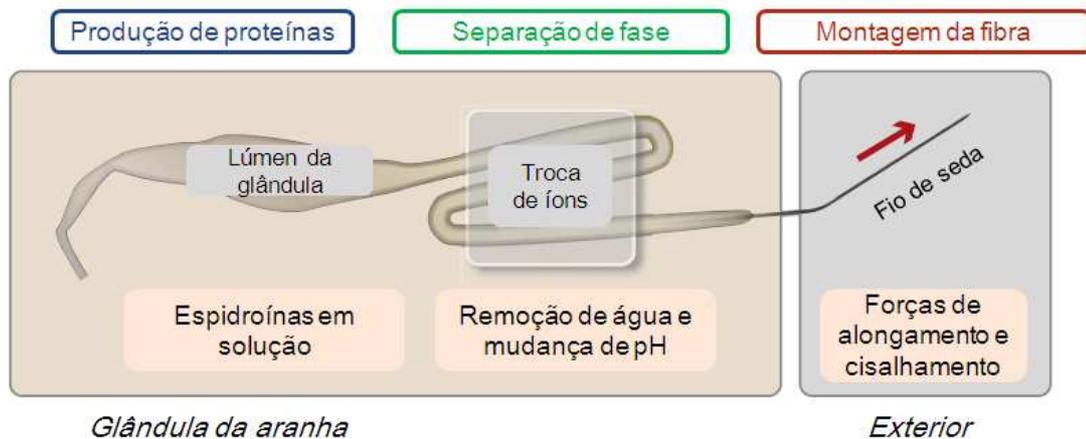
Apesar da sequência de resíduos de aminoácidos ser determinante para as propriedades das sedas, uma série de outros fatores são notadamente responsáveis por várias de suas características finais, como mencionado anteriormente. Os processos de polimerização das fibras, que parecem ser distintos para proteínas da seda diferentes (Heim *et al.*, 2010), envolvem uma série de modificações a partir da tradução da informação genética, a qual ocorre em células localizadas na parte superior das glândulas produtoras de seda das aranhas (Vollrath e Knight, 1999; Heim *et al.*, 2009).

De uma forma geral, as espidroínas - acumuladas e armazenadas nas glândulas produtoras de seda - sofrem mudanças em seu ambiente bioquímico e são submetidas a um estresse de alongamento, como representado na fig. 4. Fatores como a temperatura e a forma/diâmetro do ducto de fiação também são considerados fundamentais para as características apresentadas pelas fibras de aranha (Dicko *et al.*, 2004).

A montagem da fibra se inicia com a passagem das proteínas através do ducto de fiação, acompanhada pela extração de água, sódio e cloreto (Tillinghast *et al.*, 1984; Vollrath *et al.*, 1998). A secreção simultânea de íons de potássio e hidrogênio leva a uma redução do pH do lúmen da glândula, o que promove mudanças nas propriedades estruturais das proteínas. Este processo torna possível o alinhamento e empacotamento das moléculas em forma de fibras, promovidos por sua passagem pela parte distal do ducto (Scheibel, 2004).

Dois modelos são propostos para a transição entre a proteína solúvel e a fibra em estado sólido. No primeiro, as forças envolvidas no mecanismo de fiação promovem a transição entre o estado líquido e o sólido, resultando em uma espécie de fibra preliminar, parcialmente cristalina, em que as cadeias do polímero nas regiões cristalinas tornam-se paralelamente orientadas em relação ao eixo da fibra (Atkins, 2003; Heim *et al.*, 2009). O segundo modelo sugere a organização das proteínas solúveis em micelas devido as suas propriedades anfifílicas, dentro do ducto de fiação. As regiões hidrofóbicas das proteínas ficariam internalizadas,

enquanto os resíduos hidrofílicos se tornariam expostos, interagindo com o solvente presente no lúmen. A grande quantidade de micelas formaria glóbulos com diâmetros em escala micrométrica e as forças que surgem durante a passagem pelo ducto forçariam estes glóbulos a adotarem uma forma alongada, finalmente levando à formação da fibra (Romer e Scheibel, 2008).



**Fig. 4** Visão esquemática do processo de polimerização das fibras de aranha de acordo com as transformações físico-químicas a que são submetidas. Adaptado de Hardy *et al.*, 2008.

No caso da linha de segurança, o aumento da hidrofobicidade do ambiente associado ao alinhamento protéico induz a formação da fibra sólida e insolúvel por meio da conversão da estrutura de  $\alpha$ -hélice dos segmentos de polialanina hidrofóbicos a uma estrutura  $\beta$ -pregueada. O contato com o ar e as forças exercidas pelos músculos que constituem os ductos de fiação das aranhas são responsáveis pela completude do processo de transição (Scheibel, 2004).

A polimerização de fibras em laboratório - pela dificuldade de reprodução das condições descritas para a polimerização *in vivo* - requer a separação entre o processo de alinhamento das proteínas e o de desidratação para a formação da fibra. O método conhecido como '*wet spinning*' consiste em uma técnica de polimerização de fibras de aranha em laboratório (Scheibel, 2004; Teulé *et al.*, 2007) e é amplamente descrito na literatura. As proteínas - que devem ser produzidas em um sistema heterólogo que permita o seu acúmulo, como os já descritos em uma

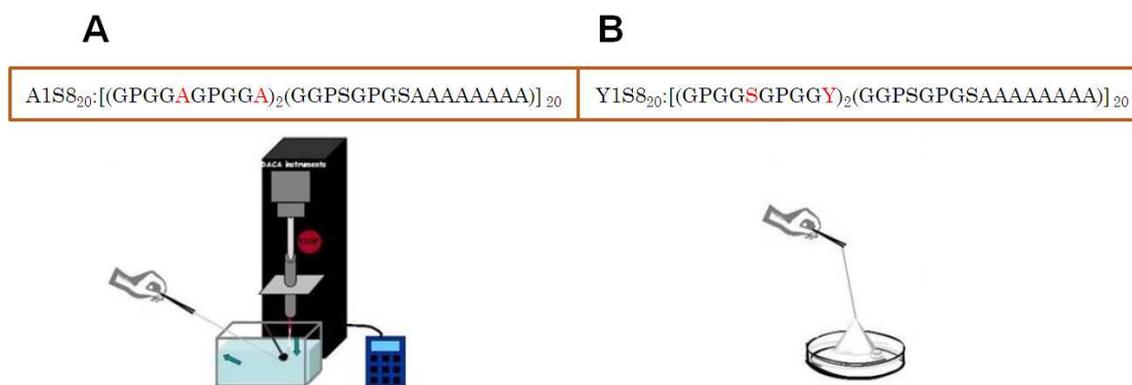
seção anterior deste estudo - devem passar pelo processo de purificação seguido de liofilização. A solubilização em um solvente como o HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) permite que as proteínas solúveis sejam passadas através de uma agulha com diâmetro pequeno - o que induz seu alinhamento - e imediatamente expostas a um banho de polimerização, responsável pela desidratação da fibra (Teulé *et al.*, 2007; Teulé *et al.*, 2009).

Em 2007, Teulé e colaboradores demonstraram a formação de filmes de fibras de aranha na superfície das soluções contendo as proteínas purificadas, e fibras individuais foram obtidas puxando-se uma das pontas dos filmes. O mesmo trabalho reporta ainda que as propriedades mecânicas exibidas pelas fibras sintéticas variam de acordo com o processo de formação da fibra empregado. As fibras foram tratadas com água após a polimerização e evidências indicam que este tipo de tratamento pode melhorar significativamente as características mecânicas apresentadas pelas fibras sintéticas (Scheibel, 2004; Teulé *et al.*, 2007).

Como a morfologia final e as propriedades mecânicas de sedas nativas de aranha resultam possivelmente de um rearranjo de suas estruturas secundárias, que mudam do estado de *random coil* para uma estrutura organizada em folhas e voltas  $\beta$  (Dicko *et al.*, 2005), torna-se importante analisar se as fibras sintéticas são capazes de adotar tal organização após sua polimerização. Uma vez que as fibras sintéticas apresentem ainda comportamento mecânico inferior quando comparadas às fibras nativas, imagina-se que sua performance debilitada possa resultar da falta de organização, mais especificamente, da inabilidade das proteínas sintéticas em converterem perfeitamente o estado de *random coil* nas estruturas secundárias e super-secundárias apropriadas.

Sugere-se que as estruturas das proteínas sintéticas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> - já citadas num momento anterior - determinem diferenças significativas nos processos que envolvem sua polimerização. As diferenças entre os módulos básicos que constituem tais proteínas e o método de formação das fibras estão dispostos na fig. 5. As ligações estáveis formadas espontaneamente para as proteínas Y1S8<sub>20</sub> possivelmente aumentam a organização da fibra, o que permite que os segmentos de polialanina interajam entre si e promovam a formação de folhas- $\beta$  por meio de nucleação, iniciando a formação da estrutura supramolecular. Fibras destas

proteínas têm a habilidade de formar-se espontaneamente, enquanto as fibras A1S8<sub>20</sub> necessitaram da aplicação de uma força de cisalhamento para o alinhamento das proteínas, o que está possivelmente relacionado à estrutura secundária mais desordenada apresentada por elas (Teulé *et al.*, 2007).



**Fig. 5** Diferenças entre os módulos básicos das proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> e os respectivos mecanismos de formação das fibras. A) A1S8<sub>20</sub>, ‘Wet spinning’ (extrusão em banho de polimerização). B) Y1S8<sub>20</sub>, formação espontânea. Adaptado de Teulé *et al.*, 2007.

Uma das principais razões apontadas para o desempenho mecânico inferior das fibras sintéticas reside na dificuldade em se produzir proteínas sintéticas com tamanhos comparáveis aos das nativas, que variam de 200 a 350 kDa (Hayashi *et al.*, 1999). Estima-se, portanto, que o tamanho da proteína recombinante represente um fator chave no controle das propriedades mecânicas das fibras sintéticas. Os sistemas heterólogos até então descritos (incluindo as linhagens comuns de *E. coli*) ofereciam limitações à produção de proteínas da seda maiores que 60 kDa, tendo sido produzida apenas uma proteína com 140 kDa, mas com propriedades mecânicas inferiores às apresentadas por outras proteínas da seda sintéticas (Lazaris *et al.*, 2002). Tal observação justifica a limitação no número de repetições dos módulos básicos dessas proteínas, observada na maioria dos trabalhos até hoje descritos, e que está intimamente relacionada às restrições impostas pelos sistemas heterólogos utilizados para a expressão das proteínas. Dentre as dificuldades encontradas residem a terminação prematura da tradução, a redução da eficiência de produção com o aumento do tamanho da proteína, a instabilidade das sequências repetitivas, podendo resultar em inserções e deleções, dentre outras.

Xiao-Xia Xia e colaboradores, 2010, no entanto, conseguiram expressar uma proteína de 284,9 kDa por meio da modificação da rota metabólica de *E. coli*. e descrevem um ganho considerável em propriedades mecânicas com relação a todas as proteínas sintéticas já expressas. Aponta-se como uma das razões para essa melhora em desempenho o fato de que proteínas maiores possuem mais repetições dos motivos básicos, permitindo um maior número de interações inter e intracadeia, enquanto, para proteínas pequenas, existe uma maior chance de ocorrerem defeitos de enovelamento.

Pode-se observar, desta forma, o progresso das pesquisas na área de sedas visando à sua aplicação como biomateriais. A complexidade dos processos descritos, os detalhes que envolvem o enovelamento das proteínas sintéticas e os obstáculos encontrados durante as tentativas em mimetizar sedas de aranha, entretanto, levam à necessidade de uma análise detalhada destas fibras de forma a esclarecer os mecanismos responsáveis por suas propriedades mecânicas notáveis, de alto potencial biotecnológico. É imprescindível, portanto, a busca por tecnologias que possibilitem uma caracterização aprofundada, que sejam capazes de preencher os vários espaços ainda existentes no conhecimento acerca destes polímeros.

A abordagem de metodologias de avaliação que conjuguem várias técnicas constitui um avanço na ciência dos biomateriais, e um passo a frente na solução das várias dificuldades intrínsecas ao estudo de fibras.

## **2.4 Caracterização de sedas utilizando microscopia**

### **2.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura e Espalhamento de raios-x**

Várias técnicas têm sido utilizadas para investigar a natureza de diversos tipos de sedas, buscando melhor entender suas estruturas e comportamento mecânico. A microscopia de luz já foi utilizada para examinar o efeito da uréia sobre a linha de segurança de *N. clavipes* e os resultados indicaram a presença de um cerne com estrutura microfibrilar (Vollrath *et al.*, 1996). Análises por meio de

microscopia eletrônica de transmissão (MET) apontaram a possível presença de uma camada externa à fibra da aranha *Nephila madagascariensis*, além de cavidades alongadas posicionadas no sentido da fibra (Frische *et al.*, 1998) e a mesma técnica apontou a presença de pequenos vãos alongados também para fibras de *B. mori* (Robson, 1999). Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises de espalhamento de raios-x a amplo ângulo também demonstraram a estrutura nanofibrilar da seda de *B. mori* (Putthanarat *et al.*, 2000).

Imagens obtidas por MEV das fibras nas áreas de ruptura geradas após testes de tensão também apontaram a estrutura fibrilar da linha de segurança de aranha e da fibra de *B. mori* (Poza *et al.*, 2002). Em 2009, Huang *et al.* demonstraram a constituição nanofibrilar segmentada da seda flageliforme da espécie de aranha *Uloborus walckenaerius*. Para seda sintética de larva de abelha, a microscopia de luz polarizada indicou alto alinhamento protéico, e técnicas de MEV e espalhamento de raios-x de amplo ângulo também foram utilizadas para caracterização destas fibras (Weisman *et al.*, 2010).

Uma série de trabalhos objetivaram ainda descrever as propriedades mecânicas de fibras de aranha, utilizando-se principalmente de testes tensores (Du *et al.*, 2006; Elices *et al.*, 2009) e espectroscopia Raman (Sirichaisit *et al.*, 2003). Os resultados obtidos em tais caracterizações reforçam o fato de que as sedas de aranha apresentam variabilidade interespecífica, intra-específica e intra-individual bastante representativas (Madsen *et al.*, 1999), como representado na tabela 2, que compara as propriedades mecânicas das fibras produzidas por algumas espécies de aranhas.

**Tabela 2** Propriedades mecânicas exibidas por fibras de seis espécies de aranhas. Dados normalizados para os comprimentos originais e as áreas transversais das amostras para permitir a comparação com dados de outros trabalhos. ORB, fibras constituintes da moldura e dos raios de teias orbitais. FF, fibras obtidas por meio de fiação forçada. GF, fibras fiadas por meio da gravidade. SNC, fibras de suporte de teias não-orbitais. Os valores representados por – não foram determinados nos trabalhos citados. Módulo de Young: módulo de elasticidade longitudinal. Extensibilidade: percentual de estiramento da fibra antes da ruptura. Força máxima: associada à tensão máxima medida antes da ruptura. Resistência: associação entre elasticidade, extensibilidade e força. Adaptado de Blackledge *et al.*, 2005.

<b>Espécie / teia</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>	<b>Extensibilidade (%)</b>	<b>Força máxima (MPa)</b>	<b>Resistência (MJ m<sup>-2</sup>)</b>	<b>Referências</b>
<i>Larinioides sclopetarius</i> ORB (N=15)	8.6±– a	0.24±–	880±–a	105.6±–	Denny (1976)
<i>A. diadematus</i> ORB (N=6)	1.2±0.9 a	0.40±0.13	1154±76a	194±–	Köhler e Vollrath (1995)
<i>Latrodectus hesperus</i> SNC (N=30)	6±3	0.22±0.05	1100±500	136±83	Moore e Tran (1999)
<i>Nephila edulis</i> FF (N=48)	8.8±1.5	0.39±0.07	1290±160	217±45	Madsen e Vollrath (2000)
<i>Argiope trifasciata</i> ORB (N=28)	6.9±2.1	0.30±0.10	600±260	90±52	Pérez-Rigueiro <i>et al.</i> (2001)
<i>N. clavipes</i> ORB	11±5	0.17±0.05	870±350	–	Work (1976)
<i>L. hesperus</i> GF	11±1	0.34±0.08	1000±200	–	Lawrence <i>et al.</i> (2004)
<i>L. hesperus</i> FF (N=52)	10.4±3.3	0.33±0.06	996±274	194±58	Blackledge <i>et al.</i> (2005)
<i>L. hesperus</i> SNC (N=54)	10.7±2.8	0.42±0.12	1069±204	238±72	Blackledge <i>et al.</i> (2005)

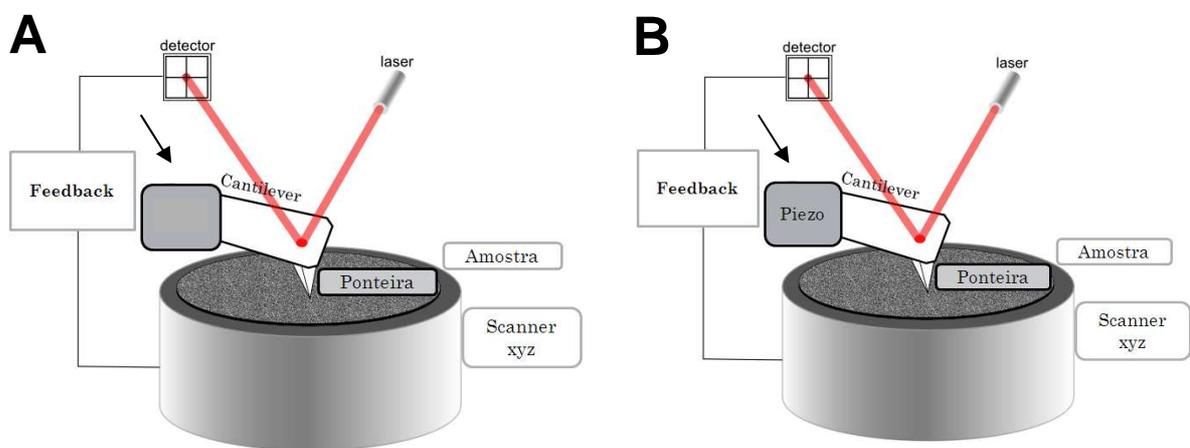
Alguns trabalhos relacionados às sedas produzidas pela espécie *B. mori* e por certas espécies de aranhas reportam ainda a utilização da microscopia de força atômica (MFA) como uma técnica bastante informativa e adequada à caracterização da superfície destas fibras (Hakimi *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2008; Pérez-rigueiro *et al.*, 2009). A aplicação desta técnica na investigação da estrutura das sedas tem se mostrado bastante promissora, revelando um número crescente de publicações. Uma caracterização mais completa, baseada na ampla exploração dos recursos oferecidos pela metodologia, entretanto, é ainda necessária. O que tem sido feito compreende principalmente a caracterização qualitativa das fibras, deixando de investigar algumas informações relevantes acerca das propriedades exibidas por elas.

#### **2.4.2** Microscopia de Força Atômica

O microscópio de força atômica, que combina características do microscópio de tunelamento e do perfilômetro com *stylus* tipo agulha, foi criado em 1986, propondo um método de investigar superfícies que pode chegar à escala atômica (Binnig *et al.*, 1986). A MFA permite uma caracterização topográfica bastante minuciosa, fornecendo importantes informações sobre a superfície do material analisado - dentre elas a rugosidade da amostra e a viscoelasticidade - podendo ainda oferecer um leque de informações que incluem a textura da amostra, dependendo do modo em que o microscópio é utilizado (Gaczynska e Osmulski, 2008). A espectroscopia de força, por meio de experimentos de nanoindentação - processo em que uma ponteira ultrafina é levada a penetrar a amostra em diferentes pontos - executados em MFA, permite ainda que propriedades como dureza, elasticidade e plasticidade sejam medidas (Bowen *et al.*, 2000), possibilitando uma caracterização mecânica qualitativa e quantitativa da superfície das amostras.

A base física por trás do microscópio de força atômica é o fator diferencial e determinante para sua utilidade na análise de diversos materiais, especialmente de complexos biológicos. O método de aquisição de imagens é pouquíssimo invasivo, não provoca danos mecânicos e permite análises de materiais tanto em ar quanto

em ambiente aquoso, permitindo ainda ajustes de temperatura e pH para contemplar condições fisiologicamente relevantes (Gaczynska e Osmulski, 2008). Além disso, não há necessidade de revestimento da superfície analisada e o MFA possibilita a varredura de uma mesma amostra sob condições distintas, o que pode fornecer importantes informações acerca do material analisado. De uma forma sintética, o princípio de funcionamento do microscópio de força atômica nos modos de aquisição de imagem consiste em uma ponteira pequena e bastante afiada montada em um cantilever (fig. 6). Esta ponteira é responsável pelo escaneamento das amostras, e as propriedades mecânicas do cantilever mudam de acordo com as características topográficas do objeto escaneado. A distância é corrigida constantemente graças ao *loop* de *feedback* existente entre a amostra, o sistema de posicionamento da ponteira e um ou mais elementos piezoelétricos (piezo) controlados por um computador (Fotiadis *et al.*, 2002). As forças que surgem entre a ponteira e a superfície durante o rastreamento da amostra provocam uma deflexão no cantilever, que é medida por um sistema óptico de alavanca (Bowen *et al.*, 2000).



**Fig. 6** A) Princípio básico de operação do microscópio de força atômica (modo contato). B) Modo contato intermitente (dinâmico). As setas indicam as diferenças entre os dois modos representados. Adaptado de Eaton, 2010.

O microscópio de força atômica possui alguns modos básicos de operação, escolhidos de acordo com a natureza da amostra, o ambiente e as medições pretendidas. Em um tipo de modo contato, a ponteira rastreia a superfície e é mantida em proximidade à amostra pela força do cantilever encurvado. A curvatura

medida é utilizada na geração da imagem topográfica. Este modo, conhecido como modo de altura constante, entretanto, só pode ser utilizado para amostras extremamente lisas, já que a ponteira pode esbarrar em picos ou perder resolução quando efetuar a varredura de depressões eventualmente presentes nas amostras (Bowen *et al.*, 2000). No modo de força constante, o *loop de feedback* opera de forma a manter uma deflexão constante no cantilever e, dependendo das condições de varredura, pode manter a ponteira um pouco mais distante da amostra, reduzindo o risco de danos à superfície e à ponteira. No modo de não contato, ideal para amostras macias, o cantilever vibra e os padrões vibracionais são monitorados quando a ponteira se aproxima e escaneia a superfície. Quando as forças da superfície mudam, a variação é refletida no padrão vibracional do cantilever, um *loop de feedback* opera de modo a manter a amplitude de vibração do cantilever constante (Sulchek *et al.*, 2000). Este modo, entretanto, perde um pouco em resolução quando comparado ao modo contato (Bowen *et al.*, 2000). Para a obtenção de informações acerca da textura do material analisado, o modo utilizado é o de força lateral, que mede a curvatura lateral do cantilever durante o rastreamento da superfície (Piner e Mirkin, 1997; Bowen *et al.*, 2000). Por fim, para escaneamento de superfícies macias, o modo mais adequado é o chamado contato intermitente, que é um híbrido entre os modos contato e não contato (Putman *et al.*, 1994). O contato intermitente reduz a incidência de forças laterais na amostra, minimizando a contaminação da amostra e os danos à superfície, mas mantendo a alta resolução (Bowen *et al.*, 2000). A interação entre ponteira e amostra altera a amplitude, a frequência de ressonância e o ângulo de fase do cantilever oscilante (Jagtap e Ambre, 2006).

O modo contato intermitente ou dinâmico permite obter três tipos de informação, sendo elas:

- 1) altura. A posição vertical da ponteira é monitorada de acordo com mudanças no comprimento do eixo z no elemento piezoelétrico xyz. A voltagem aplicada varia de acordo com essa distância e a mudança no eixo z resulta em um mapa topográfico da superfície. A altura é medida de forma eficiente, mas bordas e contornos não são distinguíveis com clareza;

2) fase. Esta forma de adquirir imagem monitora mudanças na compensação de fase, ou no ângulo da fase com relação ao equilíbrio da fase do cantilever oscilante. A fase do sinal iniciador é comparada ao sinal de resposta do cantilever, no fotodetector. À medida que áreas com elasticidades distintas são varridas, ocorre uma mudança dos ângulos de fase entre os dois sinais. Tais diferenças são então representadas nas imagens de fase, que traduzem o perfil viscoelástico das amostras, permitindo resolução desambigua das composições químicas distintas de uma amostra. Observam-se regiões claras e regiões escuras, que representam as diferenças de fase de forma semelhante a que as mudanças de altura são indicadas nas imagens de altura;

3) amplitude. A amplitude do cantilever é monitorada pelo fotodetector. Os valores do sinal do laser no eixo y do detector são gravados à medida que a ponteira rastreia a amostra e tais valores resultam em um mapa de amplitude da superfície. Estas imagens permitem uma boa definição das extremidades da amostra (Jagtap e Ambre, 2006).

#### **2.4.2.1 Caracterização por meio de microscopia de força atômica**

Há uma importância crescente acerca da avaliação de superfície em uma série de materiais. A MFA já foi utilizada para caracterização de rugosidade de cera de parafina (Zbik *et al.*, 2006), do aço inoxidável (Valois *et al.*, 2005) e do titânio, em aplicações odontológicas (Elias *et al.*, 2008), de madeira submetida a diversos tipos de tratamentos (Ayrilmis *et al.*, 2006), de nanocompósitos para preenchimento dentário após serem submetidos a diferentes processos de polimento (Janus *et al.*, 2010), dentre uma série de outras avaliações. A caracterização micromecânica de filmes finos de nitreto de carbono (Chowdhury *et al.*, 2004), de fibrilas de colágeno (Strasser *et al.*, 2007), de microfibrilas da glicoproteína fibrilina (Koenders *et al.*, 2009), de fibras de fibrinogênio (Carlisle *et al.*, 2009) e de vários outros materiais, biológicos ou não, também já foi reportada. Embora a técnica de MFA já tenha se estabelecido como ferramenta extremamente útil no estudo de amostras biológicas - por fornecer informações poderosas sobre a estrutura e as interações de superfície,

além de revelar propriedades mecânicas locais de superfícies e moléculas biológicas (Bowen *et al.*, 2000) - ainda há muito a ser feito com respeito à caracterização de sedas de aranha, em se tratando desta metodologia.

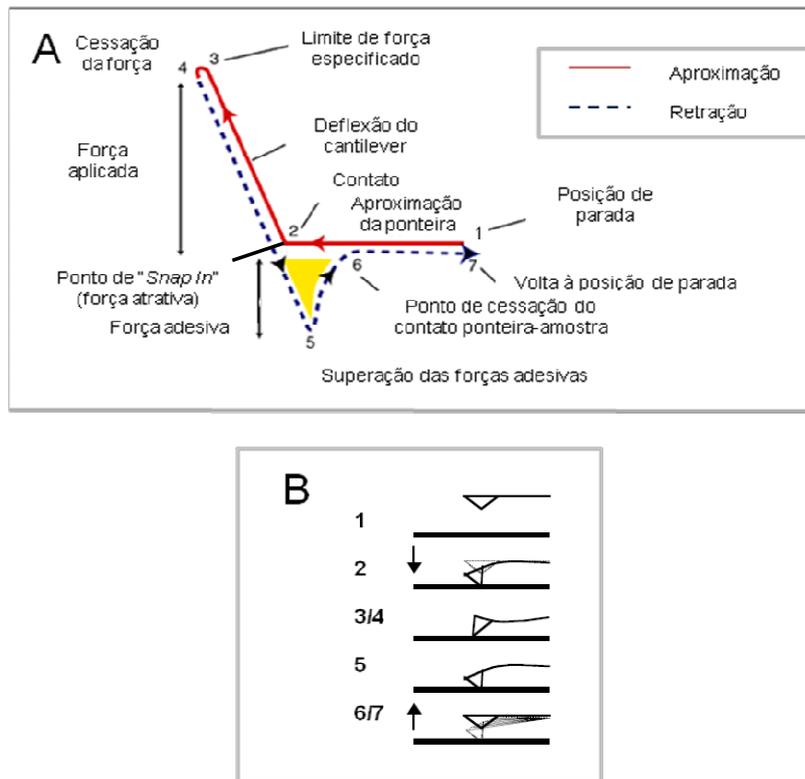
Alguns grupos já utilizaram a MFA para avaliar a superfície de fibras de aranha, dando ênfase à descrição topográfica destas fibras. Em 1994 foi proposto um modelo para a seda de *N. clavipes* após análise das fibras por MFA. Foi revelada então uma estrutura em camadas, contendo um cerne composto por duas regiões concêntricas e uma espécie de revestimento externo. Sugeriu-se que a diferença entre as regiões descritas pudesse estar ligada a composições distintas, ou seja, a macromoléculas constituintes diferentes (Li *et al.*, 1994a). Tal trabalho identificou ainda a presença de nanofibrilas (fibrilas longitudinais de tamanho nanométrico) nas fibras analisadas, como já descrito em análises utilizando outras metodologias. Indicações acerca da estrutura mencionada para a linha de segurança desta aranha já haviam surgido em um momento anterior, quando um estudo propôs comparações entre a estrutura da seda de *Nephila* e a do Kevlar, uma fibra sintética que exibe uma força tensora extremamente alta ( $4 \times 10^9 \text{ N m}^{-2}$ ) (Hinman *et al.*, 2000). Nesse trabalho, o mesmo grupo havia apontado a separação em camada interna e externa para os dois tipos de fibras, mas identificou uma organização distinta das nanofibrilas para cada um deles. A alta força apresentada pelo Kevlar estaria ligada ao alto grau de empacotamento das nanofibrilas que constituem o cerne da fibra e a uma camada de revestimento bastante encorpada. A linha de segurança, por sua vez, apresentaria alta força também devido ao empacotamento das nanofibrilas do cerne, mas as pregas identificadas nestas nanofibrilas permitiriam uma extensão considerável da fibra se submetida à tensão (Li *et al.*, 1994b).

Em 1999, Gould *et al.* demonstraram a presença de regiões ordenadas (fibrilas paralelas visíveis) e desordenadas para a fibra produzida pela glândula “*major ampullate*” de *Latrodectus hesperus*, sugerindo a existência de uma organização hierárquica da seda, além de terem identificado nanofibrilas com diâmetros bastante variados. O estudo menciona ainda o rearranjo das fibras numa estrutura mais compacta quando submetida à tensão, como já descrito anteriormente.

A constituição multicamadas com presença de nanofibrilas da linha de segurança de *N. clavipes* também foi descrita por Sponner *et al.*, 2007, que observaram nas fibras cinco regiões distintas e identificaram uma composição diferenciada para cada uma delas, atribuindo funções específicas a sua existência. Sugere-se que a camada mais externa, de constituição lipídica, confira certa proteção à teia, mas tenha como função principal o carregamento de feromônios para acasalamento e reconhecimento de espécies. A camada seguinte, glicoprotéica, protegeria a teia do ataque microbiano e atuaria no controle do balanço de água, tendo influência na força mecânica apresentada pelas fibras. Supõe-se ainda que a pele, terceira camada, esteja envolvida em proteção química e contra microrganismos, conferindo também plasticidade às fibras, além de servir como suporte mecânico ao cerne. A camada externa do cerne, de rigidez elevada, seria responsável pela força tensora exibida, enquanto a camada mais interna contribuiria para a força tensora adicionando certa elasticidade às fibras. A presença de nanofibrilas também foi identificada para a seda espiral produzida pela espécie *Uloborus walckenaerius* (Huang *et al.*, 2009).

Adicionalmente aos mapas topográficos descrevendo a superfície das amostras, o emprego da MFA em medições das propriedades mecânicas locais de amostras macias também é possível, aplicando-se forças de indentação bastante baixas (Tao *et al.*, 1992; Radmacher *et al.*, 1995; Radmacher *et al.*, 1996; Rotsch *et al.*, 1999; Schafer e Radmacher, 2005). O cantilever é aproximado e retraído verticalmente em relação à superfície da amostra e a ponteira penetra o material levantando informações acerca de suas propriedades, como esquematizado na figura 7. É um modo que não permite aquisição de imagens, mas conjuga o modo contato com uma ponteira em frequência inferior à frequência de ressonância. Regiões mais macias são mais facilmente deformáveis que as duras e curvas de força pela distância (força vs distância) são então geradas a partir da medição da deflexão do cantilever em função do movimento do elemento piezo na direção Z (Jagtap e Ambre, 2006). A aplicabilidade desta técnica para análises sobre o comportamento mecânico de fibras aponta a MFA como uma ferramenta capaz de fornecer informações que enriqueçam consideravelmente o conhecimento sobre a estrutura da seda de aranhas, permitindo relacioná-la às propriedades particulares exibidas pelas fibras. Utilizando-se o modelo de Hertz para indentações elásticas

(Sneddon, 1965), o módulo de Young pode ser calculado, além de possibilitar que forças extraídas das curvas de força geradas durante as indentações nas amostras sejam medidas.



**Fig. 7** Modelo de curva de força relativa à distância entre a ponteira e a superfície analisada durante experimentos de nanoindentação por meio de MFA. Adaptado de Lehenkari *et al.*, 2000, Marliere *et al.*, 2004.

Trabalhos anteriores já descreveram o uso de MFA para caracterizar as propriedades mecânicas apresentadas pela seda de aranha por meio do estiramento da fibra quando aderida à ponteira do microscópio (Becker *et al.*, 2003; Kesel *et al.*, 2004), mas há ainda muito pouco sobre experimentos de indentação em análise de sedas.

Becker *et al.*, 2003, utilizaram a espectroscopia de força para caracterizar o comportamento da espiral de captura de *Araneus* sp., formada por seda flageliforme. Em ciclos de estiramento e relaxamento das fibras, curvas de força com aspecto

denteado foram obtidas, indicando que ligações de hidrogênio foram quebradas e reformadas ao longo do experimento. O possível reenovelamento das proteínas sintéticas durante a fase de relaxamento permitiu concluir que as sedas analisadas possuem um comportamento elástico e auto-recuperável.

Zhou, 2006, descreve um modelo para a estrutura da seda de aranha baseado nos resultados obtidos no trabalho de Becker *et al.*, 2003, sugerindo então um modelo hierárquico de organização baseado na extensibilidade verificada, apontando que um comprimento extra deve ser armazenado na forma relaxada das fibras, e também baseado no aumento logarítmico da extensão com o crescimento da força aplicada, sugerindo que as frações dos comprimentos armazenados oferecem resistências distintas ao estiramento.

Estudos prévios baseados em espectroscopia de força por MFA revelaram o comportamento elástico em moléculas de proteínas modulares como a titina, uma proteína muscular (Rief *et al.*, 1997a; Oberhauser *et al.*, 1998), de polissacarídeos como a celulose, o dextran e a amilose (Rief *et al.*, 1997b; Marszalek *et al.*, 1998; Grandbois *et al.*, 1999), do DNA (Rief *et al.*, 1999), da seda de *B. mori* (Zhang *et al.*, 2000) e da linha de segurança de aranha (Oroudjev *et al.*, 2002). Este último trabalho, que fez uso da espectroscopia de força de única molécula para caracterizar nanofibras sintéticas, propôs a utilização da técnica para associar os eventos de ruptura de ligações covalentes medidos às estruturas secundárias esperadas para as proteínas constituintes da fibra (MaSp1 e MaSp2). O trabalho sugere ainda modelos para a organização das nanofibras de seda sintéticas, baseados na estrutura segmentada destas nanofibras, a qual foi identificada por meio de MFA.

Os diversos trabalhos em descrição de materiais biológicos por MFA, em quaisquer dos seus modos e possibilidades, mostram que a metodologia possibilita caracterização única e bastante condizente com as necessidades deste trabalho. Desta forma, a MFA foi escolhida como a técnica mais adequada à caracterização das fibras sintéticas de aranha, principalmente pela possibilidade de análise topográfica associada ao perfil viscoelástico das amostras, e combinada ainda à caracterização mecânica por medições de força. Existem, entretanto, algumas limitações de área de varredura durante as análises de MFA. Tais limitações podem ser superadas utilizando-se a MEV como ferramenta de investigação em uma escala

mais ampla de dimensões, o que constitui uma alternativa apropriada às restrições impostas pela MFA.

### **3 Hipóteses**

- Fibras sintéticas de aranhas derivadas de sequências de resíduos de aminoácidos distintas possuem características morfológicas e mecânicas diferentes?
- Fibras sintéticas submetidas a tratamentos com solventes polares e ao alongamento por meio de testes de tensão terão suas propriedades alteradas?

### **4 Justificativa**

A caracterização de materiais por meio de MFA complementada pela MEV tem crescido em importância ao longo dos últimos anos. Esta caracterização estrutural permite compreender a topografia dos materiais analisados em escalas micro e nanométrica, além de oferecer importantes informações acerca das propriedades mecânicas locais. A soma das duas técnicas (MFA e MEV) pode contribuir para a otimização da produção de diversos materiais, além de permitir um controle cada vez mais rígido sobre a qualidade dos materiais produzidos.

Alguns trabalhos reportando caracterização de fibras de aranhas nativas já foram desenvolvidos, mas a caracterização de fibras sintéticas por meio de MFA é pouquíssimo explorada. Além disso, as análises antes realizadas restringiram-se principalmente ao ponto de vista qualitativo, salvo alguns trabalhos que se valeram da espectroscopia de força para caracterização de propriedades elásticas. As medidas aqui propostas fornecerão importantes informações sobre a superfície das fibras analisadas, descrevendo os perfis topográficos e viscoelásticos, bem como o comportamento mecânico destas fibras, representado por parâmetros quantitativos como o Módulo de Young e as forças medidas durante os experimentos de indentação executados por meio de MFA. O melhor entendimento acerca das propriedades das fibras sintéticas e a posterior comparação com resultados

descritos para fibras nativas permitirão o melhoramento das características das fibras de aranha produzidas *in vitro*. O presente estudo propõe a caracterização de fibras geradas a partir de duas proteínas sintéticas de aranha, de forma a agregar conhecimento com relação à estrutura destas fibras e às propriedades mecânicas apresentadas por elas. A análise qualitativa possibilita uma comparação estrutural, à medida que o estudo quantitativo permite que parâmetros estruturais nunca antes analisados enriqueçam o conhecimento acerca das fibras sintéticas de aranhas. A partir deste tipo de estudo, será possível a produção de fibras cada vez mais semelhantes às nativas, com propriedades que permitam o uso destes biopolímeros na confecção de materiais com diversas aplicações. Além disso, as novas medidas em análise de superfície de fibras aqui propostas poderão futuramente influenciar outros trabalhos, aumentando a abrangência das técnicas descritas e, possivelmente, o rigor com relação a trabalhos de caracterização de fibras.

## **5 Objetivo geral**

Caracterizar fibras sintéticas de aranhas quanto às características topográficas, à rugosidade e às propriedades mecânicas por meio de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura.

## **6 Objetivos específicos**

- Caracterizar a topografia de fibras sintéticas de aranhas que sofreram ou não tratamentos químicos e/ou após sua formação.
- Obter imagens de MEV que forneçam informações relevantes com relação à ultra-estrutura da superfície das fibras analisadas.
- Desenvolver um estudo comparativo acerca das propriedades mecânicas exibidas pelas fibras e analisadas por meio da espectroscopia de força executada por MFA.

- Complementar as análises feitas por Teulé e colaboradores, 2007, introduzindo uma análise estrutural e mecânica das fibras sintéticas em escalas micro e nanométricas.

## 7 Material e Métodos

### 7.1 Fibras A1S8<sub>20</sub>

Fibras recombinantes foram projetadas e produzidas como descrito por (Teulé *et al.*, 2007). As bactérias foram geneticamente modificadas para produzir uma variante da proteína de seda de aranha composta de unidades de repetição de um motivo básico que combina uma porção elástica A1(GPGGAGPGGA)<sub>2</sub> e um motivo de força S8 (que codifica para um linker polialanina: (GGPSGPGSAAAAAAAA)). O primeiro motivo foi derivado da seda flageliforme e o segundo retirado da sequência que codifica para a proteína MaSp2, componente da linha de segurança, ambas da aranha *N. clavipes*. O objetivo da combinação é relacionar força tensora razoável à elasticidade, o que resultaria em fibras bastante resistentes. A construção foi feita de modo que uma proteína de 57,6 kDa formada por 20 dos motivos básicos foi gerada (A1S8<sub>20</sub>). A sequência final consistiu na seguinte MG(H)<sub>10</sub>SSGHIDDDDKHMLEDPP-[módulos de repetição da proteína A1S8]<sub>20</sub>-EISGSGC, contendo uma cauda de histidinas para posterior purificação. As fibras foram '*wet spun*', extruídas em um banho de coagulação e recuperadas usando uma pinça, após a purificação das proteínas e liofilização, procedimento também executado por Teulé e colaboradores, 2007.

As fibras geradas a partir de A1S8<sub>20</sub> são solúveis em água logo após serem extruídas, o que levou à criação de passos de preparação intermediários (Teulé *et al.*, 2007). Apesar de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; TCI America, Portland OR) - conhecido por promover a formação de ligações de hidrogênio moleculares (Haq e Khan, 2005) - ter sido utilizado para solubilizar as proteínas A1S8<sub>20</sub> antes da extrusão das fibras e de ter sido observada a iniciação de um processo de automontagem das proteínas sintéticas após a adição de 15% de água ao

dopamento, Teulé e colaboradores, 2007, apontaram tais fibras como inferiores em desempenho quando comparadas às nativas. Assumindo que um ganho em desempenho poderia ser obtido tratando-se as fibras sintéticas com alcoóis, uma vez que existem indicativos de que eles possam ser responsáveis pela indução da formação de folhas- $\beta$  nas fibroínas de bichos da seda (Chen *et al.*, 2001) e nas proteínas da seda de aranha (Dicko *et al.*, 2005), tratamentos com metanol e isopropanol foram escolhidos como procedimentos intermediários para superar a solubilidade inicial. O tratamento com água ao qual dois grupos analisados foram submetidos foi adotado com base nas evidências de que esse tratamento seja capaz de promover uma melhora no desempenho mecânico de fibras sintéticas (Sheibel, 2004). As fibras tratadas foram estiradas por meio de testes de tensão (Teulé, *et al.*, 2007) para verificar o desempenho mecânico geral das fibras.

O processamento das fibras consistiu em: (1) tratamento com metanol e alongamento de 1,5 x (grupo MA), (2) Tratamento com metanol, tratamento com água e alongamento de 1,5 x (MB), (3) tratamento com isopropanol e alongamento de 1,5 x (IA), (4) tratamento com isopropanol, alongamento de 1,5 x, tratamento com água e novo alongamento de 1,5 x (IB).

Um total de oito fibras foram processadas e separadas em quatro grupos distintos, de acordo com o tipo de tratamento a que foram submetidas. Um grupo controle de três fibras não processadas também foi analisado. Todas as fibras foram caracterizadas por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), provendo informações relevantes ao entendimento da estrutura da superfície dessas fibras de maneira complementar aos resultados obtidos por Teulé *et al.*, 2007.

## **7.2 Fibras Y1S8<sub>20</sub>**

As fibras Y1S8<sub>20</sub> foram desenvolvidas de forma semelhante às A1S8<sub>20</sub>, de forma a conjugar uma porção elástica derivada da seda flageliforme e uma porção mais forte, atribuída à sequência da MaSp2. Combinou-se, portanto, uma variação do módulo elástico, que correspondeu neste caso à sequência (GPGGSGPGGY)<sub>2</sub>,

ao motivo de força que codifica para o linker polialanina. A sequência final consistiu na seguinte MG(H)<sub>10</sub>SSGHIDDDDKHMLEDPP-[módulos de repetição da proteína Y1S8]<sub>20</sub>-EISGSGC, que apresentou variações com relação à proteína A1S8<sub>20</sub> apenas no módulo repetitivo e no peso molecular (61,9 kDa para a proteína Y1S8<sub>20</sub>). As fibras sintéticas foram formadas de maneira diferente à já descrita para as fibras A1S8<sub>20</sub>, que não foram capazes de se formar espontaneamente. As fibras Y1S8<sub>20</sub> foram geradas a partir da formação espontânea de um filme na superfície de placas de Petri contendo a proteína purificada em solução. Uma pinça foi utilizada para puxar a ponta do filme, que foi então separado em fibras únicas (Teulé *et al.*, 2007).

O processamento das fibras Y1S8<sub>20</sub> consistiu em tratamento com água e estiramento de 2x o tamanho da fibra. Ao contrário das fibras A1S8<sub>20</sub>, estas fibras não se apresentaram solúveis após sua formação, o que dispensou os tratamentos com metanol e isopropanol. Três fibras foram separadas e mantidas como controle, e um total de cinco fibras foram submetidas ao processo descrito. O grupo controle foi apresentado como YC, enquanto o tratado foi denominado YA.

Todas as oito fibras foram analisadas por MFA e MEV.

### **7.3 Microscopia de força atômica - Aquisição de imagens**

As fibras foram inicialmente colocadas em papéis após a extrusão. Uma pinça foi utilizada para reposicioná-las para a análise em MFA. Os suportes de metal foram cobertos com fita adesiva dupla-face e as fibras foram colocadas logo em seguida. A aquisição das imagens foi realizada à temperatura ambiente, em um equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão). As imagens foram obtidas no modo dinâmico, utilizando um cantilever com dimensão x-y máxima de 125 µm (constante de mola de ~ 42 N / m, frequência de ressonância de ~ 330 kHz) com ponta cônica (raio de curvatura inferior a 10 nm). As imagens foram obtidas em tamanho de 512 x 512 pixels e em uma velocidade de varredura de 0,5 Hz. O tratamento pós-aquisição consistiu em um nivelamento automático global e na remoção das linhas ruidosas. As imagens foram exibidas como perspectiva de altura e bidimensional. A área de digitalização adotada como padrão foi de 25 µm<sup>2</sup> e 10 áreas diferentes foram

analisadas para cada fibra, correspondendo a uma área total varrida de 250  $\mu\text{m}^2$  para cada uma das fibras.

A rugosidade média aritmética (Ra), a rugosidade quadrática média (Rq), a rugosidade média de 10 pontos (Rzjis) e a altura máxima (Rz), foram calculados como típicos parâmetros de altura. Parâmetros espaço-descritivos também foram calculados, incluindo altura média (Rp) e profundidade média (Rv).  $R_p + R_v =$  relação Rz. As avaliações de rugosidade geram curvas de rugosidade que permitem analisar os referidos parâmetros. Esta série de parâmetros foi selecionada de forma a incluir aqueles capazes de descrever e explicar as propriedades viscoelásticas das fibras sintéticas após serem extruídas e quando submetidas aos tratamentos descritos.

### 1) Ra

O valor de Ra é representado pela seguinte equação, à medida que a curva de rugosidade é expressa em  $y = f(x)$ .

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx \quad (1).$$

Onde:

L= comprimento referência.

### 2) Rz

Os valores de Rz são obtidos medindo-se a distância da linha dos picos e da linha dos vales na direção longitudinal da curva de rugosidade.

### 3) Rzjis

É feita a média dos valores absolutos de altitude ( $Y_p$ ) do primeiro ao quinto picos mais altos. A média dos cinco valores de vales mais baixos ( $Y_v$ ) também é feita e o valor de Rzjis corresponde à soma destes valores médios.

$$Rz = \frac{|Fp1+Yp2+Yp3+Yp4+Yp5|+|Fu1+Fu2+Fu3+Fu4+Fu5|}{5} \quad (2).$$

4) Rq

O valor de Rq corresponde ao desvio padrão obtido por meio da seguinte fórmula quando o eixo x está posicionado na direção da linha média e o eixo y está posicionado na direção da magnificação vertical.

$$Rms = \sqrt{\frac{\sum(Yi-Y)^2}{N}} \quad (3).$$

5) Rp

Corresponde à media da seção da curva de rugosidade e o valor do pico mais alto.

6) Rv

É expressa pela distância média da seção da curva e o vale mais profundo (Manual de instruções do SPM-9600, Shimadzu).

#### 7.4 Análises de espectroscopia de força

Medidas de espectroscopia de força também foram realizadas à temperatura ambiente, com o mesmo MFA utilizado para a aquisição de imagens. Um cantilever de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, com uma ponta piramidal e uma constante de mola de 0,57 nN/nm foi utilizado. Os experimentos foram realizados em modo contato, com uma '*loading rate*' de 1 nm/s. O intervalo de ajuste de força foi definido como automático. Quinze indentações em diferentes áreas foram realizadas para cada uma das fibras, em um total de 165 e 120 medições para fibras A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>, respectivamente. O software SPIP (Nanoscience Instruments, EUA) foi utilizado para análises dos dados. O Módulo de Young e as forças obtidas a partir das curvas de força-distância foram calculados por meio deste software, de acordo com o modelo analítico de Sneddon, que se baseia na indentação de cone (Sneddon, 1965).

Uma curva de força-distância gerada por MFA é uma representação das forças de interação entre a ponteira e a amostra vs a distância ponteira-amostra.

Para obter tal representação, a ponteira (ou a amostra, dependendo do caso) é movida na direção vertical (eixo z) e a deflexão do cantilever  $\delta_c$  é medida.  $k_c$  é uma constante positiva conhecida como constante elástica da mola. A força ponteira-amostra  $F$  é dada pela Lei de Hooke, que está relacionada à elasticidade de corpos, e serve para calcular a deformação causada pela força exercida sobre um corpo.

$$F = -\delta_c \times k_c \quad (4).$$

A distância controlada durante a medição não é a distância  $D$  entre a ponteira e a amostra de fato, mas a distância  $Z$  entre a superfície da amostra e a posição de parada do cantilever. Estas duas distâncias diferem devido à deflexão do cantilever  $\delta_c$  e à deformação da amostra  $\delta_s$ . Estes quatro parâmetros estão relacionados da seguinte forma:

$$D = Z - (\delta_c + \delta_s) \quad (5).$$

Como não é possível saber com antecipação as deflexões do cantilever e as deformações na amostra, a única distância que pode ser controlada é a  $Z$ , relativa ao deslocamento do piezo. Desta forma, a melhor denominação para a curva obtida por MFA é “curva de força-deslocamento” ou “curva de força-separação”.

Existem uma série de modelos que permitem calcular valores para os parâmetros analisados em MFA a partir das curvas de força-separação obtidas por nanoindentação. Dentre eles, um dos mais empregados nestas análises é representado pela Teoria de Hertz, desenvolvida em 1881, e adaptada por Sneddon, 1965.

A Teoria de Hertz considera a ponteira como uma esfera elástica, enquanto a amostra é tida como uma superfície plana e rígida. Para uma esfera de raio  $R$  pressionada em direção a uma superfície plana com uma força  $F$ , a força de adesão  $F_{ad}$ , o raio de contato  $a$ , o raio de contato na carga zero  $a_0$ , a deformação  $\delta$  da ponteira esférica e a pressão  $P$  são dados por:

$$F_{ad} = 0 \quad (6).$$

$$a = \sqrt[3]{\frac{RF}{k}}, \quad (7).$$

$$a_0 = 0 \quad (8).$$

$$\delta = \frac{a^2}{R} = \frac{F}{K\alpha} \quad (9)$$

e

$$P(x) = \frac{3K\alpha\sqrt{1-x^2}}{2\pi R} = \frac{3F\sqrt{1-x^2}}{2\pi\alpha^2} \quad (10),$$

onde  $x = \frac{y}{a}$ , em que  $y$  é a distância do centro do círculo de contato, e o módulo de Young  $E$  reduzido é dado por:

$$\frac{1}{K} = \frac{3}{4} \left( \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_i^2}{E_i} \right) \quad (11).$$

Nesta última equação,  $E$ ,  $E_i$ ,  $\nu$  e  $\nu_i$  representam os Módulos de Young e os coeficientes de Poisson da superfície plana, que corresponde à amostra no caso, e do indentador, que consiste na ponteira utilizada para as indentações.

O módulo de Young corresponde ao módulo de elasticidade do material, sendo ele proporcional à sua rigidez quando tracionado ou comprimido. Associa a tensão aplicada à deformação medida e está relacionado a diversas outras propriedades materiais.

No limite de cargas altas ou baixas forças de superfície, um experimento de MFA pode seguir a Teoria de Hertz. Entretanto, na maioria dos casos, a ponteira do microscópio de força atômica é mais dura que a amostra, o que implica que as deformações na superfície plana sejam consideradas e, em alguns casos, as deformações causadas tanto na amostra quanto na ponteira. Por assumir a ponteira como rígida o Modelo de Hertz não pode calcular as deformações da amostra.

Quando uma perfuração rígida em uma superfície elástica estiver sendo levada em consideração, a análise mais cabível é a análise de Sneddon (Sneddon, 1965). Neste modelo, a deformação elástica é dada por uma equação transcendental que pode ser computada numericamente. A força  $F$  exercida pela perfuração na superfície e a deformação de superfície  $\delta$  são representadas por:

$$F = \frac{3}{8} K \left[ (\alpha^2 + R^2) \ln \left( \frac{R+\alpha}{R-\alpha} \right) - 2\alpha R \right], \quad (12),$$

e

$$\delta = \frac{1}{2} a \ln \left( \frac{R+a}{R-a} \right) \quad (13).$$

A força e a deformação podem ser computadas por uma perfuração assimétrica genérica:

$$\delta = \int_0^1 \frac{f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx, \quad (14).$$

e

$$F = \frac{3}{2} K a \int_0^1 \frac{x^2 f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx, \quad (15),$$

em que  $f(x)$  é a função que descreve o perfil da perfuração. Soluções para geometrias comuns podem ser encontradas em Sneddon, 1965.

Desta forma, conjugando-se as deformações de Hertz e Sneddon, como as deformações da ponteira e da amostra, sempre que as forças externas às existentes no local de indentação forem insignificantes, será possível a obtenção da deformação total em uma medição por MFA (Cappella e Dietler, 1999).

Os modelos descritos contemplam todos os parâmetros de força utilizados neste trabalho. As forças analisadas correspondem à força máxima aplicada durante o experimento, às forças atrativas às forças adesivas medidas. Estas forças refletem as características do material estudado, tais como a dureza da amostra e as interações entre a ela e a ponteira. Foram obtidos também os valores de separação, ou seja, a distância de penetração na amostra, e Módulo de Young, representativo das características elásticas do material analisado.

As forças atrativas estão aqui representadas pelo “*jump to contact*” ou “*snap in*”, que descrevem o momento em que a ponteira salta em direção à amostra e correspondem a um ponto de descontinuidade nas curvas de força-separação. Esse momento surge quando a interação ponteira-amostra supera os valores da constante elástica do cantilever, e surgem forças como as de van der Waals. O valor máximo da força atrativa amostrado é definido pela seguinte equação, em que  $\delta_c$

corresponde à deflexão do cantilever relativa ao salto em direção à amostra e  $\kappa_c$  representa a constante elástica do cantilever.

$$F_{att} = \delta c \times \kappa_c \quad (16).$$

O “*jump to contact*” está sempre presente em escala atômica e a instabilidade gerada é governada pela dureza inerente da ponteira e dos materiais amostrados, relativa às suas forças coesivas (Cappella e Dietler, 1999).

Dentre as forças atrativas passíveis de causar a descontinuidade mencionada configuram principalmente as forças eletrostáticas e as de van der Waals. A primeira está ligada a experimentos que se utilizam de ponteiras carregadas ou condutivas e é gerada quando a amostra e a ponteira apresentam diferenças de potencial, ou decorre de um campo elétrico intencionalmente aplicado ao experimento. A segunda, entretanto, é baseada na interação entre átomos eletricamente neutros que se tornam localmente carregados e tem influência de propriedades físicas dos materiais, como a polarizabilidade dos átomos e a densidade da ponteira e da amostra (Sao e Jhe, 2008). As forças de van der Waals compreendem três tipos principais, sendo eles:

- 1) Dispersão ou força de London. Relativa aos momentos de dipolo instantâneo intrínsecos a todos os átomos e moléculas.
- 2) Força de Keesom. Origina-se da atração entre dipolos permanentes em rotação.
- 3) Força de Debye. Surge a partir da interação dos dipolos permanentes em rotação e a polarizabilidade de todos os átomos e moléculas.

Dentre as forças de van der Waals, a dispersão oferece maior contribuição às forças atrativas (ou repulsivas, dependendo do caso), pois todos os materiais são polarizáveis, enquanto as outras duas forças exigem a presença de dipolos permanentes (Cappella e Dietler, 1999).

Um segundo ponto de descontinuidade das curvas de força-separação é representado pelo “*jump off contact*”, e permite calcular as forças adesivas que surgem entre a ponteira e a amostra no momento de retração da ponteira. Refere-se ao momento em que o gradiente das forças adesivas ponteira-amostra se torna

menor do que a constante elástica do cantilever, e permite que várias propriedades materiais adesivas sejam mostradas.

A deflexão gerada pelo *“jump off contact”* e a distância relativa a ele são sempre maiores em comparação àquelas referentes à deflexão gerada pelo *“jump to contact”* e à distância correspondente a esse momento. Isso ocorre porque durante o contato ponteira-amostra algumas ligações químicas e ligações adesivas podem gerar forças não conservativas. Forças capilares geradas por contaminantes líquidos agem em oposição à separação entre ponteira e amostra, o que também corresponde a um aumento da adesão. Além disso, durante a indentação a amostra é deformada, dobrada e pode envolver a ponteira, aumentando ainda mais o contato em razão do comportamento elástico da amostra, e também devido à influência de forças particulares (forças hidrofóbicas e visco elásticas). Desta maneira, materiais macios e com baixas energias coesivas que contenham grupos hidrofóbicos, como no caso de alguns materiais biológicos, têm uma alta força de separação (força adesiva), e o *“jump off contact”* ocorre como uma separação gradual (não se apresenta como uma descontinuidade brusca).

Dentre as mencionadas, as forças capilares representam as interações mais fortes relativas às forças adesivas geradas num experimento de indentação executado em ar. Estas forças são geradas devido a uma pequena camada de vapor absorvida na superfície dos materiais, que surge devido à umidade natural do ambiente e tem pouco efeito sobre as forças atrativas. A presença dessa camada de vapor, entretanto, dificulta o desprendimento da ponteira devido à alta energia de superfície da amostra, o que resulta em um aumento dos valores registrados para as forças adesivas. Estas forças podem relacionar-se, portanto, com a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade do material analisado. Quanto mais hidrofílico, maior a camada de água na superfície, o que gera um aumento nas forças adesivas medidas. (Cappella e Dietler, 1999).

## **7.5 Microscopia Eletrônica de varredura**

Após as análises de MFA, as fibras também foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram cobertas 1x com ouro para garantir a sua condutividade (Emitech K550) e visualizadas em um DSM 962 Zeiss a uma voltagem de 10 kV. As fibras foram fotografadas em diversas ampliações, a partir de 100x até 3000x. As imagens de 3000x foram priorizadas por oferecerem um leque maior de detalhes.

## **7.6 Análise Estatística**

Todos os dados foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média e a significância estatística foi determinada pelo cálculo dos valores de probabilidade (P) com o Teste t de *Student*. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . A análise estatística foi feita por meio do software Assistat 7.5 Beta.

# **8 Resultados e discussão**

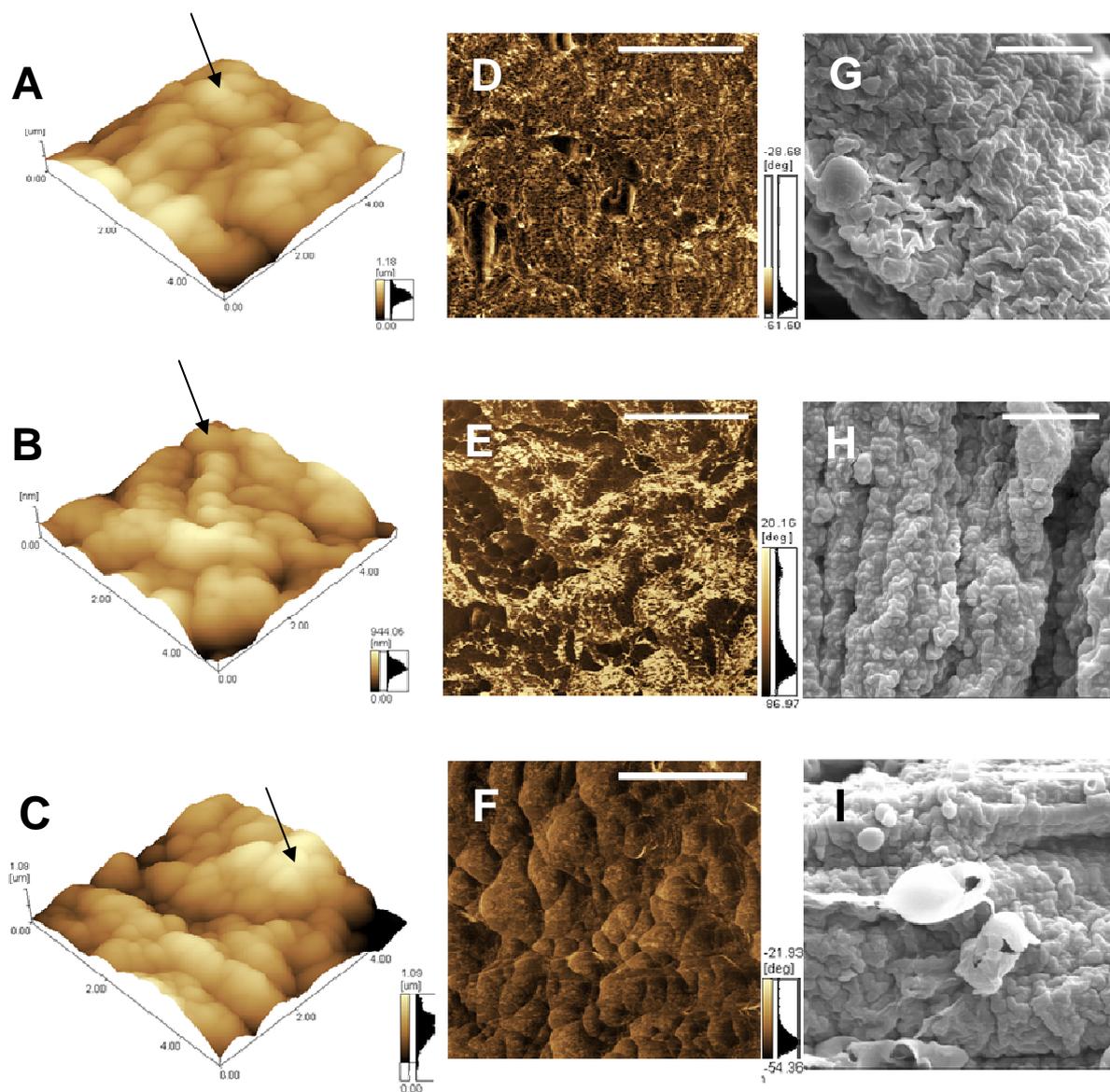
## **8.1 Fibras A1S8<sub>20</sub>**

### **8.1.1 Aquisição de imagens**

#### **8.1.1.1 Microscopia de Força Atômica**

As imagens obtidas por meio das duas técnicas revelam diferenças estruturais representativas entre as fibras analisadas, inclusive dentre aquelas pertencentes a um mesmo grupo. O escaneamento de diferentes áreas em uma mesma fibra também evidenciou características distintas. Essa variabilidade, embora não tão pronunciada, existe também em fibras de seda natural (Blackledge e Hayashi, 2006), bem como nas fibras sintéticas poliméricas (Teulé *et al.*, 2007).

Análises por MFA demonstraram a heterogeneidade mencionada, que inclui, dentre outros fatores, a proporção entre áreas elásticas e viscosas e o tamanho dos agregados de proteínas, além da irregularidade da superfície, que aparece em diferentes níveis. As características topográficas do grupo controle estão representadas em imagens de altura dispostas tridimensionalmente, estando as fibras analisadas representadas como  $C_1$ ,  $C_2$  e  $C_3$  (fig. 8, A, B e C). As características viscoelásticas estão evidenciadas nas imagens de fase (fig. 8, D, E, F). As áreas escuras correspondem a superfícies viscosas, enquanto as áreas mais claras correspondem a superfícies elásticas.



**Fig. 8** Imagens da superfície das fibras A1S8<sub>20</sub> pertencentes ao grupo não tratado adquiridas por meio de microscopia de força atômica (colunas I e II, imagens de altura e de fase, respectivamente) e microscopia eletrônica de varredura sob o aumento de 3000× (coluna III). As imagens A, D, G correspondem à fibra C<sub>1</sub>, B, E, H representam a fibra C<sub>2</sub> e as imagens C, F, I a fibra C<sub>3</sub>. As setas apontam a presença de agregados protéicos na superfície (grânulos). As imagens de topografia e fase correspondem a uma mesma área de 5×5 μm para cada fibra. A barra de escala nas imagens de fase corresponde a 2 μm, nas imagens de varredura, a 10 μm.

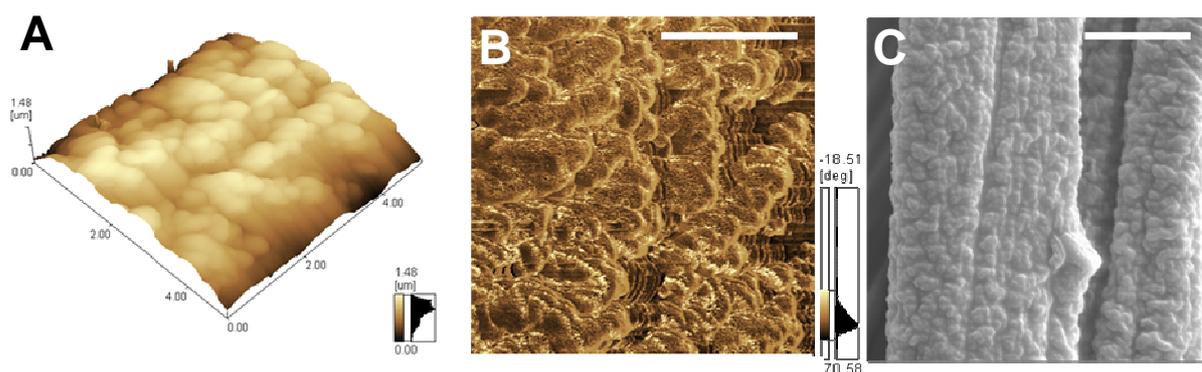
As imagens de topografia revelam características de superfície semelhantes para as fibras C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> (fig. 8 A, B). A imagem da fibra C<sub>3</sub> diferiu um pouco das outras fibras do grupo controle, apresentando-se um pouco mais irregular, com depressões mais pronunciadas (fig. 8 C). Tais diferenças, entretanto, não determinam um padrão

para as fibras analisadas, uma vez que as imagens obtidas para diferentes áreas de cada uma das fibras revelam variações bastante expressivas. A presença de agregados de proteínas (elevações, protuberâncias arredondadas) pode ser observada nas imagens de fase e topografia por MFA, como indicam as setas na fig. 8 A, B, C.

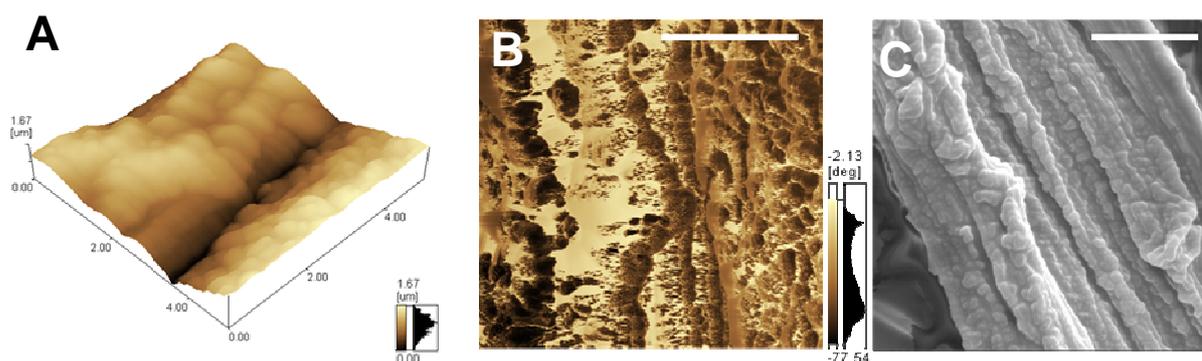
Na mesma figura, as imagens de fase das fibras  $C_1$  e  $C_3$  revelam a predominância de áreas viscosas em relação a áreas elásticas (fig. 8 D, F). A imagem de fase relativa à fibra  $C_2$  revela uma proporção bem mais expressiva de regiões elásticas, em comparação às imagens referentes às outras fibras controle. O perfil viscoelástico, entretanto, variou consideravelmente nas diferentes áreas analisadas para cada fibra.

A presença de agregados protéicos (grânulos) está possivelmente relacionada ao processo de montagem das proteínas, que pode estar ocorrendo de maneira desordenada e não uniforme, gerando aglomerações localizadas de proteínas e resultando na formação de picos e depressões ao longo da superfície das amostras. A proporção variável entre áreas elásticas e viscosas nas fibras estaria também relacionada à montagem das proteínas e ao dobramento dos motivos, que pode estar ocorrendo de forma predominantemente aleatória, resultando em distribuições heterogêneas.

As fibras pertencentes aos grupos MA e MB apresentaram variações topográficas e viscoelásticas bastante pronunciadas (fig. 9 A, B; fig. 10 A, B). Os grânulos presentes nas superfícies também apresentaram perfis variados, com características heterogêneas. Irregularidade de superfície mencionada está representada na figura 10, referente à fibra MB, que evidencia a presença de características distintas, tanto em termos de viscosidade quanto em relação à topografia e ao tamanho dos grânulos.



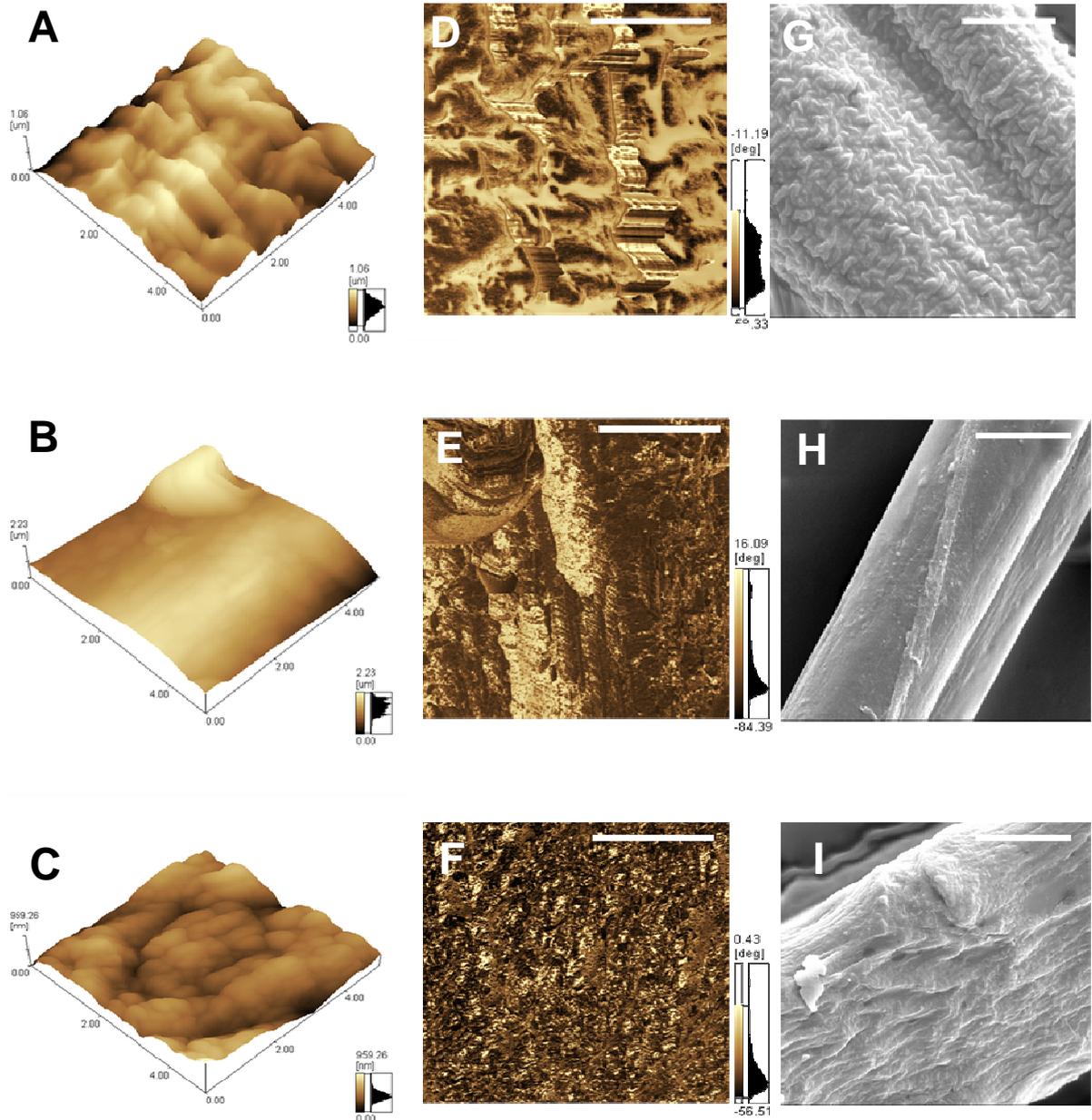
**Fig. 9** Imagens de superfície da fibra MA, tratada com metanol e estirada 1,5x. Imagens de topografia (A) e fase (B) obtidas por microscopia de força atômica e (C), obtida por microscopia eletrônica de varredura sob aumento de 3000x. As barras de escala correspondem a 2 μm (B) e 10 μm (C).



**Fig. 10** Imagens de superfície da fibra MB, tratada com metanol, água e estirada 1,5x. Imagens de topografia (A) e fase (B) obtidas por microscopia de força atômica e (C), obtida por microscopia eletrônica de varredura. As barras de escala correspondem a 2 μm (B) e 10 μm (C).

As imagens obtidas para o grupo IA (as fibras estão representadas como IA<sub>1</sub>, IA<sub>2</sub> e IA<sub>3</sub>) também evidenciam heterogeneidade (fig. 11 A, B, C), entretanto, algumas áreas varridas apresentaram uma superfície bem mais lisa em relação às fibras dos grupos C, MA e MB. Os agregados protéicos variaram em forma em algumas das regiões escaneadas, como mostra a fig. 11 A. Observou-se que as fibras pertencentes ao grupo IA apresentaram irregularidade de superfície bem menos

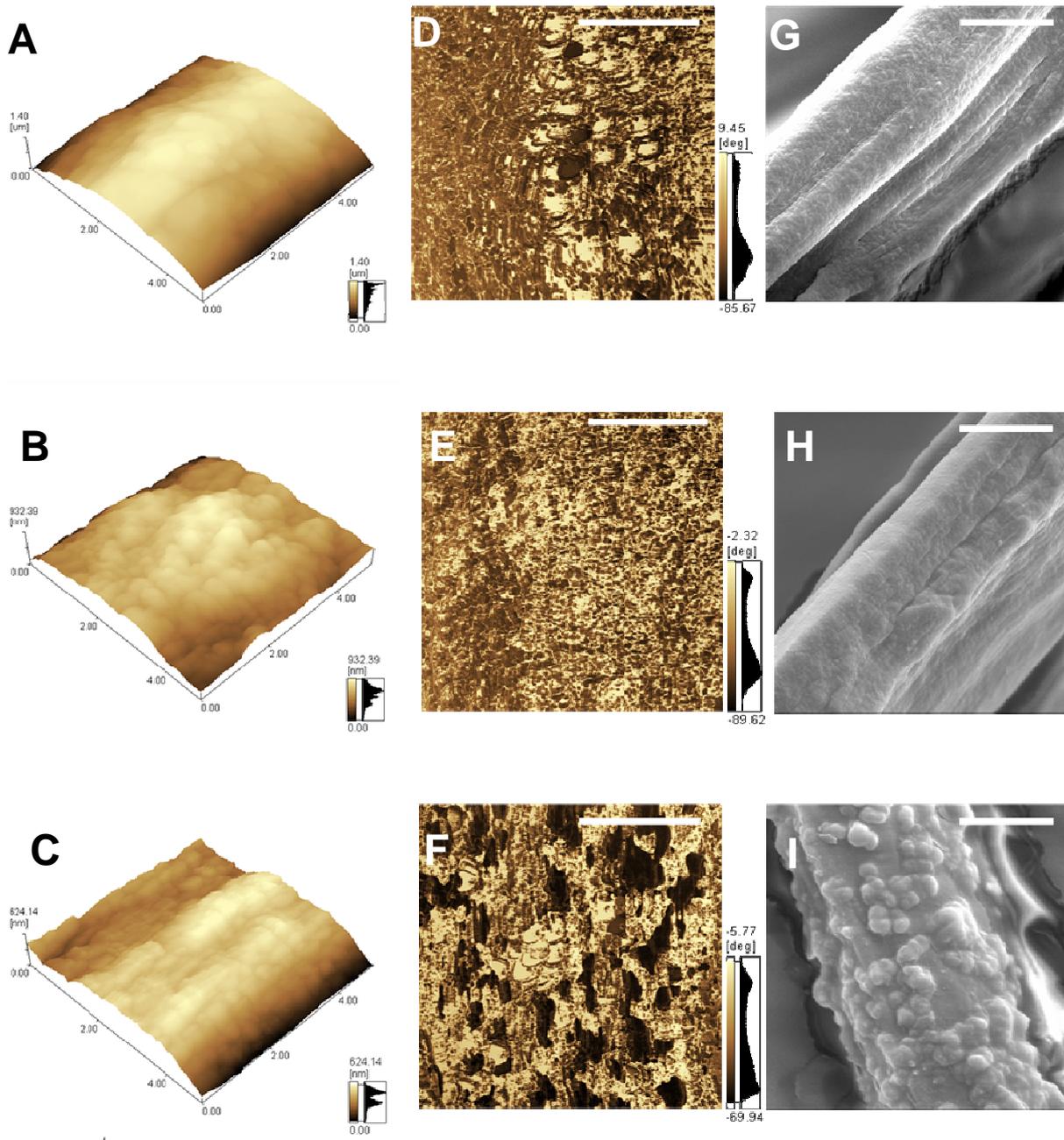
evidente, sendo aparentemente mais planas. Os vales e picos gerados pela agregação das proteínas parecem também menos pronunciados. Tais resultados indicam que o tratamento com isopropanol pode ter refletido na rugosidade das fibras. Variações nas características viscoelásticas também foram observadas (fig. 11 D, E, F).



**Fig.11** Imagens de superfície das fibras pertencentes ao grupo IA, tratadas com isopropanol e estiradas 1,5x. As Imagens de topografia A, B, C e fase D, E, F obtidas por microscopia de força atômica representam uma mesma área para cada fibra. As imagens G, H e I foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura sob aumento de 3000x. As barras de escala correspondem a 2 μm (imagens de fase) e 10 μm (imagens de varredura). A linha I corresponde à fibra IA<sub>1</sub>, a linha II à fibra IA<sub>2</sub> e a linha III à IA<sub>3</sub>.

As imagens obtidas para o grupo IB (as fibras foram apresentadas como IB<sub>1</sub>, IB<sub>2</sub> e IB<sub>3</sub>) também demonstram uma aparente diminuição da rugosidade de

superfície (fig. 12, A, B, C), o que reforça a hipótese de que o tratamento com isopropanol esteja atuando na diminuição das irregularidades topográficas. A alternância entre áreas lisas e áreas granuladas sugere que o isopropanol pode ter sido capaz de interagir com as cadeias amorfas que constituem as fibras, induzindo - ao menos superficialmente e parcialmente - a um certo nível de reorganização que levou ao aumento da lisura das fibras. As fibras pertencentes ao grupo IB apresentaram as características mais planas dentre as fibras analisadas. Isso sugere que o subsequente tratamento com água e o estiramento após o tratamento com isopropanol possam homogeneizar ainda mais a superfície das fibras sintéticas por meio da interação da água com as estruturas amorfas das fibras. A água pode ter permitido a desorientação das cadeias, intensificada pelo alongamento da fibra, o que pode ter provocado a formação de novas ligações de hidrogênio após sua evaporação, resultando em mudanças da estrutura (Shao e Vollrath, 1999). As imagens de fase revelam heterogeneidade na proporção entre áreas elásticas e áreas viscosas, como já descrito para as outras fibras analisadas.



**Fig. 12** Imagens de superfície das fibras pertencentes ao grupo IB, tratadas com isopropanol, estiradas 1,5x, tratadas com água e estiradas 1,5x novamente. As Imagens de topografia A, B, C e fase D, E, F obtidas por microscopia de força atômica representam uma mesma área para cada fibra. As imagens G, H e I foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As barras de escala correspondem a 2  $\mu\text{m}$  (imagens de fase) e 10  $\mu\text{m}$  (imagens de varredura). A linha I corresponde à fibra IB<sub>1</sub>, a linha II à fibra IB<sub>2</sub> e a linha III à IB<sub>3</sub>.

Nenhum padrão evidente foi encontrado para quaisquer dos grupos analisados. Todos os grupos apresentaram variações topográficas e viscoelásticas entre as fibras. O tamanho dos grânulos variou em diferentes áreas de uma única fibra, e as diferenças apresentaram-se ainda maiores quando fibras distintas foram colocadas em comparação. Na maioria dos casos, as imagens de fase mostraram o predomínio de áreas viscosas, com algumas manchas ou faixas elásticas distribuídas ao longo da fibra. Algumas zonas com predominância de áreas elásticas também foram observadas, mas com uma frequência menor.

As variações topográficas e os diferentes tamanhos apresentados pelos agregados de proteína estão possivelmente relacionados ao processo de extrusão - que pode não estar permitindo a organização uniforme das proteínas nas fibras - mas principalmente ao mecanismo de montagem das proteínas em fibras, que ainda não é completamente entendido. As imagens de fase, por sua vez, não levaram a nenhum padrão conclusivo, mas as variações viscoelásticas observadas parecem resultar principalmente do processo de montagem das proteínas. Espera-se que os motivos elásticos e de força dobrem-se de maneira apropriada para proteínas nativas (Sheibel, 2004), mas as proteínas sintéticas podem não ser capazes de dobrar-se corretamente, resultando em características heterogêneas. Além disso, a quantidade reduzida de resíduos de aminoácidos no C-terminal e no N-terminal, apontados como essenciais para o correto dobramento das proteínas (Sponner *et al.*, 2005; Ayoub *et al.*, 2007), pode ter contribuído para a estruturação heterogênea e possivelmente deficiente.

O surgimento de algumas dificuldades durante o escaneamento das fibras sintéticas por MFA - representadas por ruídos e vibrações que impossibilitaram a varredura de algumas áreas - levou à necessidade de uma análise micrométrica, com o intuito de entender os motivos que levaram a esta limitação. Tal análise foi realizada por meio de MEV. A heterogeneidade encontrada em escala nanométrica foi também confirmada pelas imagens de MEV, que demonstram ainda as grandes variações entre os diâmetros das fibras analisadas, como mencionado anteriormente por Teulé *et al.*, 2007.

### 8.1.1.2 **Microscopia eletrônica de varredura**

Fibras nativas de aranhas araneomorfas apresentam uma superfície muito lisa (Kitagawa e Kitayama, 1997; Madsen e Vollrath, 2000; Swanson *et al.*, 2009). Dentre as fibras sintéticas analisadas no presente trabalho, apresentaram aspecto mais suave, uniforme e com alto contraste aquelas pertencentes a grupos IA (fig. 11 H, I) e IB (fig. 12 G, H). Os grupos MA, MB e o grupo controle apresentaram superfícies bastante irregulares, o que sugere mais uma vez que o tratamento com isopropanol possa contribuir para o aspecto liso das fibras sintéticas, mesmo quando submetidas a testes de tensão. Estes resultados estão de acordo com as avaliações de Teulé *et al.* 2007, no entanto, nenhum padrão claro pôde ser estabelecido para qualquer dos grupos analisados, devido à heterogeneidade encontrada.

As imagens de MEV das fibras sintéticas mostram a presença de áreas granuladas nas fibras pertencentes aos grupos C (fig. 8 G, H, I), MA (fig. 9 C), MB (fig. 10 C), IB (fig. 12 I), enquanto algumas fibras apresentaram grânulos com formato mais alongado (fig. 11 A). A presença de protuberâncias em forma de bolhas também foi observada em alguns casos (fig. 8 I). Fissuras orientadas longitudinalmente foram observadas em quase todas as fibras analisadas (fig. 8 H, I, fig. 9, fig. 10) e a presença de vãos em algumas das áreas varridas é nitidamente observada (fig. 8 H). A presença de possíveis contaminantes também foi notada em alguns casos (fig. 11 I).

Sugere-se que a heterogeneidade verificada para todos os grupos resulte dos processos de extrusão da fibra e montagem das proteínas, como já mencionado anteriormente. A tensão aplicada às fibras também pode ter contribuído para algumas das características irregulares. Quanto à presença de contaminantes, não existe nenhuma evidência de que resultem do processo de formação das fibras. Sugere-se que os contaminantes observados tenham surgido devido à manipulação, apesar de todas as análises terem sido feitas com cautela no intuito de preservar o estado original das fibras.

As imagens obtidas por meio de MEV indicam que as dificuldades encontradas durante a varredura das fibras com o microscópio de força atômica

podem ser reflexo das irregularidades verificadas. Para complementar as informações obtidas, as medições topográficas das fibras - realizadas durante o escaneamento por meio do MFA - foram analisadas de forma a obter parâmetros quantitativos correspondentes à rugosidade das superfícies analisadas.

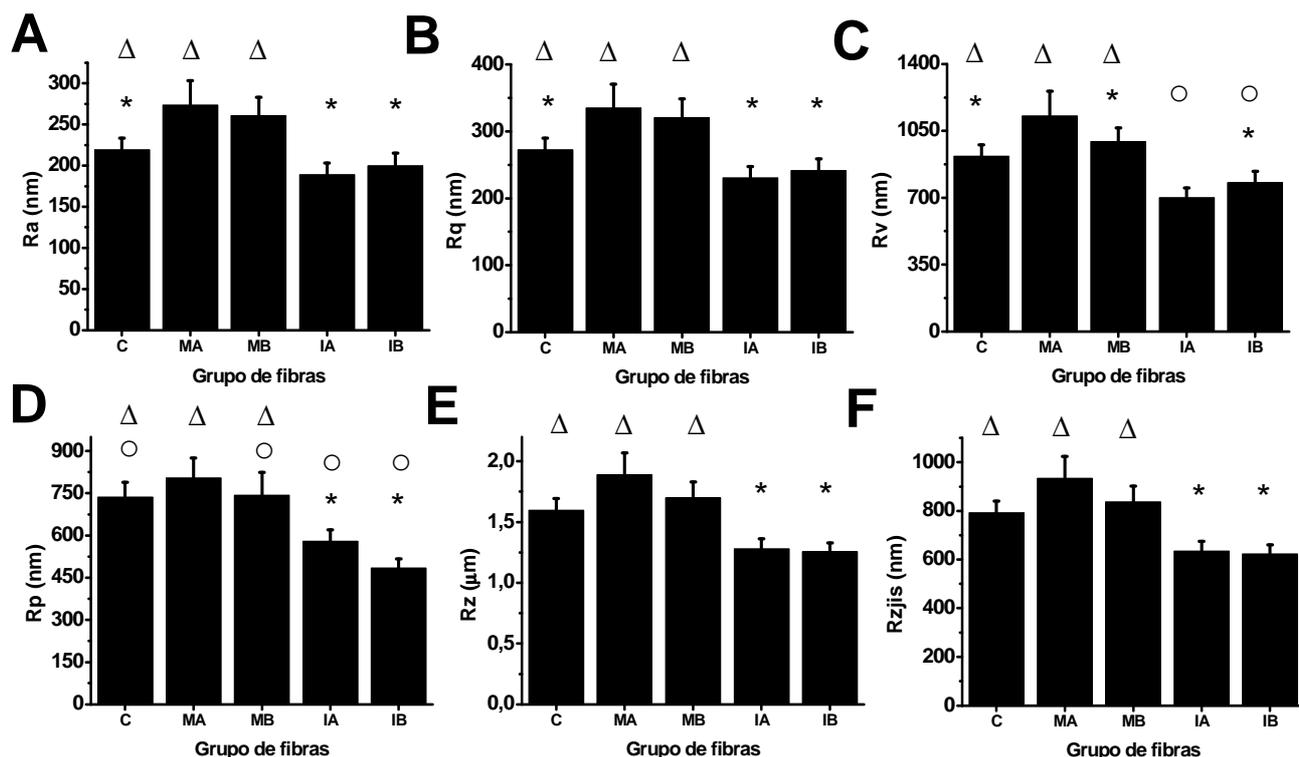
### 8.1.2 Medições de rugosidade de superfície

A rugosidade das amostras é medida com base em parâmetros definidos para o microscópio de força atômica. Ra é um dos parâmetros mais comuns em descrições de rugosidade de superfície e corresponde à rugosidade média da área escaneada, com base na distribuição dos picos e vales encontrados ao longo das áreas varridas, como disposto anteriormente.

A comparação entre a rugosidade obtida para os diferentes grupos pode enriquecer o conhecimento acerca do efeito dos tratamentos na superfície das fibras analisadas. Desta forma, tornou-se necessária a análise dos valores médios de rugosidade obtidos para cada um dos grupos. Estes valores são referentes aos seis parâmetros de rugosidade apresentados neste trabalho e estão representados na fig. 13. Todos os grupos estudados apresentaram um padrão geral similar para os seis parâmetros.

Os resultados mostrados na fig. 13 A demonstram que os tratamentos não alteraram a Ra dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, entretanto, diferenças significativas entre os grupos tratados foram observadas. Os grupos tratados com isopropanol apresentaram um decréscimo nas médias de rugosidade quando comparados aos grupos tratados com metanol ( $p < 0,05$ ). IA apresentou uma diminuição de 31% e 28% quando comparado aos grupos MA e MB, respectivamente, enquanto IB teve a rugosidade diminuída em 27% e 23%, respectivamente, comparada aos mesmos grupos ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos tratados com isopropanol ou entre aqueles tratados com metanol.

Pode-se observar que houve variações expressivas, mesmo para fibras pertencentes ao mesmo grupo, o que está representado pelos altos erros padrão das médias. Tal observação está de acordo com a hipótese de que a montagem das proteínas em fibras esteja ocorrendo de forma diferenciada, resultando em fibras significativamente distintas, com características estruturais variáveis, mesmo quando submetidas aos mesmos procedimentos.



**Fig. 13** Análise de rugosidade das fibras A1S8<sub>20</sub> por meio de MFA. Os parâmetros analisados estão dispostos no eixo Y de cada gráfico. Ra representa a rugosidade média aritmética, Rq a rugosidade quadrática média, Rzjs a rugosidade média de 10 pontos, Rz a altura máxima, Rp a altura média e Rv a profundidade média. O eixo X corresponde aos grupos de fibras A1S8<sub>20</sub>. Os símbolos \*, Δ e ○ indicam semelhanças estatísticas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

A compreensão acerca das características das superfícies pode ser enriquecida analisando-se também outros parâmetros de rugosidade. Por esta razão os valores de Rz, Rzjs, Rq, Rv e Rp, obtidos durante a varredura das fibras, também foram dispostos em gráficos e analisados.

As medições obtidas para Rq mostram que os grupos comportaram-se de maneira semelhante à descrita para os valores de rugosidade média, uma vez que nenhum dos grupos tratados divergiu estatisticamente do grupo controle. Como já observado na análise de Ra, os grupos tratados com isopropanol apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos tratados com metanol ( $p < 0,01$ ), mas grupos de fibras submetidos ao tratamento com o mesmo tipo de álcool não demonstraram discrepâncias significativas (fig. 13 B).

A análise de Rv (fig. 13 C) não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os grupos controle, MA e MB. Apesar do grupo IB não ter divergido estatisticamente do grupo controle e de MB, ele apresentou uma diminuição de 31% em comparação a MA. Com relação ao grupo IA, não foram observadas diferenças significativas quando comparado ao grupo IB, mas decréscimos de 24%, 38% e 30% foram observados em relação aos grupos controle, MA e MB, respectivamente ( $p < 0,01$ ).

Rp (fig. 13 D) divergiu substancialmente do padrão geral apresentado pelos outros parâmetros de MFA analisados. A análise de altura média - que corresponde à distância entre a média da secção da curva e o pico mais alto encontrado na superfície varrida - demonstraram que o grupo controle e os grupos tratados com metanol não divergiram estatisticamente entre si, enquanto IA diferiu apenas de MA ( $p < 0,01$ ). O grupo IB, entretanto, apresentou-se significativamente diferente dos grupos controle, MA e MB, demonstrando diminuições de 34%, 40% e 35%, respectivamente ( $p < 0,01$ ). Além disso, IB apresentou os menores erros padrão dentre todos os grupos analisados.

As análises de Rz (fig. 13 E) e Rzjis (fig. 13 F) revelaram um padrão semelhante com relação ao comportamento dos grupos. Os grupos tratados com metanol não demonstraram diferenças significativas comparadas ao grupo controle ou entre si, mas os grupos tratados com isopropanol divergiram significativamente de todos os outros grupos. A análise de Rz mostra que os valores de IA corresponderam ao decréscimo de 21%, 32% e 25% comparados aos grupos controle, MA e MB, respectivamente ( $p < 0,01$ ). O grupo IB, por sua vez, apresentou diminuições de 21%, 34% e 26% em relação aos grupos controle, MA e MB, respectivamente ( $p < 0,01$ ). A análise de Rzjis também revelou um decréscimo na

rugosidade após o tratamento com isopropanol, uma vez que a média das fibras pertencentes a IA apresentou-se 20% menor do que a observada para o grupo controle, 32% menor que a de MA e 24% menor que a de MB. Um decréscimo significativo na rugosidade também foi observado com relação a IB quando comparado aos grupos controle e tratados com metanol ( $p < 0,01$ ). Valores 21%, 33% e 26% mais baixos que os obtidos, respectivamente, para os grupos controle, MA e MB foram observados para o grupo IB.

Conjugando-se todos os resultados referentes às análises de superfície, chamam a atenção os dados obtidos para os grupos IA e IB. O tratamento com isopropanol pode ter sido capaz de promover, de uma maneira geral, a redução da rugosidade das fibras sintéticas, inclusive quando seguido de tratamento com água e mesmo quando a fibra é submetida a um maior nível de tensão (fibras pertencentes ao grupo IB foram estiradas em 1,5x por duas vezes). Tais resultados indicam que o isopropanol pode promover um aumento na uniformidade das fibras por meio da interação do solvente com as cadeias das proteínas. A adição do álcool seria capaz de enfraquecer as interações hidrofóbicas que estabilizam as espidroínas e, simultaneamente ao enfraquecimento das interações proteína-proteína, as ligações de hidrogênio locais (intramoleculares) seriam fortalecidas, o que levaria à estabilização das estruturas de hélices estendidas (hélices  $3_{10}$ ). A mudança conformacional de estruturas de *random coil* em folhas- $\beta$  já foi reportada para espidroínas em solução (Dicko *et al.*, 2005). Sugere-se, portanto, que uma melhora da organização da microestrutura da fibra possa levar à redução da rugosidade das fibras sintéticas A1S8<sub>20</sub>.

Os grupos tratados com metanol, entretanto, não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle em nenhum dos parâmetros analisados. As medições feitas indicam que o tratamento com metanol, seguido ou não por tratamento com água e estiramento, não promovem mudanças estatisticamente relevantes na rugosidade das fibras, tendo na verdade demonstrado uma tendência ao aumento da rugosidade em relação a todos os outros grupos estudados. Apesar da formação de folhas- $\beta$  induzida por metanol já ter sido reportada (Dicko *et al.*, 2005), e dos indicativos de que quanto maior a polaridade do solvente maior sua capacidade de interação (Shao e Vollrath, 1999), o metanol mostrou-se ineficiente

na uniformização da superfície das fibras. Sugere-se que isso ocorra devido à polaridade do solvente e à velocidade com a qual induz mudanças conformacionais, muito maior que a observada para o isopropanol (Dicko *et al.*, 2005). As interações do solvente com as proteínas, mais agressivas do que as providas do contato com o isopropanol, podem ter levado a uma reorganização prejudicial às características das fibras sintéticas, provocando um possível aumento da rugosidade.

Desta forma, apesar das discrepâncias encontradas entre fibras pertencentes a um mesmo grupo, o padrão geral observado permite concluir que o tratamento com isopropanol pode contribuir para a obtenção de fibras mais lisas, levando a uma melhora na organização dessas fibras e permitindo a produção de fibras com características mais semelhantes às nativas.

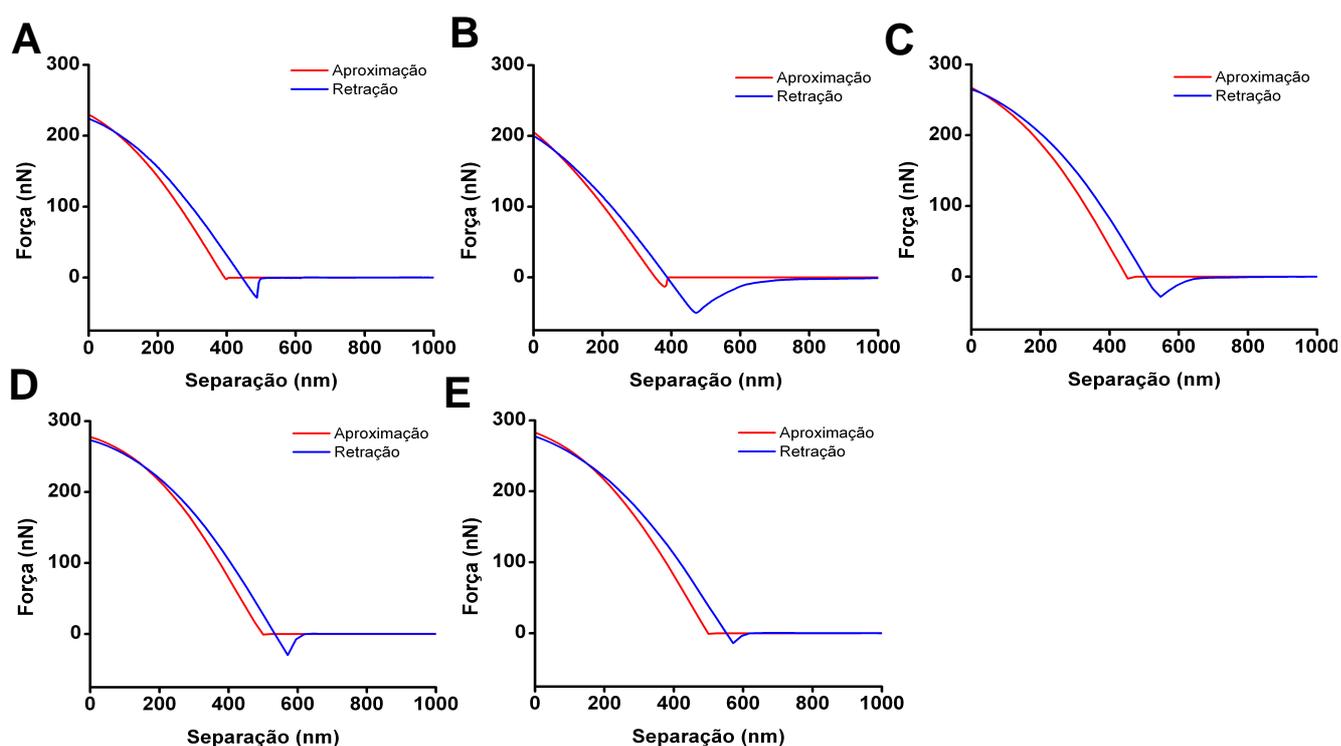
Tais descobertas levaram a um novo conjunto de experimentos, por meio dos quais as propriedades mecânicas das fibras analisadas foram testadas, enfocando os diferentes tipos de tratamento utilizados e sua influência sobre as propriedades medidas.

### **8.1.3 Espectroscopia de força**

Alguns trabalhos descrevendo o comportamento de fibras sob tratamento com uma série de solventes têm mostrado que as propriedades mecânicas destas fibras são alteradas por alguns desses solventes, como etanol, metanol, água e agentes caotrópicos como uréia (Shao & Vollrath 1999; Shao *et al.*, 1999). Uma característica comum das linhas de segurança de aranhas é a sua aparente capacidade de super contrair quando submersas em um solvente como a água (Shao e Vollrath, 1999; Liu *et al.*, 2005). Além disso, reporta-se que o efeito de alcoóis sobre as proteínas de aranhas pode induzir à formação de folhas  $\beta$ , levando à melhora no desempenho destas fibras (Dicko *et al.*, 2005). Torna-se de grande importância, portanto, analisar-se o comportamento mecânico das fibras sintéticas, antes e após os tratamentos a que foram submetidas.

A análise de curvas de força permite extrair informações importantíssimas com relação às propriedades mecânicas do material analisado. As curvas demonstradas na fig. 14 evidenciam distinções entre os grupos analisados. As fibras apresentaram-se heterogêneas, o que implica a existência de diferenças consideráveis mesmo entre as curvas adquiridas para uma única fibra.

É relevante observar o crescimento da distância de perfuração (separação) com o aumento da força aplicada, bem como os pontos de descontinuidade resultantes das forças de interação entre a ponteira do microscópio e a superfície das fibras. A não coincidência das linhas de aproximação e retração corresponde à histerese das curvas de força-separação, e resulta das forças adesivas que dificultam o desprendimento da ponteira (Cappella e Dietler, 1999).



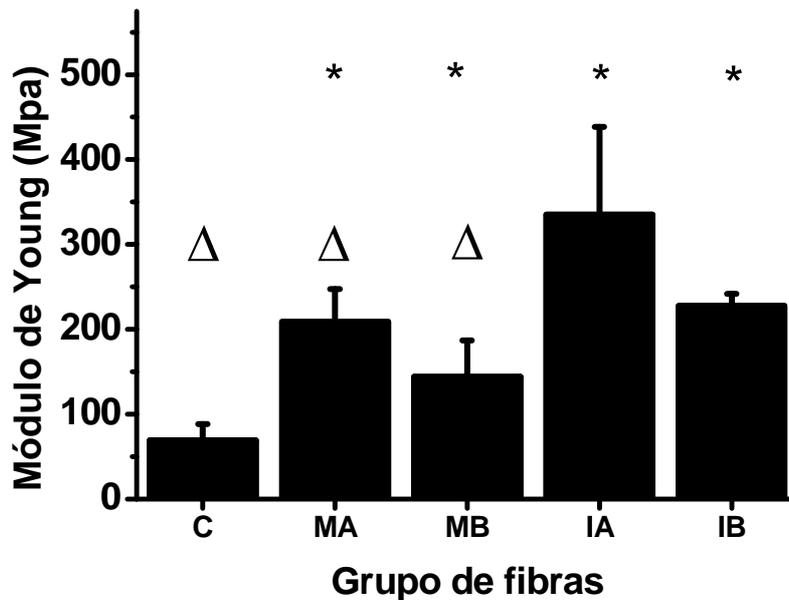
**Fig. 14** Curvas de força-separação representativas dos 5 grupos A1S8<sub>20</sub> analisados. A) Corresponde ao grupo C. B) Grupo MA. C) Grupo MB. D) Grupo IA. E) Grupo IB.

Os perfis evidenciados pelas curvas representadas mostram diferenças consideráveis nas propriedades medidas, principalmente para os grupos C (fig. 14 A), MA (fig. 14 B) e MB (fig.14 C). Observa-se grande histerese para ambos os grupos tratados com metanol. Os grupos tratados com isopropanol, por sua vez, apresentaram-se relativamente semelhantes, o que pode ser observado na fig. 14 D, E. As propriedades mecânicas mensuradas a partir das curvas de força-separação serão descritas mais detalhadamente nas seções seguintes deste trabalho.

#### 8.1.3.1 *Módulo de Young*

Testes de tensão já haviam sido realizados em 2007 por Teulé e colaboradores nestas mesmas fibras, e medições de módulo de Young foram realizadas, obtendo-se uma média geral que correspondia a  $760 \pm 540$  MPa. Estes estudos, que foram executados por meio de um sistema MTS Synergie 100 (MTS Systems Corporation, Eden Prairie MN), podem fornecer informações importantes sobre a mecânica total da amostra, mas medidas obtidas em uma escala nanométrica (medições pontuais) podem ser muito relevantes para uma compreensão mais aprofundada das características apresentadas pelas fibras sintéticas. Os experimentos executados no presente estudo permitiram a obtenção do módulo de Young transversal, diferente do módulo longitudinal obtido nos testes de tensão.

Ajustes Hertzianos das curvas força forneceram uma comparação quantitativa do módulo de Young transversal por espectroscopia de força para cada um dos grupos de fibras (fig. 15). O menor valor medido corresponde ao grupo controle, que diferiu significativamente dos grupos IA e IB ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças representativas entre os grupos tratados com isopropanol, e MA e MB não diferiram de nenhum dos grupos analisados ou entre si. O grupo IA apresentou o módulo médio mais alto dentre todos os grupos analisados, demonstrando um aumento de  $4,8 \times$  em relação ao grupo controle. IB registrou o segundo valor mais alto, representando um aumento de  $4,3 \times$ . Variações nos valores de módulo também foram observadas ao longo das diferentes posições analisadas em cada fibra, o que indica que o módulo de elasticidade das fibras não é uniforme em toda a superfície. Tais variações contribuíram para os altos erros-padrão observados.



**Fig. 15** Módulo de elasticidade das fibras A1S8<sub>20</sub> obtido por meio de nanoindentação. Os símbolos \* e Δ indicam semelhanças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Estes resultados sugerem que o tratamento com isopropanol - seguido por estiramento das fibras acompanhado ou não por tratamento com água e novo estiramento - pode ser responsável pelo aumento da elasticidade da fibra, representada pelo maior módulo de Young dos grupos tratados com isopropanol quando comparados ao grupo controle.

A elasticidade medida está diretamente relacionada à rigidez do material analisado, que está possivelmente ligada à sua organização estrutural (formação de estruturas secundárias, como hélices e folhas-β). Quanto mais altos os valores de módulo de Young registrados, maior a rigidez/dureza da área analisada, o que está possivelmente ligado a uma melhor estruturação da superfície (formação apropriada das estruturas secundárias). Desta forma, a baixa elasticidade apresentada pelo grupo não tratado sugere uma organização estrutural deficiente. Sabe-se que o processo de automontagem de proteínas nativas é iniciado por mudanças no ambiente da glândula e pelas forças alongadoras aplicadas, que promovem seu alinhamento e empacotamento. À medida que os segmentos de polialanina hidrofóbicos são aproximados e alinhados, eles são expostos à hidrofobicidade

crescente que pode iniciar a conversão de estruturas  $\alpha$ -hélices em folhas- $\beta$ , resultando na formação de uma série de ligações de hidrogênio entre cadeias (Sheibel, 2004). A ausência das condições presentes no lúmen da glândula sericígena e as diferenças das forças alongadoras aplicadas podem não ter permitido que os segmentos de polialanina se organizassem propriamente no interior das fibras sintéticas, impedindo a formação de todas as folhas- $\beta$  e ligações de hidrogênio necessárias para a correta estruturação da fibra. Desta maneira, as fibras sintéticas apresentariam originalmente uma rigidez reduzida como consequência da baixa organização estrutural, o que está refletido nos módulos de Young inferiores para as fibras pertencentes ao grupo controle.

Como já exposto, o tratamento com isopropanol induziu modificações no comportamento elástico das fibras, possivelmente resultantes de modificações estruturais. As fibras tratadas com metanol também mostraram uma tendência ao aumento da elasticidade em relação ao grupo controle. Dicko e colaboradores, 2005, descreveram a indução da formação de folhas- $\beta$  em spidroínas de aranhas após imersão em isopropanol e metanol, que podem desencadear importantes modificações estruturais. Sugere-se que o tratamento com esses alcoóis promova a transição entre um estado desordenado e a formação apropriada de estruturas secundárias, o que pode explicar os resultados obtidos para as fibras aqui analisadas. A maior organização estrutural das fibras induzida pelos tratamentos teria implicado um ganho em rigidez, o que refletiu diretamente nos valores de módulo de Young registrados para os grupos tratados, especialmente IA e IB. Após o enovelamento apropriado dos segmentos polialanina, outros motivos podem ter sido levados ao correto dobramento, resultando em um aumento expressivo da elasticidade das fibras tratadas.

Os grupos tratados posteriormente com água, entretanto, apresentaram uma tendência à redução do módulo médio quando comparados àqueles tratados apenas com álcool e estirados (MB em relação a MA e IB em relação a IA), ver fig. 15. Os efeitos da perda de elasticidade de fibras após imersão em água já foram descritos para sedas nativas de aranha, representados por um decréscimo no módulo de Young (Shaffer *et al.*, 2008). A tendência observada, que poderia ser confirmada ou rejeitada contemplando-se um número ainda mais expressivo de repetições, bem

como um número maior de fibras, representa possivelmente um reflexo das modificações estruturais induzidas pela interação da água. As sedas produzidas por alguns insetos – incluindo aquelas produzidas por aranhas - têm a capacidade de contrair quando em contato com solventes polares (com a água, em especial) resultando em perda temporária da rigidez (efeito de supercontração ou plastificação). Tal efeito implica mudanças substanciais na organização das fibras e em suas propriedades mecânicas.

As diferenças observadas entre os grupos tratados com água em relação aos tratados apenas com álcool poderiam ser explicadas pelo efeito de plastificação descrito (Shao e Vollrath, 1999). Sugere-se que a água penetre na fibra e seja então incorporada na matriz amorfa, reduzindo a interação entre as cadeias do polímero por meio da formação de novas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e as cadeias amorfas, o que levaria a uma perda temporária de rigidez promovida pelo aumento da mobilidade das cadeias (Shao e Vollrath, 1999; Schäfer *et al.*, 2008).

A perda de rigidez leva ao aumento da capacidade de deformação - propriedade característica de materiais plásticos - promovendo uma diminuição do módulo de elasticidade. Sugere-se que esta perda de rigidez esteja relacionada ao baixo grau de orientação da matriz amorfa da fibra quando na presença de um solvente polar como a água (Liu *et al.*, 2005). Apesar do efeito descrito ser considerado temporário em grande parte dos casos relativos a fibras nativas, é necessário investigar a influência de tais tratamentos na mudança permanente da estrutura de fibras sintéticas.

A supercontração de fibras de aranha está ligada à proporção de folhas- $\beta$  e à habilidade de interação do solvente, que compreende sua polaridade e o tamanho de suas moléculas (Shao e Vollrath, 1999). Um módulo de Young mais baixo dos grupos tratados com água em relação àqueles tratados apenas com isopropanol ou metanol e estirados poderia ser explicado pelo aumento nos efeitos de supercontração à medida que a polaridade do solvente aumentou, sugerindo que ligações de hidrogênio intra e/ou intermoleculares podem ter sido danificadas em proporções maiores após o tratamento com água, o mais polar dos solventes utilizados (Shao e Vollrath, 1999). Além disso, como as fibras foram estiradas após os tratamentos com metanol e isopropanol, a alongação também pode ter provocado

mudanças iniciais na microestrutura/estrutura molecular das fibras. Um tratamento posterior com água desorientaria as cadeias moleculares (preferencialmente à recuperação da conformação inicial) e promoveria a formação de novas ligações de hidrogênio (Shao e Vollrath, 1999), resultando em fibras estruturalmente diferentes das fibras não processadas.

Os resultados obtidos indicam certa estabilidade das modificações induzidas pelos tratamentos. Mesmo após a evaporação dos solventes utilizados, alterações na resposta mecânica das fibras puderam ser notadas. O estiramento posterior e o tratamento com água não foram capazes de reverter o ganho em elasticidade induzido pelo tratamento com isopropanol, o que sugere que as mudanças na estrutura secundária das fibras sintéticas, indicadas por uma melhora no desempenho das fibras, possa ser induzida de maneira permanente por meio do tratamento. O tratamento com metanol, por sua vez, não foi capaz de induzir nenhuma mudança estatisticamente relevante no desempenho das fibras, como já mencionado. Entretanto, a tendência dos grupos tratados em direção ao ganho de elasticidade também indica a possível existência de alterações permanentes na estrutura das fibras analisadas.

Os efeitos esperados para todos grupos tratados em relação ao grupo controle, no entanto, não estão em conformidade com os relatos acerca do efeito de solventes polares nas propriedades mecânicas de fibras nativas de aranha. Espera-se que solventes como o metanol e o isopropanol também atuem como agentes plastificantes (Shao e Vollrath, 1999), o que levaria a uma diminuição da elasticidade das fibras tratadas em relação às fibras controle.

Os valores registrados no presente trabalho indicam que houve um aumento do módulo de Young médio das fibras após o tratamento com os diferentes solventes, principalmente para as fibras tratadas com isopropanol (IA e IB), como descrito anteriormente. O efeito descrito para os tratamentos com os alcoóis pode ser resultado da reversão do processo de supercontração da fibra por meio do rearranjo das ligações de hidrogênio, que pode ter sido provocada pelo estiramento subsequente a que as fibras foram expostas. A tensão aplicada teria sido capaz de aumentar a elasticidade das fibras tratadas por meio da promoção de mudanças na orientação de cadeias moleculares, resultando em uma maior organização da

microestrutura das fibras. Possíveis mudanças na microestrutura de fibras de poliaminoácidos e de aranhas durante experimentos de estiramento já foram reportadas (Shao e Vollrath, 1999), e o rearranjo de fibras nativas de aranha em uma estrutura mais compacta quando submetidas à tensão também já foi descrito (Gould *et al.*, 1999).

#### 8.1.3.2 **Forças medidas**

Foram obtidos três tipos de medidas de forças derivadas das curvas força geradas durante os experimentos de indentação. Tais medidas de forças, associadas ao módulo de elasticidade, podem oferecer informações importantes sobre as propriedades mecânicas das fibras analisadas. A força máxima aplicada, que é extraída a partir da curva de aproximação, está representada na fig. 16 A. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos tratados com isopropanol, mas estes diferiram consideravelmente dos grupos controle e MB. Os grupos IA e IB apresentaram valores significativamente maiores com erros-padrão da média consideravelmente menores, apresentando um aumento de 2x e 2,2x, respectivamente, em comparação ao grupo controle, e um aumento de 29% e 34% em relação ao grupo MB ( $p < 0,01$ ). MA apresentou um aumento significativo de 75% em relação ao grupo C ( $p < 0,01$ ), mas não apresentou nenhuma diferença significativa em relação aos demais grupos. O grupo MB apresentou-se estatisticamente semelhante aos grupos controle e MA. Além disso, os erros padrão da média obtidos para os grupos tratados com metanol foram consideravelmente elevados.

A força máxima aplicada reflete diretamente as características do material analisado. Valores altos de força sugerem superfícies mais duras, enquanto valores baixos remetem a superfícies macias. Os resultados obtidos indicam que o tratamento com isopropanol resulta em um aumento da dureza superficial das fibras, evidenciado pelos altos valores medidos da força máxima aplicada. O tratamento com metanol, apesar de ter provocado um aumento significativo na dureza das fibras tratadas (grupo MA), parece permitir uma reversão deste estado, ao menos parcialmente, o que não aconteceu com o grupo tratado com isopropanol e água

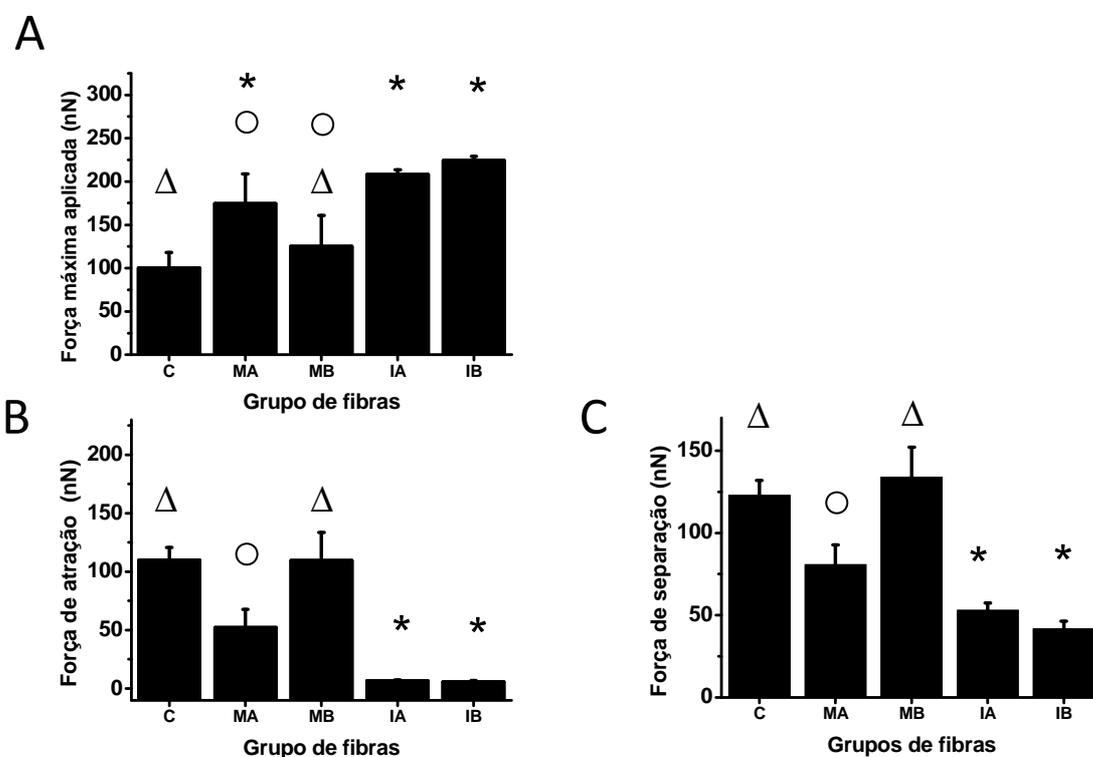
(IB). O grupo MB não apresentou diferenças significativas com relação ao grupo controle, o que indica que o tratamento com água pode ser responsável por uma reorganização estrutural da fibra, entretanto, existe uma tendência ao aumento da dureza mesmo para esse grupo.

O ganho em dureza observado reflete possivelmente a ação dos alcoóis na indução da formação de folhas- $\beta$  (Dicko *et al.*, 2005), especialmente o isopropanol. Sugere-se que estruturas das fibras tratadas tenham passado de um estado aleatório para um mais organizado (formação apropriada de estruturas secundárias), levando a um ganho estrutural que refletiu nas propriedades mecânicas. O modelo hierárquico de estruturação das fibras de aranha proposto por Zhou, 2006, sugere que polimerização da seda ocorra em etapas interdependentes. À medida que algumas estruturas são formadas no início da solidificação (folhas- $\beta$ ), outras estruturas encontram condições para se formarem corretamente.

As forças atrativas e repulsivas medidas durante os experimentos de espectroscopia de força estão representadas nas fig. 16 B e C, que ilustram as forças resultantes das interações de superfície entre as fibras analisadas e a ponta do microscópio de força atômica. As forças de atração correspondem a forças geradas entre a ponta e a superfície momentos antes do contato, enquanto as forças de separação correspondem ao ponto onde a ponta e a amostra perdem contato, resultando em informações acerca das forças adesivas geradas a partir da retração da ponta, como descrito em uma seção anterior deste trabalho. Os grupos tratados com isopropanol apresentaram valores de forças atrativas e adesivas estatisticamente semelhantes, mas diferiram consideravelmente dos demais grupos analisados ( $p < 0,01$ ). IA demonstrou uma redução significativa de 94% (atração) e 57% (adesão) em relação ao grupo controle, enquanto IB apresentou uma diminuição de 95% e 66% no valor médio correspondente às forças atrativas e adesivas ( $p < 0,01$ ). O grupo MA apresentou diferenças significativas com relação a todos os outros grupos, e os valores medidos correspondentes à atração e à adesão ponta-fibra foram, respectivamente, 53% e 34% inferiores aos valores observados para o grupo controle, enquanto o grupo MB exibiu os maiores valores dentre os grupos tratados, não apresentando diferenças significativas em relação ao

grupo controle. MB, entretanto, apresentou-se estatisticamente diferente de todos os grupos tratados ( $p < 0,01$ ).

Com relação às forças de interação de superfície, novamente os grupos tratados com isopropanol divergiram significativamente com relação aos outros grupos analisados. As forças atrativas e adesivas registradas para IA e IB apresentaram-se substancialmente inferiores às demonstradas pelos outros grupos, como pode ser observado na fig. 16. Os resultados sugerem que os grupos tratados com isopropanol sofreram mudanças em sua estrutura, provavelmente decorrentes do dobramento correto de motivos que se encontravam em condição aleatória.



**Fig. 16** Forças relativas às fibras A1S8<sub>20</sub> medidas durante os experimentos de nanoindentação. A) Força máxima aplicada. B) Força de atração. C) Força de separação (força adesiva). Os grupos de fibras estão dispostos no eixo x. Os símbolos \*, Δ e ○ correspondem às semelhanças observadas. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,01$ .

As forças de atração medidas para IA e IB sugerem um dobramento correto de estruturas que antes interagiam fortemente com a ponta do microscópio de força

atômica, e são provavelmente causadas por interações de van der Waals, que presumem a polarizabilidade de todos os átomos e moléculas (Seo e Jhe, 2008). A exposição de resíduos não devidamente dobrados nas estruturas secundárias esperadas pode ter resultado em interações ponteira-fibra mais fortes, especialmente para o grupo controle. Resíduos como a serina, polar não carregado, e a glicina, hidrofílica e relativamente polarizável, presentes na sequência repetitiva das fibras analisadas, podem ter intensificado as forças de adesão verificadas para os grupos controle e MB. A presença de vários resíduos polares (serina) e carregados (histidina, ácido aspártico, lisina, ácido glutâmico) nas regiões terminais das proteínas sintéticas, quando não propriamente dobrados, pode ter intensificado as interações entre a superfície das fibras analisadas e a ponteira. A cisteína presente no domínio C terminal também pode ter promovido parte das forças de atração verificadas, devido ao seu grupo SH altamente polarizável.

A diminuição das forças registradas para o grupo MA, mas especialmente para IA e IB, sugerem o aumento da organização das fibras, possibilitando que os resíduos expostos se dobrassem nas estruturas secundárias esperadas, reduzindo consideravelmente sua interação com a ponteira do microscópio após os tratamentos. Os resultados obtidos para MB, entretanto, sugerem a reversibilidade das mudanças estruturais causadas por metanol, enquanto as induzidas por isopropanol se demonstraram estáveis (houve redução das forças de atração para ambos os grupos tratados).

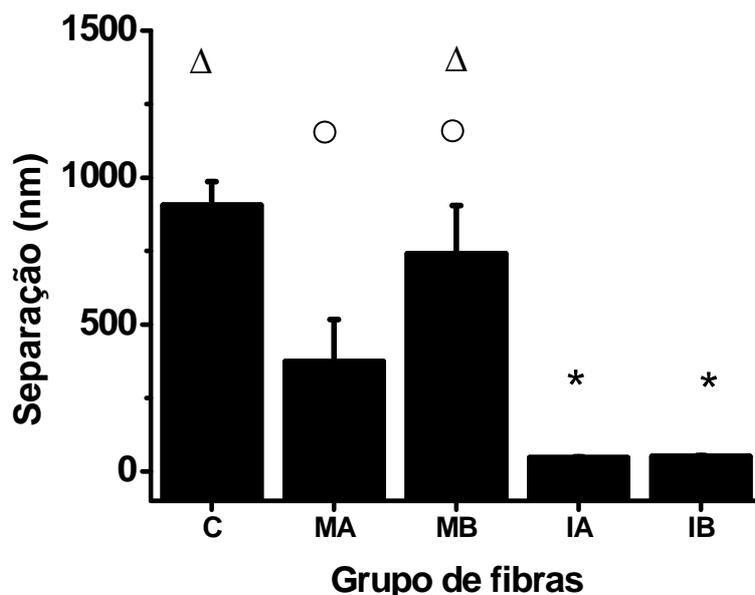
O modelo hierárquico de estruturação das fibras de aranha está de acordo com a hipótese apresentada (Zhou, 2006). A possível deficiência na formação de folhas- $\beta$  a partir dos segmentos de polialanina, que consiste em um dos primeiros passos da montagem das fibras (Sheibel, 2004), pode ter prejudicado o correto dobramento de todas as outras estruturas. À medida que os tratamentos aplicados induziram a formação das folhas- $\beta$ , a organização das fibras sintéticas pôde aumentar em todos os níveis.

Com relação às forças de adesão medidas, sugere-se que o grupo controle e o grupo MB apresentem resíduos de aminoácidos hidrofílicos expostos na superfície. Tais resíduos (que incluem a alta frequência de glicinas), quando não dobrados propriamente nas estruturas esperadas (basicamente  $\alpha$  hélices constituintes da

estrutura amorfa das fibras), podem atrair moléculas de água da umidade do ar, resultando em uma camada mais densa de água nas superfícies das fibras. Desta forma, as forças de adesão medidas aumentam, forças essas que estão representadas principalmente pelas forças capilares (Cappella e Dietler, 1999).

#### 8.1.3.3 **Separação**

A separação medida, que corresponde à distância/profundidade da penetração da ponteira na amostra em uma indentação está representada na fig. 17, que evidencia um padrão muito semelhante ao observado para as forças de atração e de separação. Os grupos IA e IB registraram valores muito baixos, que diferiram significativamente dos demais grupos analisados ( $p < 0,01$ ), ambos exibindo valores correspondentes a 5% dos valores medidos para o grupo controle. Os resultados mostram não haver diferenças significativas entre os grupos tratados com isopropanol. MA diferiu significativamente do grupo controle, apresentando um decréscimo de 60% ( $p < 0,01$ ), enquanto nenhuma diferença significativa pôde ser observada entre MB e o grupo controle ou MA.



**Fig. 17** Medições de distância (perfuração) relativas às fibras A1S8<sub>20</sub> obtidas durante os experimentos de nanoindentação. Os grupos estão dispostos no eixo x. Os símbolos \*, Δ e ○ representam semelhanças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,01$ .

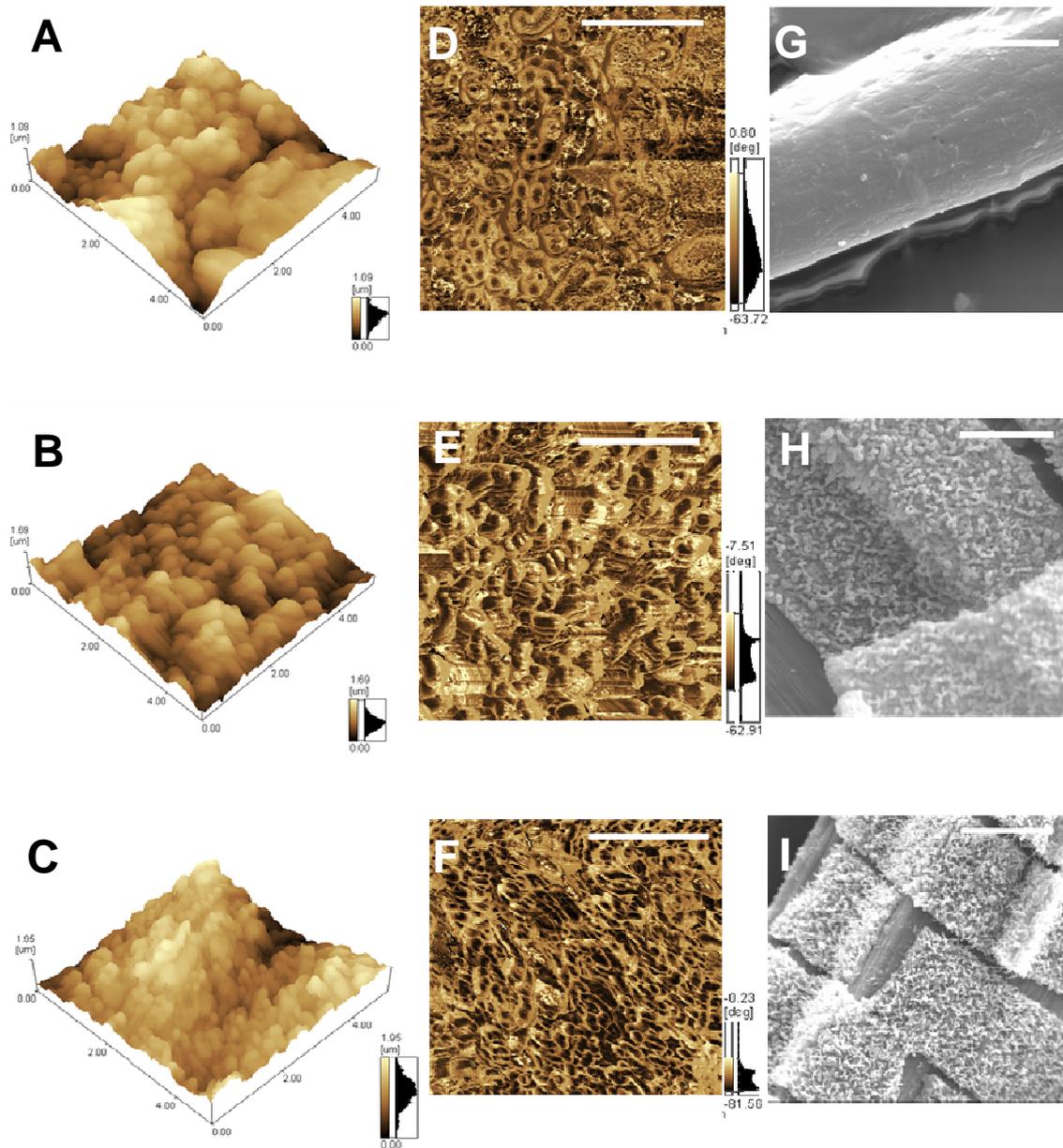
As medições da distância de penetração também sugerem um aumento da estruturação das fibras pertencentes ao grupo MA, e principalmente daquelas pertencentes aos grupos IA e IB. Os valores de separação reduzidos observados para esses grupos sugerem que as fibras apresentam maior rigidez de superfície, possivelmente resultante da indução da formação de folhas  $\beta$  em razão dos tratamentos (Dicko *et al.*, 2005). À medida que cresce a organização das fibras, mais difícil se torna a penetração da ponteira, o que sugere um ganho em dureza/força. A capacidade do isopropanol em melhorar a estrutura das fibras parece novamente superar a do metanol, o que é evidenciado pelos valores de separação consideravelmente mais baixos medidos para IA e IB.

## 8.2 Fibras Y1S8<sub>20</sub>

### 8.2.1 Aquisição de imagens

#### 8.2.1.1 *Microscopia de Força Atômica*

As figuras 18 e 19 representam a topografia das fibras Y1S8<sub>20</sub>. As imagens referentes ao grupo controle demonstram superfícies muito irregulares, com grânulos de tamanhos variados (fig. 18 A, B, C) e as imagens de fase apontam a predominância de regiões viscosas (fig. 18 D, E, F), estando as fibras representadas como YC<sub>1</sub>, YC<sub>2</sub> e YC<sub>3</sub>.

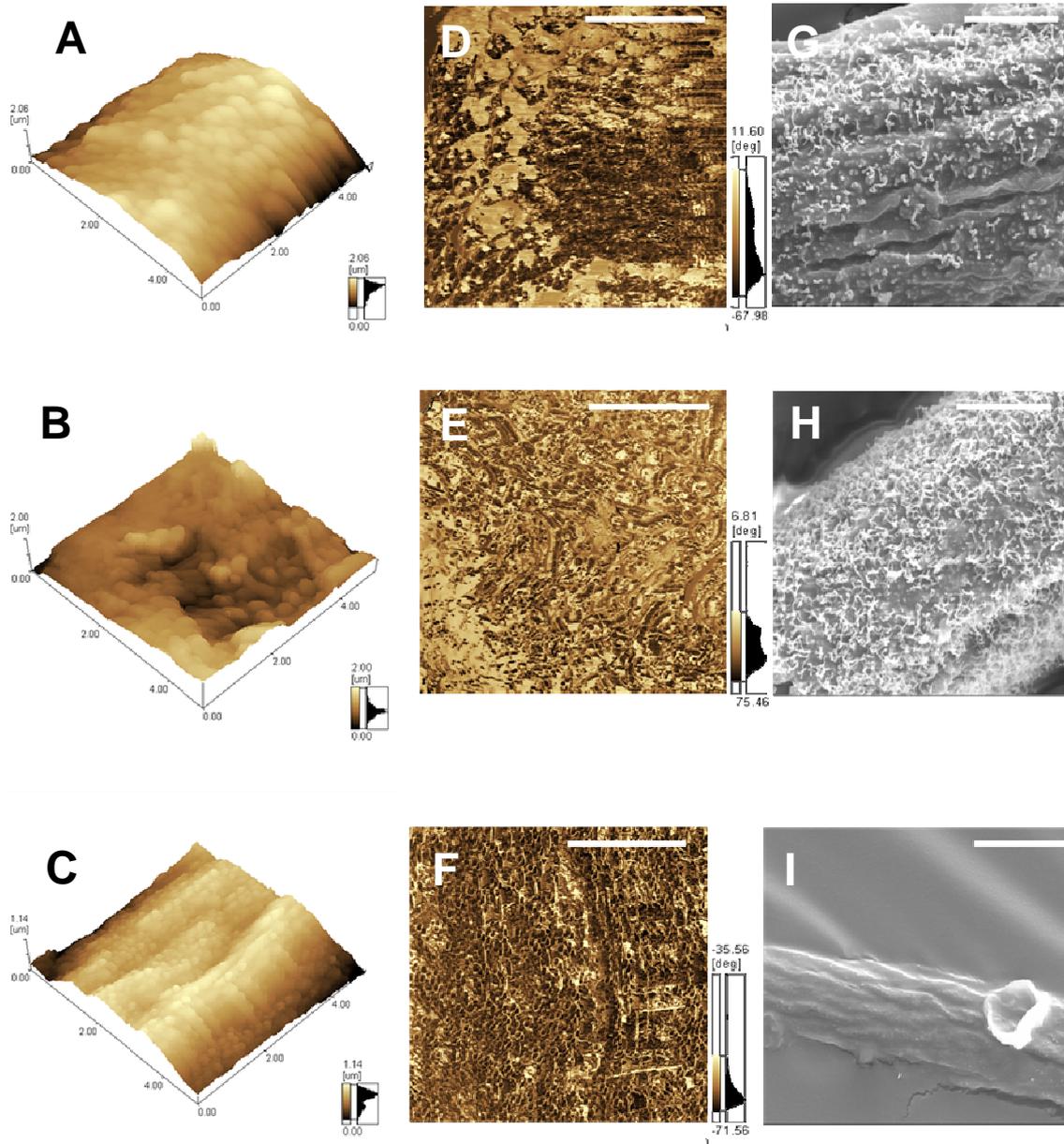


**Fig. 18** Imagens da superfície das fibras controle Y1S8<sub>20</sub> obtidas por meio de microscopia de força atômica (A, B, C, D, E, F) e microscopia eletrônica de varredura (G, H, I). As imagens de topografia representadas tridimensionalmente (A, B, C) e as imagens de fase (D, E, F) correspondem a uma área varrida de 5 × 5 μm. A escala nas imagens de fase corresponde a 2 μm. As imagens à direita correspondem a um aumento de 3000×, e a barra de escala corresponde a 10 μm. . A linha I representa a fibra YC<sub>1</sub>, a linha II a YC<sub>2</sub>, a linha III YC<sub>3</sub>

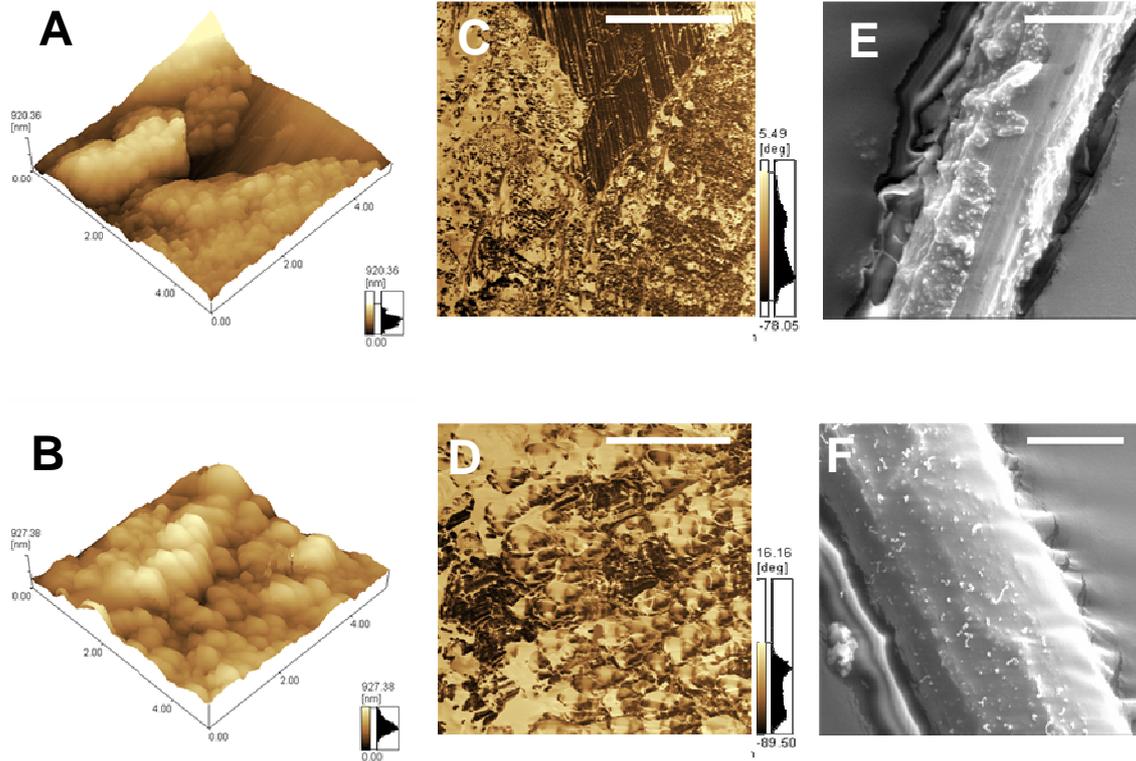
A variabilidade topográfica referente ao grupo Y pode ser observada (fig. 19 A, B, C, fig. 20 A, B). As fibras foram identificadas como YA<sub>1</sub>, YA<sub>2</sub>, YA<sub>3</sub>, YA<sub>4</sub> e YA<sub>5</sub>.

Diferenças no tamanho dos grânulos de superfície são claramente notadas, e a presença de depressões é verificada em algumas das imagens (fig. 19 B, fig. 20 A). Áreas mais planas, aparentemente menos rugosas podem também ser observadas (fig. 19 A, B, C). As imagens de fase revelam diferenças representativas entre as fibras, com predominância de regiões viscosas em algumas das áreas analisadas (fig. 19 D, E, F) e de regiões elásticas em outras (fig. 20 C, D).

Nenhum padrão pôde ser estabelecido para quaisquer dos grupos, já que a heterogeneidade observada foi bastante expressiva. Entretanto, uma diminuição da rugosidade local pode ter ocorrido para algumas áreas das fibras tratadas com água.



**Fig. 19** Imagens da superfície de três das fibras Y1S8<sub>20</sub> tratadas. As duas primeiras colunas correspondem a imagens de topografia (mais à esquerda) e de fase (à direita). Cada uma das imagens corresponde a uma mesma área de 5x5 μm em cada uma das fibras e a barra de escala representa 2 μm. A terceira coluna representa imagens de microscopia eletrônica de varredura para as mesmas fibras sob um aumento de 3000x. A barra de escala corresponde a 10 μm. A linha I representa a fibra YA<sub>1</sub>, a linha II a YA<sub>2</sub>, a linha III YA<sub>3</sub>.



**Fig. 20** Imagens da superfície de duas das fibras Y1S8<sub>20</sub> tratadas. As duas primeiras colunas correspondem a imagens de topografia (mais à esquerda) e de fase (à direita). Cada uma das imagens corresponde a uma mesma área de 5x5 µm em cada uma das fibras e a barra de escala representa 2 µm. A terceira coluna representa imagens de microscopia eletrônica de varredura para as mesmas fibras sob um aumento de 3000x. A barra de escala corresponde a 10 µm. A linha I representa a fibra YA<sub>4</sub> e a linha II a YA<sub>5</sub>.

As mesmas dificuldades encontradas durante a obtenção de imagens por MFA das fibras A1S8<sub>20</sub> foram observadas para as fibras Y1S8<sub>20</sub>. A aquisição de imagens por MEV permitiu a visualização em escala mais ampla, evidenciando as irregularidades da superfície das fibras, as quais podem ter contribuído largamente para as complicações surgidas durante a varredura por MFA.

### 8.2.1.2 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

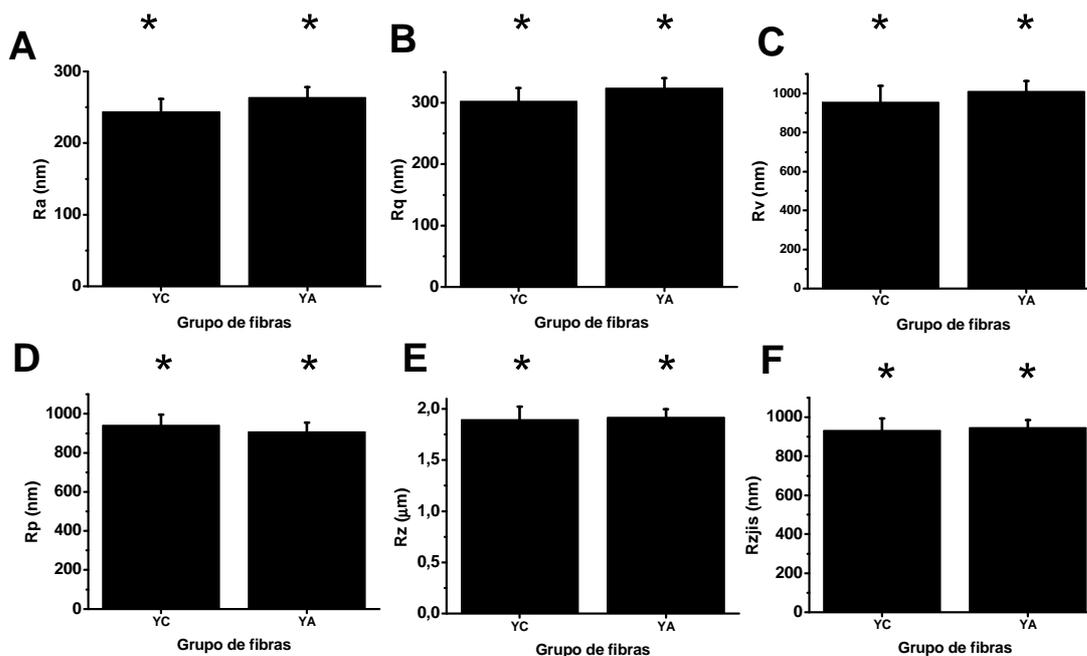
A heterogeneidade descrita também foi demonstrada pelas imagens de varredura de ambos os grupos. Fibras com características mais lisas foram observadas (fig. 18 G, fig. 19 I, fig. 20 F) e a presença de áreas granuladas intercaladas com áreas lisas também foi notada em algumas das regiões varridas (fig. 20 E). Algumas fibras apresentaram ainda fissuras longitudinais (fig. 19 G, H) e a presença de protuberâncias em forma de bolhas também foi observada em alguns casos (fig. 19 I).

A maioria das fibras Y1S8<sub>20</sub> apresentou, entretanto, possíveis tramas de nanofibrilas em suas superfícies, como demonstrado na fig. 18 H, I e na fig. 19 G, H. A aparência 'quebrada' de algumas superfícies também foi observada, evidenciando uma organização interna distinta, nitidamente mais lisa (Fig. 18 H, I). A presença de uma região interna diferenciada pode estar relacionada a certo nível de hierarquização da organização das fibras, já descrito em outros trabalhos sobre fibras nativas, que identificaram uma estrutura multicamadas (Gould *et al.*, 1999; Sponner *et al.*, 2007).

### 8.2.2 Medições de rugosidade de superfície

Os parâmetros de rugosidade obtidos por MFA foram também analisados para as fibras Y1S8<sub>20</sub>. A heterogeneidade de valores referentes à rugosidade média das amostras está expressa pelos erros-padrão da média observados.

Ra e os outros parâmetros de rugosidade foram organizados em gráficos, de maneira a permitir comparações entre os dois grupos analisados (fig. 21). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros de rugosidade, o que indica que o tratamento com água e o subsequente estiramento não alteram significativamente a rugosidade da superfície das fibras sintéticas Y1S8<sub>20</sub>.

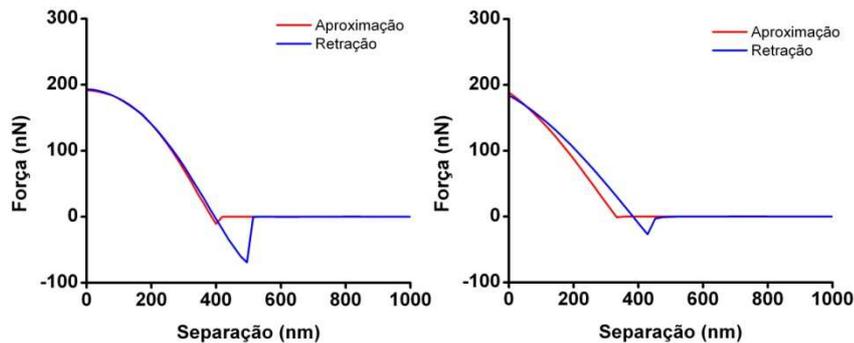


**Fig. 21** Análise de rugosidade das fibras Y1S8<sub>20</sub> por meio de MFA. Os parâmetros analisados estão dispostos no eixo Y de cada gráfico. Ra representa a rugosidade média aritmética, Rq a rugosidade quadrática média, Rzjis a rugosidade média de 10 pontos, Rz a altura máxima, Rp a altura média e Rv a profundidade média. O eixo X corresponde aos grupos de fibras A1S8<sub>20</sub>. YC grupo controle. YA grupo tratado. O símbolo \* indica semelhanças estatísticas entre os grupos.

Para verificar se o tratamento aplicado às fibras YA refletiu em suas propriedades mecânicas, medições de força foram realizadas de maneira a obter informações acerca das características elásticas das fibras, representadas pelo Módulo de Young.

### 8.2.3 Espectroscopia de força

A obtenção de curvas de força-separação evidenciou diferenças consideráveis nas propriedades medidas para as fibras analisadas, como demonstra a fig. 22. Houve diferenças significativas tanto entre os grupos quanto dentro de um mesmo grupo, o que aponta a heterogeneidade das fibras analisadas. O perfil das curvas divergiu substancialmente, bem como os pontos de descontinuidade representativos das interações de superfície.



**Fig. 22** Curvas de força-separação representativas dos 2 grupos Y1S8<sub>20</sub> analisados. A) Corresponde ao grupo YC. B) Grupo YA.

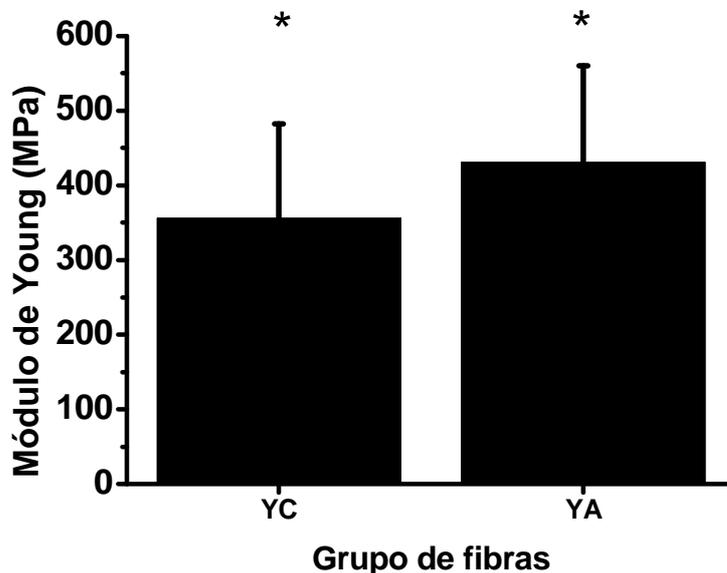
A partir das curvas obtidas foi possível analisar todos os parâmetros dispostos nas seções seguintes deste trabalho.

### 8.2.3.1 *Módulo de Young*

O módulo de elasticidade está representado na fig. 23. O módulo para as fibras tratadas apresentou-se ligeiramente maior, mas a diferença encontrada não é considerada significativa. De acordo com as avaliações de Shao e Vollrath, 1999 e Shaffer *et al.*, 2008, um provável efeito de plastificação das fibras seria esperado para o grupo tratado com água, o que resultaria em uma redução considerável do módulo de Young.

Os valores correspondentes ao módulo de Young indicam que o tratamento com água não altera as propriedades elásticas locais das fibras Y1S8<sub>20</sub>, apesar das expectativas de que a água interferisse nas ligações de hidrogênio da matriz amorfa das fibras, levando a uma possível reorganização de sua microestrutura (Shao e Vollrath, 1999; Liu *et al.*, 2005). Tais resultados podem, entretanto, ser reflexo do posterior estiramento das fibras tratadas. A tensão aplicada pode ter sido responsável por um rearranjo das ligações de hidrogênio, fazendo com que as fibras retornassem a um estado próximo ao original, não demonstrando diferenças estatísticas com respeito à elasticidade medida em relação ao grupo controle. O efeito de plastificação sugerido para as fibras tratadas com água pode ainda ter sido

temporário/reversível, como o descrito para fibras nativas (Blackledge, *et al.*, 2009), permitindo que as fibras sintéticas retornassem à sua condição inicial.

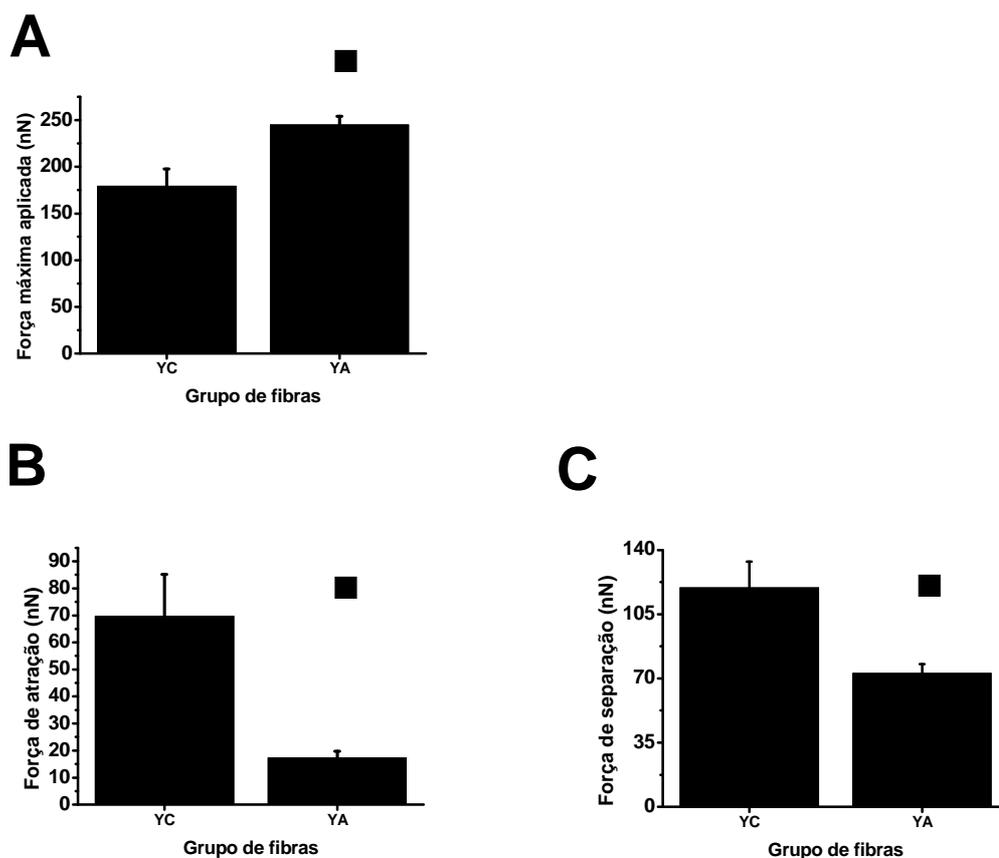


**Fig. 23** Módulo de elasticidade das fibras Y1S8<sub>20</sub> obtido por nanoindentação. YC representa o grupo não tratado. YA corresponde ao grupo submetido a tratamento com água e estiramento. O símbolo \* indica semelhança estatística entre os grupos.

Uma outra explicação para os resultados obtidos se baseia no fato que o grupo tratado com água, apesar de não ter demonstrado diferenças significativas com relação ao grupo controle, sugere uma tendência ao ganho de elasticidade, representada pela média de módulo de Young sutilmente mais alta. O aumento da elasticidade estaria possivelmente relacionado à formação de folhas- $\beta$  induzida pela água (Lawrence *et al.*, 2010), que permitiria uma estruturação mais correta das proteínas nas fibras. Essa hipótese poderia ser verificada com um número maior de repetições, abrangendo também um maior número de fibras.

### 8.2.3.2 **Forças medidas**

As forças medidas durante os experimentos de nanoindentação revelam diferenças significativas entre os dois grupos de fibras analisados (fig. 24). O grupo tratado YA apresentou uma elevação de 37% na média de força máxima aplicada ( $p < 0,01$ ), o que sugere um aumento da rigidez de superfície após o tratamento com água e o estiramento. Blackledge e colaboradores, 2009, sugerem que a supercontração das fibras possa resultar da reorientação das moléculas a níveis mais baixos de energia, após a quebra de ligações de hidrogênio entre as proteínas da seda. É possível que o aumento na dureza superficial observado tenha sido induzido pela reorientação das cadeias e que esse ganho em dureza tenha se tornado parcialmente irreversível após o estiramento, o que sugere que as cadeias amorfas tenham estabelecido novas ligações de hidrogênio preferencialmente àquelas da fibra em estado inicial, como já reportado para fibras nativas de aranha (Shao e Vollrath, 1999).



**Fig. 24** Forças relativas às fibras Y1S8<sub>20</sub> medidas durante os experimentos de nanoindentação. A) Força máxima aplicada. B) Força de atração. C) Força de separação (força adesiva). Os grupos de fibras estão dispostos no eixo x. YC representa o grupo não tratado e YA corresponde ao grupo submetido a tratamento com água e estiramento. O símbolo ■ representa as diferenças observadas, que foram consideradas significativas quando  $p < 0,01$ .

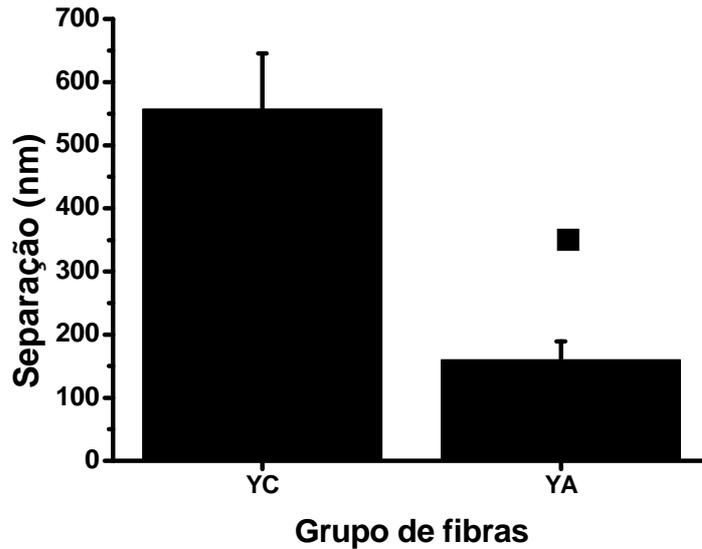
Com respeito às forças atrativas e adesivas medidas (Fig. 24 B, C), ficam evidentes os valores médios substancialmente mais altos registrados para o grupo de fibras não tratadas (controle). O grupo tratado exibiu, em relação ao grupo controle, diminuições de 75% e 39% nos valores registrados para as forças de atração e separação, respectivamente. Os dados obtidos corroboram a hipótese de que o tratamento com água implique alterações nas propriedades mecânicas, evidenciado pela diminuição das interações das fibras com outros materiais (a ponta do microscópio).

Sugere-se que a água penetre a estrutura das fibras, induzindo à sua reorganização. O estiramento também pode provocar o estabelecimento de novas ligações de hidrogênio, preferencialmente às existentes inicialmente (Shao e Vollrath, 1999). Aponta-se ainda a que a água seja capaz de induzir a formação de folhas- $\beta$  e promover o aumento do ordenamento e da estrutura secundária geral de filmes de fibroína da seda (Lawrence *et al.*, 2010). Com base nesse raciocínio, sugere-se que a reorganização das fibras tratadas e o aumento de sua estruturação podem ter levado à redução das forças de interação registradas. A formação de folhas- $\beta$  pode ter levado motivos em estado aleatório a se dobrarem corretamente, reduzindo a exposição de resíduos polares e carregados (presentes principalmente nas regiões terminais das proteínas) na superfície das fibras. Com uma melhor organização estrutural, menores as interações de van der Waals geradas por efeito de polarização, o que teria levado à redução das forças de atração registradas para o grupo YA.

Os resultados verificados para as forças adesivas medidas estão também possivelmente relacionados à melhoria da estrutura das fibras após o tratamento. A menor exposição de resíduos não dobrados levaria a uma redução da hidrofiliabilidade na superfície dessas fibras, o que implicaria em menor adsorção de água. Com isso, naturalmente, as forças capilares seriam consideravelmente reduzidas, hipótese que está de acordo com os resultados obtidos.

### 8.2.3.3 **Separação**

As medições de distância obtidas para os dois grupos Y1S8<sub>20</sub> estão representadas na fig. 25. Nota-se claramente a diminuição da profundidade média de indentação após o tratamento a que as fibras do grupo YA foram submetidas, tendo havido um decréscimo significativo de 71% nos valores registrados para este grupo ( $p < 0,01$ ). Tais resultados sugerem mais uma vez a existência de uma nova organização na superfície das fibras tratadas, que permitiram uma penetração muito reduzida da ponteira quando comparada à registrada para o grupo não tratado.



**Fig. 25** Medições de distância (profundidade de perfuração) das fibras Y1S8<sub>20</sub> durante os experimentos de nanoindentação. YC representa o grupo não tratado. YA corresponde ao grupo submetido a tratamento com água e estiramento. O símbolo ■ representa as diferenças observadas, que foram consideradas significativas quando  $p < 0,01$ .

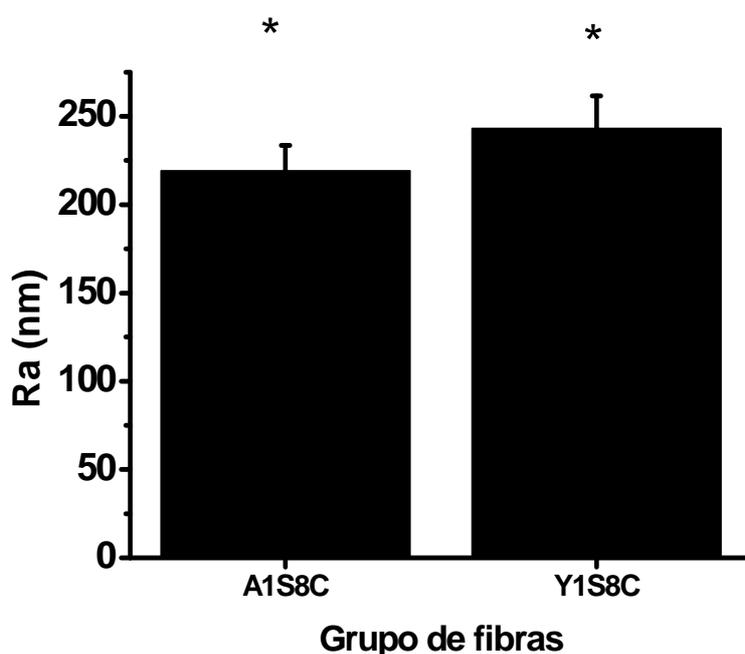
O sugerido ganho estrutural, relativo à formação de folhas- $\beta$  induzida pelo tratamento com água (Lawrence *et al.*, 2010) do grupo YA, pode ter contribuído para o aumento em dureza das superfícies das fibras tratadas, o que está evidenciado pelos baixos valores de separação medidos para esse grupo em relação ao grupo controle.

### 8.3 Comparações entre as fibras A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>

As diferenças na sequência das duas proteínas e as formas distintas de polimerização das fibras podem gerar características estruturais e mecânicas diferentes, tornando importante a comparação entre os dois grupos controle. Não é possível a comparação dos demais grupos, uma vez que os tratamentos aplicados foram diferentes.

### 8.3.1 Rugosidade média Ra

A rugosidade média dos grupos controles relativos às fibras sintéticas formadas pelas duas proteínas analisadas está representada na fig. 26. Não houve diferença significativa entre os grupos, o que sugere que a rugosidade de superfície não é alterada pelas modificações feitas nas sequências das proteínas sintéticas.



**Fig. 26** Rugosidade média comparativa entre os grupos controle das proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>. O símbolo \* indica semelhança estatística entre os dois grupos.

Os resultados indicam que a rugosidade de superfície de fibras sintéticas pode envolver fatores que vão além da sequência primária das proteínas e do método de polimerização das fibras. Supõe-se que a alta rugosidade observada para ambos os grupos de fibras sintéticas esteja parcialmente relacionada à agregação prematura das proteínas, formando estruturas como os glóbulos observados nas imagens de MFA. A extensa região C-terminal das proteínas nativas e as forças aplicadas no ducto de fiação são fundamentais para a manutenção da solubilidade das proteínas e para o seu correto alinhamento (Sponner *et al.*, 2005; Heim *et al.*, 2009), e as condições existentes no lúmen da glândula das aranhas parecem

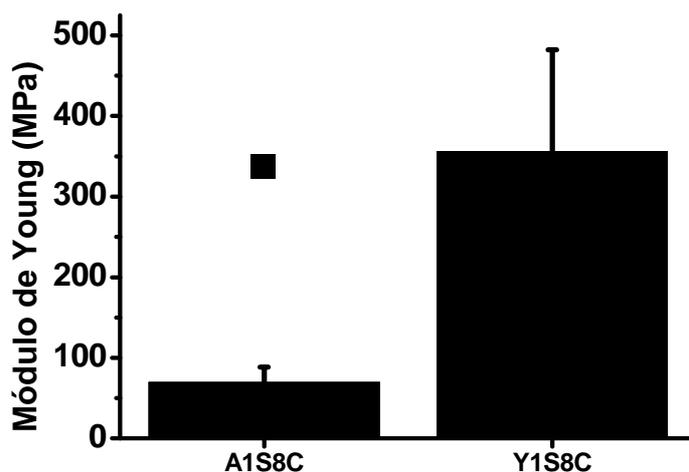
permitir que a montagem das proteínas aconteça da maneira correta (Romer e Sheibel, 2008).

A existência parcial das condições descritas pode resultar nos elevados valores de rugosidade observados. As proteínas podem não estar devidamente dobradas e alinhadas, aglomerando-se de forma inapropriada. Rammensee e colaboradores, 2008, relataram a obtenção de fibras com superfícies granulosas, atribuindo esse aspecto à imaturidade das fibras sintéticas, possivelmente relacionada à sua formação precoce ou a um estado intermediário de organização das proteínas.

As grandes diferenças entre os tratamentos aplicados às fibras formadas por cada uma das proteínas não permite comparação entre os grupos tratados.

### 8.3.2 Módulo de Young

As características elásticas dos grupos controle A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> estão representadas na fig. 27. Os resultados demonstram uma diferença significativa entre os módulos médios obtidos para os grupos analisado, tendo o grupo Y1S8 apresentado valor médio correspondente a 5,1× o valor exibido pelo grupo A1S8 ( $p < 0,05$ ).

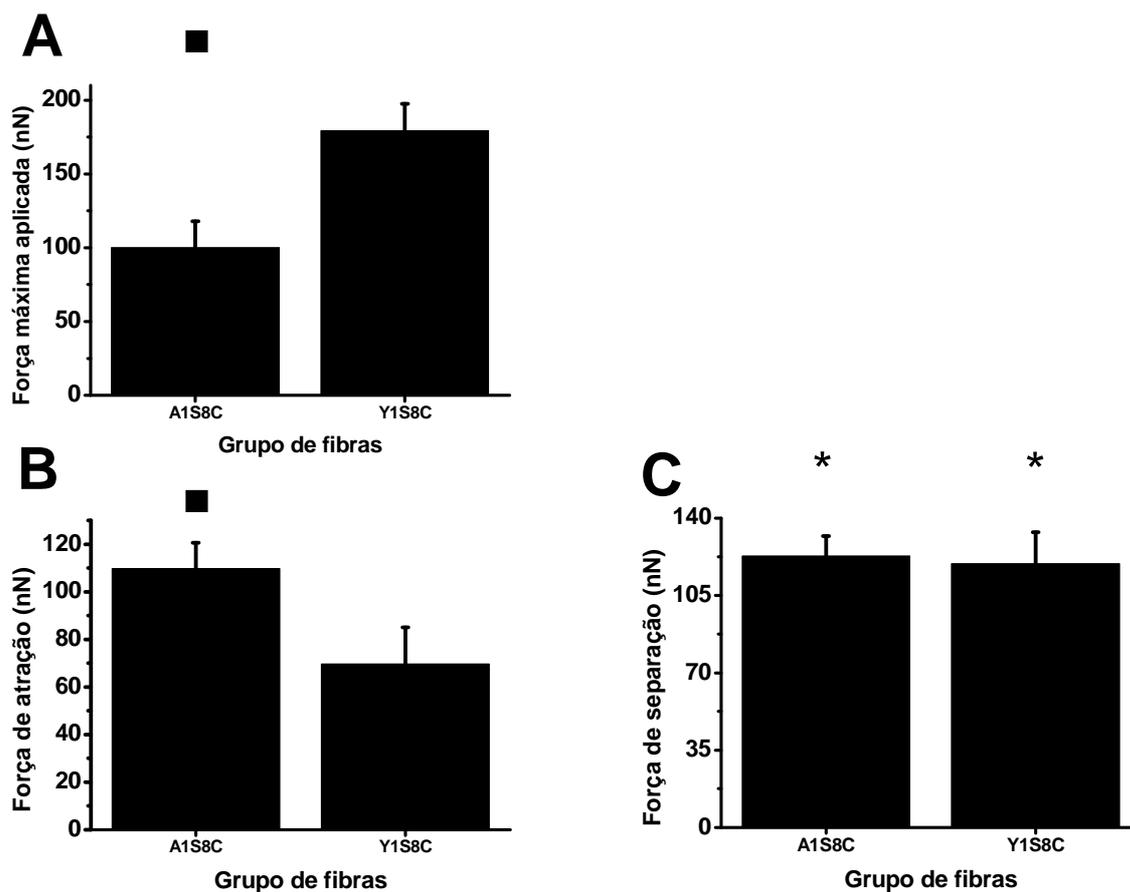


**Fig. 27** Módulos de elasticidade correspondentes aos grupos controle das fibras geradas a partir das proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub>. O símbolo ■ difere os dois grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos estão de acordo com as avaliações feitas por Teulé *et al.*, 2007, que descreveram a obtenção de valores inferiores de módulo para as fibras geradas por meio de 'wet spinning' em relação àquelas que formaram-se espontaneamente. Sugere-se que tal comportamento possa ser explicado pelo fato de que o ato de puxar o filme pré-formado para a separação das fibras sintéticas pode se assemelhar mais aos mecanismos de pós-fiação envolvidos na polimerização final das fibras nativas. Isso teria resultado então na melhoria da organização geral da fibra e, conseqüentemente, do seu desempenho. Os resíduos de tirosina e serina presentes na sequência repetitiva das proteínas Y1S8<sub>20</sub> parecem também ser indispensáveis para a estrutura das fibras do grupo Y1S8C. A possibilidade de formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os dois resíduos parece estabilizar a estrutura das fibras (Teulé *et al.*, 2007), o que se reflete nas propriedades mecânicas mensuradas.

### 8.3.3 Forças medidas

Em relação à força máxima medida (Fig. 28 A), o grupo A1S8 apresentou valores 44% inferiores aos registrados para o grupo Y1S8 ( $p < 0,01$ ). Os dados corroboram a hipótese de que as fibras Y1S8 possuam uma maior organização estrutural, refletida pelos altos valores de força máxima aplicados. Os níveis de organização distintos, como descrito por Teulé e colaboradores, 2007, podem ser resultantes das diferenças na sequência repetitiva das duas proteínas. O aumento e a estabilidade da formação de voltas- $\beta$  verificados para a proteína Y1S8<sub>20</sub> estão possivelmente ligados à presença de resíduos de tirosina e serina na sequência destas fibras, como já mencionado. O maior nível de organização estaria, portanto, relacionado às ligações de hidrogênio estabelecidas entre os dois resíduos, o que não acontece para as proteínas A1S8<sub>20</sub>.



**Fig. 28** Forças relativas aos grupos controle das fibras A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> medidas durante os experimentos de nanoindentação. A) Força máxima aplicada. B) Força de atração. C) Força de separação (força adesiva). YC representa o grupo não tratado. YA corresponde ao grupo submetido a tratamento com água e estiramento. O símbolo ■ indica a presença de diferenças significativas, enquanto \* indica semelhança entre os dois grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Para as forças atrativas medidas (fig. 28 B) o grupo A1S8C apresentou valores significativamente superiores, com uma média 57% mais alta que a observada para o grupo Y1S8C ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre os dois grupos quanto aos valores de forças adesivas medidos (fig. 28 C).

Aponta-se que a maior estruturação das fibras pertencentes ao grupo Y1S8C implicou a redução das forças de atração medidas. Os resíduos polares e carregados constituintes das fibras pertencentes a esse grupo estariam dobrados de maneira mais apropriada, reduzindo as interações superfície-ponteira -

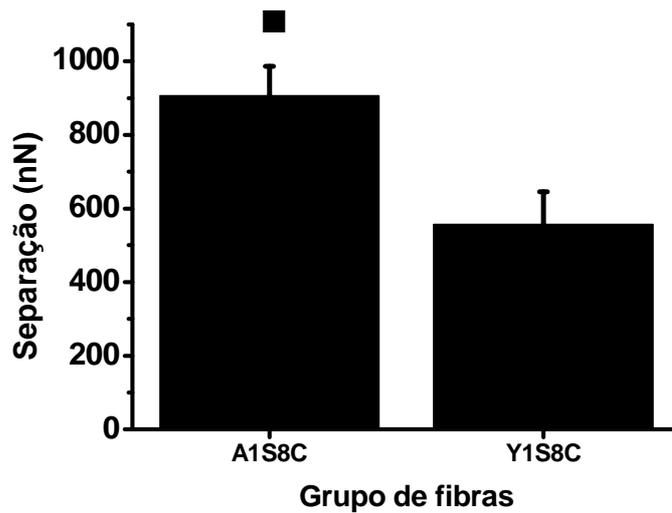
representadas principalmente pelas forças de van der Waals (Seo e Jhe, 2008) – o que teria refletido nos valores de forças atrativas medidos.

As medições das forças de separação (ou adesivas), representadas principalmente pelas forças capilares resultantes da adsorção de água na superfície das amostras (Cappella e Dietler, 1999), entretanto, não estão de acordo com os resultados esperados. Supunha-se que a maior organização estrutural das fibras pertencentes ao grupo Y1S8C resultasse na diminuição dos resíduos de aminoácidos expostos, reduzindo a hidrofiliicidade e, conseqüentemente, a espessura da camada de água na superfície. Desta forma, os valores de forças adesivas medidas para esse grupo seriam inferiores aos registrados para o grupo A1S8C.

Sugere-se que os resultados obtidos decorram principalmente do fato que, mesmo que corretamente dobradas, as regiões hidrofílicas permanecem ainda expostas ao contato com o vapor de água presente no ar, atraindo moléculas de água a serem adsorvidas às fibras. Os resíduos tirosina e serina presentes na sequência repetitiva das proteínas Y1S8<sub>20</sub> podem ser responsáveis por um aumento na hidrofiliicidade da superfície das fibras, o que resultaria na medição de forças adesivas (capilares) relativamente altas. Desta forma, as forças medidas para o grupo Y1S8C poderiam ser equiparáveis às medidas para o grupo A1S8C, ao qual é atribuída uma menor organização estrutural.

#### **8.3.4 Separação**

Os valores correspondentes às profundidades de perfuração registradas para os dois grupos estão representados na fig. 29. As distâncias medidas estão de acordo com as análises feitas para os parâmetros anteriores, e evidenciam média 39% inferior do grupo Y1S8 em relação ao A1S8 ( $p < 0,01$ ).



**Fig. 29** Medições de distância (profundidade de perfuração) relativas aos grupos controle das fibras A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> durante os experimentos de nanoindentação. O símbolo ■ indica a presença de diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os dois grupos.

Os resultados obtidos novamente corroboram a hipótese de que as fibras Y1S8<sub>20</sub> possuam maior organização estrutural. Os valores inferiores de distância de separação medidos indicam maior resistência e força superficial dessas fibras, o que provavelmente resulta das ligações de hidrogênio estabilizadoras formadas entre os resíduos de serina e tirosina constituintes da sequência das proteínas Y1S8<sub>20</sub> (Teulé *et al.*, 2007).

## 9 Conclusões e perspectivas

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho contribui para o entendimento mais aprofundado acerca da estrutura e das propriedades mecânicas de fibras sintéticas de aranha, oferecendo informações e análises ainda não exploradas em outros trabalhos da área. As proteínas A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> deram origem a fibras com características distintas, o que sugere que a sequência primária e a forma de montagem das fibras sintéticas estejam intimamente ligadas às características estruturais e mecânicas observadas.

Os tratamentos a que as fibras A1S8<sub>20</sub> foram submetidas influenciam diretamente sua organização estrutural, o que pode ser explorado de forma a desenvolver fibras com propriedades semelhantes às nativas. A aplicação de isopropanol demonstrou a melhora das fibras sintéticas tanto no seu aspecto visual como em desempenho. Os baixos erros padrão verificados para os grupos tratados com isopropanol em alguns dos parâmetros analisados sugerem ainda uma uniformização das fibras após o processamento. As fibras tratadas com metanol, por sua vez, demonstraram relativa piora em muitos dos aspectos analisados, o que indica que este pode não constituir o tipo mais adequado de tratamento para fibras solúveis de aranha. Com relação às fibras Y1S8<sub>20</sub>, ficou evidente que o tratamento com água influencia as propriedades mecânicas das fibras, levando a uma melhora em seu desempenho.

A rugosidade medida para as fibras controle A1S8<sub>20</sub> e Y1S8<sub>20</sub> mostrou que, em escala nanométrica, não houve diferenças topográficas substanciais entre os dois tipos de fibras analisados. Entretanto, a geração de curvas de força por MFA permitiu que parâmetros relevantes fossem quantificados de forma que características como elasticidade e força - intrínsecas a alguns tipos de fibras nativas de aranhas - pudessem ser avaliadas nas fibras sintéticas aqui analisadas, o que evidenciou diferenças consideráveis entre os dois grupos controle. O módulo de Young, as forças medidas e os valores de separação registrados mostram as fibras Y1S8<sub>20</sub> possuem a superfície mais elástica, rígida e resistente à penetração, o que sugere um maior nível de organização proporcionado por sua sequência primária.

A exploração dos recursos aqui descritos possibilita caracterização em escalas micro e nanométrica, o que permite compreender não apenas a organização das fibras *per se*, mas as consequências de suas estruturas secundárias e supersecundárias nas propriedades exibidas por essas fibras.

A utilização das técnicas descritas para caracterização de fibras de aranha sintéticas constitui um avanço importante para a ciência dos materiais. O domínio do entendimento acerca das características de superfície aqui descritas complementa as análises já desenvolvidas para as fibras de aranha, e permite contemplar novos parâmetros nunca antes considerados. A partir disso, espera-se que haja um rigor crescente com relação às análises de fibras, o que permitirá que suas características sejam melhoradas e que os objetivos sejam alcançados mais rapidamente. O controle da qualidade possibilitará, portanto, que materiais de alta qualidade com diversas finalidades e aplicações sejam desenvolvidos a partir das fibras sintéticas de aranhas.

## **10 Plano de publicação**

### **10.1 Título provisório**

Characterization of synthetic spider silk: an attempt to relate surface structure to the local mechanical properties of fibers under different treatments.

## 11 Referências Bibliográficas

Arcidiacono, S., C. M. Mello, M. Butler, E. Welsh, J. W. Soares, A. Allen, D. Ziegler, T. Laue, S. Chase. Aqueous Processing and Fiber Spinning of Recombinant Spider Silks. *Macromolecules*, v.35, n.4, p.1262-1266. 2002.

Atkins, E. Biomaterials: Silk's secrets. *Nature*, v.424, n.6952, p.1010-1010. 2003.

Ayoub, N. A., J. E. Garb, R. M. Tinghitella, M. A. Collin, C. Y. Hayashi. Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *Plos One*, v.2, n.6. 2007.

Ayrilmis, N., S. Korkut, E. Tanritanir, J. E. Winandy, S. Hiziroglu. Effect of various fire retardants on surface roughness of plywood. *Building and Environment*, v.41, n.7, p.887-892. 2006.

Becker, N., E. Oroudjev, S. Mutz, J. P. Cleveland, P. K. Hansma, C. Y. Hayashi, D. E. Makarov, H. G. Hansma. Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nature Materials*, v.2, n.4, p.278-283. 2003.

Bini, E., D. P. Knight, D. L. Kaplan. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *Journal of Molecular Biology*, v.335, n.1, p.27-40. 2004.

Binnig, G., C. F. Quate, C. Gerber. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, v.56, n.9, p.930. 1986.

Blackledge, T. A., J. E. Swindeman, C. Y. Hayashi. Quasistatic and continuous dynamic characterization of the mechanical properties of silk from the cobweb of the black widow spider *Latrodectus hesperus*. *Journal of Experimental Biology*, v.208, n.10, p.1937-1949. 2005.

Blackledge, T. A., C. Y. Hayashi. Unraveling the mechanical properties of composite silk threads spun by cribellate orb-weaving spiders. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, n. 16, p. 3131-3140. 2006.

Blackledge, T. A., C. Boutry, S.C. Wong, A. Baji, A. Dhinojwala, V. Sahni, Agnarsson, I. How is supercontraction? Persistent versus cyclic responses to humidity in spider dragline silk. *Journal of Experimental Biology*, v.212, n.13, p. 1981-1989. 2009.

Blasingame, E., T. Tuton-Blasingame, L. L. Arnold, M. F. L. Zhao, J. Fong, V. Vaidyanathan, A. Visperas, P. Geurts, X. Hu, C. LaMattina, C. Vierra. Pyriform spidroin 1, a novel member of the silk gene family that anchors dragline silk fibers in attachment discs of the Black Widow spider, *Latrodectus Hesperus*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.284, n.42, p.29097-29108. 2009.

- Bowen, W. R., R. W. Lovitt, C. J. Wright. Application of atomic force microscopy to the study of micromechanical properties of biological materials. *Biotechnology Letters*, v.22, n.11, p.893-903. 2000.
- Bram, A., C. I. Branden, C. Craig, I. Snigireva, C. Riekel. X-ray diffraction from single fibres of spider silk. *Journal of Applied Crystallography*, v.30, p.390-392. 1997.
- Brooks, A. E., S. M. Stricker, S. B. Joshi, T. J. Kamerzell, C. R. Middaugh, R. V. Lewis. Properties of synthetic spider silk fibers based on *Argiope aurantia* MaSp2. *Biomacromolecules*, v.9, n.6, p.1506-1510. 2008.
- Cappella, B., G. Dietler. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*, v.34, n.1-3, p.1-104. 1999.
- Carlisle, C. R., C. Coulais, M. Namboothiry, D. L. Carroll, R. R. Hantgan, M. Guthold. The mechanical properties of individual, electrospun fibrinogen fibers. *Biomaterials*, v.30, n.6, p.1205-1213. 2009.
- Challis, R. J., S. L. Goodacre, G. M. Hewitt. Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus. *Insect Molecular Biology*, v.15, n.1, p.45-56. 2006.
- Chen, X., Z. Shao, N. S. Marinkovic. Conformation transition kinetics of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, v.89, n.1, p.25-34. 2001.
- Chen, X., Z. Z. Shao, F. Vollrath. The spinning processes for spider silk. *Soft Matter*, v.2, n.6, p.448-451. 2006.
- Chowdhury, S., M. T. Laugier, I. Z. Rahman. Measurement of the mechanical properties of carbon nitride thin films from the nanoindentation loading curve. *Diamond and Related Materials*, v.13, n.4-8, p.1543-1548. 2004.
- Colgin, M. A., R. V. Lewis. Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like 'spacer regions'. *Protein Science*, v.7, n.3, p.667-672. 1998.
- Denny, M. The physical properties of spider's silk and their role in the design of orb-webs. *The Journal of Experimental Biology*, v.5, n.2, p. 483-506. 1976
- Dicko, C., D. Knight, J. M. Kenney, F. Vollrath. Secondary structures and conformational changes in flagelliform, cylindrical, major, and minor ampullate silk proteins. Temperature and concentration effects. *Biomacromolecules*, v.5, n.6, p.2105-2115. 2004.
- Dicko, C., Knight, J. M. Kenney, F. Vollrath. Conformational polymorphism, stability and aggregation in spider dragline silks proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.36, n.4, p.215-224. 2005.

Du, N., X. Y. Liu, J. Narayanan, L. A. Li, M. L. M. Lim ,D. Q. Li. Design of superior spider silk: From nanostructure to mechanical properties. *Biophysical Journal*, v.91, n.12, p.4528-4535. 2006.

Eaton, P. Atomic Force Microscopy (AFM): Atomic Force Microscope [internet]. Version 25. Knol. 2010 apr 27. Online at: <http://knol.google.com/k/peter-eaton/atomic-force-microscopy-afm/25laaiqlcn2x8/3>. Accessed June 5 2010.

Elias, C. N., Y. Oshida, J. H. C. Lima, C. A. Muller. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v.1, n.3, p.234-242. 2008.

Elices, M., G. R. Plaza, M. A. Arnedo, J. Perez-Rigueiro, F. G. Torres ,G. V. Guinea. Mechanical Behavior of Silk During the Evolution of Orb-Web Spinning Spiders. *Biomacromolecules*, v.10, n.7, p.1904-1910. 2009.

Fahnestock, S. R., L. A. Bedzyk. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.47, p.33 - 39. 1997.

Fahnestock, S. R., S. L. Irwin. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.47, p.23 - 32. 1997.

Fahnestock, S. R., Z. Yao, L. A. Bedzyk. Microbial production of spider silk proteins. *Journal of Biotechnology*, v.74, p.105 - 119. 2000.

Fotiadis, D., S. Scheuring, S. A. Muller, A. Engel, D. J. Muller. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron*, v.33, n.4, p.385-397. 2002.

Frische, S., A. B. Maunsbach, F. Vollrath. Elongate cavities and skin-core structure in *Nephila* spider silk observed by electron microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford*, v.189, p.64-70. 1998.

Fu, C. J., Z. Z. Shao ,V. Fritz. Animal silks: their structures, properties and artificial production. *Chemical Communications*, n.43, p.6515-6529. 2009.

Gaczynska, M., P. A. Osmulski. AFM of biological complexes: What can we learn? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.13, n.5, p.351-367. 2008.

Garb, J. E., T. Dimauro, V. Vo ,C. Y. Hayashi. Silk Genes Support the Single Origin of Orb Webs. *Science*, v.312, n.5781, June 23, 2006, p.1762-. 2006.

Gatesy, J., C. Hayashi, D. Motriuk, J. Woods, R. Lewis. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science*, v.291, n.5513, p. 2603-2605. 2001.

- Gould, S. A. C., K. T. Tran, J. C. Spagna, A. M. F. Moore, J. B. Shulman. Short and long range order of the morphology of silk from *Latrodectus hesperus* (Black Widow) as characterized by atomic force microscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.24, n.2-3, p.151-157. 1999.
- Grandbois, M., M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub. How Strong Is a Covalent Bond? *Science*, v.283, n.5408, March 12, 1999, p.1727-1730. 1999.
- Hakimi, O., D. P. Knight, M. M. Knight, M. F. Grahn, P. Vadgama. Ultrastructure of Insect and Spider Cocoon Silks. *Biomacromolecules*, v.7, n.10, 2901-2908. 2006.
- Hardy, J. G., L. M. Romer, T. R. Scheibel. Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*, v.49, n.20, p. 4309-4327. 2008.
- Hayashi, C. Y., R. V. Lewis. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *Journal of Molecular Biology*, v.275, n.5, p.773-784. 1998.
- Hayashi, C. Y., N. H. Shipley, R. V. Lewis. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.24, n.2-3, p.271-275. 1999.
- Hayashi, C. Y., T. A. Blackledge, R. V. Lewis. 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, n.10, p.1950-1959. 2004.
- Haq, S., R. Khan. Effect of detergents and hexafluoroisopropanol on the conformation of a non-helical and a helical plant protease inhibitor. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 36, n.1-2, p.47-53. 2005.
- Heim, M., C. B. Ackerschott, T. Scheibel. Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains. *Journal of Structural Biology*, v.170, n.2, p.420-425. 2010.
- Heim, M., D. Keerl, T. Scheibel. Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber. *Angewandte Chemie-International Edition*, v.48, n.20, p.3584-3596. 2009.
- Hijirida, D. H., K. G. Do, C. Michal, S. Wong, D. Zax, L. W. Jelinski. <sup>13</sup>C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophysical Journal*, v.71, n.6, p.3442-3447. 1996.
- Hinman, M. B., J. A. Jones, R. V. Lewis. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends in biotechnology*, v.18, p.374 - 379. 2000.
- Hinman, M. B., R. V. Lewis. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *The Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.27, September 25, 1992, p.19320-19324. 1992.

Huang, Z. B., X. M. Liao, G. F. Yin, Y. Q. Kang, Y. D. Yao. Segmented Nanofibrils of Spiral Silk in *Uloborus walckenaerius* Spider. *Journal of Physical Chemistry B*, v.113, n.15, p.5092-5097. 2009.

Huemmerich, D., T. Scheibel, F. Vollrath, S. Cohen, U. Gat, S. Ittah. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current Biology*, v.14, n.22, p.2070-2074. 2004.

Janus, J., G. Fauxpoint, Y. Arntz, H. Pelletier, O. Etienne. Surface roughness and morphology of three nanocomposites after two different polishing treatments by a multitechnique approach. *Dental Materials*, v.26, n.5, p.416-425. 2010.

Jagtap, R. N., A. H. Ambre. Overview literature on atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization. *Indian Journal of Engineering and Materials Sciences*, v.13, n.4, p.368-384. 2006.

Kesel, A. B., A. Martin, T. Seidl. Getting a grip on spider attachment: an AFM approach to microstructure adhesion in arthropods. *Smart Materials & Structures*, v.13, n.3, p.512-518. 2004.

Kitagawa, M., T. Kitayama. Mechanical properties of dragline and capture thread for the spider *Nephila clavata*. *Journal of Materials Science*, v.32, n.8, p.2005-2012. 1997.

Kluge, J. A., U. Rabotyagova, G. G. Leisk, D. L. Kaplan. Spider silks and their applications. *Trends in Biotechnology*, v.26, n.5, p.244-251. 2008.

Koenders, M. M. J. F., L. Yang, R. G. Wismans, K. O. Van Der Werf, D. P. Reinhardt, W. Daamen, M. L. Bennink, P. J. Dijkstra, T. H. Van Kuppevelt, J. Feijen. Microscale mechanical properties of single elastic fibers: The role of fibrillin-microfibrils. *Biomaterials*, v.30, n.13, p.2425-2432. 2009.

Kohler, T., F. Vollrath. Thread biomechanics in the two orb-weaving spiders *Araneus diadematus* (Araneae, Araneidae) and *Uloborus walckenaerius* (Araneae, Uloboridae). *Comparative Physiology and Biochemistry*, v.271, n.1, p.1-17, 1995.

Lawrence, B. A., C. A. Vierra, A. M. F. Moore. Molecular and mechanical properties of major ampullate silk of the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. *Biomacromolecules*, v.5, n.3, p.689-695. 2004.

Lawrence B. D., Wharram, S., Kluge, J. A., Leisk, G. G., Omenetto, F. G., Rosenblatt, M. I., D. L. Kaplan. Effect of Hydration on Silk Film Material Properties. *Macromolecular Journals*, v.10, n.4, p.393-403. 2010.

Lazaris, A., S. Arcidiacono, Y. Huang, J. F. Zhou, F. Duguay, N. Chretien, E. A. Welsh, J. W. Soares, C. N. Karatzas. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*, v.295, p.472 - 476. 2002.

Lefèvre, T., J. Leclerc, J.-F. Rioux-Dubé, T. Buffeteau, M.-C. Paquin, M.-E. Rousseau, I. Cloutier, M. Auger, S. M. Gagné, S. Boudreault, C. Cloutier, M. Pézolet.

Conformation of Spider Silk Proteins In Situ in the Intact Major Ampullate Gland and in Solution. *Biomacromolecules*, v.8, n.8, p.2342-2344. 2007.

Lehenkari, P. P., G. T. Charras, S. A. Nesbitt, M. A. Horton. How the atomic force microscope generates force–distance curves for a cell receptor and ligand. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, United Kingdom: Cambridge University Press, p.1462-3994. 2000.

Lewis, R. Unraveling the weave of spider silk. *Bioscience*, v.46, n.9, p.636-638. 1996.

Lewis, R. V., M. Hinman, S. Kothakota, M. J. Fournier. Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Expression and Purification* v.7, p.400 - 406. 1996.

Lewis, R. V., Spider Silk: Ancient Ideas for New Biomaterials. *Chemical Reviews*, v.106, n.9, p.3762-3774. 2006.

Li, S. F. Y., A. J. Mcghe, S. L. Tang. New Internal Structure of Spider Dragline Silk Revealed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, v.66, n.4, p.1209-1212. 1994.

Li, S. F. Y., A. J. Mcghe, S. L. Tang. Comparative-Study of the Internal Structures of Kevlar and Spider Silk by Atomic-Force Microscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films*, v.12, n.4, p.1891-1894. 1994.

Liu, Y., Z. Shao, F. Vollrath. Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk. *Nature materials*, v.4, n.12, p.901-905. 2005.

Madsen, B., Z. Z. Shao, F. Vollrath. Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.24, n.2-3, p.301-306. 1999.

Madsen, B., F. Vollrath. Mechanics and morphology of silk drawn from anesthetized spiders. *Naturwissenschaften*, v.87, n.3, p.148-153. 2000.

Marliere, S., D. Urma, J. –L. Florens, F. Marchi. Multi-sensorial interaction with a nano-scale phenomenon: the force curve. Presented at EuroHaptics, Munich, Germany. 2004.

Marszalek, P. E., A. F. Oberhauser, Y. P. Pang, J. M. Fernandez. Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature*, v.396, n.6712, p.661-664. 1998.

Moore, A. M. F., Tran. Material properties of cobweb silk from the black widow spider *Latrodectus hesperus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.24, n.2-3, p. 277-282. 1999.

Motriuk-Smith, D., A. Smith, C. Y. Hayashi, R. V. Lewis. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules*, v.6, n.6, p.3152-3159. 2005.

Mukhopadhyay, S., J. C. Sakhivel. Spider Silk - Providing New Insights in the Field of High Performance Materials. *Journal of Industrial Textiles*, v.35, n.2, October 1, 2005, p.91-113. 2005.

Oberhauser, A. F., P. E. Marszalek, H. P. Erickson, J. M. Fernandez. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature*, v.393, n.6681, p.181-185. 1998.

Oroudjev, E., J. Soares, S. Arcidiacono, J. B. Thompson, S. A. Fossey, H. G. Hansma. Segmented nanofibers of spider dragline silk: Atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* v.99, n. Suppl 2, April 30, 2002, p.6460-6465. 2002.

Pérez-rigueiro, J. M. Elices, J. Llorca, C. Viney. Tensile Properties of Argiope trifasciata Drag Line Silk Obtained from the Spider's Web. *Journal of Applied Polymer Science*, v.82, n.1, pp.2245-2251. 2001.

Pérez-Rigueiro, J., L. Biancotto, P. Corsini, E. Marsano, M. Elices, G.R. Plaza, G.V. Guinea. Supramolecular organization of regenerated silkworm silk fibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.44, n.2, p.195-202. 2009.

Piner, R. D., C. A. Mirkin. Effect of Water on Lateral Force Microscopy in Air. *Langmuir*, v.13, n.26, p.6864-6868. 1997.

Platnick, N. I. The world spider catalog, version 10.5. *American Museum of Natural History*, online at: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>. Accessed June, 5 2010.

Poza, P., J. Perez-Rigueiro, M. Elices, J. Llorca. Fractographic analysis of silkworm and spider silk. *Engineering Fracture Mechanics*, v.69, n.9, p.1035-1048. 2002.

Putman, C. A. J., K. O. Werf Van Der, B. G. Grooth De, N. F. Hulst Van, J. Greve. Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Applied Physics Letters*, v.64, n.18, p.2454-2456. 1994.

Putthanarat, S., N. Stribeck, S. A. Fossey, R. K. Eby, W. W. Adams. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer*, v.41, n.21, p.7735-7747. 2000.

Radmacher, M., M. Fritz, P. K. Hansma. Imaging Soft Samples with the Atomic-Force Microscope - Gelatin in Water and Propanol. *Biophysical Journal*, v.69, n.1, p.264-270. 1995.

Radmacher, M., M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland, P. K. Hansma. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal*, v.70, n.1, p.556-567. 1996.

- Rammensee, S., U. Slotta, T. Scheibel, A. R. Bausch. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v.105, n.18, May 6, 2008, p.6590-6595. 2008.
- Rief, M., H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Mol Biol*, v.6, n.4, p.346-349. 1999.
- Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science*, v.276, n.5315, May 16, 1997, p.1109-1112. 1997a.
- Rief, M., F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, v.275, n.5304, p.1295-1297. 1997b.
- Rising, A., G. Hjalm, W. Engstrom, J. Johansson. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules*, v.7, n.11, p.3120-3124. 2006.
- Robson, R. M. Microvoids in Bombyx mori silk. An electron microscope study. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.24, n.2-3, p.145-150. 1999.
- Romer, L., T. Scheibel. The elaborate structure of spider silk Structure and function of a natural high performance fiber. *Prion*, v.2, n.4, p.154-161. 2008.
- Rotsch, C., K. Jacobson, M. Radmacher. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.96, n.3, p.921-926. 1999.
- Schafer, A., M. Radmacher. Influence of myosin II activity on stiffness of fibroblast cells. *Acta Biomaterialia*, v.1, n.3, p.273-280. 2005.
- Schäfer, A., T. Vehoff, A. Glišović, T. Salditt. Spider silk softening by water uptake: an AFM study. *European Biophysics Journal*, v.37, n.2, p.197-204. 2008.
- Scheibel, T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial Cell Factories*, v.3, n.1, p.14. 2004.
- Scheller, J., U. Conrad. Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Current Opinion in Plant Biology*, v.8, n.2, p.188-196. 2005.
- Scheller, J., K. H. Guhrs, F. Grosse, U. Conrad. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnology*, v.19, n.6, p.573-577. 2001.
- Seo, Y., W. Jhe. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports on Progress in Physics*, v.71, n.1, p.1-24. 2008.

- Shao, Z. Z., F. Vollrath. The effect of solvents on the contraction and mechanical properties of spider silk. *Polymer*, v.40, n.7, p.1799-1806. 1999.
- Shao, Z., R. J. Young, F. Vollrath. The effect of solvents on spider silk studied by mechanical testing and single-fibre Raman spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 24, n.2-3, p. 295-300. 1999.
- Sirichaisit, J., V. L. Brookes, R. J. Young, F. Vollrath. Analysis of structure/property relationships in silkworm (*Bombyx mori*) and spider dragline (*Nephila edulis*) silks using Raman Spectroscopy. *Biomacromolecules*, v.4, n.2, p.387-394. 2003.
- Sneddon, I. N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, v.3, n.1, p.47-57. 1965.
- Sponner, A., E. Unger, F. Grosse, K. Weisshart. Conserved C-termini of Spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules*, v.5, p.840 - 845. 2004.
- Sponner, A., W. Vater, W. Rommerskirch, F. Vollrath, E. Unger, F. Grosse ,K. Weisshart. The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.338, n.2, p.897-902. 2005.
- Sponner, A., W. Vater, S. Monajembashi, E. Unger, F. Grosse ,K. Weisshart. Composition and Hierarchical Organisation of a Spider Silk. *Plos One*, v.2, n.10. 2007.
- Stark, M., S. Grip, A. Rising, M. Hedhammar, W. Engstrom, G. Hjalm, J. Johansson. Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules*, v.8, n.5, p.1695-1701. 2007.
- Strasser, S., A. Zink, M. Janko, W. M. Heckl, S. Thalhammer. Structural investigations on native collagen type I fibrils using AFM. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.354, n.1, p.27-32. 2007.
- Sulchek, T., R. Hsieh, J. D. Adams, S. C. Minne, C. F. Quate ,D. M. Adderton. High-speed atomic force microscopy in liquid. *Review of Scientific Instruments*, v.71, n.5, May, p.2097-2099. 2000.
- Swanson, B. O., S. P. Anderson, C. Digiovine, R. N. Ross, J. P. Dorsey. The evolution of complex biomaterial performance: The case of spider silk. *Integrative and Comparative Biology*, v.49, n.1, p.21-31. 2009.
- Swanson, B. O., T. A. Blackledge, J. Beltran, C. Y. Hayashi. Variation in the material properties of spider dragline silk across species. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, v.82, n.2, p.213-218. 2006.

- Tai, P. L., G. Y. Hwang, I. M. Tso. Inter-specific sequence conservation and intra-individual sequence variation in a spider silk gene. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.34, n.5, p.295-301. 2004.
- Tao, N. J., S. M. Lindsay, S. Lees. Measuring the Microelastic Properties of Biological-Material. *Biophysical Journal*, v.63, n.4, p.1165-1169. 1992.
- Teulé, F., A. R. Cooper, W. A. Furin, D. Bittencourt, E. L. Rech, A. Brooks, R. V. Lewis. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat. Protocols*, v.4, n.3, p.341-355. 2009.
- Teulé, F., W. A. Furin, A. R. Cooper, J. R. Duncan, R. V. Lewis. Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *Journal of Materials Science*, v.42, n.21, p.8974-8985. 2007.
- Tian, M., R. V. Lewis. Molecular characterization and evolutionary study of spider Tubuliform (eggcase) silk protein. *Biochemistry*, v.44, n.22, p.8006-8012. 2005.
- Tillinghast, E. K., S. F. Chase, M. A. Townley. Water Extraction by the Major Ampullate Duct During Silk Formation in the Spider, *Argiope aurantia* Lucas. *Journal of Insect Physiology*, v.30, n.7, p.591-&. 1984.
- Valois, C. R. A., L. P. Silva, R. B., Azevedo. Atomic Force Microscopy Study of Stainless-Steel and Nickel-Titanium Files. *Journal of Endodontics*, v. 31, n.12, p.882-885. 2005.
- Van Beek, J. D., S. Hess, F. Vollrath, B. H. Meier. The molecular structure of spider dragline silk: Folding and orientation of the protein backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, n.16, p.10266-10271. 2002.
- Vandijk, A. A., L. L. Vanwijk, A. Vanvliet, P. Haris, E. Vanswieten, G. I. Tesser, G. T. Robillard. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins .1. Model studies using cyclic and linear peptides. *Protein Science*, v.6, n.3, p.637-648. 1997.
- Vollrath, F., E. K. Tillinghast. Glycoprotein glue beneath a spider web's aqueous coat. *Naturwissenschaften*, v.78, n.12, p.557-559. 1991.
- Vollrath, F., T. Holtet, H. C. Thogersen, S. Frische. Structural organization of spider silk. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v.263, n.1367, p.147-151. 1996.
- Vollrath, F., D. P. Knight. Structure and function of the silk production pathway in the Spider *nephila edulis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.24, n.2-3, p.243-249. 1999.
- Vollrath, F., D. P. Knight, X. W. Hu. Silk production in a spider involves acid bath treatment. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v.265, n.1398, p.817-820. 1998.

Vollrath, F., B. Madsen, Z. Z. Shao. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v.268, n.1483, p.2339-2346. 2001.

Weisman, S., V. S. Haritos, J. S. Church, M. G. Huson, S. T. Mudie, A. J. W. Rodgers, G. J. Dumsday, T. D. Sutherland. Honeybee silk: Recombinant protein production, assembly and fiber spinning. *Biomaterials*, v.31, n.9, p.2695-2700. 2010.

Wen, H. X., X. Q. Lan, Y. S. Zhang, T. F. Zhao, Y. J. Wang, Z. Kajiura, M. Nakagaki. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Molecular Biology Reports*, v.37, n.4, p.1815-1821. 2010.

Winkler, S., D. L. Kaplan. Molecular biology of spider silk. *Reviews in Molecular Biotechnology*, v.74, n.2, p.85-93. 2000.

Work, R. W. Force-Elongation Behavior of Web Fibers and Silks Forcibly Obtained from Orb-Web-Spinning Spiders. *Textile Research Journal*, v.46, n.7, p.485-492. 1976.

Xia, XX., ZG. Qian, C. S. Ki, Y. H. Park, D. L. Kaplan, S. Y. Lee. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.107, n.32, p.14059-14063. 2010.

Xu, H. T., B. L. Fan, S. Y. Yu, Y. H. Huang, Z. H. Zhao, Z. X. Lian, Y. P. Dai, L. L. Wang, Z. L. Liu, J. Fei, N. Li. Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Animal Biotechnology*, v.18, p.1-12. 2007.

Zbik, M., R. G. Horn, N. Shaw. AFM study of paraffin wax surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.287, n.1-3, p.139-146. 2006.

Zhang, W. K., Q. B. Xu, S. Zou, H. B. Li, W. Q. Xu, X. Zhang, Z. Z. Shao, M. Kudera, H. E. Gaub. Single-molecule force spectroscopy on *Bombyx mori* silk fibroin by atomic force microscopy. *Langmuir*, v.16, n.9, p.4305-4308. 2000.

Zhou, H. Structural transitions in biopolymers: From DNA to protein to spider silk. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Frontiers of Applied Mathematics*, Singapore: World Scientific, p.77-94. 2007.