

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – CAMPUS MACAÉ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E CONSERVAÇÃO
(PPGCiAC)

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DAS TEIAS DRAGLINE,
TUBULIFORME E ACINIFORME E DA OOTECA DE *Nephilingis*
cruentata (ARANEAE: ARANEIDAE)**

Giovanni Torres Vargas

2018



UFRJ

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DAS TEIAS DRAGLINE,
TUBULIFORME E ACINIFORME E DA OOTECA DE *Nephilingis*
cruentata (ARANEAE: ARANEIDAE)**

Giovanni Torres Vargas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-Orientadora: Paula Alvarez Abreu

Macaé

Maio, 2018

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DAS TEIAS
DRAGLINE, TUBULIFORME E ACINIFORME E DA OOTECA DE
Nephilingis cruentata (ARANEAE: ARANEIDAE)**

Giovanni Torres Vargas

Orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-Orientadora: Paula Alvarez Abreu

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovado por:

Presidente, Prof. Rodrigo Nunes da Fonseca

Professora Analy Machado de Oliveira Leite

Professor Vinicius Albano Araujo

Macaé, RJ

Maiο, 2018

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Olga Inés Vargas Gaviria e José Uriel Torres Villegas

Ao meu irmão Daniel Torres Vargas

AGRADECIMENTOS

A primeira pessoa a quem devo agradecer é a minha mãe, **OLGA INÉS VARGAS GAVIRIA**, quem desde sempre esteve do meu lado para me apoiar em todas as minhas decisões na vida e tem me inspirado para dar o melhor de mim e enfrentar todos os obstáculos que a vida colocou na minha frente. Sem ela, nada disto aqui valeria a pena!

Ao meu irmão **DANIEL TORRES VARGAS** e ao meu pai **JOSÉ URIEL TORRES VILLEGAS**, que junto com minha mãe compõem meu núcleo familiar, e também sempre estão do meu lado para oferecer sua ajuda e valiosos conselhos.

Ao **RODRIGO NUNES DA FONSECA**, quem sem me conhecer depositou sua confiança em mim para me orientar, ter me acolhido como integrante do Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais. Agradeço pelo tempo investido, pelos conhecimentos compartilhados, que não são só acadêmicos, mas sim também sobre a vida do cientista. Agradeço também porque, além da orientação, me ofereceu sua amizade.

À **PAULA ALVAREZ ABREU**, minha co-orientadora que desempenhou uma função fundamental no desenvolvimento da pesquisa. Seus aportes na área da microbiologia foram importantíssimos, assim como sua disposição para resolver as dúvidas que surgiram ao longo destes dois anos de aprendizagem. Agradeço também às suas alunas **Karol, Daiane, Erline e Raíssa**, que sempre me ajudaram nos momentos que precisei.

À **ALESSANDRA DA SILVA ALVARENGA**, obrigado por ter sido o contato direto com o Rodrigo, que foi o primeiro passo para tornar uma realidade esse sonho de realizar uma pós-graduação na UFRJ, e pelos anos de amizade, pelo apoio que me deu desde o momento em que cheguei ao Brasil.

Aos professores **JACKSON MENEZES** e **NATÁLIA FEITOSA**, e em geral a todos os integrantes do **LABORATÓRIO INTEGRADO DE CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**, que foram minha família e ofereceram sempre sua amizade e tornaram-se minha família brasileira. Vocês são demais! Em especial quero destacar a amizade de **LEO e DIEGO**, com quem compartilhei tantos momentos de risadas e souberam também me ouvir quando precisei.

A todos meus **amigos da Colômbia** que sempre estiveram me incentivando a continuar e lutar por seguir em frente e não desistir nos momentos em que a saudade de casa bateu com força, especialmente a **ANDRÉS PATIÑO**, que desde sempre tem sido como um irmão para mim. Também a **ANGELA SALINAS, JULIÁN RESTREPO, ANDRÉS QUINTERO, DAVID GONZALES e SEBASTIÁN ESCOBAR**, por sempre me acompanhar, mesmo à distância.

Ao **JUAN** e **ORLANDO**, amigos inestimáveis, por tantos momentos engraçados ao longo destes dois anos, churrascos e histórias de piratas que dificilmente vamos esquecer. À **ALEJANDRA HUERFANO**, uma amiga que sempre disposta a ajudar, e me fez sentir perto de casa.

Agradeço à **MARCELA MORENO**, por sua nobreza e sincera companhia, por abrir um espaço para mim na sua vida e compartilhar comigo durante todo este tempo momentos inesquecíveis.

Ao **GAUC**, Grupo de aracnologia da Universidade de Caldas, pela troca continua de informações que ajudaram substancialmente com o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **JURUBATIME**, amigos da pelada de todas as quartas, que sempre foram momentos de relaxamento e risos.

À técnica do LICM **PAULA VERONESI** e ao professor **JOSÉ ROBERTO SILVA**, pela colaboração nos experimentos e a troca de informações que ajudaram a esclarecer as dúvidas que surgiram ao longo do mestrado, assim como ao engenheiro Elton John Robaina da Silva pela construção do aparelho para a extração da teia.

Agradecimentos aos **professores do PPG-CiAC**, que aportaram significativamente na minha formação profissional e pessoal com toda a informação que compartilharam comigo. A **meus amigos da turma de mestrado** que me acolheram muito bem e me ajudaram bastante, principalmente quando ainda nem sabia falar português.

Finalmente, agradeço à instituição de fomento **CAPES** pelos recursos econômicos para o desenvolvimento da pesquisa e meu sustento.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Filo Arthrópoda	1
1.2. Classe Arachnida	1
1.3. Ordem Araneae	2
1.3.1. Morfologia das aranhas	2
1.3.2. Ootecas	5
1.3.3. Teias	6
1.3.3.1. Teias Ampola maior, Tubuliforme e Aciniforme	9
1.4. <i>Nephilingis cruentata</i> (Fabricius, 1775)	11
1.5. Aplicações da teia de aranha	12
1.5.1. Controle de micro-organismos	13
1.5.2. <i>Candida albicans</i>	14
1.5.3. <i>Aspergillus flavus</i>	15
1.5.4. <i>Escherichia coli</i>	15
1.5.5. <i>Enterococcus faecalis</i>	16
1.5.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.6. JUSTIFICATIVA	18
II. OBJETIVOS	19
III. METODOLOGIA	20
3.1. Padronização do protocolo de extração das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme de <i>N. cruentata</i>	20
3.2. Avaliação e inativação de micro-organismos na teia Dragline de <i>N. cruentata</i>	21
3.3. Identificação de proteínas presentes nas teias Dragline e Tubuliforme de <i>N. cruentata</i>	22
3.4. Avaliação da presença de DNA bacteriano presentes na teia Dragline <i>N. cruentata</i>	22
3.5. Testes antimicrobianos	23
3.5.1. Testes antimicrobianos com teia Dragline	24
3.5.2. Testes antimicrobianos com Ooteca	25
3.6. Eletroforese de gel nativo para isolamento de proteínas da teia	25
IV RESULTADOS	27
4.1. Padronização do protocolo de extração das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme de <i>N. cruentata</i>	27

4.2. Avaliação da presença de micro-organismos na teia Dragline de <i>N. cruentata</i>	27
4.3. Identificação de proteínas presentes nas teias Dragline e Tubuliforme de <i>N. cruentata</i>	29
4.4. Testes antimicrobianos	31
4.5. Eletroforese de gel nativo para isolamento de proteínas da teia.....	35
V. DISCUSSÃO	38
5.1. Padronização para a obtenção das teias.....	38
5.2. Avaliação da presença de micro-organismos na teia Dragline <i>N. cruentata</i>	40
5.3. Identificação de proteínas presentes nas teias Dragline e Tubuiforme de <i>N. cruentata</i>	41
5.4. Testes antimicrobianos	42
5.4. Eletroforese de gel nativo para isolamento de proteínas das teias.....	45
VI. CONCLUSÕES	47
VII. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resumo da árvore filogenética da análise concatenada de seis marcadores, sendo três de genomas mitocôndrias (12S, 16S e COI) e três de genomas nucleares (histona H3, 18S e 28S) obtidos sob máxima verossimilhança, restringida por grupos altamente apoiados a partir da análise transcriptômica, quatro terminais instáveis podados (análise C-ML-P). Extraído de Wheeler et al., (2017).....3
- Figura 2.** Características morfológicas externas ventrais (A) e dorsais (B) das aranhas, destacando a posição das fiandeiras, lugar pelo qual a teia é extraída, no extremo inferior do opistosoma. Extraído de ARACHNO HOBBY BRASIL (2017).....4
- Figura 3.** Desenho esquemático da anatomia interna de uma aranha, destacando seus órgãos principais, entre eles as fiandeiras e as glândulas produtoras de seda na parte região do opistosoma. Extraído de VeVET (2013).....5
- Figura 4.** Um dos vários tipos de ooteca existentes em aranhas. (A) Ooteca *N. cruentata* com a camada externa de teia; e (B) ooteca de *N. cruentata* sem a camada externa de teia.....6
- Figura 5.** Representação das glândulas produtoras de teia, diferenciadas aqui por cores no opistosoma e sua função na teia orbicular, e da localização de pontos onde acontecem alguns passos da produção da teia. Os círculos de cores representam o número de proteínas em cada glândula. A seda sai do abdômen através das fiandeiras. Retirado a partir de Altounian & Pennisi, (2017).....8
- Figura 6.** Diagrama (sem escala) do ducto de dragline de *Araneus*, mostrando a posição da zona em que a teia fluida muda para fio, que é observado do lado esquerdo, sob várias condições de rotação. (A) zona de transição na ponta do Spigot quando o excesso de teia fluida está disponível; (B) zona de transição na válvula de controle quando a quantidade de teia fluida disponível está balanceada com a extração; (C) zona de transição na região em loop do ducto quando a teia fluida disponível é insuficiente para equilibrar a extração; e (D) ponto de ruptura da seda sob tensão extrema. Figura retirada de Wilson (1962).....9
- Figura 7.** Modelo de estudo: fêmea adulta de *N. cruentata*, foto de R. Joque, Adaptado de Kuntner (2007).....12
- Figura 8.** Ferramentas utilizadas na extração da teia Dragline: (6A) Aparelho para extração da teia Dragline. (6B) lâmpada, estereoscópio, pincel e fonte de energia (PC).....21
- Figura 9.** Leitura dos resultados da exposição da teia Dragline à luz UV em diferentes tempos de exposição: Como zero (sem exposição, 30, 45 e 60 min). Observa-se ausência de microorganismos só na amostra exposta durante 60 minutos.....29
- Figura 10.** SDS-PAGE das proteínas das teias Dragline (DRA) e Tubuliforme (TUB) de *N. cruentata*. São três as BANDAS facilmente detectáveis na teia Dragline (A, B e C) com outras bandas mais finas que o corante não marcou o suficiente. Na teia Tubuliforme, são 5 as proteínas maioritárias, com presença também de outras bandas mais finas ao longo do poço.....30

- Figura 11.** Gel de Agarose (1,2%) com o padrão de peso molecular (PM), DNA bacteriano do queijo Kefir (BAC) e teia Dragline (TEIA). Observa-se ausência de DNA bacteriano no poço TEIA.....31
- Figura 12.** Análise do potencial inibitório da teia pura Dragline estéril e não estéril sobre o crescimento de (A) *A. flavus*, (B) *C. albicans*, (C) *E. coli*, (D) *E. faecalis* e (E) *S. aureus*. O (+) representa a teia exposta à luz UV e o (-) representa a teia não exposta.....32
- Figura 13** Avaliação do potencial inibitório da teia Dragline de *N. cruentata* suspensa na mistura de ácido clorídrico e ácido propanoico (m+) e o controle negativo (os ácidos sem a teia) (m-). (A) *A. flavus*, (B) *S. aureus*, (C) *C. albicans* e (D) *E. faecalis*.....33
- Figura 14.** Análise da potencial inibição da teia Dragline de *N. cruentata* suspendida Acetona, representada com o número 1, e o controle negativo (Acetona só), representada com o número 2. (A) *C. albicans*, (B) *E. coli*, (C) *S. aureus* e (D) *E. faecalis*. A ausência do disco 2 na placa que contém *E. faecalis* foi considerada irrelevante devido à ausência de halo de inibição no disco 1) não apresentam halo de inibição nem na mistura com teia nem no controle.....34
- Figura 15.** Leitura dos resultados do teste antimicrobiano feito com o conteúdo da ooteca de *N. cruentata*. (A) *A. flavus*, (B) *C. albicans*, (C) *E. coli* (DH5 α) e (D) *S. aureus*. O conteúdo da ooteca só teve halo de inibição *E. coli*. As letras N e V, representam ootecas Novas e Velhas, respectivamente.....35
- Figura 16.** Gel nativo, concentração 7% com amostras de teias Aciniforme (ACIN), Tubuliforme (TUB) e Dragline (DRA). Ao longo de cada poço é possível reconhecer uma série de bandas que foram isoladas para posteriormente serem usadas nos testes antimicrobianos.....36
- Figura 17.** Leitura dos resultados dos testes antimicrobianos feitos com *E. coli* (DH5 α) (A, B e C) e *S. aureus* (D, E e F). Tx1, Tx2, Tx3, Tx4 e Tx5 correspondem com as bandas isoladas do poço que contém a amostra da teia Tubuliforme; Ti1 e Ti2, com as bandas isoladas que contém a amostra da teia Aciniforme; D1, uma das 4 bandas isoladas da amostra que contém a teia Dragline; e C, banda isolada do poço 9 usado como controle negativo.....37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diferentes glândulas produtoras de teia e sua função. Adaptado de Vasanthavada et al. (2012).....7
- Tabela 2.** Extração de teia Dragline com os detalhes para cada um dos 93 indivíduos: tempo de extração (em segundos), velocidade média de extração e metros totais de teia extraída.....28
- Tabela 3.** Exposição de amostras de teia à luz UV com diferentes tempos (30, 45 e 60 min) e o controle negativo. (+) representa crescimento de micro-organismos; (-) representa ausência de crescimento de micro-organismos.....29
- Tabela 4.** Leitura das amostras em NanoDrop 2000c com amostras de teia Dragline, pata de aranha e controle (branco). Unidades em ng/ μ l.....32

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS (Ordenação livre)

- A: Alanina
- ACIN: aciniforme
- AcSp: do inglês, *Aciniform Silk protein* (Proteína de teia Aciniforme)
- AM: Ampola Maior
- ATCC: do inglês *American Type Culture Collection* (Coleção de Tipo de Cultura Americana)
- BAC: bactéria
- BHI: ágar infusão cérebro-coração
- BN-PAGE: do inglês, *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese de gel de poliacrilamida azul nativo)
- cm/s: centímetros por segundo
- mA: mili Amperes
- CO₂: gás carbônico
- COI: citocromo C oxidase subunidade 1
- DNA: do inglês, *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DRA: Dragline
- G: Glicina
- HPLC: do inglês, *High performance liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- kDa: quilodalton
- LICM: Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais
- LIB: Laboratório Integrado de Bioquímica (LIB)
- LLA: Laboratório de Limnologia Aquática
- m/s: metros por segundo
- m-: controle negativo (os ácidos sem a teia)
- m+: mistura de ácido clorídrico e ácido propanoico
- MaSp-a: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - a)
- MaSp-b: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - b)
- MaSp-c: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - c)
- MaSp-d: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - d)
- MaSp-e: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - e)

MaSp-f: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - f)
MaSp-g: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - g)
MaSp-h: do inglês, *Major ampullate Silk protein* (Proteína de teia Ampola maior - h)
MH: ágar Mueller Hinton
Min: minutos
MW: do inglês, *molecular weight* (peso molecular)
N: ooteca nova
nm: nanômetros
PBS: do inglês, *Phosphate-Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)
PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (Reação Da Polimerase Em Cadeia)
RNA: do inglês, *Ribonucleic Acid* (Acido Ribonucleico)
RT-PCR: do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Reação Da Polimerase Em Cadeia De Transcrição Reversa)
SDS: do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate* (Sódio Doecil Sulfato)
SDS-PAGE: do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese De Gel De Poliacrilamida -Sódio Doecil Sulfato)
TEIA: Teia Dragline
TEMED: Tetrametiletilenodiamina
Ti1 e Ti2: correspondem com as bandas isoladas do poço que contém a amostra da teia Aciniforme
TUB: Tubuliforme
TuSp: do inglês, *Tubuliform Silk protein* (Proteína de teia Tubuliforme)
Tx1, Tx2, Tx3, Tx4 e Tx5: correspondem com as bandas isoladas do poço que contém a amostra da teia Tubuliforme
UV: ultravioleta
v/v: volume por volume

RESUMO

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DAS TEIAS DRAGLINE,
TUBULIFORME E ACINIFORME E DA OOTECA DE *Nephilingis cruentata*
(ARANEAE: ARANEIDAE)

Giovanni Torres Vargas

Orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-Orientadora: Paula Alvarez Abreu

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

A classe Arachnida faz parte do filo Arthropoda, contém 11 ordens, entre os quais está Araneae. As aranhas contam com características vitais, entre elas a produção de teia e veneno, que são usadas ao longo da sua vida. As aranhas que constroem teias orbiculares, possuem sete tipos de glândulas especializadas na elaboração de teia e cada uma tem sua função biológica e composição bioquímica determinada. Dentre estas glândulas, encontram-se a Dragline, Tubuliforme e Aciniforme, com as funções de linha de arrasto no caso da primeira e envoltura e proteção da ooteca no caso das outras duas. A composição das teias é majoritariamente de espidroínas. As ootecas podem variar amplamente entre os tipos de aranhas, mas todas têm a função de oferecer proteção contra o vento, dessecação, ataques e micro-organismos. Tanto as teias de aranha quanto o conteúdo da ooteca em certas aranhas, tem demonstrado ter ação antimicrobiana. Frente à alta capacidade de mutação dos micro-organismos e a resistência destes aos fármacos existentes, é importante o desenvolvimento de pesquisas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Por conta disso, o objetivo deste estudo é avaliar a potencial atividade antimicrobiana das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme e do conteúdo da ooteca contra as cepas dos fungos *Aspergills flavus* e

Candida albicans, e as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. A Dragline foi obtida por extração mecânica, enquanto a Tubuliforme e Aciniforme foram obtidas das ootecas. Foram obtidos 3.065 m de teia Dragline com uma velocidade média de 2,62 cm/s. Dragline foi testada pura, e diluída em acetona e na mistura de ácido propanoico e clorídrico. Foi feito SDS-PAGE para observar a composição de proteínas das teias, e extração de DNA da teia Dragline para determinar se a ação antimicrobiana ocorreu por conta da produção destas substâncias por micro-organismos presentes nas amostras. A ooteca foi macerada, centrifugada e foi usado o sobrenadante nos testes antimicrobianos. Foi feito um BN-PAGE para separar as proteínas das teias, macerá-las com PBS autoclavado e testar sua ação antimicrobiana. A amplificação de DNA não demonstrou presença de bactérias nesta teia. O SDS-PAGE permitiu observar principalmente proteínas de alto peso molecular, algumas das quais são similares com os pesos moleculares estabelecidos em outras pesquisas. A Dragline não teve ação antimicrobiana, nem pura nem diluída nos solventes estabelecidos, enquanto o conteúdo da ooteca teve ação antibacteriana contra *E. coli*. É importante abordar novos experimentos com o conteúdo da ooteca e proteínas de teia de baixo peso molecular, pois de acordo com outras pesquisas, peptídeos de baixo peso molecular podem oferecer melhores resultados.

Palavras chave: Espidroína, teia de aranha, ooteca, antibacteriano, antifúngico

Macaé

Maio, 2018

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF DRAGLINE, TUBULIFORM AND
ACINIFORM SILKS AND COCCON OF *Nephilingis cruentata* (ARANEAE:
ARANEIDAE)

Giovanni Torres Vargas

Orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-Orientadora: Paula Alvarez Abreu

Abstract da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

The class Arachnida is part of the phylum, has 11 orders, such as Araneae. Spiders have unique features, such as production of silk and poison, which are essential throughout their lives. Spiders that build orbicular webs have seven types of specialized glands for web preparation and each of them has a determined biological function and biochemical composition. Among these glands, Dragline, Tubuliform and Aciniform function on drag line, coccon covering and coccon protection, respectively. Webs are composed mainly by spidroins. The coccons can vary widely among types of spiders, however all of them offer protection against wind, dryness, attacks and microorganisms. Both the spider webs and the coccon contents of some spiders have shown antimicrobial activity. Against microorganisms' capacity of change and make conventional medicines obsolete, is important to research aiming to find new compounds that can inhibit their growth against the fungi *A. flavus* and *C. albicans* and bacteria *E. coli*, *S. aureus* and *E. faecalis*. The Dragline was obtained by mechanical extraction, while Tubuliform and Aciniform were obtained from the coccons. 3065 meters of Dragline web was obtained with average speed of 2,62 m/s, which is in the speed range that spiders naturally build their orbicular webs, showing the importance of the equipment for the development of this research, which has improved features when compared to previously developed ones. Draglines were tested pure, diluted in acetone and in a mixture of propanoic

andhydrochloric acid. A SDS-PAGE was done to see web proteins and bacterial DNA extraction of Dragline web to determine if the antimicrobial activity was because of some bacteria in the samples. The cocoon was macerated, centrifuged and supernatant was collected for antimicrobial tests. A BN-PAGE was done to separate web proteins that were macerated with autoclaved PBS and tested for antimicrobial activity. DNA extraction didn't show presence of bacteria in this web, suggesting that its antimicrobial activity would be the result of its own compounds. SDS-PAGE allowed mostly the observation of high molecular weight proteins, some of which match with the molecular weights established in other studies. Pure Dragline didn't have antimicrobial activity, and when diluted in acids, showed the same result. Cocoon content showed antibacterial activity against *E. coli*. Acetone didn't show capacity of diluting antimicrobial compounds. It is important to approach new experiments with cocoon content and low molecular weight proteins, since, according to other studies, peptides with low molecular weight may offer better results.

Key words: Spidroin, Antibacterial, antifungal, spider silk, ootheca.

Macaé

Maio, 2018

I. INTRODUÇÃO

1.1. Filo Artrópoda

O Filo Arthropoda é o mais diversificado grupo do clado Ecdysozoa, com mais de 1,5 milhões de espécies descritas, compreendendo cerca de 80% do total das espécies do reino animal (Zhang, 2011; Giribet & Edgecombe, 2013). Os primeiros artrópodes provavelmente apareceram nos mares do Pré-cambriano há 600 milhões de anos e no início do Cambriano, verdadeiros crustáceos já se encontravam bem estabelecidos (Brusca & Brusca, 2005). O filo Arthropoda é atualmente dividido em cinco subfilos: Trilobitomorpha (extintos), Crustacea, Hexapoda, Myriapoda e Chelicerata (Brusca & Brusca, 2005; Zhang, 2011).

O subfilo Chelicerata, além das características básicas comuns aos artrópodes, pode se distinguir por características únicas como, por exemplo, corpo dividido em dois tagmas principais, prossoma e opistossoma, a presença de olhos simples na região mediana e olhos laterais compostos, sendo estes visíveis morfologicamente só nos estados embrionários finais ou estados pós-embrionários (Schomburg et al., 2015) e ausência de antenas (Brusca & Brusca, 2005). Outras características que definem Chelicerata são: sua especificidade por lectinas séricas (Vasta & Marchalonis, 1983) e quelíceras como autapomorfias resultantes de uma modificação de antenas deutocerebrais em artrópodes mandibulados (Legg et al., 2013) baseado em caracteres morfológicos e moleculares. Dentro do subfilo Chelicerata encontra-se a classe Arachnida.

1.2. Classe Arachnida

Algumas das características que definem a classe Arachnida são: prossoma total ou parcialmente coberto por um escudo semelhante a um capacete, opistossoma segmentado ou não segmentado, dividido ou não; apêndices do opistossoma ausentes ou modificados como fiandeiras (aranhas) ou pentes (escorpiões); pênis ausentes (exceto em Opiliones e alguns Acaros); troca gasosa por traqueia, pulmões foliáceos, ou ambos; e, terrestrialização quase total dos seus membros (Brusca & Brusca, 2005). A classe é composta por 11 ordens: Acari, Amblypygi, Araneae, Opiliones, Palpigradi, Pseudoscorpionida, Ricinulei, Schizomida, Scorpiones, Solifugae e Uropygi

(Thelyphonida) (Savory, 1964; Wheeler & Hayashi, 1998; Harvey, 2002; Brusca & Brusca, 2005; Beccaloni, 2009; Francke, 2011) Estudos baseados em filogenia molecular concordam com 11 ordens, mas separam Acari em Arariformes e Parasitiformes (Regier et al., 2010). Dentre as ordens, apenas Araneae e Pseudoscorpionida produzem teia.

1.3. Ordem Araneae

As aranhas (Arachnida: Araneae) (Figura 1) são um grupo diverso e bem-sucedido de artrópodes composto por 47.451 espécies já descritas, agrupadas em 4.082 gêneros e 116 famílias (World Spider Catalog, 2018; Wheeler et al., 2017), mas algumas estimativas do grupo podem incluir mais de 120.000 espécies (Agnarsson et al., 2013), com extensa variedade morfológica (Bristowe, 1958; Comstock, 1948; Foelix, 2011). Aranhas representam um grupo que vem se diversificando taxonômica e ecologicamente desde o Devoniano (> 380 milhões de anos) (World Spider Catalog, 2018), sendo *Attercopus fimbriamguis* a espécie mais antiga conhecida (Selden et al., 1991). Muitas incertezas envolvem a origem das aranhas, mas é provável que o clado esteja intimamente relacionado com o recentemente reconhecido Uraraneida (385 a 275 Milhões de anos) (Selden et al., 2008), aracnídeos que se assemelhavam a aranhas, mas contendo um aguilhão flageliforme (Garwood et al., 2016). As aranhas também são reconhecidas pela produção de teia e veneno (exceto a família Uloboridae) e pela sua diversidade ecológica e comportamental (Agnarsson et al., 2013).

1.3.1. Morfologia das aranhas

Segundo Melic et al. (2015) as aranhas têm uma série de características que permitem defini-las como grupo natural (Figura2). Externamente apresentam um corpo dividido em dois segmentos, o prossoma constituído por só uma peça, não segmentado e o opistossoma, unido ao primeiro através de um estreitamento, chamado pedicelo. Outras características próprias das aranhas são a presença de quelíceras com sua porção final em unha e com comunicação interna com uma glândula produtora de veneno, a modificação dos pedipalpos dos machos adaptados para a cópula, e a presença no opistossoma de apêndices chamados fiandeiras, pelos quais emitem os fios de seda (Melic et al., 2015).

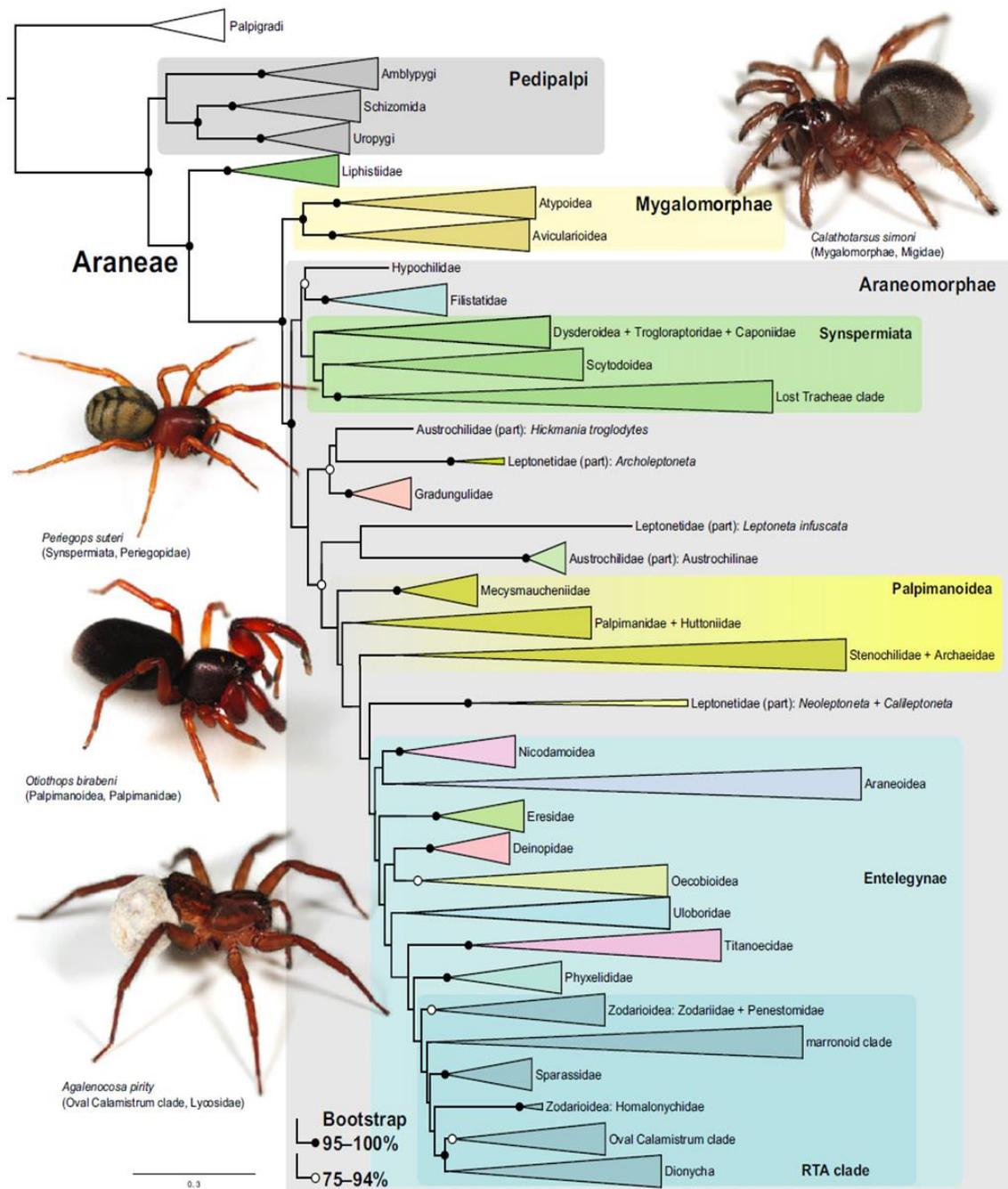


Figura 1. Resumo da árvore filogenética da análise concatenada de seis marcadores, sendo três de genomas mitocôndrias (12S, 16S e COI) e três de genomas nucleares (histona H3, 18S e 28S) obtidos sob máxima verossimilhança, restringida por grupos altamente apoiados a partir da análise transcriptômica, quatro terminais instáveis podados (análise C-ML-P). Extraído de Wheeler et al., (2017).

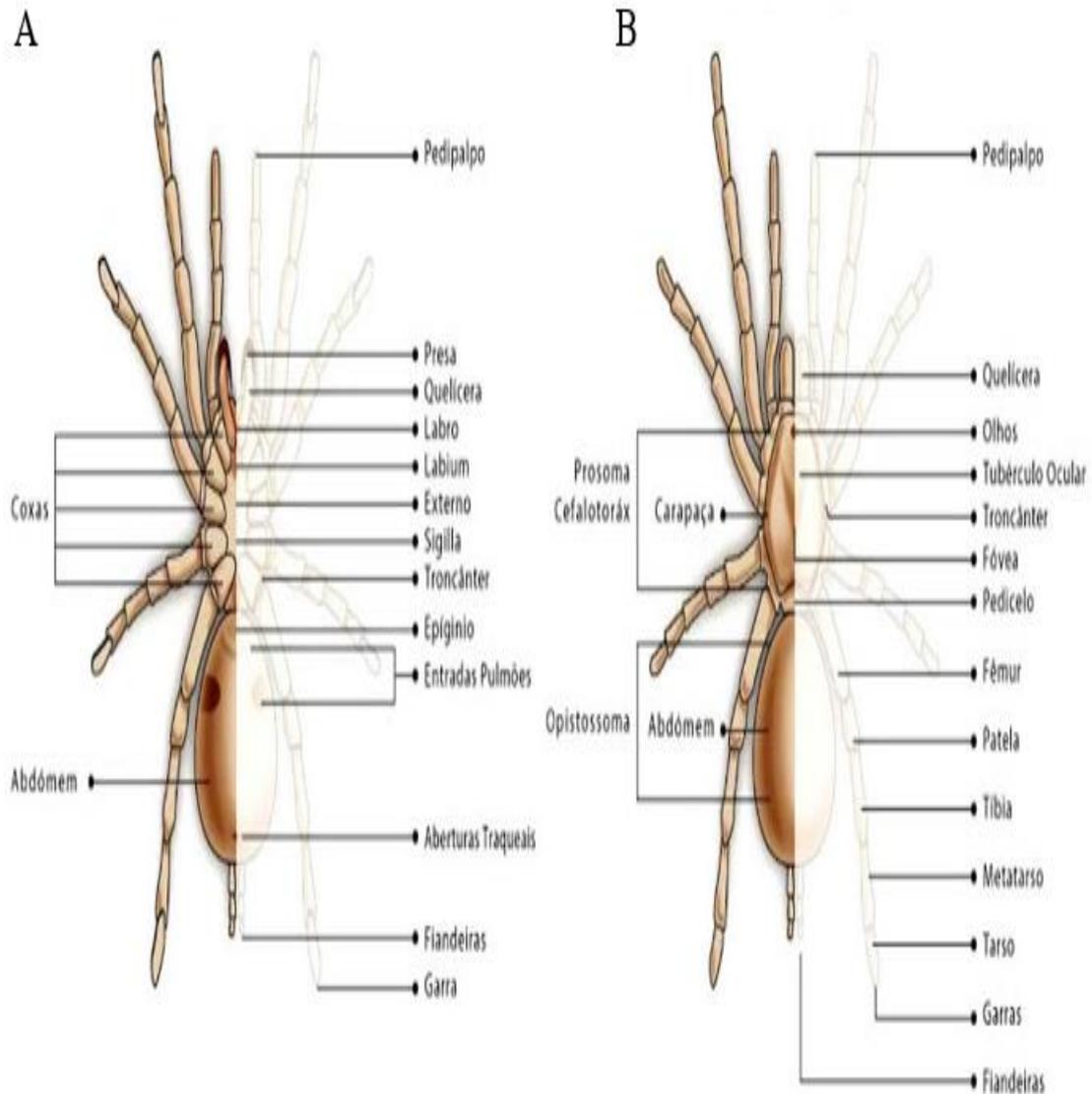


Figura 2. Características morfológicas externas ventrais (A) e dorsais (B) das aranhas, destacando a posição das fiandeiras, lugar pelo qual a teia é extraída, no extremo inferior do opistossoma. Extraído de ARACHNO HOBBY BRASIL (2017).

Internamente (Figura 3) as aranhas têm uma distribuição corporal estabelecida. No prossoma encontram-se órgãos vitais como estômago, esôfago e glândula de veneno; no opistossoma os pulmões, coração, intestino e glândulas produtoras de teia (Foelix, 2011).

Além das características previamente descritas, nenhuma outra linhagem animal tem um uso tão variado da teia. As aranhas produzem uma variedade de teias, algumas muito fortes, implicadas em quase todos os aspectos da vida da aranha como: linhas de segurança e em espiral para retenção de presas no caso das aranhas que fazem teias orbiculares; dispersão como no caso da família Salticidae, que usa a teia como ponto de ancoragem ao momento de pular; reprodução nos machos que fazem redes de esperma;

para envolver e proteger as ootecas; ou também pode ser usada para liberar trilhas de feromônio, como paraquedas na dispersão pelo ar e defesa (Blackledge et al., 2011; Wright, 2011; Garb, 2013). A diversidade morfológica das teias pode ser útil também para identificação de famílias de aranhas (Jocqué et al., 2006).

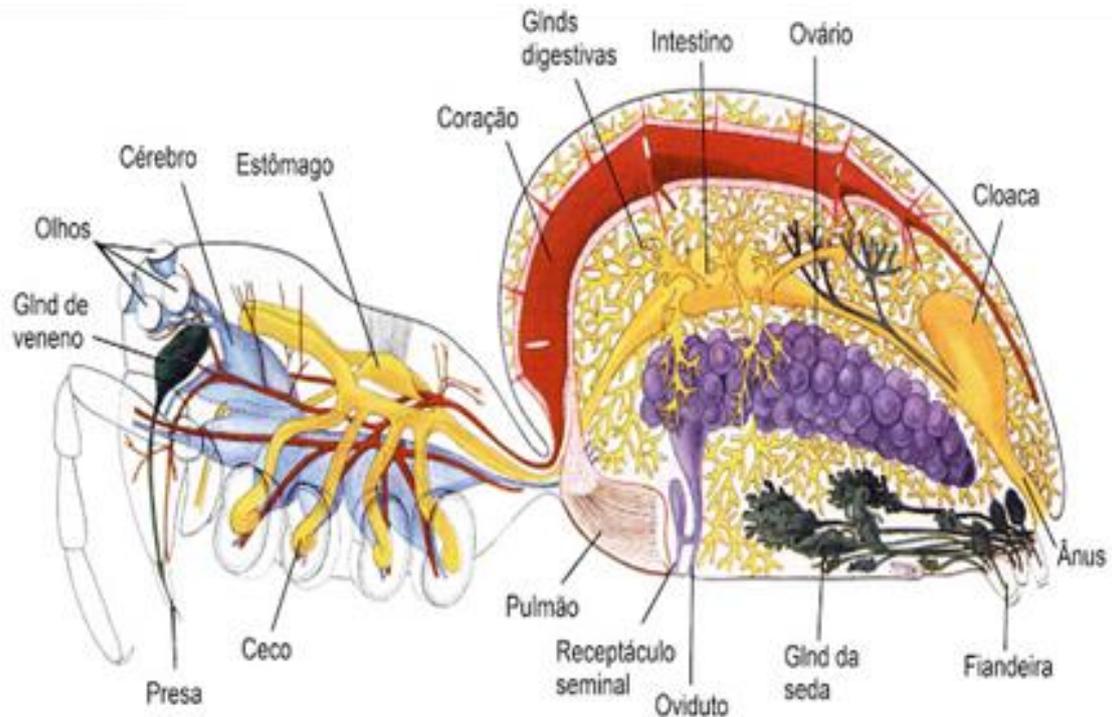


Figura 3. Desenho esquemático da anatomia interna de uma aranha, destacando seus órgãos principais, entre eles as fiandeiras e as glândulas produtoras de seda na parte região do opistossoma. Extraído de VeVET (2013).

1.3.2. Ootecas

Muitas aranhas colocam seus ovos (Figura 4) dentro de refúgios, os quais podem se chamar de ninhos de ovos. As aranhas saltadoras *Heliophanus* produzem somente alguns fios ao redor dos seus 20-40 ovos e os guardam dentro do seu refúgio de teia fechado. Outras saltadoras como *Marpissa*, constroem de 3-5 ootecas, cada uma contendo de 20-40 ovos, envoltos por camada basal e mais uma de cobertura. *Agroeca brunnea* constrói uma ooteca camuflada, sendo um dos tipos mais incomuns, parecida com uma lanterna japonesa. Nem todas as famílias de aranhas têm um tipo de ooteca só e ainda que seja possível diferenciar dois tipos básicos entre as aranhas enteleginas (Foelix, 2011), uma característica compartilhada por todas as ootecas é o fato de oferecerem proteção, especialmente durante o inverno, proteção contra ataques microbianos, dessecação e contato com gelo (Schaefer, 1977).

A construção de uma ooteca começa com uma camada basal na qual os ovos são colocados. Depois disso, a aranha cobre a massa de ovos com uma rede de fitas de seda que estão unidas a camada basal. A maioria das aranhas cobrem a ooteca com uma ou mais camadas adicionais de teia externa, que atuam como barreira física (Austin, 1985), para garantir uma proteção mecânica, como é feito pelas aranhas da família Lycosidae. Adicionalmente, essa camada externa pode estar coberta por partículas, exuvia ou sobras de presas (Nentwig & Heimer, 1987).

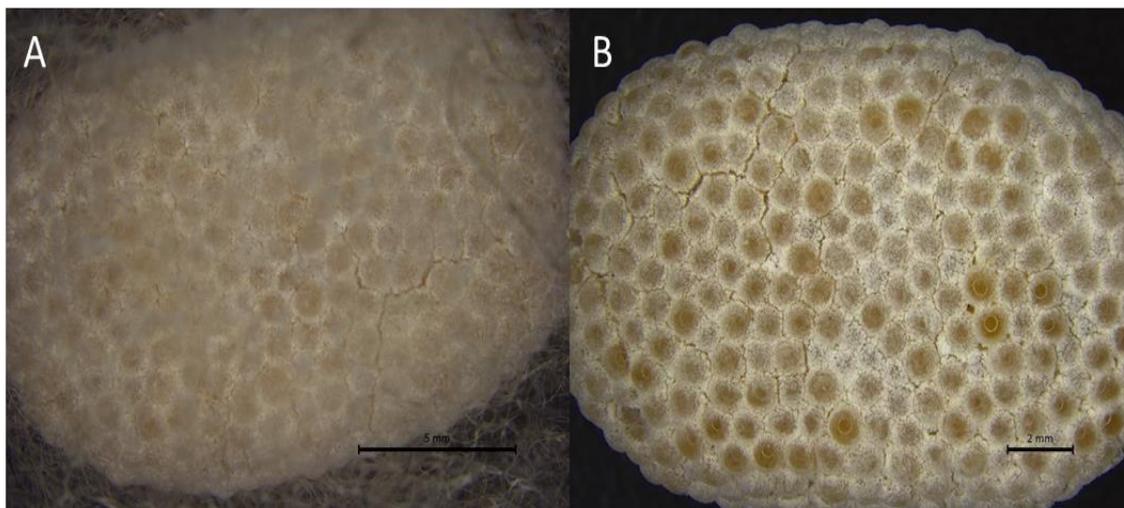


Figura 4. Um dos vários tipos de ooteca existentes em aranhas. (A) Ooteca de *N. cruentata* com a camada externa de teia; e (B) ooteca de *N. cruentata* sem a camada externa de teia.

Os ovos das aranhas estão sempre envolvidos por duas camadas, a membrana vitelina interna e o córion externo. O córion parece opaco e granuloso devido ao líquido que circunda o ovo durante a colocação dos ovos. A parte principal do ovo, no entanto, consiste em grânulos de vitelo e líquido vitelino. Os grânulos de vitelo tendem a ser maiores na parte inferior do ovo, mas isto não reflete uma polaridade verdadeira, porque girar o ovo de cabeça para baixo reverte a distribuição do vitelo (Holm, 1940, citado por Foelix, 2011). Depois da oviposição, que em algumas aranhas pode acontecer 45 dias depois da cópula (Morishita et al., 2003) os ovos são mantidos juntos por um líquido que evapora lentamente e são colocados sempre vários ovos, então uma função adicional da teia é mantê-los unidos (Foelix, 2011).

1.3.3. Teias

As aranhas usam diferentes tipos de teias para situações específicas. Consequentemente, tanto o tipo de teia e seu desenvolvimento tendem a ser bons

indicadores do estilo de vida específico das aranhas (Vollrath & Selden, 2007). Os rasgos característicos da engenharia da teia e seu uso estão tipicamente correlacionados com características morfológicas e anatômicas do plano corporal do animal (Coddington, 1989; Eberhard, 1990; Vollrath & Knight, 2005, Witt et al., 1968). As fibras que as constituem são proteínas (espidroínas), as quais são sintetizadas nas células epiteliais de glândulas especializadas e secretadas no lúmen glandular onde são armazenadas em forma líquida em altas concentrações (50% peso/volume) (Hijirida et al., 1996; Scheibel, 2004 citados por Bittencourt et al, 2007).

As aranhas orbiculares (Orbiculariae, um nome informal para o táxon contendo as superfamílias Deinopoidea e Araneoidea), produzem sete tipos de fibras de seda e adesivos (Figura 5, Tabela 1) que se distinguem pelos ductos que emergem (Coddington, 1989), por suas propriedades mecânicas (Blackledge & Hayashi, 2006), pelas sequências de aminoácidos das proteínas (Guerette et al., 1996) e a glândula onde é produzida, sendo a glândula ampola maior (MaAS) uma das mais estudadas (Swanson et al., 2009; Vollrath et al., 2013).

Tabela 1. Diferentes glândulas produtoras de teia e sua função. Adaptado de Vasanthavada et al. (2012).

Glândula de seda	Função
Ampola maior	Quadro, rádios da rede, linha de arrasto/segurança (dragline).
Ampola menor	Reforço da linha de arrasto (dragline).
Tubuliforme	Bolsa dos ovos.
Piriforme	Disco de fixação.
Flageliforme	Espiral de captura, revestimentos.
Aciniforme	Envolvimento, bolsa dos ovos.
Agregada	Colas pegajosas, juntas de conexão.

A obtenção de teia deve estar regulada por diferentes parâmetros, como a velocidade de extração. A importância de padronizar o tempo e a velocidade de extração foi descrita nos estudos de Wilson (1962), que afirma que para a extração contínua com uma espessura uniforme, a teia extraída em forma de fios deve estar balanceada pelo movimento de seda fluida pelo ducto que comunica a glândula com o Spigot e nessas condições o ponto de formação do fio se mantém numa região entre o spigot e a válvula

de controle. Se o fio de teia é extraído mais rápido do que a seda fluida pode substituí-lo, o diâmetro do fio vai diminuir, ou a teia fluida no interior pode esgotar. A consequência disso é um aumento na fricção ao longo do comprimento do ducto e o aumento na força necessária para manter a taxa de extração. Finalmente, o ponto de formação vai retornar para a região em loop do ducto e o fio pode se arrebrantar (Figura 6).

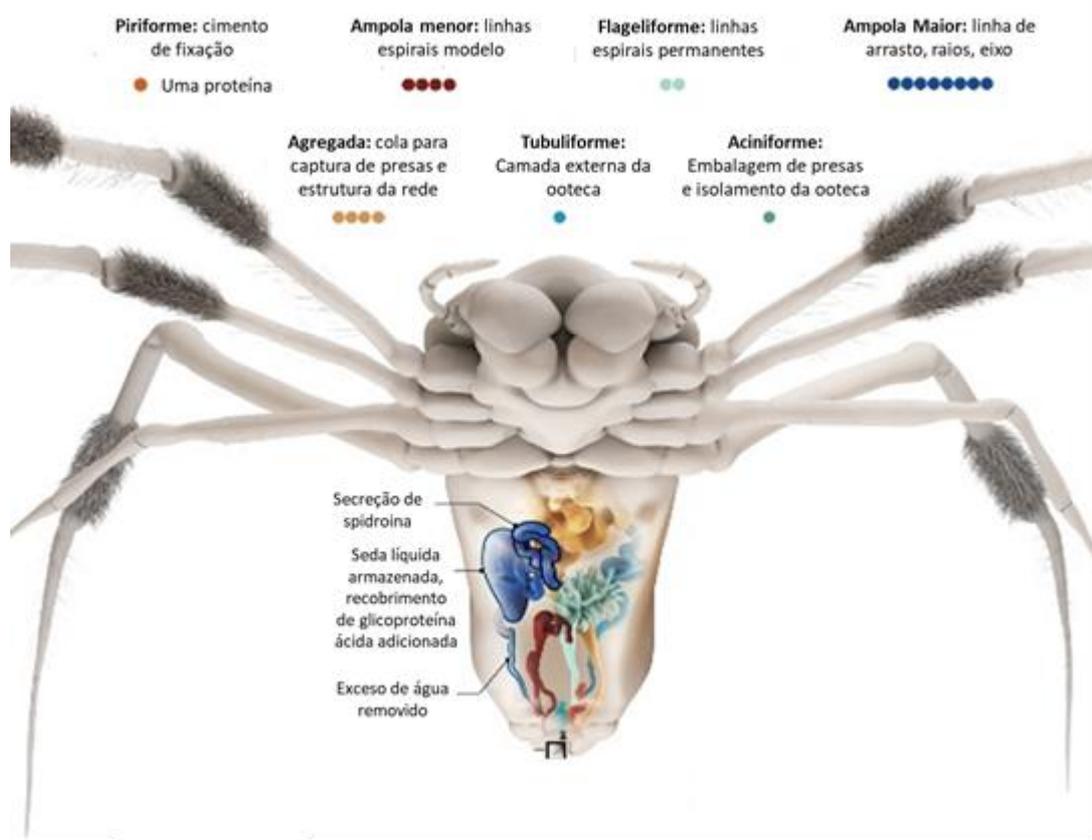


Figura 5. Representação das glândulas produtoras de teia, diferenciadas aqui por cores no opistossoma e sua função na teia orbicular, e da localização de pontos onde acontecem alguns passos da produção da teia. Os círculos de cores representam o número de proteínas em cada glândula. A seda sai do abdômen através das fiandeiras. Retirado a partir de Altounian & Pennisi, (2017).

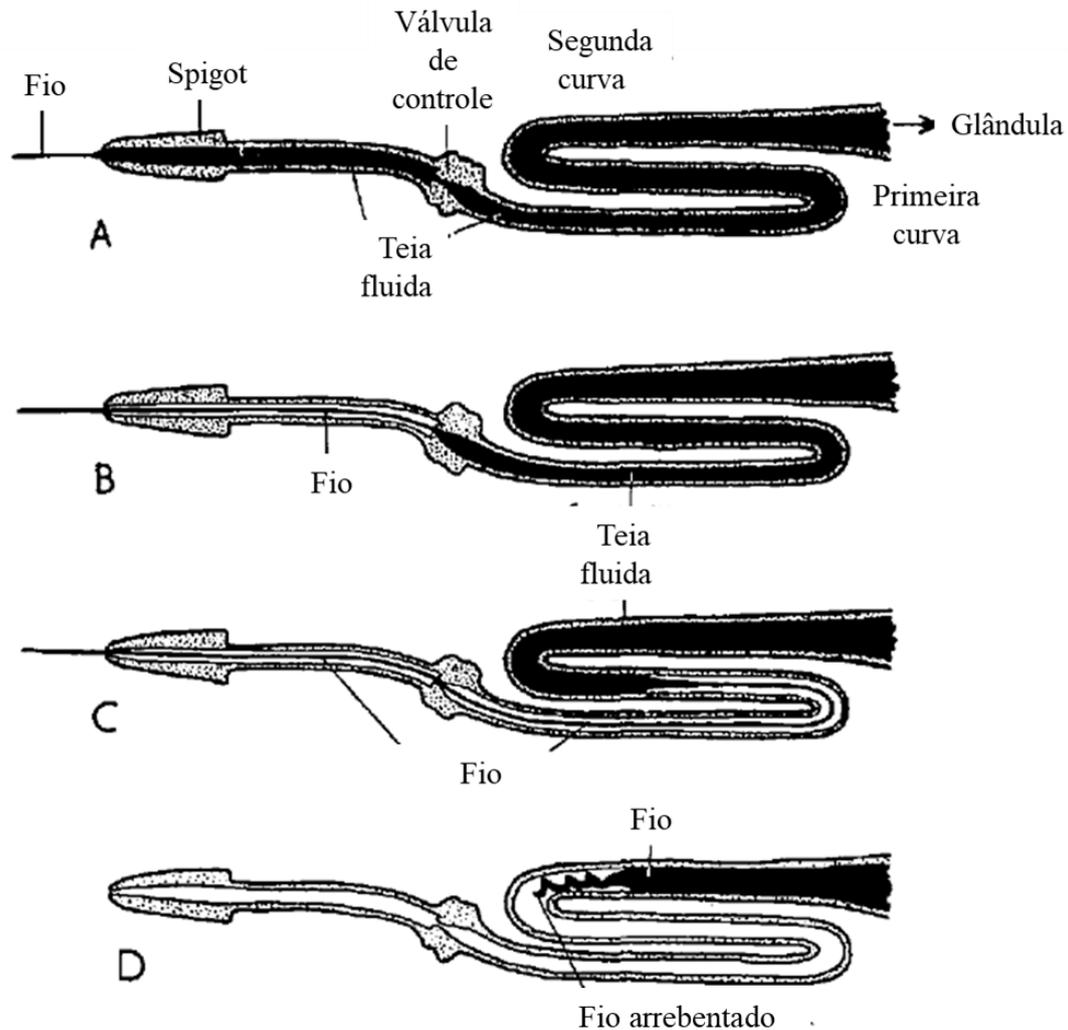


Figura 6. Diagrama (sem escala) do ducto de dragline de *Araneus*, mostrando a posição da zona em que a teia fluida muda para fio, que é observado do lado esquerdo, sob várias condições de rotação. (A) zona de transição na ponta do Spigot quando o excesso de teia fluida está disponível; (B) zona de transição na válvula de controle quando a quantidade de teia fluida disponível está balanceada com a extração; (C) zona de transição na região em loop do ducto quando a teia fluida disponível é insuficiente para equilibrar a extração; e (D) ponto de ruptura da seda sob tensão extrema. Figura retirada de Wilson (1962).

1.3.3.1. Teias Ampola maior, Tubuliforme e Aciniforme

A seda da ampola maior (MA) utilizada por aranhas para a construção de suas icônicas redes orbiculares é o material biológico mais resistente conhecido (Agnarsson et al., 2010). Das 28 espidroínas já caracterizadas, a glândula ampola maior, é encarregada de produzir a teia Dragline, que possui oito proteínas descritas: MaSp-a, MaSp-b, MaSp-c, MaSp-d, MaSp-e, MaSp-f, MaSp-g e MaSp-h (Babb et al., 2017), as quais contam com alta presença de Alanina (A) (14,6%), Glicina (G) (20,1%) e Serina (11,6%) e resíduos de $(GA)_n$, $(A)_n$, e (GGX) , onde X pode ser Alanina, Serina ou Tirosina (Sanggaard et al., 2014; Hayashi & Lewis, 1998, em Babb et al., 2017). Esta

teia tem como funções principais a linha de arrasto, eixos, quadro e raios que podem transmitir vibrações à aranha (Altounian & Pennisi, 2017; Masters et al., 1986; Vasanthavada et al., 2012; Shanggaard et al., 2014).

A teia dragline tem sido amplamente estudada e sabe-se que nem todas as aranhas possuem a glândula produtora desta teia, como no caso das aranhas da infraordem Mygalomorphae, que devido à ausência de glândulas bem diferenciadas e a redução das fiandeiras laterais anteriores, perderam a habilidade de produzir este tipo de teia (Boutry & Blackledge, 2010; Hajer, Karschová & Řeháková 2016). Ancestralmente, a seda da MA foi utilizada principalmente em redes terrestres que simplesmente enredavam insetos que se passavam pelo solo ou atuavam como linhas de suporte (Blackledge et al., 2009). A mudança comportamental inovadora da utilização da seda desta glândula para construir estruturas aéreas discretas para as redes de aranhas de teia orbicular esteve acompanhada por mudanças significativas nos genes que codificam as suas proteínas (Gatesy et al., 2001; Blackledge et al., 2009).

A glândula Aciniforme está presente em todas as aranhas araneomorfas (Platnick et al., 1991) e possui uma única espidroína, a AcSp (Sanggaard et al., 2014; Babb et al., 2017), com uma quantidade menor de Glicina e Alanina quando comparada com a glândula Ampola maior. O mesmo acontece na glândula Tubuliforme (Hayashi et al., 2004). As funções principais desta glândula são o isolamento da ooteca (camada interna), assim como também o envolvimento das presas na hora de se alimentar (Altounian & Pennisi, 2017), redes de esperma e decorações nas teias (Foelix, 2011). No caso de outras araneomorfas que não fazem teias orbiculares, a Aciniforme também está envolvida nas linhas de arrasto (dragline) (Sanggaard et al., 2014). A teia Aciniforme, se diferencia das teias Agregada e Piriforme que são adesivas, pois a primeira é fibrosa e emerge de spigots múltiplos nas fiandeiras médias posteriores e fiandeiras laterais posteriores (Foelix, 2011).

As glândulas Tubuliformes, também chamadas cilíndricas, estão constituídas por um conjunto de seis glândulas (Candelas et al., 1986) que possuem só uma das 28 espidroínas, chamada TuSp (Sanggaard et al., 2014; Babb et al., 2017), com maior porcentagem de Serina do que Glicina e Alanina quando comparada com a ampola maior e também possui resíduos de (GA)_n, (A)_n, e (GGX) (Hayashi et al., 2004). Diferente das glândulas Ampola Maior e Aciniforme, as glândulas tubuliformes evoluíram no grupo ancestral das aranhas eneleginas (Platnick et al., 1991), que são um subgrupo das araneomorfas (Sanggaard et al., 2014). Esta glândula Tubuliforme tem

como função principal o envolvimento e proteção das ootecas (camada exterior) (Ayoub et al., 2012; Altounian & Pennisi, 2017), o que faz dela um modelo interessante para pesquisas de expressão gênica diferencial de tecidos, uma vez que a reprodução acontece somente num momento particular da vida da fêmea adulta (Candelas et al., 1986).

As observações no contexto da função biológica da teia tubuliforme sugerem que essa fibra em particular teria que ser suficientemente forte para proteger os ovos, ainda frágeis, de modo a fazer com que seja possível a prole se desenvolver. Sobre isso, é sabido que seda tubuliforme tem um módulo de Young (relação entre uma força aplicada e a direção em que é aplicada) mais elevado quando comparado a seda da ampola maior, gerando uma maior elasticidade longitudinal, mas um limite de ruptura e resistência menores (Blackledge & Hayashi, 2006, em Bittencourt, 2007), características que garantem certo limite de proteção.

1.4. *Nephilingis cruentata* (Fabricius, 1775)

A família Araneidae está composta por 174 gêneros (World Spider Catalog, 2018). Espécies do gênero *Nephilingis*, incluída *N. cruentata*, a aranha modelo de estudo neste projeto de pesquisa (Figura 7), constroem teias orbiculares aéreas grandes a mais de um metro de altura com um refúgio tubular conectado com o centro da teia. Suas teias não possuem a típica cor dourada das espécies do gênero *Nephila*, e são construídas sempre em substratos como troncos de árvores ou afloramentos de rocha, mas são notadas principalmente em paredes de casas ou telhados. Seu dimorfismo sexual extremo com fêmeas gigantes, até 10 vezes maiores que os machos, e cores vívidas fazem dela popular em estudos biológicos. Sua distribuição geográfica compreende a América do Sul Tropical e a África Subtropical, as Ilhas do oceano Índico, Ásia e Austrália (Kuntner, 2007).

A dieta da espécie consiste em insetos (Japyassú & Viera, 2002; Mendes et al., 2010), mamíferos, como descrito no trabalho de Jacomassa et al., (2015) onde foram reportadas duas ocorrências de morcegos em teias de *N. cruentata*. Embora esses morcegos não tenham sido predados, esta espécie de aranha não deve ser descartada como um predador oportunista de pequenos morcegos, como observado em outras regiões fora do Brasil, em Suazilândia, por Nyffeler & Knörnschild (2013). Pássaros também fazem parte da dieta, Peloso & Sousa (2013) reportaram a predação de

Todirostrum cinereum (Tyrannidae) por *N. cruentata*. Diniz, (2011) reporta a *N. cruentata* como predadora de gecos no Parque Estadual Paulo César Vinha.

Em relação ao seu comportamento, *N. cruentata* podem construir suas teias perto de outros indivíduos da mesma espécie (Schuck-Paim & Alonso, 2001), embora sejam reconhecidas por serem aranhas solitárias (Schuck-Paim, 2000), e é reconhecido que as aranhas mais velhas mudam as características da teia, passando a construir uma teia orbicular incompleta (Japyassú & Ades, 1998).



Figura 7. Modelo de estudo: fêmea adulta de *N. cruentata*, foto de R. Joque, Adaptado de Kuntner (2007).

1.5. Aplicações da teia de aranha

As primeiras declarações sobre o uso de teias de aranha foram de Bon (1710) no trabalho “*A Discourse upon the Usefulness of the Silk of Spiders*”, onde descreve a capacidade da teia de aranha para parar o sangramento e ajudar no processo de cicatrização, isolando a ferida do ar circundante, o qual foi modelo de referência para outros trabalhos que foram desenvolvidos anos depois (Rolt, 1831; Hope, 1836). Hope, 1836 e Rolt, 1831 descreveram o uso de teia de aranha de várias espécies, principalmente de *N. clavipes*.

Na Espanha, uma pesquisa mais recente desenvolvida por Gonzáles & Vallejo (2012) identificou 59 formulações feitas de teia de aranha de uso tópico, sendo reconhecidos alguns deles como placebos, e outros como realmente efetivos. A teia de aranhas tem sido então utilizada ao longo da história. A habilidade das aranhas de fabricar um material simultaneamente forte, fino e resistente é intrigante, como já foi demonstrado pelos trabalhos de Griffiths & Salanitri (1980) sobre força nominal de fratura da seda de *Nephila maculata*, ou o trabalho sobre o efeito da hidratação sobre as forças de super-contração da Dragline de *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae) desenvolvido por Agnarsson et al., (2009). Esta combinação de propriedades torna a seda de aranha uma fibra extremamente atraente para inúmeras aplicações na medicina, defesa e indústria do lazer (Babu, 2013).

Atualmente, pesquisas sobre as aplicações das teias de aranha têm resultado na criação de empresas dedicadas a comercialização em quantidades industriais deste material. Dois exemplos importantes de ciência aplicada onde teia de aranha é o modelo de referência são a empresa Alemã AMSilk, que atualmente produz e distribui volumes crescentes de biopolímeros de teia de aranha de alta qualidade para uso como produtos têxteis, dispositivos médicos e cosméticos (Amsilk.com, 2018), e a empresa japonesa Spiber, que usa proteínas de teia de aranha como um trampolim para o progresso constante dos seus produtos têxteis (Spiber Inc., 2018).

1.5.1. Controle de micro-organismos

O controle de populações de micro-organismos é importante para vários setores do desenvolvimento humano, tendo como finalidades básicas a prevenção ou cura de doenças e a conservação de materiais. Este controle pode ser realizado a partir de métodos físicos, tais como calor e radiação. A luz ultravioleta, que segundo Brooks et al., (2011) induz a formação de dímeros de pirimidina, remoção mecânica e filtração, ou utilizando métodos químicos, como com o emprego de antissépticos, desinfetantes, esterilizantes químicos e antimicrobianos (Sidrim & Rocha, 2004).

Alguns estudos foram desenvolvidos sobre a ação antimicrobiana de teias de aranha e do conteúdo da ooteca, os quais incluem diferentes metodologias, o que demonstra seu uso potencial, assim como também a ausência de um protocolo padronizado para o desenvolvimento deste tipo de pesquisas. Gomes et al., (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

de peptídeos de teia de *N. clavipes* fusionados com peptídeos antimicrobianos humanos, particularmente defensinas do neutrófilo humano 2 e 4 (HNP-2 e HNP-4) e hepcidina, usando tecnologia de DNA recombinante. Wright & Goodarce (2012) avaliaram o efeito da teia de *Tegenaria domestica* contra *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Mirghani et al., (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes espécies de aranhas contra *E. coli* e *B. subtilis*. Torres-Vargas et al., (2013) testaram a teia de *Argiope argentata*, *Verrucosa sp.* e *Leucauge cf. venusta* contra *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Amaley et al., (2014) testaram a Dragline of *N. clavipes* contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Lei et al., (2015) estudaram o efeito das toxinas isoladas da ooteca de *Latrodectus tredecimguttatus* contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*. Finalmente, Harvey et al., (2017) pesquisaram a efetividade da teia de aranha recombinante de *Euprosthops australis* contra *E. coli*, demonstrando o sitio específico de conjugação química de diferentes ligandos orgânicos que conferem propriedades antibióticas às teias de aranha. Todos os trabalhos mencionados anteriormente tiveram resultados que mostram a capacidade das teias de aranha de inibir micro-organismos, concluindo que a teia de aranha tem potencial num amplo espectro de aplicações em engenharia de tecidos, biomedicina e biomateriais para matrizes celulares.

1.5.2. *Candida albicans*

O gênero *Candida* é formado por leveduras capazes de formar pseudo-hifas (McCullough et al., 1996) e que têm a capacidade de mudar sua morfologia dependendo da expressão gênica de virulência (Thompson et al., 2011). *C. albicans* é a espécie mais importante como agente de infecções. Outras espécies do gênero que possuem grande importância são: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, (Samaranayake & Macfarlane, 1990), algumas das quais podem estar envolvidas na formação de biofilmes em dispositivos implantados, como cateteres internos ou válvulas cardíacas protéticas (Douglas, 2003). Andes et al., (2016) identificaram candidemias causadas por várias espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans* com o 46.3% dos casos, seguido por *Candida glabrata* com o 24.4%, e *Candida parapsilosis* com o 8.1%, em pacientes que tinham feito transplantes de órgãos sólidos.

Este fungo faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário (Willey, 2008). Pode causar infecções importantes principalmente em

pacientes imunodeprimidos, sendo a infecção mais comum nos pacientes soropositivos para HIV. O desencadeamento de candidíase na boca ou orofaringe, gera dificuldade de alimentar, febre, sores (Menchaca et al., 2015), pode causar também sintomas como prurido vaginal, ardor e dor para urinar, em pacientes gestantes (Jimenez et al., 2016). Wisplinghoff et al., (2004) indicam que *C. albicans* é o fungo mais prevalente em infecções nosocomiais da corrente sanguínea, com uma representação do 54%. É por estes motivos que McCullough et al., (1996) destacaram o valor científico desta levedura que tem estimulado avanços no entendimento da epidemiologia da candidíase, na patogênese da doença e sua diversidade genética.

1.5.3. *Aspergillus flavus*

De todos os fungos que causam doenças em hospedeiros humanos, nenhum é tão amplamente distribuído na natureza como as espécies de *Aspergillus*. Este fungo filamentosos é encontrado em detritos orgânicos ocorrendo especialmente no solo, matéria vegetal em decomposição, poeira doméstica, materiais de construção, alguns alimentos e água. *A. flavus* é a segunda espécie mais importante como agente de infecção invasiva principalmente em pacientes imunossuprimidos, depois de *A. fumigatus* (Stevens et al., 2000). A principal manifestação clínica causada por esta espécie é a doença pulmonar invasiva que pode disseminar para outros órgãos pela circulação sanguínea (Willey, 2008).

Poucos fungos têm tão amplo impacto econômico como o *A. flavus*, sendo além de patógeno para os humanos, também patógeno de plantas, animais e insetos, causando danos nas raízes em inúmeras culturas, produzindo a micotoxina Aflatoxina B1 (Stevens et al., 2000), que é um agente cancerígeno formado naturalmente (Bennett & Klich, 2003).

1.5.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli é familiar aos biólogos como um sistema modelo clássico. As cepas de *E. coli* estão muito presentes em laboratórios de biologia molecular em todo o mundo, e o estudo desse organismo levou a muitas das conquistas marcantes da biologia (Neidhardt, 1996). *E. coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram negativa que não forma esporos, predominante na microbiota do cólon dos humanos. Algumas cepas de

E. coli são importantes agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos. Faz parte da família Enterobacteriaceae e constitui aproximadamente 10% dos micro-organismos intestinais de seres humanos e outros animais (Willey, 2008). Análises filogenéticas mostraram que as cepas de *E. coli* se enquadram em quatro grupos filogenéticos principais (A, B₁, B₂ e D) (Selander et al., 1987; Herzer et al., 1990). Esses estudos fornecem também uma melhor compreensão sobre como cepas patogênicas adquirem genes de virulência (Bingen et al., 1998).

O organismo tipicamente coloniza o trato gastrointestinal dos infantes em poucas horas de vida, e posteriormente desenvolve um benefício mútuo com o hospedeiro (Drasar & Hill, 1974). Embora geralmente comensal, a *E. coli* é também patógeno, associado a doenças diarreicas e infecções extra-intestinais (Kaper et al., 2004; Nataro & Kaper, 1998; Russo & Johnson, 2000). A bactéria permanece confinada no lúmen intestinal; em hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, ou quando barreiras gastrointestinais são violadas, podem causar infecções (Nataro & Kaper, 1998), sendo três as síndromes clínicas resultantes de infecções com cepas inerentemente patogênicas: (i) infecção do trato urinário, (ii) sepse/meningite, e (iii) doença entérica/diarreica.

1.5.5. *Enterococcus faecalis*

Espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* podem ser encontradas em diversos ambientes, como no trato gastrointestinal de humanos e de outros mamíferos e em aves, répteis, insetos, plantas, água e solo (Rôças et al., 2004), figurando entre as causas mais frequentes de infecções intra-hospitalares, principalmente nas unidades de cuidados intensivos (Brooks et al., 2011). Existem pelo menos 12 espécies de *Enterococcus*, sendo *E. faecalis* a mais frequente e responsável por 85 e 90% das infecções enterocócicas (Brooks et al., 2011). É uma bactéria coco Gram-positivo não formadora de esporos, anaeróbio facultativo e fermentador de açúcares, cujas células são ovaladas e de 0,5 a 1 µm de diâmetro, ocorrendo isoladamente, em pares ou em cadeias curtas, e são frequentemente alongados na direção da cadeia. As colônias de superfície no ágar de sangue são circulares, lisas e inteiras e a maioria das cepas são não hemolíticas (Schleifer, 1984, em Rôças et al., 2004). Algumas das doenças frequentes e importantes causadas por este micro-organismo são abscesso abdominal, infecção das vias urinárias e endocardite (Brooks et al., 2011).

Em condições de estresse, as células de *E. faecalis* são capazes de manter sua viabilidade por períodos extensos e tornam-se resistentes a radiação UV, calor, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, etanol e água com pH ácido (Giard et al., 1996; Harthe et al., 1998). Esta habilidade de *E. faecalis* para tolerar ou se adaptar as dificuldades das condições ambientais pode atuar como uma vantagem sobre outras espécies (Kayaoglu & Ørstravik, 2004).

1.5.6. *Staphylococcus aureus*

Em uma série de observações clínicas e estudos de laboratório (Ogson, 1882; Ogson, 1884) foi descrita a doença estafilocócica e seu papel na sepse e na formação de abscessos. Mais de 100 anos depois, *Staphylococcus aureus* permanece como um patógeno perigoso em seres humanos e as frequências de infecções estafilocócicas adquiridas pela comunidade e no ambiente hospitalar aumentaram de forma constante, com pouca mudança na mortalidade geral, fazendo com que o tratamento destas infecções torne-se mais difícil devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos (Lowy, 1998).

Mudanças claras na epidemiologia das infecções por *S. aureus* ocorreram nas duas últimas décadas: houve um número crescente de infecções associadas aos cuidados de saúde, particularmente vistas em endocardites infecciosas e infecções relacionadas a dispositivos protéticos, e também epidemias de infecções da pele e dos tecidos moles por cepas com certos fatores de virulência e resistência aos antibióticos β -lactâmicos (Tong et al., 2015).

O gênero *Staphylococcus* consiste em cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , ocorrendo isoladamente, em pares e em tétrades, e dividindo-se caracteristicamente em mais de um plano para formar agrupamentos irregulares. A parede celular contém ácido peptidoglicano e ácido teicoico, são anaeróbias facultativas e usualmente catalase positiva. Estão entre as mais importantes bactérias causadoras de doenças nos humanos, sendo *S. aureus* o patógeno mais importante do gênero, devido ao efeito combinado de fatores extracelulares e toxinas, junto com as propriedades invasivas de tensão (Willey, 2008). Algumas doenças causadas por *S. aureus* são: espinhas e impetigo e carbúnculos em qualquer superfície, infecções e abscessos de feridas, osteomielite, endocardite, meningite, nefrite e infecções respiratórias (Willey, 2008; Tong et al., 2015).

1.6. JUSTIFICATIVA

Idealmente, os agentes antimicrobianos utilizados para tratar doenças infecciosas combatem, dentre outros, micro-organismos patogênicos ou inibem o seu crescimento em concentrações suficientemente baixas para evitar danos indesejáveis ao hospedeiro (Willey, 2008). A pesquisa da atividade antimicrobiana se faz importante para a saúde de milhões de pessoas no mundo devido às graves doenças que os micro-organismos podem produzir e também pelo aumento de micro-organismos, especialmente as bactérias, resistentes a mais e mais agentes antimicrobianos. Como foi mencionado anteriormente, sabe-se que teias de aranha possuem a capacidade para inibir o desenvolvimento de diferentes micro-organismos (González & Vallejo, 2012; Gomes et al., 2011; Wright & Goodarce, 2012; Mirghani et al., 2012; Amaley et al., 2014; Lei et al., (2015); e Harvey et al., 2017), e sendo Araneae uma ordem tão ampla e mais ainda os tipos de teias que produzem, o desenvolvimento deste tipo de pesquisas usando estes artrópodes como modelo de estudo pode abrir portas a futuros novos tratamentos contra as doenças produzidas por micro-organismos de importância médica.

Este fato faz com que pesquisas em novas fontes como as teias de aranha sejam de grande interesse para inibir o crescimento desses micro-organismos (Mirghani et al., 2012). No caso de *N. cruentata*, é uma espécie que nunca foi investigada neste tipo de pesquisas, sendo este estudo importante por poder contribuir com os conhecimentos sobre esta espécie e seu potencial biotecnológico da biodiversidade brasileira.

A escolha dos micro-organismos foi devido a sua incidência na saúde humana e a sua capacidade de resistir aos medicamentos comumente usados para tratá-los, o que fazem deles importantes agentes de doenças nos seres humanos e em alguns animais.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar as propriedades antimicrobianas das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme e da ooteca da aranha *N. cruentata* (Araneae: Araneidae).

Objetivos específicos

- 1- Padronizar um protocolo para a obtenção das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme de *N. cruentata*.
- 2- Avaliar a atividade antibacteriana das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme e da ooteca de *N. cruentata*.
- 3- Avaliar a atividade antifúngica das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme e da ooteca de *N. cruentata*.
- 4- Avaliar a presença de DNA bacteriano na teia Dragline de *N. cruentata*.
- 5- Avaliar o perfil proteico e a atividade antifúngica e antibacteriana das frações da teia Dragline de *N. cruentata*.

III. METODOLOGIA

3.1. Padronização do protocolo de extração das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme de *N. cruentata*

A teia Dragline foi obtida por extração mecânica num ambiente estéril (fluxo laminar), com um aparelho (Figura 8) criado pelo engenheiro brasileiro Elton John Robaina da Silva exclusivamente para cumprir essa função. As aranhas usadas foram fêmeas adultas que vivem livremente na UFRJ em Macaé no NUPEM e Pólo Universitario e foram liberadas uma vez finalizada a extração, podendo ser usadas novamente depois de passadas duas (2) semanas. A velocidade pode ser ajustada segundo a necessidade, permitindo a extração de 30 cm de teia por cada volta. O aparelho foi desenhado com materiais reciclados e ligado por cabo num computador como fonte de energia, visando evitar danos em caso de queda de energia elétrica.

As aranhas, fêmeas adultas, foram fixadas com fita adesiva com o ventre virado para cima para se conseguir identificar as fiandeiras e capturar a teia Dragline com pinças, e fixá-la no aparelho por tempos que variaram de 15 a 30 minutos. Utilizando uma velocidade baixa e constante de 2 a 3 cm/s, e com ajuda de uma lâmpada para conseguir enxergar a teia durante o tempo de extração; uma vez finalizada a extração, as aranhas foram colocadas de volta à teia onde foram encontradas. A teia obtida foi armazenada num tubo do tipo eppendorf de 1,5 ml previamente autoclavado, sendo os demais materiais limpos com álcool 70% tanto antes de iniciar a extração da teia quanto após a finalização do procedimento.

As teias Tubuliforme e Aciniforme foram obtidas diretamente das ootecas encontradas no local onde as aranhas construíram as teias orbiculares, sendo estas ootecas separadas da teia orbicular utilizando tesouras e pinças lavadas previamente com álcool 70% e transportadas para o Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais (LICM). A teia Tubuliforme (camada externa de teia) foi separada dos ovos com pinças previamente limpas com álcool 70% e da teia Aciniforme, que fica grudada dos ovos com uma aparência de pó. Para a separação da teia Aciniforme, a ooteca foi depositada num frasco de vidro junto com 1 ml de solvente (água destilada autoclavada para realização da eletroforese, e acetona para testes antimicrobianos). Após agitação suave, a água junto com a teia que foi liberada da ooteca foi retirada e

armazenada num tubo eppendorf autoclavado de 1,5 ml com ajuda de pipeta e ponteiros autoclavadas.

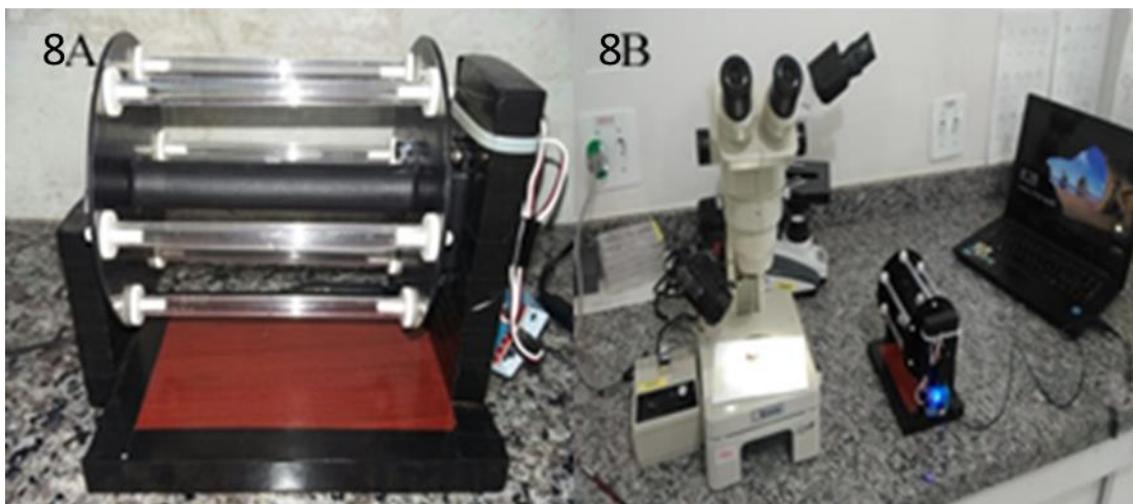


Figura 8. Ferramentas utilizadas na extração da teia Dragline: (8A) Aparelho para extração da teia Dragline. (8B) lâmpada, estereoscópio, pincel e fonte de energia (PC).

3.2. Avaliação e inativação de micro-organismos na teia Dragline de *N. cruentata*.

Como a teia Dragline obtida nos experimentos iniciais para os testes antimicrobianos foi extraída num ambiente não estéril, foi analisada a presença de micro-organismos presentes na teia para padronização dos testes. Esta análise foi realizada para garantir que o possível efeito antimicrobiano seja devido aos compostos da teia e não produzido por micro-organismos associados a teia. Depois do processo de extração a teia foi submetida à exposição de luz UV. Esta metodologia seguiu Villarino et al. (2000) que descreve a utilização de luz UV como um mecanismo efetivo para controle de micro-organismos, mas aqui foram implementados diferentes intervalos de tempo de exposição através de um transluminador Benchtop UV com intensidade alta, equivalente a 302 nm.

Os tempos de exposição avaliados foram: trinta (30) minutos, quarenta e cinco (45) minutos e sessenta (60) minutos. Além disso foi avaliada a amostra sem exposição (controle). Uma vez finalizada a exposição, estas amostras foram colocadas em placas de petri com ágar Mueller Hinton (MH) para avaliar o efeito da luz UV sob o crescimento de micro-organismos na teia e padronizar os testes baseado em tempo de exposição à luz UV suficiente para que não ocorra crescimento de outros micro-organismos.

3.3. Identificação de proteínas presentes nas teias Dragline e Tubuliforme de *N. cruentata*.

Foi extraída a teia Dragline num ambiente estéril e a Tubuliforme removida da ooteca com pinças estéreis para a detecção das proteínas presentes nas mesmas, através de uma eletroforese de proteínas em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) com um gel de corrida com concentração 10% (5,9 ml de H₂O; 5 ml desolução acrilamida 30%; 3,8 ml de Tris 1,5 M (pH 8.8); 0,15 ml de SDS 10%; 0,15 ml de persulfato de amônio 10%; e 0,006 ml de TEMED) e um gel de empacotamento com concentração 5% (6,8 ml de H₂O; 1,8 ml desolução acrilamida 30%; 1,5 ml de Tris 1 M (pH 6.8); 0,1 ml de SDS 10%; 0,1 ml de persulfato de amônio 10%; e 0,01 ml de TEMED), adicionando 60 µl de tampão (Tris/HCl pH 6,8; SDS 4%; azul de bromofenol 0,2%; e glicerol 20%) e 40 µl de corante nos eppendorfs que contém as amostras. Depois de realizada a eletroforese, o gel foi corado com azul de coomassie por 2 horas, e logo depois colocado na solução descorante. O padrão de peso molecular usado foi o Sigma N°: SDS7B2 MW=26.600-180.000.

3.4. Avaliação da presença de DNA bacteriano presentes na teia Dragline *N. cruentata*.

Para determinar a presença de micro-organismos, particularmente bactérias, na teia Dragline foi feita uma extração de DNA segundo o protocolo de Pragger (1999), modificado por Xu et al., (2015) que consistiu na adição de 800 µl de tampão de lise celular (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% de dodecil sulfato de sódio [SDS], pH 8,0) e 8 µL de proteinase K (20 mg/l) aos tubos contendo amostras de teia seguida por 10–20 inversões e incubação a 55°C durante 4 horas. Ao atingir a temperatura ambiente, 8 mL de RNase A (5 mg/ml) foram adicionados a cada amostra, seguido por 20 inversões. As amostras foram incubadas a 37°C durante 15 min e depois trazidas de volta a temperatura ambiente. 300 µl de solução de precipitação de proteína (7,5 M acetato de amônio) foram adicionados a cada amostra e agitados em vórtice por 20 segundos, seguido de incubação em gelo por 15 min. As amostras foram então centrifugadas a 17.000 G durante 3 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de

microcentrífuga de 2 ml contendo 750 µl de isopropanol gelado e invertidos 50 vezes antes da centrifugação a 17.000 G por 2 min. Todos os sobrenadantes foram drenados e 750 µl de etanol a 70% foram adicionados a cada amostra, seguido de centrifugação a 17.000 G por 3 min. Todos os líquidos foram removidos e as amostras foram secas ao ar. Os pellets de DNA foram reidratados usando 100 µL de tampão TE baixo (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM).

Depois foi feita uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com 35 ciclos usando uma amostra da teia Dragline extraída em meio estéril, uma amostra de bactéria isolada do queijo Kefir (cepa desconhecida). Adicionou-se no tubo eppendorf que contém a amostra de teia 12,5 µl de GoTaq G2 Mix; 5 µl do primer Senso 1µM; e 5µl do primer Antisenso 1 µM usando o seguinte programa no Veriti™ 96-Well Thermal Cycler: 95°C/3 min; 95°C/30 seg; 55°C/30 seg; 72°C/30 seg; 72°C/5 min; e 4°C/∞ segundo os parâmetros estabelecidos em: Amplicon®. Os primers usados foram:

Senso 5':

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Anti-senso5':

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA
ATCC

Logo depois da realização do PCR, foi feito um gel de Agarose 1,2% para observar a presença de DNA bacteriano na teia Dragline. O padrão de peso molecular do Vetor Puc19 digerido pela Taq1. Adicionalmente, quantificou-se o DNA com um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) e usando DNA extraído da para de uma aranha como controle. Uma amostra de 1 µl utilizando as razões de (260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm) foi usada como parâmetro para a avaliação da pureza no Laboratório Integrado de Bioquímica.

3.5. Testes antimicrobianos

Os micro-organismos testados foram mantidos congelados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e repicados em meio Agar infusão cérebro-coração (BHI) no

caso de bactérias e Sabouraud no caso dos fungos antes da realização dos testes no Laboratório de Limnologia Aquática (LLA) da UFRJ-NUPEM. Os inóculos das bactérias e leveduras foram preparados a partir de culturas de 24 horas de crescimento enquanto para o fungo filamentosso *A. flavus* a partir de cultura de sete dias e com densidade ótica equivalente a escala Mac Farland 0,5 que corresponde a absorvância de 0,2 para *C. albicans* (ATCC 19053) e 0,08 para *A. flavus* (ATCC 16883) no comprimento de ondas de 520 nm e absorvância de 0,13 a 590 nm para *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* (DH5 α), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *S. aureus* (ATCC 25925). Essas densidades óticas foram medidas visando padronizar a quantidade de unidades formadoras de colônias em cada um dos testes, equivalentes a 1-2 x 10⁸ UFC/ml aproximadamente para bactérias (Cockerill & Patel, 2015) .

3.5.1. Testes antimicrobianos com teia Dragline

Amostras de aproximadamente 80 μ g de teia Dragline esterilizada e controle (não estéril) foram adicionadas em diferentes placas de petri contendo cada um dos micro-organismos previamente inoculados em ágar Mueller Hinton. A inoculação consistiu em espalhar cada micro-organismo na placa que contem o agar usando um cotonete (swab, em inglês) que foi impregnado com a suspensão que contém o micro-organismo três vezes e em diferentes ângulos, visando abarcar 100% da superfície do meio.

Além do teste com a teia propriamente dita, foi preparada uma suspensão em dois solventes: acetona, e uma mistura de ácido clorídrico 6N e ácido propanoico 50% v/v. A utilização destes solventes seguiu trabalhos desenvolvidos por Mirghani et al., (2012) e Lombardi & Kaplan (1990) respectivamente, e foi utilizada uma concentração de 0,0024 g/mL. Esta concentração também foi utilizada para a teia Tubuliforme suspendida em acetona, mas no caso da Aciniforme, a manutenção da mesma concentração não foi possível devido as condições de extração, pois para sua obtenção foi suspendida a ooteca em 1 ml acetona e agitada levemente até a teia se liberar, impossibilitando sua pesagem.

A quantidade de amostra de teia suspendida nos solventes usados para os testes foi de 5 μ l, que foram pipetados sobre discos estéreis com diâmetro de 6 mm. As placas contendo os micro-organismos inoculados e as teias, tanto as puras quanto as

ressuspendidas nos solventes foram colocadas na estufa para cultura bacteriológica DeLeo a 35°C. A leitura dos resultados foi realizada 24 e 48 horas após adição das teias ou das suspensões dos diferentes solventes contendo as teias.

3.5.2. Testes antimicrobianos com Ooteca

Os testes com as ootecas foram realizados baseado na metodologia de Lei et al, (2015), modificando a potência da centrifugação e sem usar Tampão Fosfato Salino (PBS) como solvente para a maceração, assim: uma ooteca foi macerada utilizando pistilo plástico e sem solvente nenhum em tubos eppendorf de 1,5 ml. Após a maceração realizou-se centrifugação por 10 minutos a 17.000 G e 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi usado para os testes antimicrobianos. Os inóculos foram preparados conforme o item 3.5 e 5 µl de sobrenadante foi adicionado nos discos que foram imediatamente adicionados a placas contendo micro-organismos inoculados em meio Agar Mueller Hinton conforme o item 3.5.1. As leituras dos resultados foram feitas 24 e 48 horas depois de levadas as placas à estufa para cultura bacteriológica DeLeo a 35°C.

3.6. Eletroforese de gel nativo para isolamento de proteínas da teia

Para os três tipos de teia, foi realizado no Laboratório Integrado de Bioquímica (LIB) um gel nativo (BN-PAGE) (Schägger & von Jagow, 1991) utilizando uma concentração de 8% no gel de corrida (2,3 ml de água destilada; 1,3 ml de solução acrilamida 30%; 1,3 ml de Tris 1,5 M (pH 8.8); 0,05ml de água destilada; 0,05ml de persulfato de amônio 10%; e 0,003 ml de TEMED) e um gel de empacotamento com concentração 5% (2,1 ml de água destilada; 0,5 ml de solução acrilamida 30%; 0,33 ml de Tris 1 M (pH 6.8); 0,03 ml de água destilada; 0,03 ml de persulfato de amônio 10%; e 0,003 ml de TEMED). Este procedimento foi adotado para separar as proteínas presentes nas amostras de teia sem desnaturá-las para posterior utilização nos testes antimicrobianos.

A obtenção das amostras de teias foi feita seguindo o protocolo previamente estabelecido (ver item 3.1), e em cada tubo eppendorf que as continha, foi adicionado

PBS (60 µl para dragline e 120 µl para Aciniforme e Tubuliforme, pois a quantidade de dragline foi aproximadamente a metade das outras duas) e Tampão de amostra (20 µl para dragline e 40 µl para Aciniforme e Tubuliforme). Foram utilizados 25 µl de cada amostra para aplicação nos poços do gel em duplicata.

A corrida eletroforética foi realizada por duas horas com 20 mA de corrente elétrica. O gel foi cortado pela metade no poço 5 no LIB com o objetivo de corar com azul de comassie só a metade dos poços (2, 3 e 4). Esta metade foi chamada Gel A, que teoricamente contém as mesmas bandas dos poços 6, 7 e 8, que foi chamada Gel B. Tal procedimento foi realizado a fim de evitar assim possíveis efeitos da solução corante e da solução descorante nos testes antimicrobianos. Uma vez as proteínas foram observadas no Gel A, o gel de acrilamida B (Gel B) foi cortado nas regiões correspondentes utilizando um bisturi estéril no fluxo laminar. Estas bandas foram depositadas em tubos eppendorf de 1,5 ml autoclavados, e adicionou-se 60 µl de PBS autoclavado para macerar o gel com as bandas e poder separar as proteínas.

As proteínas separadas foram então usadas nos testes antimicrobianos, incluindo também uma amostra do poço 9, que não continha amostra, para ser usado como controle negativo. Uma vez maceradas as bandas, estas foram centrifugadas por 5 minutos a 17.000 G e a temperatura de 4°C, permitindo a separação do sobrenadante que contém as proteínas em tubos eppendorf de 1 ml. Foram usados 5 µl da amostra final para a realização dos testes antimicrobianos, seguindo os mesmos passos dos testes descritos no ponto 3.5.

IV RESULTADOS

4.1. Padronização do protocolo de extração das teias Dragline, Tubuliforme e Aciniforme de *N. cruentata*.

A extração foi realizada em fluxo laminar. As aranhas foram imobilizadas com fita adesiva sobre uma superfície plástica que foi limpa com álcool 70% antes de ser usada, e o fio de teia Dragline que ela libera, enquanto se desloca pela superfície momentos prévios antes de ser fixada, foi tomado com pinças igualmente limpas com álcool 70% e foi fixado ao aparelho extrator com fita adesiva. A velocidade da extração foi estabelecida manualmente usando o controle de velocidade Servo Tester.

Foram obtidos 3065 m aproximadamente de teia Dragline de *N. cruentata* em 93 extrações ao longo de dois anos para cada um dos experimentos, evitando sua acumulação e mantendo assim sempre material em boas condições experimentais. A velocidade de extração média foi de 0,0262 m/s, ($\pm 0,0097$) a qual foi calculada no software Excel através da contagem de 10 voltas do aparelho (cada volta representa 30 cm) e dividido pelo o tempo que este processo levou. O tempo estabelecido para a extração foi de 20 a 25 minutos, que garantiu a sobrevivência de cada indivíduo após a extração. Os detalhes sobre a extração da teia Dragline são mostrados na Tabela 2.

A separação da teia Tubuliforme permitiu a obtenção de 100 μg por amostra, podendo ser dividida em duas amostras para os testes antimicrobianos. No caso da Aciniforme, não foi possível fazer uma pesagem da amostra, mas estima-se que a quantidade de teia obtida é menor quando comparada com a Tubuliforme.

4.2. Avaliação da presença de micro-organismos na teia Dragline de *N. cruentata*.

As amostras de teia foram expostas aos diferentes tempos de luz UV (80 μg aproximadamente em cada amostra), foram feitas as leituras dos resultados 48 horas depois de terem sido levadas à estufa, observando que a teia que foi exposta por 60 minutos foi a única que não teve crescimento de micro-organismos (Tabela 3 e Figura 9).

Tabela 2. Extração de teia Dragline com os detalhes para cada uma das 93 extrações: tempo de extração (em segundos), velocidade média de extração e metros totais de teia extraída.

Ind	Tempo (seg)	Vel. média (m/s)	Metros teia extraída	Ind	Tempo (seg)	Vel. média (m/s)	Metros teia extraída	Ind	Tempo (seg)	Vel. média (m/s)	Metros teia extraída
1	1200	0,0365	43,812	32	1130	0,0341	38,523	63	1200	0,025	29,8605
2	1200	0,0368	44,166	33	1200	0,0337	40,449	64	1200	0,025	29,8605
3	1132	0,0359	40,695	34	1500	0,0330	49,451	65	1500	0,023	35,2232
4	1200	0,0344	41,270	35	1200	0,0330	39,560	66	1200	0,025	30,061
5	1260	0,0360	45,324	36	1200	0,0349	41,860	67	1500	0,025	38,1538
6	1200	0,0340	40,756	37	1020	0,0341	34,773	68	1500	0,023	34,8394
7	1098	0,0291	31,981	38	1800	0,0345	62,069	69	1200	0,026	30,649
8	1200	0,0295	35,398	39	1800	0,0333	60,000	70	1200	0,026	30,654
9	835	0,0411	34,292	40	1200	0,0130	15,652	71	1200	0,023	27,9512
10	1202	0,0299	35,988	41	1500	0,0136	20,362	72	1100	0,023	25,6178
11	1200	0,0276	33,180	42	1200	0,0140	16,744	73	1200	0,026	31,7424
12	1200	0,0273	32,727	43	1200	0,0134	16,071	74	1200	0,026	31,7371
13	1206	0,0349	42,070	44	1500	0,0158	23,684	75	1200	0,024	29,1805
14	1206	0,0349	42,070	45	1500	0,0165	24,725	76	1200	0,026	30,8571
15	1200	0,0335	40,179	46	1500	0,0154	23,077	77	1450	0,023	33,8333
16	1206	0,0351	42,271	47	1500	0,0146	21,951	78	1200	0,024	28,9091
17	1200	0,0354	42,523	48	1500	0,0143	21,429	79	1500	0,026	38,5714
18	1200	0,0332	39,872	49	1500	0,0136	20,455	80	1250	0,023	29,1667
19	1200	0,0355	42,649	50	1530	0,0140	21,349	81	1250	0,024	30,1136
20	1200	0,0355	42,654	51	1500	0,0145	21,739	82	1200	0,023	27,5604
21	1200	0,0333	39,951	52	1630	0,0155	25,337	83	1200	0,025	30,3529
22	1200	0,0333	39,947	53	1500	0,0139	20,833	84	1500	0,025	37,813
23	900	0,0365	32,807	54	1500	0,0142	21,226	85	1500	0,024	36,7241
24	1401	0,0364	51,063	55	1500	0,0150	22,500	86	1500	0,025	37,9412
25	600	0,0343	20,590	56	1500	0,0144	21,531	87	1200	0,024	29,3793
26	1200	0,0357	42,857	57	1500	0,0143	21,429	88	1200	0,023	27,8715
27	1200	0,0333	40,000	58	1500	0,0147	22,059	89	1200	0,023	27,9512
28	1200	0,0341	40,909	59	1500	0,0153	22,959	90	1250	0,026	32,1429
29	1200	0,0357	42,857	60	1500	0,0150	22,500	91	1500	0,023	35
30	1200	0,0333	40,000	61	1507	0,0145	21,841	92	1200	0,025	30,3529
31	1200	0,0341	40,909	62	1507	0,0145	21,841	93	1200	0,025	30,2563

Tabela 3. Exposição de amostras de teia à luz UV com diferentes tempos (30, 45 e 60 min) e o controle negativo. (+) representa crescimento de micro-organismos; (-) representa ausência de crescimento de micro-organismos.

Réplica	Tratamento			
	Controle negativo	30 min	45 min	60 min
1	+	+	-	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-



Figura 9. Leitura dos resultados da exposição da teia Dragline à luz UV em diferentes tempos de exposição: Como zero (sem exposição, 30, 45 e 60 min). Observa-se ausência de micro-organismos só na amostra exposta durante 60 minutos.

4.3. Identificação de proteínas presentes nas teias Dragline e Tubuliforme de *N. cruentata*.

O gel SDS-PAGE foi corrido durante 90 minutos e com 20 mA de corrente elétrica, e foram obtidas diferentes bandas com pesos moleculares desde 20 até 116 kDa aproximadamente para a teia Dragline, sendo a proteína B a maioritária com um peso próximo aos 80 kDa, seguida pelas bandas C e A, que podem se observar nos poços 3 e 6 (Figura 10). Na teia Tubuliforme as bandas superam os 180 kDa (banda 1) e migram até o limite inferior do gel (bandas 2, 3, 4 e 5), sendo assim difícil estabelecer seu peso, mas com certeza menores de 20 kDa (Figura 10).

Foi realizada a extração de DNA presente na teia Dragline para determinar se havia micro-organismos presentes nela, e conseqüentemente se o possível efeito

antimicrobiano seria por conta de algum composto da teia, ou de um micro-organismo produtor de substâncias antimicrobianas. De acordo com os resultados obtidos, representados pela ausência de bandas no gel de Agarose e a quantificação feita no NanoDrop não foi observado DNA bacteriano (Tabela 4 e Figura 11). Desta forma, a presença de micro-organismos em outras amostras de teia pode ter sido devido à presença de fungos ou contato dela com o meio não estéril. Ao mesmo tempo, significa que os halos de inibição encontrados são devido aos produtos presentes na teia.

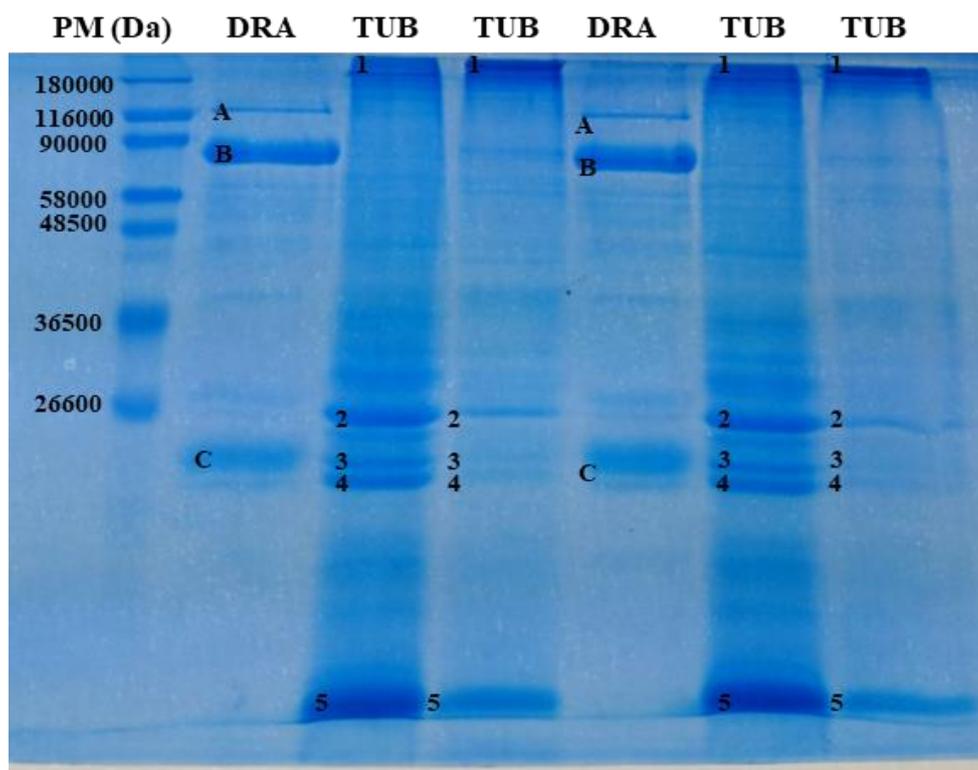


Figura 10. SDS-PAGE das proteínas das teias Dragline (DRA) e Tubuliforme (TUB) de *N. cruentata*. São três as bandas facilmente detectáveis na teia Dragline (A, B e C) com outras bandas mais finas que o corante não marcou o suficiente. Na teia Tubuliforme, são 5 as proteínas maioritárias, com presença também de outras bandas mais finas ao longo do poço.

Tabela 4. Leitura das amostras em NanoDrop 2000c com amostras de teia Dragline, pata de aranha e controle (branco). Unidades em ng/ μ l.

AMOSTRA	[AN]	A260	A280	260/280	260/230
TEIA	0,5	0,010	0,35	0,29	-0,02
PATA	37,5	0,750	0,595	1,26	0,79
BRANCO	1,5	0,031	0,30	1,03	0,27

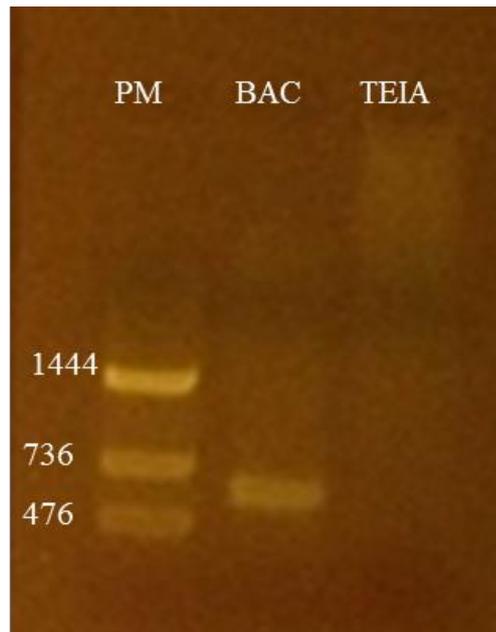


Figura 11. Gel de Agarose (1,2%) com o padrão de peso molecular (PM), DNA bacteriano isolado do queijo Kefir (BAC) e teia Dragline (TEIA). Observa-se ausência de DNA bacteriano no poço TEIA.

4.4. Testes antimicrobianos

Depois de estabelecido o tempo e a intensidade de exposição mais adequados para esterilizar a teia (60 min e 302 nm), foram desenvolvidos os experimentos em triplicata com a teia pura com luz UV e sem luz UV para avaliar sua capacidade para inibir os fungos e as bactérias analisados no presente trabalho. Os resultados mostraram que a teia pura Dragline, com e sem luz UV, de *N. cruentata* não conseguiu inibir os micro-organismos nas condições experimentais estabelecidas, sendo que não foi observado halo de inibição (Figura 12).

A teia Dragline de *N. cruentata* suspensa na mistura de ácido propanoico 6N e ácido clorídrico 50% v/v foi testada contra os micro-organismos junto com os ácidos sem a teia como controle negativo, sendo observados resultados que permitem concluir que o solvente é inadequado para este tipo de experimentos. Tanto a teia suspensa no solvente quanto o controle tiveram halo de inibição em todos os micro-organismos testados, e o tamanho dos halos não apresentaram diferença no seu diâmetro (Figura 13). No caso de *E. coli* (ATCC 25922) o resultado não foi incluído devido à contaminação do estoque do micro-organismo, obrigando a descartar esses resultados. Todos os testes foram feitos em triplicata.

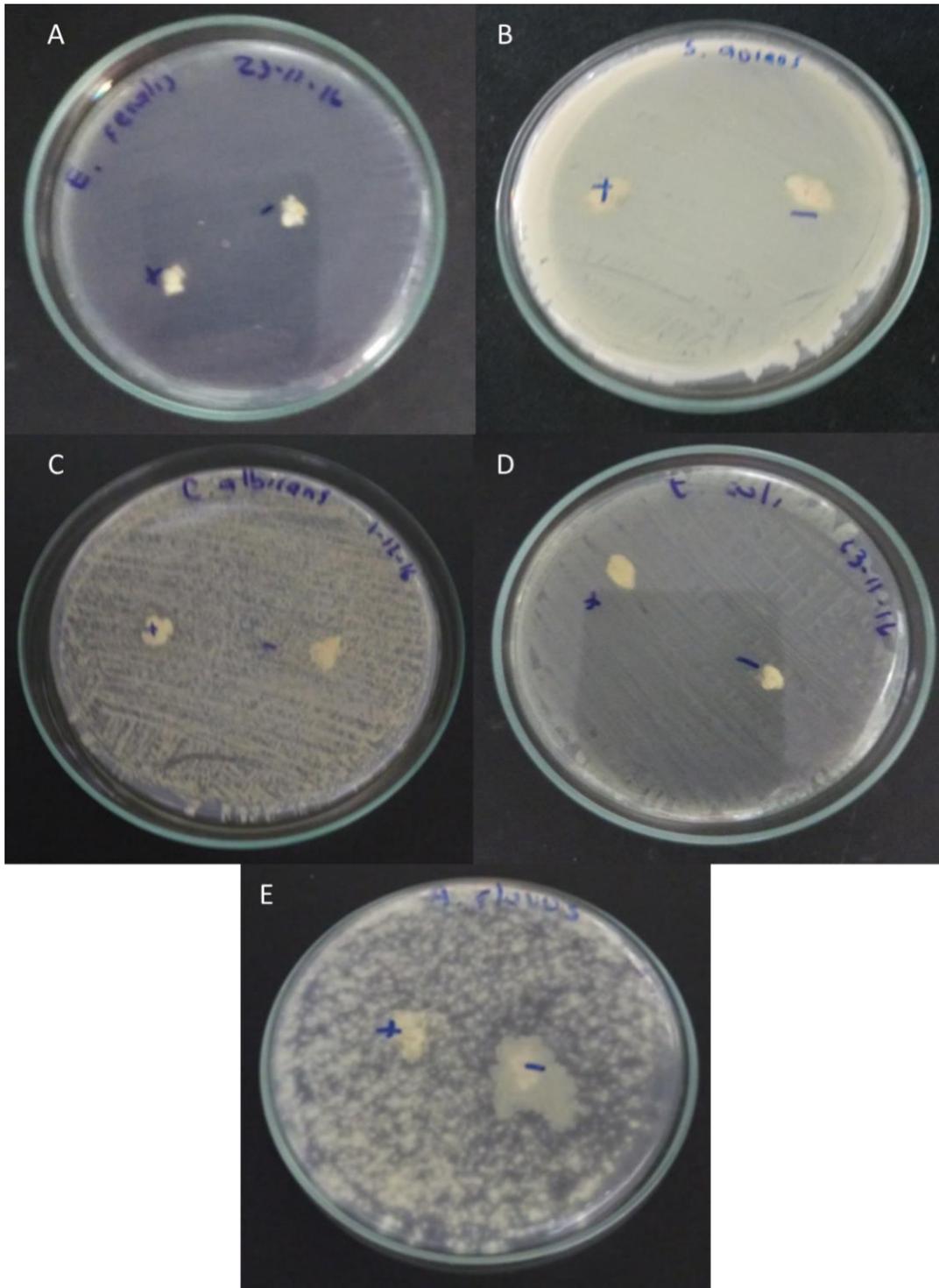


Figura 12. Análise do potencial inibitório da teia pura Dragline estéril e não estéril sobre o crescimento de (A) *A. flavus*, (B) *C. albicans*, (C) *E. coli*, (D) *E. faecalis* e (E) *S. aureus*. O (+) representa a teia exposta à luz UV e o (-) representa a teia não exposta.

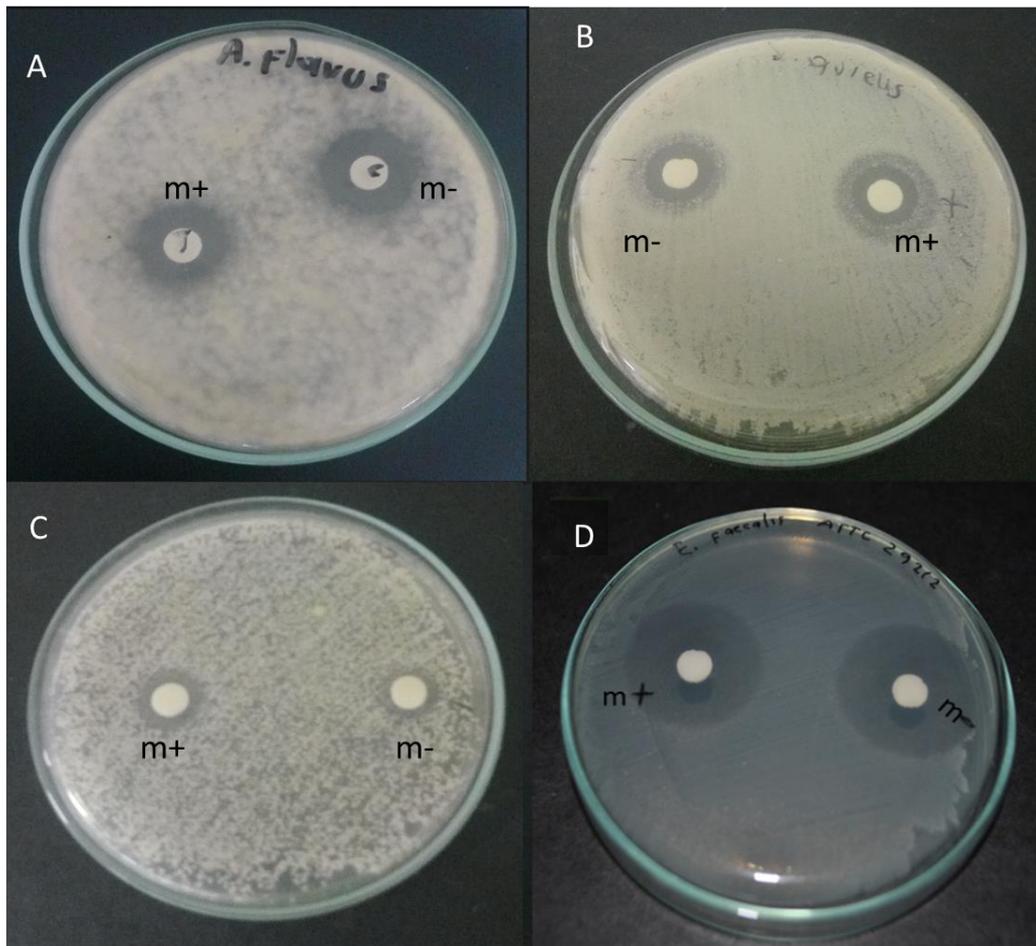


Figura 13. Avaliação do potencial inibitório da teia dragline de *N. cruentata* suspensa na mistura de ácido clorídrico e ácido propanoico (m+) e o controle negativo (os ácidos sem a teia) (m-). (a) *A. flavus*, (b) *S. aureus*, (c) *C. albicans* e (d) *E. faecalis*

No caso da teia Dragline em acetona observa-se um resultado diferente quando comparado com o resultado da teia diluída na mistura dos ácidos, não teve halo de inibição em nenhum dos casos, tanto na suspensão quanto no controle negativo (Figura 14). Os resultados do fungo *A. flavus* foram descartados por contaminação do meio de cultura, o que impossibilitou fazer a leitura dos resultados.

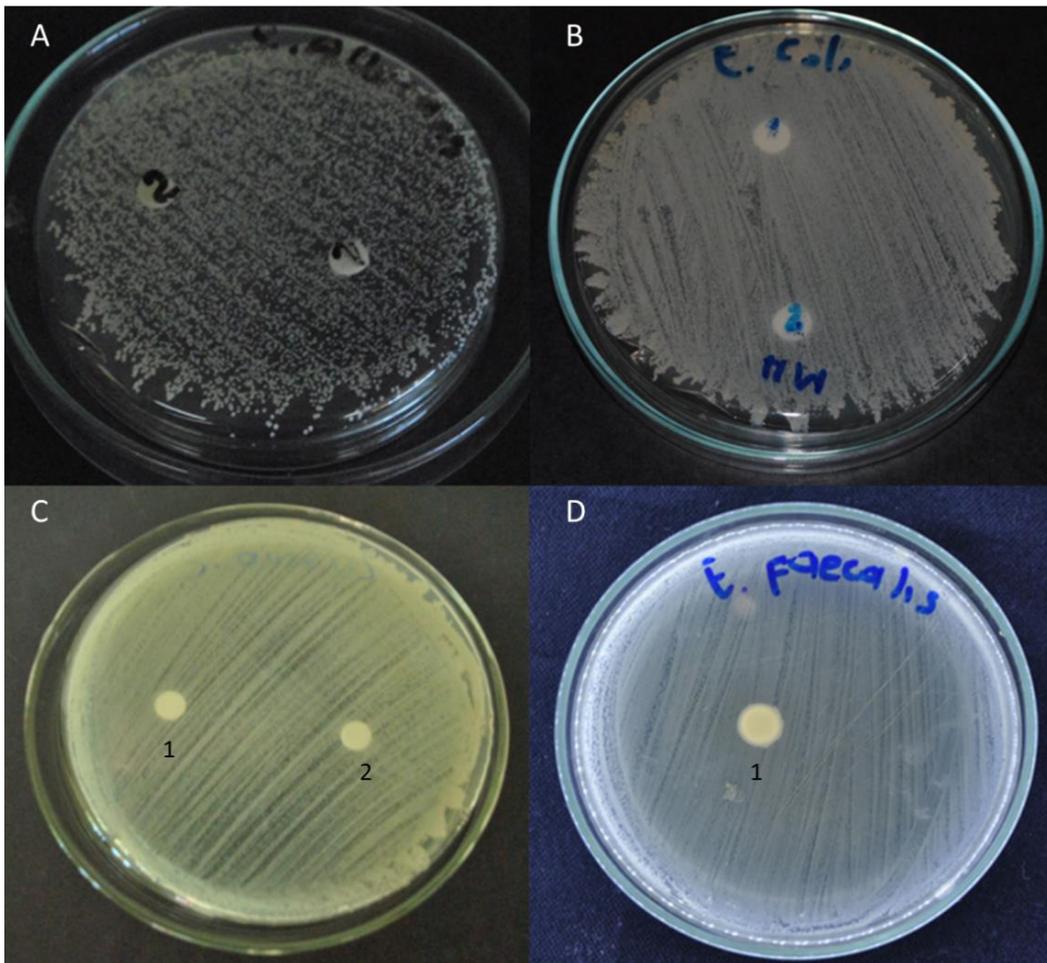


Figura 14. Análise da atividade antifúngica da teia Dragline de *N. cruentata* suspendida em acetona, representada com o número 1, e o controle negativo (acetona), representada com o número 2. (A) *C. albicans*, (B) *E. coli*, (C) *S. aureus* e (D) *E. faecalis*. A ausência do disco 2 na placa que contém *E. faecalis* foi considerada irrelevante devido à ausência de halo de inibição no disco 1) não apresentam halo de inibição nem na mistura com teia nem no controle.

O conteúdo que foi separado por centrifugação da ooteca (o sobrenadante) foi testado contra os fungos *C. albicans* e *A. flavus*, e as bactérias *E. coli* (DH5 α) e *S. aureus*, e as leituras dos resultados mostraram um halo de inibição contra *E. coli* (DH5 α) de 17 mm de diâmetro (Fig. 15C) que foi evidenciado tanto às 24 horas quanto às 48 horas, enquanto os resultados com os outros micro-organismos não mostraram halo de inibição em nenhuma das duas leituras realizadas (15A, 15B e 15D). Para este teste, não houve diferenciação entre controle nem tratamento, pois a o conteúdo da ooteca foi testado no seu estado puro, sem ser diluído em solvente nenhum. As letras N e V, que significam nova e velha, respectivamente, e que aparecem em duas das placas neste teste representam ootecas coletadas em momentos diferentes, mas como não foi possível testar em todos os micro-organismos o efeito do tempo em que a ooteca foi

colocada pela aranha, e dado que essa variável não teve resultados diferentes nos casos onde sim foi testado, dito efeito não foi levado em consideração.

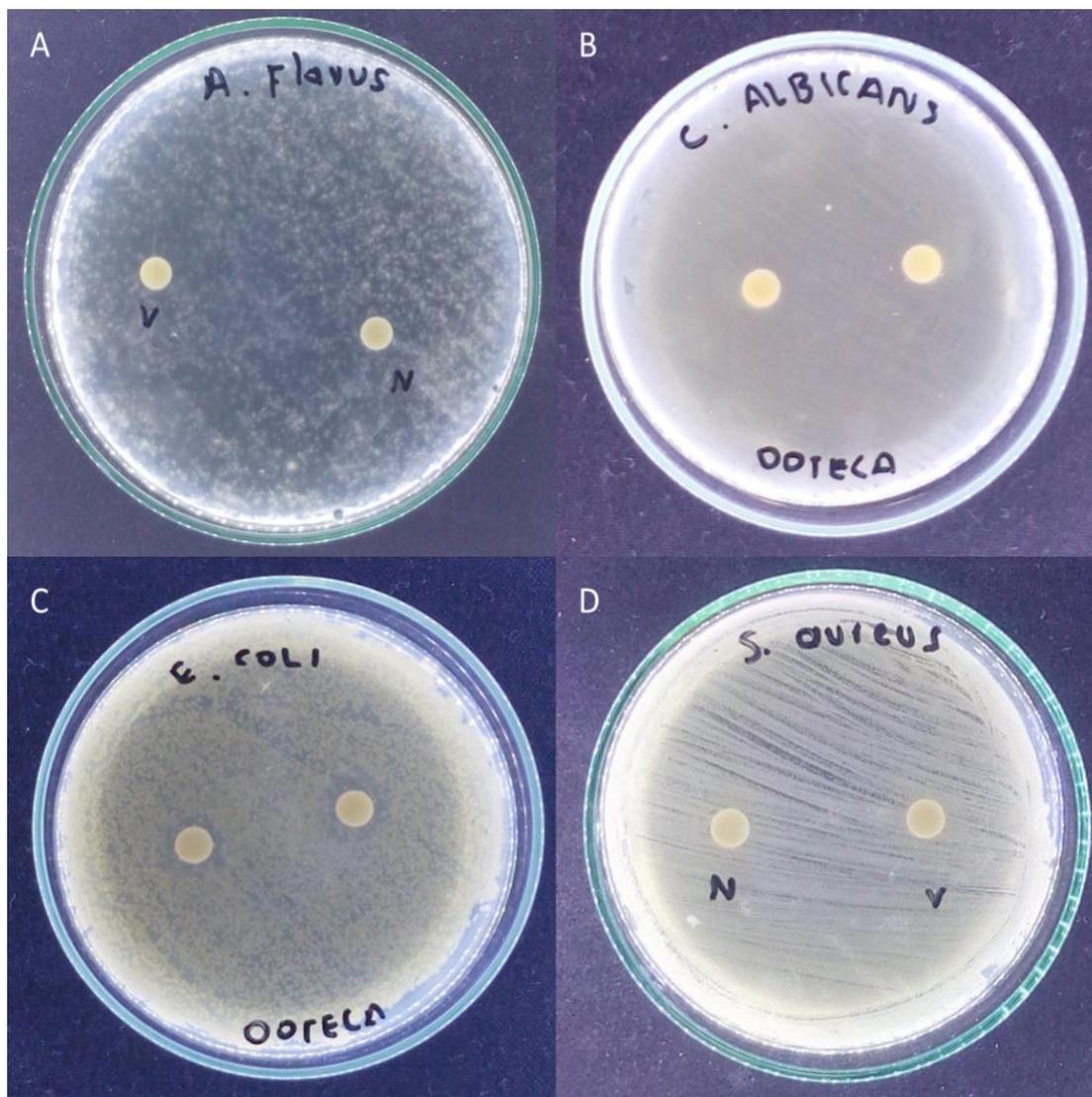


Figura 15. Leitura dos resultados do teste antimicrobiano feito com o conteúdo da ooteca de *N. cruentata*. (A) *A. flavus*, (B) *C. albicans*, (C) *E. coli* (DH5 α) e (D) *S. aureus*. O conteúdo da ooteca só teve halo de inibição *E. coli*. As letras N e V representam ootecas novas e velhas, respectivamente.

4.5. Eletroforese de gel nativo para isolamento de proteínas da teia

O gel nativo permitiu a observação de várias bandas pertencentes as teias produzidas pelas glândulas Dragline, Tubuliforme e Aciniforme (Figura16) aparentemente de alto peso molecular, pela posição delas na parte superior do gel, as quais foram cortadas e separadas do gel dentro do fluxo laminar com um bisturi estéril para poderem ser usadas nos testes antimicrobianos, obtendo um total de 12 amostras

assinaladas com quadros pretos, sendo cinco (5) da teia Tubuliforme, duas (2) da Acinidorme e quatro (4) da Dragline e o controle negativo, representado por uma (1) amostra do poço 9 que só continha o gel sem amostra de teias e que não foi assinalada, pois foi tomada do gel que não foi corado. Os resultados dos testes antimicrobianos feitos com estas amostras contra *E. coli* (DH5 α) e *S. aureus* sugerem que as proteínas isoladas não têm efeito antibacteriano, e podem ser observados na (Figura 17). A bactéria *E. faecalis* e os fungos *C. albicans* e *A. flavus*, tiveram os mesmos resultados de *E. coli* (DH5 α) e *S. aureus* (Dados não mostrados).

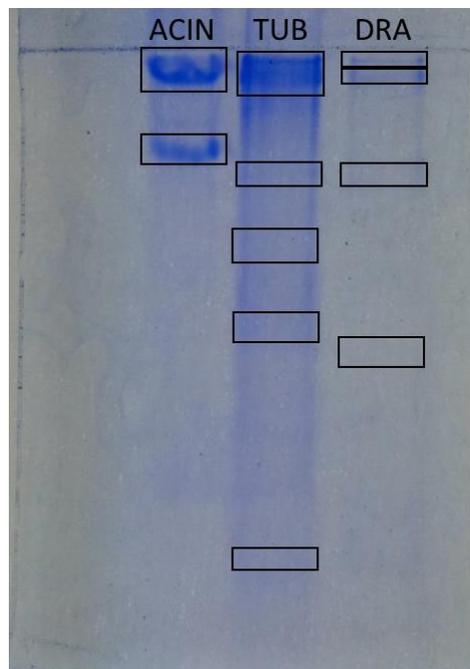


Figura 16. Gel nativo, concentração 7% com amostras de teias Aciniforme (ACIN), Tubuliforme (TUB) e Dragline (DRA). Ao longo de cada poço é possível reconhecer uma série de bandas que foram isoladas para posteriormente serem usadas nos testes antimicrobianos.

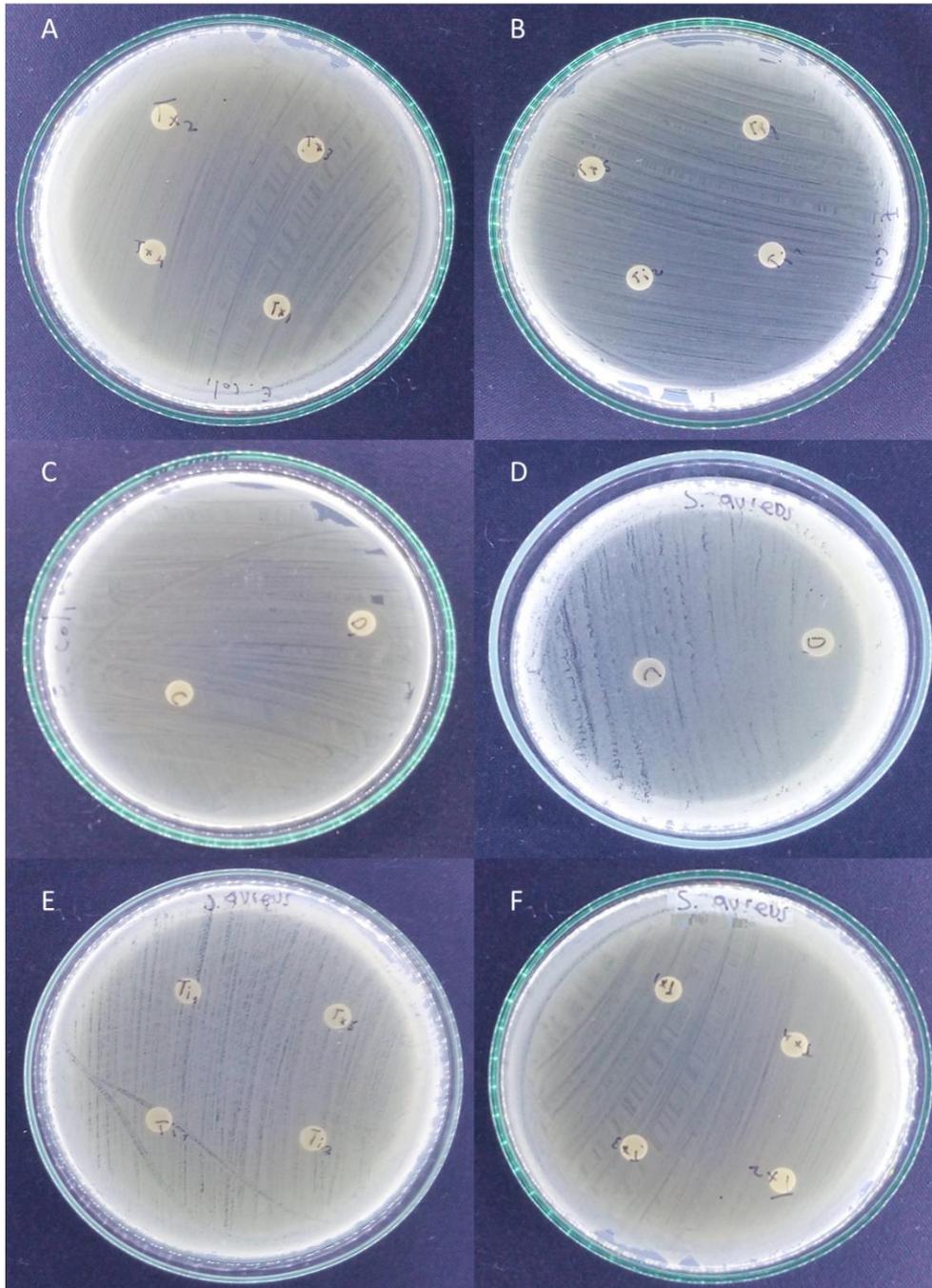


Figura 17. Leitura dos resultados dos testes antimicrobianos feitos com *E. coli* (DH5 α) (A, B e C) e *S. aureus* (D, E e F). Tx1, Tx2, Tx3, Tx4 e Tx5 correspondem com as bandas isoladas do poço que contém a amostra da teia Tubuliforme; Ti1 e Ti2, com as bandas isoladas que contém a amostra da teia Aciniforme; D1, uma das 4 bandas isoladas da amostra que contém a teia Dragline; e C, banda isolada do poço 9 usado como controle negativo.

V. DISCUSSÃO

5.1. Padronização para a obtenção das teias

Existem vários métodos para extrair a seda Dragline, como a extração direto da teia orbicular pegando os fios radiais, ou pegando a seda que ela deixa pela superfície sob a qual ela caminha, mas nenhum deles é tão efetivo quanto comparado com o aparelho desenvolvido neste projeto para a extração de teia, o qual foi uma ferramenta vital, uma vez que permite extrair uma quantidade de teia durante um tempo determinado. Além disto, é um aparelho mais simples e prático que outros anteriormente desenvolvidos, podendo conhecer a quantidade de teia obtida durante a duração extração.

O primeiro aparelho visando a extração de teia Dragline foi desenvolvido por Wilson (1962) com o objetivo de estudar as unhas do tarso, os aparelhos de fiação e outros fatores que afetam a fiação da Dragline de *Araneus diadematus*, e usando éter para anestésias as aranhas. Anos depois Work & Emerson (1982), desenvolveram outro aparelho que permitia a extração de teia Dragline com uma velocidade aproximada de 5 cm/s. Estes modelos de aparelho dependiam de muitas peças para seu funcionamento, o que demandava uma maior complexidade para uma extração efetiva e, no caso de Work & Emerson (1982), seu uso requeria da presença de duas pessoas para garantir o uso correto, necessitando também do uso de anestesia para adormecer as aranhas, no caso CO₂. Mesmo que estes aparelhos hoje em dia são difíceis de usar pelas características já mencionadas, a importância destes trabalhos é ser reconhecidos como os primeiros (e modernos) métodos efetivos na época de seu desenvolvimento.

Viney et al., (1994) usando como modelo de referência a pesquisa de Wilson (1962), desenvolveram um aparelho para extrair teia e pesquisar as características óticas da Dragline de *N. cruentata*. Madsen et al., (1999) descreveu que a teia de aranhas das famílias Araneidae, Tetragnathidae, Theridiidae e Pisauridae podem ter diferenças significativas inter e intraespecíficas, e essas variações consideráveis vão depender de fatores estressantes como a fome e condições ambientais como a velocidade de enrolamento da teia. Plaza Baonza (2004) demonstrou que há diferenças nas propriedades mecânicas da teia entre os fios feitos naturalmente pela aranha e fios extraídos forçadamente. Se bem estes aparelhos para extração de teia foram efetivos e

fizeram algumas modificações para melhorar seu funcionamento, como a redução do número de peças ou a inclusão de osciloscópio e amplificador, nesta pesquisa o aparelho desenvolvido para a extração possui características melhoradas, como a possibilidade de calcular com facilidade a quantidade de metros de teia extraída, um número menor de peças que facilitam ainda mais seu funcionamento, a conexão ao computador como fonte de energia e a possibilidade de ser usado num ambiente estéril.

Somente Plaza Baonza (2004) informou a velocidade de extração usada em seus experimentos, que foi de 1,5 cm/s, ao mesmo tempo que indicou que a velocidade natural média em que uma aranha extrai sua seda para fazer sua teia seria entre 1 e 10 cm/s. A velocidade de extração neste trabalho foi de 2,62 cm/s e se encaixa dentro do valor determinado para a velocidade natural, logo a velocidade estabelecida neste estudo não é um fator que possa ser considerado como prejudicial para a qualidade da teia obtida. O fato de terem sido realizadas quase 100 extrações de teia dragline corrobora a importância da utilização de equipamentos apropriados como o desenvolvido neste trabalho para a obtenção de teia em grandes quantidades (metros). Por outro lado, a quantidade de metros de teia coletada representa uma quantidade de peso de aproximadamente 0,8732 g.

Esses trabalhos citados anteriormente, junto com o trabalho aqui apresentado, usam um método de extração mecânica que é chamado de “seda forçada” (forced silk, em inglês) que, segundo Guinea et al., (2005), que padronizaram a extração a 1 cm/s e contrastou com fios feitos naturalmente pela aranha, é um método adequado para obtenção de teia sem modificar suas propriedades e em quantidades suficientes. Já Madsen et al., (1999) afirmaram que diferentes velocidades, de 0,4 cm/s até 8 cm/s, afetam algumas propriedades elásticas da teia, sem utilizarem seus experimentos fios obtidos naturalmente como controle e sim todos obtidos por extração mecânica. Ambos trabalhos usaram como modelo de referência aranhas do gênero *Argiope*, que pertence à família Araneidae, assim como *N. cruentata*.

O tempo e a velocidade estabelecidos para a extração, que estiveram entre 20 e 25 minutos e 2,62cm/s respectivamente, sendo testado o tempo de extração para reduzir o estresse da aranha e garantir a sua sobrevivência após a extração. Inicialmente o tempo de extração foi de 15 minutos, o qual foi aumentando de 5 em 5 minutos até chegar aos 30 minutos de extração, momento no qual as aranhas testadas, três no total, morreram

após de finalizada a extração. Desta forma, foram estabelecidos tempos entre 20 a 25 minutos que podem ser considerados como seguros para a sobrevivência de *N. cruentata* e a possibilidade da mesma aranha ser utilizada posteriormente numa nova extração.

Por outro lado, a velocidade de extração teve momentos que atingiu os 4 ou 5 cm/s durante os testes experimentais afim de avaliar o correto funcionamento do aparelho, ainda que este valor esteja dentro dos tempos estabelecidos por Plaza Baonza (2004), acredita-se que velocidades menores representem um estresse menor, pois segundo Madsen et al., (1999) uma das consequências de aumentar a velocidade de extração é o aumento da probabilidade do fio se arrebentar, como demonstrado por Wilson (1962) (Figura 6). Ao longo das 93 extrações realizadas neste trabalho, não foi registrado ruptura dos fios da teia Dragline, o que indica que a velocidade implementada se manteve dentro do limite de estresse necessário para poder causar este dano.

Neste estudo a aranha não foi adormecida com CO₂ para facilitar a extração da teia, diferentemente dos trabalhos de Work & Emerson (1982) e Madsen et al., (1999), os quais usaram esta técnica para fazer diferentes experimentos, facilitando sua fixação e diminuindo o estresse da aranha nesse ponto do experimento. É sabido que quanto menor seja o estresse sofrido pela aranha, menor também é a probabilidade de alterar a estrutura da proteína ou o alinhamento dos aminoácidos presentes na teia (Blamires et al., 2017). Porém, nesses mesmos experimentos desenvolvidos por eles, a teia só foi extraída depois da aranha ter acordado do efeito do CO₂, assim este gás foi utilizado para facilitar a fixação da aranha no aparelho e não durante a extração da teia propriamente dita. Assim, sugere-se que a utilização de CO₂ não é essencial nem relevante para o processo de extração, levando em consideração que *N. cruentata* não é uma espécie reconhecida pela periculosidade da sua peçonha e que para estudos com aranhas peçonhentas o uso do CO₂ sim seria recomendável.

5.2. Avaliação da presença de micro-organismos na teia Dragline *N. cruentata*.

A extração num ambiente isolado, sem presença de micro-organismos, (Figura 11) permitem sugerir que a presença de micro-organismos contaminantes nos testes antimicrobianos iniciais ocorreu devido ao tratamento da teia em ambientes não estéreis.

Adicionalmente a evidência de ausência de DNA bacteriano nas amostras de Dragline analisadas usando primers para 16S na teia Dragline de *N. cruentata* (Tabela 4) indicam que os resultados não estiveram afetados por este fator.

Estes resultados reforçam a necessidade da realização da extração da teia dentro de um ambiente estéril visando o desenvolvimento de pesquisas com fins biotecnológicos e microbiológicos. Ao mesmo tempo, nesta pesquisa são gerados os primeiros reportes sobre presença/ausência de micro-organismos em teias de aranha, os quais abrem uma porta para mais pesquisas sobre a relação de teias e micro-organismos.

5.3. Identificação de proteínas presentes nas teias Dragline e Tubuiforme de *N. cruentata*

O gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 10) mostra seis bandas, sendo três majoritárias na amostra da teia Dragline, não entanto Babb et al., (2017) e Sanggaard et al., (2014) descreveram a presença de mínimo oito espidroínas, as quais, segundo afirmam Lin et al., (2015), podem ter mais de 3000 aminoácidos e pesos moleculares maiores do que 250 kDa, sendo este valor maior que os resultados obtidos no gel de poliacrilamida, onde a amostra de teia Dragline não apresentou pesos moleculares maiores que o padrão de peso molecular que é de 180 kDa. Embora algumas bandas observadas no gel de SDS-PAGE correspondam com os pesos moleculares reportados em Babb et al., (2017), nem todas as proteínas observadas demonstram correspondência.

Assim pelo menos duas hipóteses podem explicar os resultados. A primeira é que a concentração de acrilamida do gel não permitiu que as proteínas de maiores pesos moleculares migrassem, e a segunda e mais provável hipótese é que nem todas as espécies de aranhas orbiculares têm as mesmas oito proteínas. Por outro lado, se observou também bandas finas (Figura 16), que poderiam representar outras proteínas. Não entanto foram bem visualizadas com o azul de coomassie, fazendo com que o uso de outro corante como o Nitrato de Prata possa ser uma alternativa para visualizar tanto no SDS-PAGE quanto no BN-PAGE.

Esses resultados são diferentes aos reportados por Bittencourt et al, (2007), que encontraram apenas uma proteína na glândula Ampola maior e mais uma na

Tubuliforme (Cilíndrica), e no caso das proteínas presentes nesta última glândula, os resultados poderiam representar tanto proteínas próprias da teia, quanto proteínas de algum micro-organismo (Figura 9), já que a teia não foi mantida num ambiente estéril. Adicionalmente, nos trabalhos de Sanggaard et al., (2014) e Babb et al., (2017) só foi descrita a proteína TuSp com peso molecular de 273.978 kDa para a teia produzida na glândula Tubuliforme, utilizando *N. clavipes* como modelo de referência, enquanto Bittencourt et al., (2007) utilizaram *N. cruentata*.

5.4. Testes antimicrobianos

Um dos métodos mais usados para o controle físico do crescimento de micro-organismos, além do calor e baixas temperaturas, é a radiação (Willey, 2008), a qual foi usada inicialmente sobre a teia para matar qualquer micro-organismo presente nela. Segundo Wright & Goodarce (2012) espera-se que a exposição à luz UV a 254 nm e por um período de tempo de 20 minutos danifique o DNA e afete assim micro-organismos que já estão presentes na amostra de teia. Este tratamento, todavia, não levaria à desnaturação de proteínas, porém, esses valores são diferentes aos aqui usados, pois a luz UV com uma intensidade de 302 nm foi testada durante 30, 45 e 60 minutos, sendo este último tempo de exposição o que conseguiu inibir o desenvolvimento dos micro-organismos presentes na teia durante os primeiros experimentos. No entanto, diferentes pesquisadores fornecem informações contrárias sob a exposição da seda à luz UV.

Segundo Nelson et al., (2015), os principais fatores que desnaturam as proteínas são a temperatura e o pH, e não menciona a luz UV como um fator, o qual sugere que não há uma alteração da composição bioquímica da teia. Por outro lado, Lai & Goh (2015) descreveram os efeitos da exposição de luz UV sob a teia de aranha, concluindo que há uma diminuição de suas propriedades mecânicas devido ao rompimento das cadeias polipeptídicas. Esses dois argumentos, com visões diferentes sobre o mesmo aspecto, deixam dúvidas sobre a integridade da teia na hora de avaliar a capacidade para inibir micro-organismos, argumento que foi importante no momento de padronizar o protocolo para a extração da teia e realizar o procedimento dentro do fluxo laminar, deixando de lado o possível efeito negativo da luz UV sobre os compostos presentes na teia.

Na leitura dos resultados dos testes antimicrobianos foram observados que alguns fatores tiveram influência, como a escolha dos solventes e a forma como as amostras foram tratadas com eles, assim como os fatores meramente biológicos, como a natureza da teia e a capacidade dos micro-organismos para resistir aos efeitos dos compostos presentes nela.

Acetona, metanol, etanol e água destilada foram usadas testados por Mirghani et al., (2012) para avaliar seu efeito antimicrobiano contra *E. coli* e *B. subtilis*, encontrando diferentes halos de inibição nos seus resultados, sendo que com a acetona foi observado um maior halo de inibição, com 9 mm e 10 mm respectivamente. Todavia eles não informaram a presença de controle negativo utilizando somente o solvente, nem foi informada a concentração da suspensão, nem o diâmetro do disco usado nos testes. No presente estudo buscamos realizar uma precisa padronização levando todos esses fatores em consideração. A ausência de halos de inibição após a utilização de solventes não necessariamente indica ausência de atividade antimicrobiana. Em nossos experimentos a teia foi somente ressuspensa em solventes, não tendo sido realizados métodos de maceração ou ultrassom, visando maior efetividade na extração dos compostos da teia, sendo esta uma alternativa para futuros estudos.

A mistura dos ácidos propanoico e clorídrico foi usada por Lombardi & Kaplan (1990) para determinar a composição de aminoácidos da teia Dragline de *N. clavipes*, conseguindo manter a integridade da teia, a qual foi observada a partir do peso molecular usando um SDS-PAGE e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e nunca tinha sido usada para testes antimicrobianos. Porém, foram observados halos de inibição tanto na suspensão quanto no controle negativo, demonstrando que este solvente não é apropriado para a realização de testes de atividade antimicrobiana nas condições experimentais estabelecidas.

A capacidade dos micro-organismos de resistir aos agentes antimicrobianos também é algo que deve ser analisado. A emergência de resistência antimicrobiana é inevitável para quase todos os novos medicamentos e é reconhecida como o maior problema no tratamento de infecções tanto em hospitais quanto nas comunidades (Kapoor et al., 2017). A bactéria *E. faecalis* tem a capacidade de modificar a alvos moleculares, alterando os precursores da parede celular e evitando que os peptídeos antimicrobianos a cruzem. *E. faecalis* e *S. aureus* possuem enzimas modificadoras de

aminoglicosídeos, que impedem a união das moléculas antimicrobianas com suas subunidades 30S ribossomais. *E. coli*, que é uma bactéria gram negativa, pode mudar a permeabilidade da sua membrana externa como mecanismo de resistência aos antimicrobianos. Fungos filamentosos, como o *A. flavus*, podem ter sistemas de bombas de efluxo que fazem a extrusão do composto para o exterior por transporte ativo, bem como podem ter aumento da expressão de alvos moleculares e modificações em enzimas das vias metabólicas (Mellado et al., 2002). O fungo *C. albicans* assim como fungos filamentosos e bactérias também possui capacidade de superexpressão de bombas que expulsam as moléculas antimicrobianas (White et al., 2002).

Nos resultados dos testes antimicrobianos desenvolvidos com o conteúdo da ooteca foi observado o halo de inibição contra *E. coli* (Figura 14C), resultado que concorda com o resultado da pesquisa desenvolvida por Lei et al., (2015), na qual foi utilizado o extrato da ooteca de *Latrodectus tredecimguttatus* para avaliar seu potencial antibacteriano, testando além de *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essa pesquisa teve diferenças consideráveis com o atual trabalho, sendo que eles maceraram a ooteca com PBS neutro, e separaram o sobrenadante do precipitado por centrifugação durante 10 minutos a 4°C e 10.000 G, processo que foi realizado um total de três vezes, com uma proporção 1:3 massa/volume, contrario deste trabalho, onde só foi centrifugado uma única vez, por 15 minutos a 4°C a 17.000 G.

Outra diferença com a pesquisa de Lei et al., (2015), foi que no presente trabalho o conteúdo da ooteca foi usado puro, e não separado por técnica alguma para isolar os compostos, e desta forma não podemos esclarecer qual foi o composto, ou mistura de compostos, responsáveis pela inibição da bactéria Gram negativa aqui testada. No caso, Lei et al., (2015) identificaram vários compostos e estabeleceram que Latroeggtxin-IV, com um peso molecular de 3,6 kDa, é um composto com potencial antibacteriano. Para interpretar corretamente este resultado deve se considerar também que aranhas da família Araneidae e Theridiidae, as quais agrupam a *N. cruentata* e *L. tredecimguttatus* respectivamente, tem hábitos diferentes, sendo a primeira uma aranha orbicular, e a segunda uma aranha de teia irregular.

Aranhas tem se caracterizado por apresentar diferentes tipos de defesas para suas ootecas, tanto mecânicas quanto biológicas, como mencionado anteriormente. Hieber

(1992a) estudou os mecanismos de defesa das ootecas das aranhas *Mecynogea lemniscata* e *Argiope aurantia* contra predadores generalistas e especialistas, concluindo que a função principal da envoltura das ootecas é a proteção contra predadores e parasitas, sendo mais efetivas contra predadores especialistas. Num outro estudo com estas mesmas espécies, Hieber (1992b) demonstrou, tanto em condições de laboratório quanto no ambiente natural, que outra função da envoltura das ootecas também é de proteção contra a dissecação. Estas considerações sugerem que ootecas de *N. cruentata*, que faz parte da mesma família de ambas espécies, podem exercer também essas funções.

Outros artrópodes também são conhecidos por desenvolver propriedades antimicrobianas nos seus ovos, como já foi descrito por Jacobs & van der Zee (2013), descrevendo o papel da serosa como primeira linha de defesa imune no desenvolvimento de *Tribolium castaneum*. No processo desenvolvimento embrionário de insetos e aracnídeos existem muitas diferenças, dentre estas a ausência da membrana protetora serosa nos ovos de aranha, a qual demonstrou ser a produtora dos peptídeos antimicrobianos em *T. castaneum*. Sendo assim, existe a possibilidade de que estes artrópodes quelicerados tenham desenvolvido outros mecanismos de defesa na sua embriogênese.

5.4. Eletroforese de gel nativo para isolamento de proteínas das teias

As análises com as proteínas separadas usando BN-PAGE utilizadas neste estudo foi inovadora, pois não se tem registros do uso desta metodologia para separação e uso de proteínas em estudos de propriedades antimicrobianas de teias de aranha. Os resultados deste experimento, assim como no SDS-PAGE mostram várias proteínas nos tipos de teia analisadas, e esse número de proteínas não corresponde com o número de proteínas proposto por Bab et al., (2017) que são: 8 para Dragline, 1 para Tubuliforme e 1 para Aciniforme. No nosso estudo foram: 4 para Dragline, 5 para Tubuliforme e 2 na Aciniforme. Embora o BN-PAGE não tenha sido realizado com padrão de peso molecular, as proteínas são possivelmente de alto peso molecular, uma vez que a maioria delas ficaram na parte superior do gel, mesmo após duas horas de corrida eletroforética. Para *Nephilingis cruentata* foram descritas as proteínas achadas nas suas

teias, particularmente na ampola maior, ampola menor, tubuliforme e flageliforme, uma para cada tipo de teia usando a técnica de RT-PCR e amostras de RNA total isoladas com Trizol (Bittencourt et al., 2007), e que é reafirmado por Bittencourt et al., (2012) que fizeram uma revisão das espiroínas identificadas em diferentes aranhas representativas da araneofauna brasileira.

A ausência de halos de inibição nas proteínas separadas do gel BN-PAGE pode estar relacionada com o peso molecular das proteínas que foram obtidas que eram de alto peso molecular. Em experimentos desenvolvidos por Gomes et al., (2011) e Harvey et al., (2017), os peptídeos de teia de aranha que apresentaram atividade antimicrobiana possuem menos de 25 kDa, enquanto aqui neste estudo foram usadas proteínas que superam esses pesos. Pesquisas com outros modelos de referência, como o polissacarídeo Quitosana, mas com o mesmo objetivo de achar compostos antimicrobianos, determinaram que quanto menor o peso molecular do composto, melhor o resultado nas leituras dos testes antimicrobianos (Shin et al., 2001; Fernández-Pan et al., 2015), sugerindo a necessidade de fazer novos gels de corrida com uma maior concentração.

Purificação de proteínas em aracnídeos tem sido usada para vários aspectos, como no caso de Frontali et al., (1976) que purificou peptídeos de *Latrodectus mactans* para avaliar sua ação sobre mudanças neuromusculares em rãs; Corzo & Escoubas (2003) fizeram uma revisão sobre peptídeos farmacologicamente ativos de aranhas, concluindo que no veneno delas, os peptídeos de até 12 kDa podem ter algum tipo de atividade; em escorpiões também foi utilizada a purificação de peptídeos de baixo peso molecular, (e.g. 7,2 kDa), para avaliar sua ação analgésica e antitumoral em ratos (Shao et al., 2014). Adicionalmente, Cordeiro et al., (2015) estudaram os compostos ativos em aracnídeos de importância médica no Brasil como aranhas, escorpiões e carrapatos, demonstrando que são principalmente os peptídeos de baixo peso molecular os que possuem importância. Portanto, a purificação de proteínas de aranha, tanto das teias quanto das ootecas, poderia ser uma ferramenta importante para avaliar se alguma delas de forma independente, ou em conjunto, tem a capacidade de inibir o crescimento dos micro-organismos, pois este tipo de pesquisas não tem sido amplamente desenvolvidas.

VI. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de aparelhos apropriados para a extração da teia Dragline com controle de velocidade de extração foi essencial para otimizar o processo de extração das teias neste estudo.

A teia dragline de *N. cruentata* no seu estado puro não apresentou atividade antimicrobiana. Os solventes usados podem ser testados junto com ultrassom ou maceração para melhorar a liberação dos compostos presentes nas teias.

Não foi observada amplificação de DNA bacteriano a partir das teias obtidas, sugerindo ausência de bactérias nas teias.

A purificação de proteínas de aranha, tanto das teias quanto das ootecas, pode ser uma ferramenta importante para avaliar se alguma delas de forma independente, ou em conjunto, tem a capacidade de inibir o crescimento dos micro-organismos aqui testados.

Foi observado pela primeira vez em *N. cruentata*, como já observado em outras espécies de aranhas e também em insetos, que sua ooteca contém moléculas com atividade antimicrobiana contra *E. coli*.

O Brasil é um país megadiverso e possui mais de 3000 espécies de aranhas (cerca do 7% da biodiversidade mundial) as quais têm sido muito pouco usadas em estudos biotecnológicos, mesmo sabendo do seu grande potencial. Este trabalho abre portas para novas pesquisas e metodologias que ligam a ciência básica com a ciência aplicada, sendo muito importante para futuros avanços na ciência brasileira.

VII. REFERÊNCIAS

Agnarsson, I., Boutry, C., & Blackledge, T. A. (2008). Spider silk aging: initial improvement in a high performance material followed by slow degradation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(8), 494-504.

Agnarsson, I., Boutry, C., Wong, S. C., Baji, A., Dhinojwala, A., Sensenig, A. T., & Blackledge, T. A. (2009). Supercontraction forces in spider dragline silk depend on hydration rate. *Zoology*, 112(5), 325-331.

Agnarsson, I., Coddington, J. A., & Kuntner, M. (2013). Systematics: progress in the study of spider diversity and evolution. *Spider Research in the 21st Century: Trends and Perspectives*. Siri Scientific Press, Manchester, 58-111.

Agnarsson, I., Kuntner, M., & Blackledge, T. A. (2010). Bioprospecting finds the toughest biological material: extraordinary silk from a giant riverine orb spider. *PloS one*, 5(9), e11234.

Altounian, V., & Pennisi, E. (2017). A spinner's secrets.

Amaley, A., Gawali, A. A., & Akarte, S. R. (2014). Antibacterial nature of dragline silk of *Nephila pilipes* (Fabricius, 1793). *Indian Journal of Arachnology*, 3 (1), 08-11.

Amplicon®, P. C. R., Clean-Up, P. C. R., & Index, P. C. R. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.

Amsilk.com. (2018). Home | AMSilk. [Online] Available at: <https://www.amsilk.com/home/>. Visitado: 25 março de 2018.

Andes, D. R., Safdar, N., Baddley, J. W., Alexander, B., Brumble, L., Freifeld, A., ... & Morrison, V. (2016). The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transplant Infectious Disease*, 18(6), 921-931.

ARACHNO HOBBY BRASIL. (2017 Maio 2017). Uma geral sobre anatomia das mygalomorphas. Recuperado de aracnohobbybrasil.blogspot.com.br/2009/09/uma-geral-sobre-anatomia-das.html. Visitado em: 20/05/2017.

Austin, A. D. (1985). The function of spider egg sacs in relation to parasitoids and predators, with special reference to the Australian fauna. *Journal of Natural History*, 19(2), 359-376.

Ayoub, N. A., Garb, J. E., Kuelbs, A., & Hayashi, C. Y. (2012). Ancient properties of spider silks revealed by the complete gene sequence of the prey-wrapping silk protein (AcSp1). *Molecular biology and evolution*, 30(3), 589-601.

Babb, P. L., Lahens, N. F., Correa-Garhwal, S. M., Nicholson, D. N., Kim, E. J., Hogenesch, J. B., ... & Voight, B. F. (2017). The *Nephila clavipes* genome highlights the diversity of spider silk genes and their complex expression. *Nature Genetics*, 49(6), 895-903.

Babu, K. M. (2013). *Silk: processing, properties and applications*. Elsevier.

Beccaloni, J. (2009). *Arachnids*. CSIRO Publishing. Londres.

- Bennett, J., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 497-516.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., & Denamur, E. (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of infectious diseases*, 177(3), 642-650.
- Bittencourt, D. M. D. C. (2007). Caracterização molecular de proteínas de sedas de aranhas da biodiversidade brasileira.
- Bittencourt, D., Souto, B. M., Verza, N. C., Vinecky, F., Dittmar, K., Silva, P. I., ...& Rech, E. L. (2007). Spidroins from the brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(4), 597-606.
- Bittencourt, D., Oliveira, P. F., Prosdociami, F., & Rech, E. L. (2012). Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk. *Genetics and Molecular Research*, 11(3), 2360-2380.
- Blackledge, T. A., & Hayashi, C. Y. (2006). Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). *Journal of experimental biology*, 209(13), 2452-2461.
- Blackledge, T. A., Kuntner, M., & Agnarsson, I. (2011). The form and function of spider orb webs: evolution from silk to ecosystems. *Advances in insect physiology*, 41, 175.
- Blackledge, T. A., Scharff, N., Coddington, J. A., Szüts, T., Wenzel, J. W., Hayashi, C. Y., & Agnarsson, I. (2009). Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5229-5234.
- Blamires, S. J., Blackledge, T. A., & Tso, I. M. (2017). Physicochemical property variation in spider silk: ecology, evolution, and synthetic production. *Annual review of entomology*, 62, 443-460.
- Bon, M. (1710). A discourse upon the usefulness of the silk of spiders. By Monsieur Bon, President of the Court of Accounts, Aydes and Finances, and President of the Royal Society of Sciences at Montpellier. Communicated by the author. *Philosophical Transactions*, 27(325-336), 2-16.
- Boutry, C., & Blackledge, T. A. (2010). Evolution of supercontraction in spider silk: structure–function relationship from tarantulas to orb-weavers. *Journal of Experimental Biology*, 213(20), 3505-3514.
- Bristowe, W. S. (1958). *World of Spiders*. New Nat. Ser. London: Collins. vi, 304.
- Brooks, G. F., Jawetz, E., & Blengio Pinto, J. R. (2011). Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología médica* (No. 616.9041 616.9041 J3 JAWE4).
- Brusca, R., & Brusca, G. (2005). *Invertebrados*. 2ª edición en español.
- Candelas, G. C., Ortiz, A., & Molina, C. (1986). The cylindrical or tubiliform glands of *Nephila clavipes*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 237(2), 281-285.

- Cockerill, F. R., & Patel, J. B. (2015). M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. *Clin Lab Stand Inst*, 35, 44-49.
- Coddington, J. A. (1989). Spinneret silk spigot morphology: evidence for the monophyly of orbweaving spiders, Cyrtophorinae (Araneidae), and the group Theridiidae plus Nesticidae. *Journal of Arachnology*, 71-95.
- Comstock, J. H. (1948). *The spider Book*, (revised ed.). Comstock Publ. Co. Ithaca NY (36).
- Cordeiro, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A., & Arantes, E. C. (2015). Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21(1), 24.
- Drasar, B. S., & Hill, M. J. (1974). *Human intestinal flora*. Academic Press (London) Ltd., 24/28 Oval Road, London, NW1.
- Diniz, S. (2011). Predation and feeding on the tropical house gecko *Hemidactylus mabouia* (Squamata: Gekkonidae) by the giant orb-weaver spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). *Herpetology Notes*, 4, 357-358.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1), 30-36.
- Eberhard, W. G. (1990). Function and phylogeny of spider webs. *Annual review of Ecology and Systematics*, 21(1), 341-372.
- Fernández-Pan, I., Maté, J. I., Gardrat, C., & Coma, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hydrocolloids*, 51, 60-68.
- Foelix, R. F. (2011) *Biology of Spiders*. Oxford University Press.
- Francke, O. F. (2011). La aracnología en México: pasado, presente, futuro. Em *Memorias e resumos, III Congreso Latinoamericano de Aracnología*, E. Flórez y C. Perafán (eds.). Sistecrom Limitada, Colombia (pp. 43-50).
- Frontali, N., Ceccarelli, B., Gorio, A., Mauro, A., Siekevitz, P., Tzeng, M. C., & Hurlbut, W. P. (1976). Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. *The Journal of Cell Biology*, 68(3), 462-479.
- Garb, J. E. (2013). *Spider Silk: An ancient biomaterial for the 21st century. Spider Research in the 21st Century: Trends and Perspectives*. (D. Penney, ed.). Siri Scientific Press, Manchester, UK, 252-281.
- Garwood, R. J., Dunlop, J. A., Selden, P. A., Spencer A. R., Atwood, R. C., Vo, N. T., & Drakopoulos, M. (2016). Almost a spider: a 305-million-year-old fossil arachnid and spider origins. In *Proc. R. Soc. B (Vol. 283, No. 1827, p. 2016125)*. The Royal Society.
- Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J., & Lewis, R. (2001). Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science*, 291(5513), 2603-2605.

- Giard, J. C., Hartke, A., Flahaut, S., Benachour, A., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1996). Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Current microbiology*, 32(5), 264-271.
- Guinea, G. V., Elices, M., Real, J. I., Gutiérrez, S., & Pérez-Rigueiro, J. (2005). Reproducibility of the tensile properties of spider (*Argiope trifasciata*) silk obtained by forced silking. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 303(1), 37-44.
- Giribet, G., & Edgecombe, G. D. (2013). The Arthropoda: a phylogenetic framework. In *Arthropod Biology and Evolution* (pp. 17-40). Springer Berlin Heidelberg.
- Gomes, S. C., Leonor, I. B., Mano, J. F., Reis, R. L., & Kaplan, D. L. (2011). Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk. *Biomaterials*, 32(18), 4255-4266.
- González, J. A., & Vallejo, J. R. (2012). Las telarañas en la medicina popular en España: historia reciente, vigencia y distribución geográfica de un recurso terapéutico. *Rev Ibérica Aracnol*, 21, 169-74.
- Griffiths, J. R., & Salanitri, V. R. (1980). The strength of spider silk. *Journal of Materials Science*, 15(2), 491-496.
- Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H., & Gosline, J. M. (1996). Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science*, 272(5258), 112-115.
- Hajer, J., Karschová, S., & Řeháková, D. (2016). Silks and silk-producing organs of Neotropical tarantula *Avicularia metallica* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). *Ecologica Montenegrina*, 7, 313-327.
- Hartke, A., Giard, J. C., Laplace, J. M., & Auffray, Y. (1998). Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4238-4245.
- Hieber, C. S. (1992a). Spider cocoons and their suspension systems as barriers to generalist and specialist predators. *Oecologia*, 91(4), 530-535.
- Hieber, C. S. (1992b). The role of spider cocoons in controlling desiccation. *Oecologia*, 89(3), 442-448.
- Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D., & Jelinski, L. W. (1996). ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophysical journal*, 71(6), 3442-3447.
- Holm, A. (1940). Studien über die Entwicklung und Entwicklungsbiologie der Spinnen. na. Em Foelix, R. F. (2011) *Biology of Spiders*. Oxford University Press.
- Harvey, M. S. (2002). The neglected cousins: what do we know about the smaller arachnid orders? *Journal of Arachnology*, 30(2), 357-372.
- Harvey, D., Bardelang, P., Goodacre, S. L., Cockayne, A., & Thomas, N. R. (2017). Antibiotic Spider Silk: Site-Specific Functionalization of Recombinant Spider Silk Using “Click” Chemistry. *Advanced Materials*, 29(10).

- Hayashi, C. Y., & Lewis, R. V. (1998). Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *Journal of molecular biology*, 275(5), 773-784.
- Hayashi, C. Y., Blackledge, T. A., & Lewis, R. V. (2004). 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*, 21(10), 1950-1959.
- Herzer, P. J., Inouye, S. U. M. I. K. O., Inouye, M. A. S. A. Y. O. R. I., & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6175-6181.
- Hope, F. W. (1836). XXVII. Observations on Insects producing Silk, and on the possibility of rearing Silk Crops in England. *Ecological Entomology*, 1(2), 123-127.
- Jacobs, C. G., & van der Zee, M. (2013). Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(2), 263-269.
- Jacomassa, F. A. F., Guzman, M. B., & Dourado, M. (2015). Bats in cobwebs of the giant-spider *Nephilingis cruentata* (Fabricius, 1775) (Araneae: Nephilidae) in Brazil. *Biotemas*, 28(4), 169-172.
- Japyassú, H. F., & Ades, C. (1998). From Complete Orb to Semi-Orb Webs: Developmental Transitions in the Web of *Nephilengys cruentata* (Araneae: Tetragnathidae). *Behaviour*, 931-956.
- Japyassú, H. F., & Viera, C. (2002). Predatory plasticity in *Nephilengys cruentata* (Araneae: Tetragnathidae): relevance for phylogeny reconstruction. *Behaviour*, 139(4), 529-544.
- Jimenez, S. R., Valle, J. S. L., Padilla, L. M. R., & Sánchez, L. M. M. (2016). Infecciones vaginales en pacientes gestantes de una clínica de alta complejidad de Medellín-Colombia. *Arquivos de Medicina (Manizales)*, 16(1), 32-42.
- Jocqué, R., Dippenaar-Schoeman, A. S., & Zoologin, S. (2006). Spider families of the world. *Muséeroyal de l'Afriquecentrale*.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123.
- Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(5), 308-320.
- Kuntner, M. (2007). A monograph of *Nephilengys*, the pantropical 'hermit spiders' (Araneae, Nephilidae, Nephilinae). *Systematic Entomology*, 32(1), 95-135.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Lai, W. L., & Goh, K. L. (2015). Consequences of ultra-violet irradiation on the mechanical properties of spider silk. *Journal of functional biomaterials*, 6(3), 901-916.

- Legg, D. A., Sutton, M. D., & Edgecombe, G. D. (2013). Arthropod fossil data increase congruence of morphological and molecular phylogenies. *Nature communications*, 4, ncomms3485.
- Lei, Q., Yu, H., Peng, X., Yan, S., Wang, J., Yan, Y., & Wang, X. (2015). Isolation and preliminary characterization of proteinaceous toxins with insecticidal and antibacterial activities from black widow spider (*L. tredecimguttatus*) eggs. *Toxins*, 7(3), 886-899.
- Lin, A., Chuang, T., Pham, T., Ho, C., Hsia, Y., Blasingame, E., & Vierra, C. (2015). Advances in understanding the properties of spider silk. In A. Basu, *Advances in Silk Science and Technology* (1st ed., pp. 17-40). Cambridge: Arindam Basu.
- Lombardi, S. J., & Kaplan, D. L. (1990). The amino acid composition of major ampullate gland silk (dragline) of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Arachnology*, 297-306.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532.
- Madsen, B., Shao, Z. Z., & Vollrath, F. (1999). Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *International Journal of Biological Macromolecules*, 24(2), 301-306.
- Masters, W. M., Markl, H. S., & Moffat, A. J. (1986). Transmission of vibration in a spider's web. *Spiders: Webs, behavior, and evolution*, 49.
- McCullough, M. J., Ross, B. C., & Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 25(2), 136-144.
- Melic, A., Barrientos, J. A., Morano, E., & Urones, C. (2015). Orden Araneae. *Revista IDE@-SEA*, n° 11, 1-13.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., & Rodríguez-Tudela, J. L. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 20(10), 523-530.
- Menchaca, H. R. M., Treviño, M. G. G., & Silva, G. R. (2015). Manejo de la salud oral en el paciente pediátrico infectado por VIH. *Revista ADM*, 72(6), 299-305.
- Mendes, L. W., Netto, J. C., Barbieri, E. F., Guarda, D. D., & Braga, M. R. B. (2010). Influence of prey size on the capture of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) by the orb-web spider *Nephilengys cruentata*. *Sociobiology*, 56(3), 745-754.
- Mirghani, M. E. S., Kabbashi, N. A., Elfaki, F. A. M., & Zulkifli, M. Z. (2012). BT-201: Investigation of the spider web for antibacterial activity.
- Morishita, R., Aparecida Ferreira, S., Santiago Filha, A., & Ditzel Faraco, C. (2003). Studies on oogenesis and oviposition in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). *The Anatomical Record*, 273(1), 575-582.
- Neidhardt, F. C. (1996). The enteric bacterial cell and the age of bacteria. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, Ed. FC Neidhardt, ASM Press, Washington, 1-3.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.

- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Cuchillo, C. (2015). *Lehninger principios de bioquímica*. Omega.
- Nentwig, W., & Heimer, S. (1987). Ecological aspects of spider webs. In *Ecophysiology of spiders* (pp. 211-225). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nyffeler, M., & Knörnschild, M. (2013). Bat predation by spiders. *PloS one*, 8(3), e58120.
- Peloso, P. L., & Sousa, V. P. (2013). Predation on *Todirostrum cinereum* (Tyrannidae) by the orb-web spider *Nephilengys cruentata* (Araneae, Nephilidae). *Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology*, 15(30), 3.
- Platnick, N. I., Coddington, J. A., Forster, R. R., & Griswold, C. E. (1991). Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae).
- Plaza Baonza, G. R. (2004). *Comportamiento termo-higro-mecánico de las fibras de seda de araña* (Doctoral dissertation, Caminos).
- Regier, J. C., Shultz, J. W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., ... & Cunningham, C. W. (2010). Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*, 463(7284), 1079-1083.
- Rôças, I. N., Siqueira, J. F., & Santos, K. R. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics*, 30(5), 315-320.
- Rolt, D. B. (1831). *Silk from Spiders*. Transactions of the Society, Instituted at London, for the Encouragement of Arts, Manufactures, and Commerce, 48, 234-236.
- Samaranayake, L. P., & MacFarlane, T. W. (1990). *Oral candidosis*. Wright Publishing Company.
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1753-1754.
- Sanggaard, K. W., Bechsgaard, J. S., Fang, X., Duan, J., Dyrland, T. F., Gupta, V., ... & Han, L. (2014). Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. *Nature communications*, 5.
- Savory, T. (1964). *Arachnida*. London and New York.
- Schaefer, M. (1977). Zur Bedeutung des Winters für die Populationsdynamik von vier Spinnenarten (Araneida). *Zoologischer Anzeiger*.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*, 199(2), 223-231.
- Scheibel, T. (2004). Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial cell factories*, 3(1), 14.
- Schomburg, C., Turetzek, N., Schacht, M. I., Schneider, J., Kirfel, P., Prpic, N. M., & Posnien, N. (2015). Molecular characterization and embryonic origin of the eyes in the common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Evodevo*, 6(1), 1.

- Schuck-Paim, C. (2000). Orb-webs as extended-phenotypes: web design and size assessment in contests between *Nephilengys cruentata* females (Araneae, Tetragnathidae). *Behaviour*, 137(10), 1331-1347.
- Schuck-Paim, C., & Alonso, W. J. (2001). Deciding where to settle: conspecific attraction and web site selection in the orb-web spider *Nephilengys cruentata*. *Animal Behaviour*, 62(5), 1007-1012.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., & Whittam, T. S. (1987). Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*.
- Selden, P. A., Shear, W. A., & Bonamo, P. M. (1991). A spider and other arachnids from the Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Araneae.
- Selden, P. A., Shear, W. A., & Sutton (2008). Fossil evidence for the origin of spider spinnerets, and a proposed arachnid order. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20781-20785.
- Shao, J. H., Cui, Y., Zhao, M. Y., Wu, C. F., Liu, Y. F., & Zhang, J. H. (2014). Purification, characterization, and bioactivity of a new analgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*, 53, 89-96.
- Shin, Y., Yoo, D. I., & Jang, J. (2001). Molecular weight effect on antimicrobial activity of chitosan treated cotton fabrics. *Journal of Applied Polymer Science*, 80(13), 2495-2501.
- Sidrim, J. J. C., & Rocha, M. F. G. (2004). *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan.
- Spiber Inc. (2018). About Us - Spiber Inc.. [online] Available at: <https://www.spiber.jp/en/about>. Visitado: 25 março 2018.
- Stevens, D. A., Kan, V. L., Judson, M. A., Morrison, V. A., Dummer, S., Denning, D. W., ... & Pankey, G. A. (2000). Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases*, 696-709.
- Swanson, B. O., Anderson, S. P., DiGiovine, C., Ross, R. N., & Dorsey, J. P. (2009). The evolution of complex biomaterial performance: the case of spider silk. *Integrative and Comparative Biology*, 49(1), 21-31.
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661.
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1173-1182.
- Torres-Vargas, G., Durán, A. M. Y Orozco, K. J. 2013. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIALES Y MECÁNICAS DE LAS TELARAÑAS DE *Argiope argentata*, *Verrucosa sp.* y *Leucauge sp.* Em Ponce J. (Presidência). IV Congreso Latinoamericano de Aracnología. Morelia, México.
- Vasanthavada, K., Hu, X., Tuton-Blasingame, T., Hsia, Y., Sampath, S., Pacheco, R., ...& Kohler, K. (2012). Spider glue proteins have distinct architectures compared with traditional spidroin family members. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 35986-35999.

- Vasta, G. R., & Marchalonis, J. J. (1983). Humoral recognition factors in the Arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins. *American Zoologist*, 23(1), 157-171.
- VeVET. (2013, Junho 2013). Anatomia de uma aranha. Recuperado de <http://www.vevet.com.br/2013/06/anatomia-de-uma-aranha.html>. Visitado em: 21/05/2017.
- Villarino, A., Bouvet, O. M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., & Grimont, P. A. (2000). Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Research in microbiology*, 151(9), 755-768.
- Viney, C., Huber, A. E., Dunaway, D. L., Kerkam, K., & Case, S. T. (1994). Optical characterization of silk secretions and fibers.
- Vollrath, F., & Knight, D. (2005). Biology and technology of silk production. *Biopolymers Online*.
- Vollrath, F., & Selden, P. (2007). The role of behavior in the evolution of spiders, silks, and webs. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38.
- Vollrath, F., Porter, D., & Holland, C. (2013). The science of silks. *MRS bulletin*, 38(01), 73-80.
- Wheeler, W. C., & Hayashi, C. Y. (1998). The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics*, 14(2), 173-192.
- Wheeler, W. C., Coddington, J. A., Crowley, L. M., Dimitrov, D., Goloboff, P. A., Griswold, C. E., ... & Almeida-Silva, L. (2017). The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*, 33(6), 574-616.
- Willey, J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology-7th international ed./Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Wilson, R. S. (1962). The control of dragline spinning in the garden spider. *Journal of Cell Science*, 3(64), 557-571.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases*, 39(3), 309-317.
- White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F., & Stevens, D. A. (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1704-1713.
- Witt, P. N., Redd, C. F., & Peakall, D. B. (1968). A spider's web: problems in regulatory biology.
- World Spider Catalog (2018). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 17.5. Visitado em: 08/04/2018.
- Work, R. W., & Emerson, P. D. (1982). An apparatus and technique for the forcible silking of spiders. *Journal of Arachnology*, 1-10.

Wright, S. (2011). The antimicrobial properties of spider silk (Doctoral dissertation, University of Nottingham).

Wright, S., & Goodacre, S. L. (2012). Evidence for antimicrobial activity associated with common house spider silk. *BMC research notes*, 5(1), 1.

Xu, C. C., Yen, I. J., Bowman, D., & Turner, C. R. (2015). Spider web DNA: a new spin on noninvasive genetics of predator and prey. *PloS one*, 10(11), e0142503. ISO 690.

Zhang, Z. Q. (2011). *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. Magnolia press.