



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO LUÍS SACCO

**ESTUDOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO CASULO
DE BICHO-DA-SEDA E NANOESTRUTURAÇÃO DA
SUPERFÍCIE DO CASULO COM PRATA VISANDO A
CARACTERIZAÇÃO DE TRAÇOS DE CORANTE**

Londrina
2021

BRUNO LUÍS SACCO

**ESTUDOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO CASULO
DE BICHO-DA-SEDA E NANOESTRUTURAÇÃO DA
SUPERFÍCIE DO CASULO COM PRATA VISANDO A
CARACTERIZAÇÃO DE TRAÇOS DE CORANTE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Henrique de Santana

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S119 Sacco, Bruno Luís .
Estudos por espectroscopia Raman do casulo de bicho-da-seda e nanoestruturação da superfície do casulo com prata visando a caracterização de traços de corante / Bruno Luís Sacco. - Londrina, 2021.
118 f.

Orientador: Henrique de Santana.
Coorientador: Alexandre Orsato.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Espectroscopia Raman - Tese. 2. Bicho-da-seda - Tese. 3. Casulo de seda - Tese. 4. SERS - Tese. I. Santana, Henrique de. II. Orsato, Alexandre . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

BRUNO LUÍS SACCO

**ESTUDOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO CASULO
DE BICHO-DA-SEDA E NANOESTRUTURAÇÃO DA
SUPERFÍCIE DO CASULO COM PRATA VISANDO A
CARACTERIZAÇÃO DE TRAÇOS DE CORANTE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Henrique de Santana
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Urbano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Edson Laureto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS)

Ao Prof. Dr. Henrique de Santana, pela orientação, incentivo, apoio e compreensão na realização deste trabalho.

À coorientação do Professor Dr. Alexandre Orsato, contribuindo com seus conhecimentos e ideias durante a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química da UEL, pela permissão da utilização do espaço físico e suporte técnico para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Espectroscopia da Central de Multiusuários da PROPPG da UEL pelo espaço físico e da infraestrutura que possibilitaram a obtenção das caracterizações espectroscópicas.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura pelo auxílio nas análises morfológicas.

Às amigas Aline D. Batista e Natália Romero pela ajuda em análises, constante amizade, companheirismo e compreensão desde o início até a conclusão desse trabalho.

Ao amigo Dr. Tiago Varão pelos ensinamentos, ideias e constante amizade, até a conclusão desse trabalho.

Gostaria de agradecer principalmente à minha família, pelo amor, apoio e incentivo. E também a Mayara minha namorada, por sempre estar ao meu lado.

Gostaria também de agradecer aos atendimentos oferecidos pelo SEBEC, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A força não provém da capacidade física.
Provém de uma vontade indomável.
(Mahatama Gandhi)

SACCO, Bruno Luís. **Estudos por espectroscopia Raman do casulo de bicho-da-seda e nanoestruturação da superfície do casulo com prata visando a caracterização de traços de corante**. 2021. 119 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A seda proveniente do casulo do bicho-da-seda *Bombyx mori* tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores como um recurso promissor nas áreas de química, engenharia, biotecnologia e materiais biomédicos por ser um biopolímero versátil, que pode ser processado de diversas maneiras tais como nanofibras, micropartículas e microesferas. Apesar desses materiais demonstrarem um alto potencial de aplicações nas áreas de estudo, ser economicamente vantajoso e um recurso natural, a seda ainda é pouco explorada no Brasil, mesmo o país ocupando a quinta posição no ranking da produção mundial. Desse modo, faz-se necessários, o desenvolvimento de novas pesquisas focadas nesse biomaterial. Nesse sentido, neste trabalho foram propostos dois estudos divididos em capítulos utilizando casulo do bicho-da-seda. No primeiro capítulo, foi conduzido um estudo sobre efeito da temperatura nas diferentes conformações moleculares das estruturas das fibras de seda dispostas nos casulos crus e processados na indústria. Para investigar esse efeito foi utilizado a espectroscopia Raman confocal em diferentes radiações de excitação (532 e 785 nm) em conjunto com a calorimetria de varredura diferencial. Os espectros Raman obtidos em ambas radiações de excitação foram comparados através da correlação entre a razão de intensidade das bandas Raman deconvoluídas características das amidas I e III, onde foi possível mediante variação da temperatura a observação de alterações conformacionais em ambos os materiais estudado. Por fim, no capítulo 2, foi explorado o casulo na produção controlada de sistemas nanoestruturados com prata, gerando substratos amplificadores do sinal Raman para ser aplicado à espectroscopia Raman intensificada pela superfície. Inicialmente o coloide de prata foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis, distribuição de tamanho de partículas, e os resultados indicaram a uma absorção máxima de 453 nm e a obtenção de nanopartículas com tamanho de 110 nm. Os substratos amplificadores do sinal Raman foram preparados através da nanoestruturação da superfície das fibras de seda de fragmentos de casulo contendo partículas de prata. Sua caracterização foi feita por microscopia eletrônica de varredura e espectro de raios X dispersivos, que mostraram a organização das nanoestruturas depositadas sobre as fibras de seda. A eficiência dos substratos foi avaliada através do fator de intensificação observado pela técnica Raman intensificada pela superfície utilizando a molécula sonda cristal violeta a partir de soluções diluídas consecutivamente, utilizando fonte de excitação em 532 nm, comparados com os obtidos usando coloide de prata. O estudo demonstrou que os substratos nanoestruturados constituem materiais promissores, pois foram verificados que os substratos se mostraram mais adequados para intensificação do sinal Raman pela superfície da prata do que a solução coloidal.

Palavras-chave: fibroína de seda; espectroscopia Raman; *Bombyx mori*; conformação molecular; SERS.

SACCO, Bruno Luís. **Studies by Raman spectroscopy of the silkworm cocoon and nanostructuring of the cocoon surface with silver aiming too characterization dye traces**. 2021. 119 p. Dissertation (Masters degrees in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021

ABSTRACT

Silk from the cocoon of the *Bombyx mori* silkworm has been the object of study by several researchers as a promising resource in the areas of chemistry, engineering, biotechnology and biomedical materials as it is a versatile biopolymer, which can be processed in several ways such as nanofibers, microparticles and microspheres. Although these materials demonstrate a high potential for applications in the study areas, being economically advantageous and a natural resource, silk is still little explored in Brazil, even though the country occupies the fifth position in the ranking of world production. Thus, it is necessary, the development of new research focused on this biomaterial. In this sense, in this work, two studies were proposed, divided into chapters using the silkworm cocoon. In the first chapter, a study was carried out on the effect of temperature on the different molecular conformations of the structures of silk fibers arranged in raw cocoons and processed in the industry. To investigate this effect, confocal Raman spectroscopy was used in different excitation radiations (532 and 785 nm) in conjunction with differential scanning calorimetry. The Raman spectra obtained in both excitation radiations were compared through the correlation between the intensity ratio of the deconvolved Raman bands characteristic of amides I and III, where it was possible, by varying the temperature, to observe conformational changes in both materials studied. Finally, in Chapter 2, silk and cocoon were explored in the controlled production of nanostructured systems with silver, generating substrates that amplify the Raman signal to be applied to surface-enhanced Raman spectroscopy. Initially, the silver colloid was characterized by UV-Vis spectroscopy, particle size distribution, and the results indicated a maximum absorption of 453 nm and the obtaining of nanoparticles with a size of 110 nm. The amplifying substrates of the Raman signal were prepared by nanostructuring the surface of the silk fibers of cocoon fragments containing silver particles. Its characterization was made by scanning electron microscopy and dispersive X-ray spectrum, which showed the organization of the nanostructures deposited on the silk fibers. The efficiency of the substrates was evaluated through the intensification factor observed by the Raman technique intensified by the surface using the crystal violet probe molecule from diluted solutions consecutively, using an excitation source at 532 nm, compared with those obtained using silver colloid. The study demonstrated that nanostructured substrates are promising materials, as it was verified that the substrates were more suitable for intensifying the Raman signal through the silver surface than the colloidal solution.

Keywords: silk fibroin; Raman spectroscopy; *Bombyx mori*; molecular conformation; SERS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia de um casulo produzido pela lagarta <i>Bombyx mori</i> : Parte superior, superfície externa do casulo (a) e parte inferior, estrutura em multicamada do casulo (b)22
Figura 2	Esquema estrutural da fibra de seda do bicho-da-seda <i>Bombyx mori</i>23
Figura 3	Imagens da superfície da fibra de seda mostrando as irregularidades da superfície do filamento (a) e imagem da fibra de seda após processo de degomagem (b), obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura23
Figura 4	Esquema ilustrativo da estrutura polipeptídica da fibra de seda ...25
Figura 5	Representação esquemática da organização dos 12 domínios repetitivos e 11 domínios repetidos amorfos na estrutura primária da cadeia H da fibroína da seda <i>B. mori</i>26
Figura 6	Estrutura primária de fibroína de seda e seus respectivos aminoácidos, Gly: glicina, Ser: serina, Ala: alanina27
Figura 7	Estrutura secundária seda I do tipo (a) α -hélice, (b) β -volta tipo II28
Figura 8	Estrutura secundária seda II do tipo β -folha antiparalela29
Figura 9	Desenvolvimentos em instrumentação e conceitos relacionados a Raman até o século XX33
Figura 10	Diagrama de energia de Jablonski ilustrando os diferentes processos e os estados envolvidos no processo de espalhamento Raman: absorção no infravermelho (A), espalhamento Rayleigh (B), espalhamento Raman Stokes (C), espalhamento Raman anti-Stokes (D), espalhamento Raman por ressonância (E) e fluorescência (F). As setas para cima representam a excitação, enquanto as setas para baixo indicam a emissão.....35
Figura 11	Exemplo de um espectro Raman mostrando a linha Rayleigh (centro) e das linhas de Stokes (esquerda) e anti-Stokes (direita)36
Figura 12	Imagens ampliadas da superfície do casulo (a), da mesma com

	a incidência (b) e após a incidência de radiação laser 532 nm (c). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal, com objetiva de 50 vezes	42
Figura 13	Espectros Raman do — casulo cru (a) e — casulo processado (b) obtidos na região de 600-1800 cm^{-1} na radiação excitante 532 nm	43
Figura 14	Espectros Raman deconvoluídos do casulo cru das bandas em 1675 cm^{-1} (a) e 1238 cm^{-1} (b) e das bandas do casulo processado em 1676 cm^{-1} (c) e 1239 cm^{-1} (d) obtidos na radiação excitante de 532 nm	45
Figura 15	Espectros Raman no intervalo de 600-1800 cm^{-1} do — casulo cru (a) e — casulo processado (b) do bicho-da-seda <i>Bombyx mori</i> , obtidos na radiação excitante de — 532 nm (i) e — 785 nm (ii)	46
Figura 16	Espectros Raman deconvoluídos do casulo cru das bandas 1670 cm^{-1} (a), 1233 cm^{-1} (b) e do casulo processado das bandas em 1670 cm^{-1} (c), 1236 cm^{-1} (d) obtidos na radiação excitante de 785 nm	48
Figura 17	Análises termogravimétricas TG (—) e derivadas das curvas termogravimétricas DTG (—), do casulo cru (a) e casulo processado (b)	50
Figura 18	Curvas de DSC do — casulo cru (a) e do — casulo processado (b)	50
Figura 19	Espectros Raman da superfície do casulo cru (a) e casulo processado (b) na região de 600-1800 cm^{-1} , — sem aquecimento (i); — processado em estufa à 80 °C (ii) e — 125 °C (iii), por um período de 60 minutos, obtidos na radiação excitante de 532 nm.....	51
Figura 20	Formação de agregados de sericina sobre a superfície da fibra de seda	52
Figura 21	Espectros Raman deconvoluídos obtidos na radiação excitante 532 nm no intervalo de 1175-1390 cm^{-1} , do casulo cru: sem aquecimento (a), seco em estufa à 80 °C (c), seco em estufa à 125 °C (e); do casulo processado (b) sem aquecimento, seco	

	em estufa à 80 °C (d), seco em estufa à 125 °C (f).....	53
Figura 22	Espectros Raman deconvoluídos obtidos na radiação excitante 785 nm no intervalo de 1629-1720 cm^{-1} , do casulo cru: sem aquecimento (a), seco em estufa à 80 °C (c), seco em estufa à 125 °C (e); do casulo processado sem aquecimento (b), seco em estufa à 80 °C (d), seco em estufa à 125 °C (f)	55
Figura 23	Diagrama de energia de Jablonski Ilustrando o processo de ressonância Raman mostrando porque se espera que a fluorescência cause interferência	70
Figura 24	Espectro de absorção eletrônica de cristal violeta (a) e espectros Raman de cristal violeta obtidos em diferentes radiações excitantes (b)	71
Figura 25	Esquema ilustrativo do mecanismo de transferência de carga	73
Figura 26	Esquema da excitação de ressonância de plasmon de superfície localizada para uma nanopartícula, mostrando o dipolo criado pela excitação coletiva da nuvem eletrônica	76
Figura 27	Esquema de diferentes formas de nanoestruturas e concentração do campo elétrico nas regiões de alta curvatura	78
Figura 28	Imagens de diferentes formas de nanoestruturas possíveis de serem sintetizadas em solução	80
Figura 29	Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis (a) e espectro Raman obtido na radiação excitante 532 nm (b), de uma solução aquosa de CV $3,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	91
Figura 30	Gráfico de Distribuição do tamanho de partículas do coloide de prata (a) e espectro eletrônico de absorção no UV-Vis do coloide de prata (b)	93
Figura 31	Espectros Raman Ressonante das soluções aquosas de CV (a) e espectros SERS das soluções de CV em coloide de prata (b), obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 10	94
Figura 32	Gráfico da variação das intensidades da banda em 1623 cm^{-1} em função da concentração de CV dos espectros Raman ressonante (a) e SERS (b) obtidos na radiação excitante de 532 nm e tempo de integração de 10 s	97

Figura 33	Espectros Raman Ressonante das soluções aquosas de CV (a) e espectros SERS das soluções de CV em coloide de prata (b), obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 1 s	99
Figura 34	Gráfico da variação das intensidades da banda em 1623 cm ⁻¹ em função da concentração de CV dos espectros Raman ressonante (a) e SERS (b)	101
Figura 35	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia da superfície interna do fragmento do casulo do bicho-da-seda <i>B. mori</i> , sem adição de coloide de prata (a) e com adição de 1600 µL de coloide de prata (b)	103
Figura 36	Espectro de raios X dispersivos em energia da superfície da fibra de seda nanoestruturada com nanopartícula de prata	104
Figura 37	Espectros SERRS dos substratos CV/AgNPs (a) e espectros SERS das AgNPs/CV (b), obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 1 s	105
Figura 38	Gráfico da variação das intensidades da banda em 1623 cm ⁻¹ em função da concentração de CV dos substratos SERS: CV/AgNPs (a) e AgNPs/CV (b), utilizando tempo de integração de 1 s	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição de aminoácidos do filamento de seda do bicho-da-seda <i>Bombyx mori</i>24
Tabela 2	Relação das intensidades das bandas $I_{(1238)}/I_{(1274)}$ e $I_{(1093)}/I_{(1270)}$ dos casulos cru e casulos processado obtidos na radiação excitante 532 nm54
Tabela 3	Relação das intensidades das bandas $I_{(1670)}/I_{(1654)}$, $I_{(1670)}/I_{(1684)}$ e $I_{(1670)}/I_{(1694)}$ dos casulos cru e casulo processado obtidos na radiação excitante 785 nm56
Tabela 4	Comparação da seção de choque observada em vários processos de interação da radiação eletromagnética com matéria68
Tabela 5	Concentrações de estudo das soluções de cristal violeta e de soluções de cristal violeta em coloide de prata para estudo Raman e estudo SERS87
Tabela 6	Fator de intensificação utilizando como referência a banda em 1623 cm^{-1} dos espectros Raman e SERS das soluções de CV ($t=10\text{ s}$)96
Tabela 7	Fator de intensificação utilizando como referência a banda em 1623 cm^{-1} dos espectros Raman e SERS das soluções de cristal violeta ($t=1\text{ s}$)101

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Fator de intensificação analítico	84
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alanina
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs/CV	Nanoestruturação das fibras de seda com nanopartículas de prata com posterior adsorção de cristal violeta
C ₂₅ H ₃₀ CIN ₃	Cristal violeta
CD	Cadeia pesada
CL	Cadeia leve
CRaman	Concentração Raman do analito
CSERS	Concentração SERS do analito
CV	Raman ressonante
CV/AgNPs	Adsorção de cristal violeta e posterior nanoestruturação das fibras de seda com nanopartículas de prata
D	Ácido Aspártico
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina
FIA	Fator de intensificação analítico
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G	Glicina
H	Histidina
HOMO	Nível ocupado de maior energia da molécula (highest occupied molecular orbital)
I	Isoleucina
IRaman	Intensidade das bandas Raman
ISERS	Intensidades das bandas SERS
K	Lisina
LUMO	Nível não ocupado de menor energia da molécula (lowest unoccupied molecular orbital)
M	Metionina
nm	Nanômetros
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	Citrato de sódio tribásico

P	Prolina
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Arginina
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RR	Raman ressonante
S	Serina
SERRS	Surface-Enhanced Ressonance Raman Scattering
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering
SMEF	Fator de intensificação para uma única molécula
SSEF	Fator de intensificação para o substrato SERS
TG	Termogravimetria
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V	Valina
Y	Tirosina
π - π^*	Nível de energia

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I - IMPACTO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DE FIBRAS DE CASULOS DE SEDA	18
1.1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	SEDA – UM BREVE HISTÓRICO.....	20
2.2	Estrutura das Fibras de Seda Produzidas pela Lagarta Bombyx mori	21
2.2.1	Fibroína de Seda	23
2.2.2	Estrutura Primária e Secundária.....	27
2.2.3	Sericina	30
2.3	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	31
2.4	ESPECTROSCOPIA RAMAN	32
2.5	ESPECTROSCOPIA NA ANÁLISE DE PROTEÍNAS	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	40
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	40
4.2.1	Secagem em Estufa dos Casulos Cru e Processado	40
4.2.2	Classificação	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CASULO CRU E PROCESSADO	40
4.3.1	Análise Termogravimétrica.....	40
4.3.2	Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)	41
4.3.3	Espectroscopia Raman	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
6	CONCLUSÃO	58

REFERÊNCIAS	59	
7	CAPÍTULO II - ESTUDO SERS DE FRAGMENTOS DE CASULO NANOESTRUTURADOS COM PARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO O CRISTAL VIOLETA COMO MOLÉCULA SONDA	65
7.1	INTRODUÇÃO	65
8	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	68
8.1	EFEITO RAMAN RESSONANTE (RR)	68
8.2	EFEITO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE (SERS)	70
8.2.1	Mecanismo Químico	72
8.2.2	Mecanismo Eletromagnético	73
8.3	SUBSTRATO SERS-ATIVO	76
8.4	FATOR DE INTENSIFICAÇÃO SERS	82
9	OBJETIVOS	84
9.1	OBJETIVO GERAL.....	84
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	84
10	MATERIAIS E MÉTODOS	85
10.1	MATERIAIS E REAGENTES	85
10.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	85
10.2.1	Procedimento de Limpeza das Vidrarias	85
10.2.2	Síntese do Coloide de Prata.....	84
10.2.3	Preparo de Soluções para Estudo Raman Ressonante e Estudo SERS.....	86
10.2.4	Preparo dos Substratos SERS-ativos.....	86
10.2.4.1	Limpeza e fabricação dos substratos	86
10.2.4.2	Preparo dos substratos para o estudo SERS.....	87
10.2.5	Caracterização das Soluções de Cristal Violeta (CV), do Coloide de Prata e dos Substratos	87
10.2.5.1	Espectroscopia de absorção no UV-Vis	87

10.2.5.2	Distribuição de tamanho de partículas	88
10.2.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	88
10.2.5.4	Espectroscopia Raman	88
11	RESULTADOS E DISCUSSÕES	91
12	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110
	ANEXOS	116
	ANEXO A - Artigo Publicado Durante o Mestrado	117

1 CAPÍTULO I - IMPACTO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DE FIBRAS DE CASULOS DE SEDA

1.1 INTRODUÇÃO

As lagartas *Bombyx mori* (*B. mori*) são responsáveis por uma parcela importante na produção global de seda (MORIN; ALAM, 2016), utilizada principalmente nas indústrias têxteis (JO; UM, 2015). O casulo do bicho-da-seda compreende duas proteínas: fibroína da seda e de sericina, em uma relação de massa aproximada de 70-80% a 30-20%, respectivamente, apresentando frações de contaminantes residuais que variam entre 1-2%, incluindo ceras e cinzas, pigmentos, açúcares e outras impurezas (CAO; ZHANG, 2016; PARTLOW et al., 2016). A sericina é uma proteína que possui caráter hidrofílico (JO; UM, 2015), sendo responsável por unir e envolver os filamentos de seda, formando a estrutura do casulo (JIN; KAPLAN, 2003; ZHANG et al., 2004).

A fibroína de seda por sua vez é um biopolímero de caráter hidrofóbico (PARTLOW et al., 2016), composto por duas regiões altamente organizadas: a parte cristalina, responsável pela resistência mecânica e a parte amorfa, que confere a elasticidade e flexibilidade a seda (ALTMAN et al., 2003; KUMAR; SINGH, 2016). Além disso, as fibras de seda são constituídas de uma estrutura primária composta por uma sequência de aminoácidos que constituem uma cadeia polipeptídica, que irá determinar as formas que essas cadeias assumem (SASHINA et al., 2006). As estruturas intermoleculares são formadas por ligações de hidrogênio em um arranjo em forma de folha (BRANDEN 1999). As conformações das cadeias polipeptídicas podem ser mais bem entendidas considerando o trabalho de Lefèvre, Rousseau e Pezolét (2007) que através do estudo por microespectroscopia Raman polarizada demonstrou uma organização molecular na seda produzida pelo *B. mori*, com a mistura de diferentes quantidades de β -folhas e estruturas flexíveis (β -volta e α -hélices).

A industrialização do filamento de seda é um processo composto por várias etapas, e algumas etapas envolvem submeter o casulo a temperaturas moderadamente altas. Uma dessas etapas é a secagem do casulo antes da transformação das crisálidas em mariposas, preservando a qualidade do filamento. A

secagem inicia-se a uma temperatura de 125 a 130 °C, interrompendo o ciclo de vida das crisálidas vivas dentro do casulo cru. As sessões de secagem variam em termos de temperatura, que é gradualmente reduzida à medida que o processo continua. O tempo de secagem é de 6 a 7 horas e a temperatura final é de cerca de 40 °C. Após a secagem, os casulos são armazenados por pelo menos duas semanas para permitir que a sericina se estabilize completamente. Na fase de processamento, os casulos são cozidos sob pressão em água quente para amaciar a goma de sericina, facilitando a operação de desenrolamento e melhorando o brilho e a textura do tecido (JO; UM, 2015).

A partir disso, este estudo visa investigar o efeito da temperatura na organização estrutural de casulos crus e processados, com o objetivo de entender melhor as propriedades desse material. A análise térmica e os recursos de espectroscopia Raman foram utilizadas para caracterizar o arranjo dos segmentos nas matrizes geradoras de polipeptídios que originam o casulo. Os resultados mostram que a temperatura desempenha um papel crucial na determinação da natureza das estruturas secundárias da fibroína de seda.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SEDA – UM BREVE HISTÓRICO

A seda é uma das fibras mais antigas conhecidas pela humanidade. É uma fibra proteica natural, e sua descoberta data mais de 5 milênios na China (GIACOMIN et al., 2017; SANTOS; VIDIGAL; MERLINI, 2011; SOARES JUNIOR; ALMEIDA; PÁDUA, 2018). Segundo a lenda, foi uma concubina do imperador da China que notou que de um casulo que caiu no chá saía um fio muito fino e resistente. Outra lenda chinesa, conta que o nascimento do cultivo do bicho-da-seda surgiu da observação da Imperatriz chamada Xi Ling Shi (esposa do imperador Huangdi), que ao tocar uma lagarta com um dedo percebeu que dela saía uma fibra na forma de fio (seda). Conforme o fio saía da lagarta a Imperatriz o enrolava no dedo, obtendo uma sensação de calor. No final, viu um pequeno novelo e de repente compreendeu a relação entre a lagarta e a seda. Não é possível afirmar qual dessas histórias corroboram com os primeiros dados sobre a seda, no entanto compreende-se que esses dados foram importantes para o estado da arte desse produto (FANTONI, 2012).

Considerando o avanço histórico na produção da seda (sericultura), sabe-se que esse produto se espalhou por grande parte da Europa e Ásia, chegando ao Brasil somente em meados do século XIX, com o início da produção no estado do Rio de Janeiro. Com o decorrer dos anos, o produto se popularizou entre os estados, sendo o Paraná, na década de 80, o estado que se destacou como maior produtor (SOARES JUNIOR; ALMEIDA; PÁDUA, 2018).

Conforme descrito por Babu (2015) e Giacomini et al. (2017), além do cultivo de amoreiras (*Morus sp.*) que é o alimento imprescindível para a lagarta, a produção de seda é dividida nas seguintes etapas: (i) sericultura; (ii) enrolamento da seda; (iii) transformação de fios de seda em tecidos. A sericultura é uma atividade integrada à produção e indústria agrícola, e a maior parte da produção de fibras de seda é proveniente do bicho-da-seda domesticado *Bombyx mori* (*B. mori*) da família *Bombycidae* (HANADA; WATANABE, 1986; SANTOS et al., 2016).

No Brasil a sericultura é uma atividade desenvolvida principalmente em áreas rurais, com média de 2,5 hectares, representando uma alternativa

importante para melhorar a renda das famílias rurais, o que contribui significativamente para a redução do êxodo rural. Além dessas características, a sericultura contribui para o desenvolvimento sustentável do país, devido ao seu relevante aspecto social e por constituir uma atividade de baixo impacto para o meio ambiente, pois ela é desenvolvida em pequenas propriedades que empregam mão de obra familiar, contribuindo para a renda dessas famílias (SANTOS et al., 2016).

Atualmente no Brasil, a produção de fibras de seda obtidas a partir dos bichos-da-seda domesticados é restrita a apenas uma empresa de processamento, a Bratac S. A., que é responsável por 100% do processamento de matéria-prima e enrolamento de fios de seda. A Bratac é uma empresa com capital 100% brasileiro e possui mais de 2.000 funcionários em seus setores, situada na cidade de Londrina-PR. Esse fato coloca o Brasil como o único país ocidental a produzir fibra de seda em escala comercial, ocupando uma posição de destaque como quinto maior produtor no mercado mundial (GIACOMIN et al., 2017). O estado do Paraná é responsável pela maior produção de fibras de seda, cerca de 90% da produção brasileira, seguidos pelos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (GIACOMIN et al., 2017; SOARES JUNIOR; ALMEIDA; PÁDUA, 2018). Apesar de enfrentar forte concorrência das fibras sintéticas, as fibras a seda são ainda consideradas um material têxtil de primeira no mundo, devido à sua alta resistência à tração, brilho e capacidade de unir corantes químicos, o que mantêm sua supremacia na produção de aparelhos de luxo e produtos especializados de alta qualidade (GIACOMIN et al., 2017).

2.2 ESTRUTURA DAS FIBRAS DE SEDA PRODUZIDAS PELA LAGARTA *BOMBYX MORI*

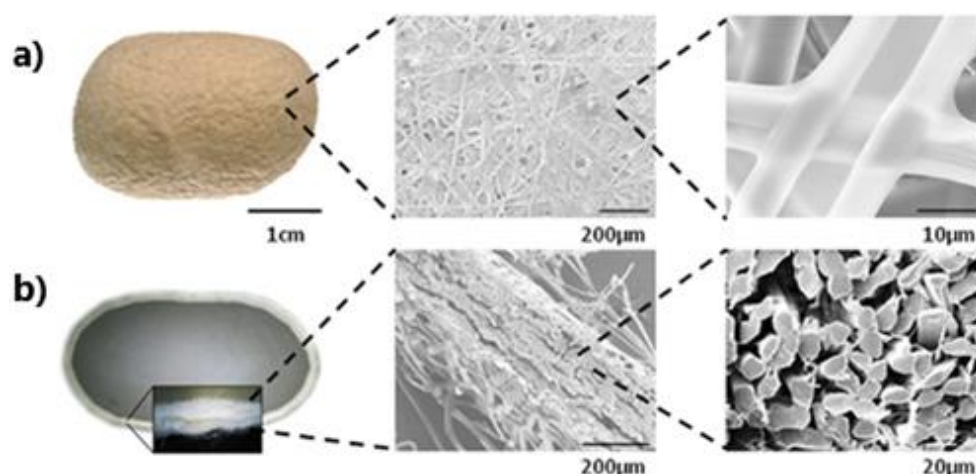
Diversos animais (bichos-da-seda, aranhas, escorpiões e ácaros) produzem fibras de seda para diferentes fins. Porém, somente sete espécies (*Bombyx mori*, *Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi*, *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama*, *Atlacus ricini* e *Philosamia cynthia*) são criadas para fins comerciais devido ao seu sucesso em têxteis, uso médico e disponibilidade em comparação com outros organismos produtores de fibras de seda. Destas, seis são selvagens e uma é domesticada (o bicho-da-seda *B. mori*) responsável pela maior produção de casulos (MHUKA, 2014).

Os casulos do bicho-da-seda da lagarta *B. mori* são produzidas por

um par de glândulas chamadas sericígenas na forma de fibras filamentosas que apresentam elevado teor de proteínas (SANTOS; VIDIGAL; MERLINI, 2011). As proteínas secretadas, normalmente na forma líquida, são fibroína, sericina e P25, as quais se solidificam quando entram em contato com o ar e tornam-se aptas para a formação do filamento que irá formar o casulo (SOARES JUNIOR; ALMEIDA; PÁDUA, 2018).

A maioria dos casulos possui formas esféricas, ovais ou cinturadas, que variam de acordo com as raças do bicho-da-seda (SAYEG; BARUQUE-RAMOS, 2014). Na Figura 1, é apresentado um conjunto de imagens do casulo do bicho-da-seda *B. mori* que ilustra esquematicamente a estrutura tridimensional de um casulo.

Figura 1 - Morfologia de um casulo produzido pela lagarta *Bombyx mori*: Parte superior, superfície externa do casulo (a) e parte inferior, estrutura em multicamada do casulo (b).



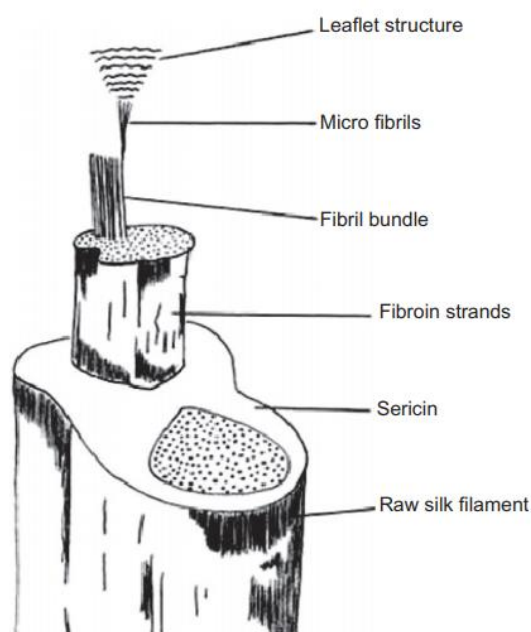
Fonte: Chen (2012)b

Como apresentado nas imagens acima, a morfologia de um casulo produzido pela lagarta *B. mori* é formado por múltiplas camadas a partir de um único filamento que é trançado pela lagarta, tanto em forma de “S” como em forma de “8” (SAYEG; BARUQUE-RAMOS, 2014), conferindo um aspecto poroso, rígido e resistente o suficiente para proporcionar conforto e proteção para as pupas contra o ambiente, parasitismo ou predadores (CHEN; PORTER; VOLLRATH, 2012a). Sobre a composição do casulo, além de fibroína de seda (70-80%) e sericina (20-30%), também existem impurezas, como, gorduras (1,2-1,6%) e ceras (0,4-0,8), sais inorgânicos (0,7%) e pigmento, (0,2%) (MONDAL; TRIVEDIY; NIRMAL KUMA, 2007).

2.2.1 Fibroína de Seda

Morfologicamente a fibra seda é constituída por dois monofilamentos proteicos, denominados brins, embebidos por cobertura de sericina (ALTMAN et al., 2003; POZA et al., 2002). Os brins são filamentos longos e finos de fibroína de seda compostos por maços de nanofibrilas, que são orientadas paralelamente ao eixo da fibra. Acredita-se que as nanofibrilas interajam fortemente umas com as outras (HAKIMI et al., 2007; POZA et al., 2002). Uma representação esquemática do fio da seda do *B. mori* é apresentada na Figura 2.

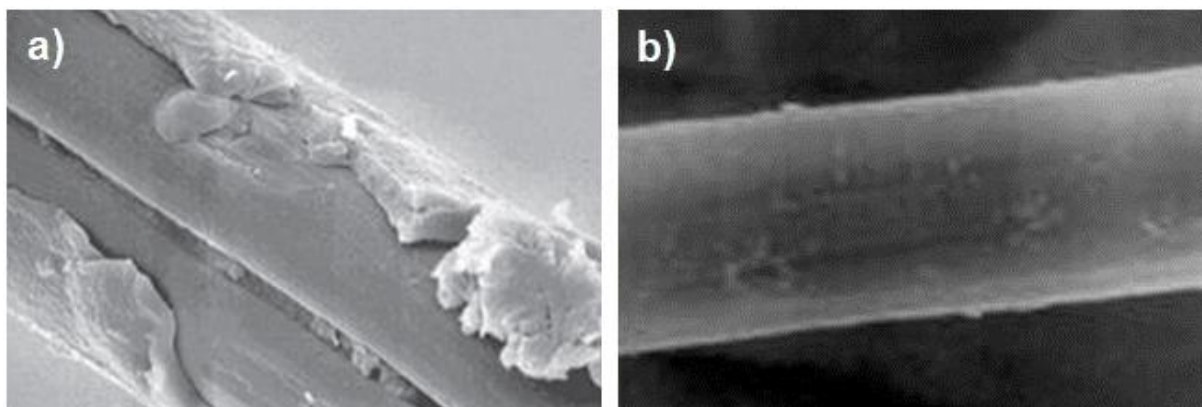
Figura 2 – Esquema morfológico da fibra de seda do bicho-da-seda *Bombyx mori*.



Fonte: Babu (2019)

O comprimento dos filamentos de seda pode atingir de 700 a 1.500 m de comprimento (ASAKURA; OKUSHITA; WILLIAMSON, 2015; CHEN; PORTER; VOLLRATH, 2012b) e seu diâmetro pode variar entre 10 a 25 μm de diâmetro (ASAKURA; OKUSHITA; WILLIAMSON, 2015; CHEN; PORTER; VOLLRATH, 2012b). No estado cru, a largura do filamento de seda é desigual e a superfície mostra muitas irregularidades, tais como fissuras e pregas (Fig. 3 (a)). Após o processo de degomagem (processo de cozimento cuja finalidade é a remoção da sericina), as fibras apresentam largura uniforme e uma superfície lisa (Fig. 3 (b)) (BABU, 2019).

Figura 3 – Imagens da superfície da fibra de seda mostrando as irregularidades da superfície do filamento (a) e imagem da fibra de seda após processo de degomagem (b), obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Adaptado de Babu (2019)

Quanto a composição química, são apresentados na Tabela 1, os aminoácidos mais importantes encontrados na estrutura primária das fibras da fibroína de seda da *B. mori*.

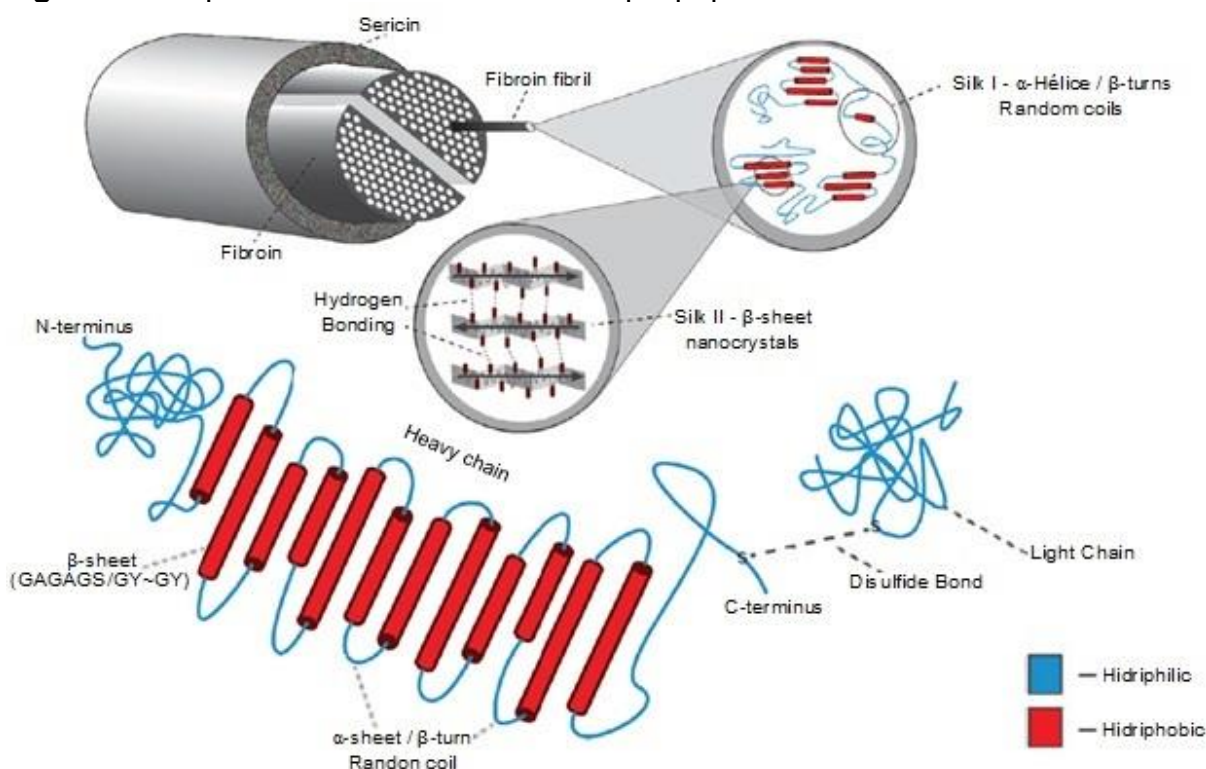
Tabela 1 – Composição de aminoácidos do filamento de seda do bicho-da-seda *Bombyx mori*.

Aminoácidos	Composição (mol %)	
	Fibroína	Sericina
Glicina (G)	42,68	17,85
Alanina (A)	33,38	6,70
Serina (S)	7,65	25,05
Tirosina (Y)	5,84	3,10
Valina (V)	2,58	4,05
Ácido Aspártico (D)	1,79	18,38
Ácido Glutâmico (E)	1,36	5,74
Treonina (T)	0,85	7,47
Fenilalanina (F)	0,81	0,67
Metionina (M)	0,15	0,31
Isoleucina (I)	0,72	1,02
Leucina (L)	0,54	1,49
Prolina (P)	0,47	0,81
Arginina (R)	0,44	3,12
Histidina (H)	0,21	1,32
Lisina (K)	0,33	2,08

Fonte: Reddy (2020)

Estruturalmente, a fibroína de seda consiste em duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia pesada (H) (~390 kDa) e uma cadeia leve (L) (~26 kDa) unidas por meio de uma única ponte dissulfeto (formada entre dois resíduos de cisteína) no carbono terminal da cadeia H, formando um H-L complexo (DYAKONOV et al., 2012; HAKIMI et al., 2007; HOLLAND et al., 2019; KOH et al., 2015; QI et al., 2017; SEHNAL; ŽUROVEC, 2004) conforme apresentado na Figura 4. Outro componente da fibroína de seda, é uma glicoproteína denominada P25 (25-30 kDa), que também está ligada de forma não covalente ao complexo H-L (QI et al., 2017; SEHNAL; ŽUROVEC, 2004). Pensa-se que a cadeia H, a cadeia L e a P25 sejam montadas em uma unidade elementar de alta massa molecular com a proporção de 6:6:1, respectivamente (ASAKURA; OKUSHITA; WILLIAMSON, 2015).

Figura 4 - Esquema ilustrativo da estrutura polipeptídica da fibra de seda.



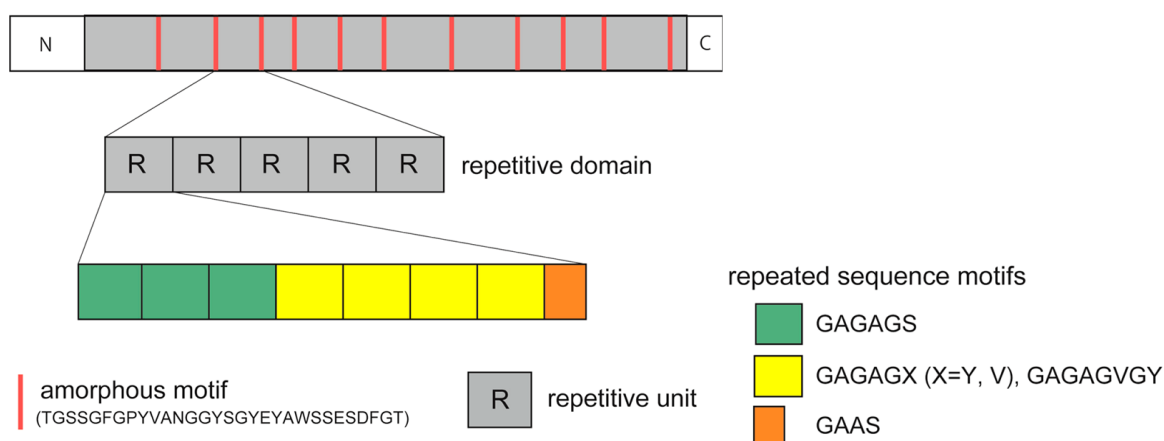
Fonte: DeBari (2018)

A cadeia pesada é hidrofóbica e composta por uma sequência repetitiva de aminoácidos a qual tende a formar β -folhas antiparalelas através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas fornecendo a cristalinidade. Por outro lado, a cadeia leve tem uma composição de aminoácidos diferente, com sequências não repetitivas, denotando propriedades mais hidrofílicas, com relativa

elasticidade com pouca ou nenhuma cristalinidade (ZAFAR, 2015; CAO; WANG, 2009; HAKIMI et al., 2007; MONDAL; TRIVEDI; NIRMAL KUMA, 2007).

Organizacionalmente, a cadeia pesada da fibroína da seda é um biopolímero altamente regular, que consiste em 12 domínios hidrofóbicos intercalados com 11 domínios hidrofílicos como representados na Figura 5 (ASAKURA; OKUSHITA; WILLIAMSON, 2015).

Figura 5 – Representação esquemática da organização dos 12 domínios repetitivos e 11 domínios repetidos amorfos na estrutura primária da cadeia H da fibroína da seda *B. mori*.



Fonte: Susuki (2014)

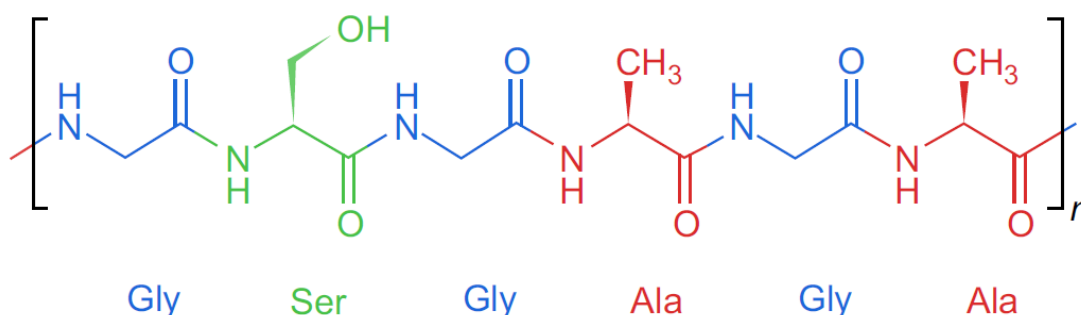
Esses domínios repetitivos são compostos de 1 a 8 repetições da unidade repetitiva R, que consiste em três elementos repetidos dos domínios da sequência de aminoácidos. Essas sequências podem ser divididas em quatro domínios (Fig. 5), isto é, o módulo (i) contém uma sequência altamente repetitiva de GAGAGS que compõe a maior parte das regiões cristalinas e é encontrada principalmente no início de cada subdomínio; o módulo (ii) contém uma sequência relativamente menos repetitiva contendo resíduos hidrofóbicos e/ou aromáticos GAGAGY, GAGAGV e GAGAGVGY, constituindo as regiões semicristalinas; o módulo (iii) as sequências são muito semelhantes ao módulo (i), exceto pela presença de um domínio AAS, que geralmente são encontrados na extremidade do carbono terminal (C terminal) de cada subdomínio; e o módulo (iv) constitui de regiões amorfas que separam os domínios e contêm resíduos polares, hidrofóbicos volumosos e/ou aromáticos carregados negativamente, por exemplo, TGSSGFGPYVANGGYSGYEYAWSSSEDFGT (ASAKURA; OKUSHITA;

WILLIAMSON, 2015; SUZUKI et al., 2014). Os domínios repetitivos são capazes de se organizarem juntos em camadas através de forças intramoleculares ou intermoleculares, incluindo ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, e interações hidrofóbicas, levando à formação de regiões cristalinas altamente ordenadas na fibroína da seda (KOH et al., 2015; NGUYEN et al., 2015).

2.2.2 Estrutura Primária e Secundária das Proteínas da Seda

A variação na composição de aminoácidos entre sericina e fibroína resulta em diferenças consideráveis em suas configurações primária e secundária. A sericina é primariamente amorfa e não possui estrutura organizada. A fibroína da seda, por outro lado, é altamente ordenada devido a uma estrutura primária repetitiva baseada predominantemente nos aminoácidos glicina, alanina e serina (Fig. 6). As subunidades recorrentes desses aminoácidos de cadeia curta permitem um empacotamento próximo entre as cadeias moleculares, resultando em extensas regiões cristalinas na fibroína. A maioria dos resíduos de aminoácidos com cadeias laterais polares e volumosas é encontrada nas áreas menores não cristalinas (amorfas). Esta região é composta de várias estruturas desordenadas com diferentes graus de ligação de hidrogênio (MHUKA, 2014).

Figura 6 – Estrutura primária de fibroína de seda e seus respectivos aminoácidos, Gly: glicina, Ser: serina, Ala: alanina.



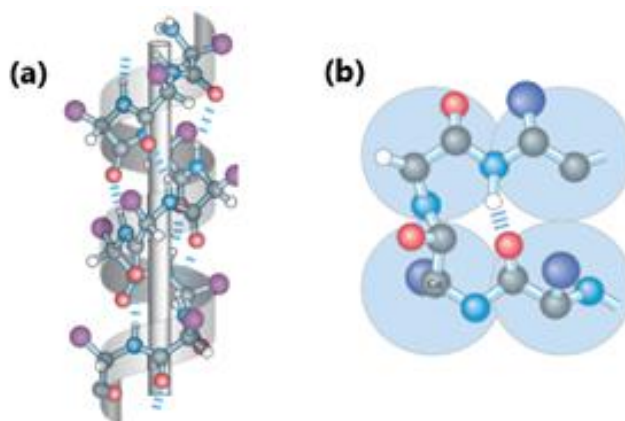
Fonte: Herrera (2018)

A natureza cristalina das fibras de seda *B. mori* tem sido estudada principalmente desde o início do século XX (ASAKURA; OKUSHITA; WILLIAMSON, 2015). Dentre as estruturas observadas para fibroína de seda pode ser encontrada três conformações estruturais distintas da estrutura secundária, isto é, seda I, seda II

e seda III que podem estar presentes em diferentes proporções (ZHANG, 2002). Essas estruturas foram exaustivamente investigadas usando várias técnicas analíticas que incluem difração de raios X (DRX), difração de elétrons, cálculos de energia conformacional, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^{15}N , espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular no ultravioleta distante, etc (ASAKURA; OKUSHITA; WILLIAMSON, 2015; SUZUKI et al., 2014).

A seda I, é a forma metaestável solúvel em água. Sua conformação ainda não foi totalmente compreendida, mas é geralmente descrita como um conjunto de conformações como: α -hélice, β -volta tipo II (β -turn) (Fig. 7) e domínios enovelamento aleatório (Random coil), que apresentam desde a falta de estrutura secundária, até cristais parcialmente ordenados (HAKIMI et al., 2007; VEPARI; KAPLAN, 2007). A estrutura seda I pode ser convertida na estrutura seda II (β -folhas) por ação de calor, tratamento mecânico (MONTI et al., 1998, 2001; VEPARI; KAPLAN, 2007) ou métodos químicos (como tratamento com metanol) (CAO; WANG, 2009; VEPARI; KAPLAN, 2007).

Figura 7 – Estrutura secundária seda I do tipo (a) α -hélice, (b) β -volta tipo II.



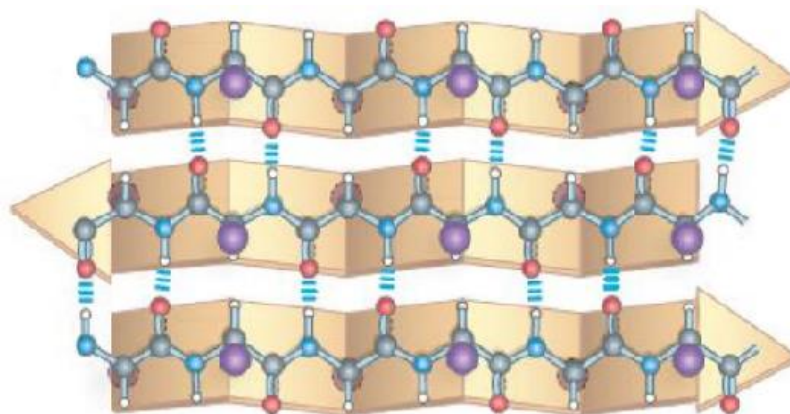
Fonte: Nelson e Cox (2014)

A conformação enovelamento aleatório predominante em proteínas, consiste de uma estrutura aleatória sem nenhuma periodicidade, onde as moléculas podem se ligar de todas as formas possíveis. Normalmente, esta conformação é apresentada em cadeias poliméricas amorfas (CANEVAROLO JUNIOR., 2002). As estruturas β -volta (β -turn) normalmente são encontradas próximas à superfície das proteínas, onde os grupos peptídicos dos dois resíduos de aminoácidos centrais da

alça podem fazer ligação de hidrogênio com a água. São particularmente comuns e conectam as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma β -folha antiparalela. Além disso, as β -voltas são elementos conectores que ligam estruturas sucessivas de α -hélices e conformações β (NELSON; COX, 2014).

A conformação seda II é caracterizada como uma estrutura hidrofóbica e insolúvel em diversos solventes incluindo ácidos e bases diluídos (CAO; WANG, 2009; VEPARI; KAPLAN, 2007). Geralmente é descrita como uma estrutura β -folha antiparalelas (Fig. 8) arranjada de forma que os grupos metílicos e grupos hidrogenados das folhas opostas interajam para formar o empilhamento inter-folhas, no qual, fortes ligações de hidrogênio (pontes de hidrogênio entre os grupos C=O dos resíduos dos aminoácidos da cadeia principal) e forças de Van der Waals (interação dos grupos N-H na sequência de aminoácidos) geram uma estrutura termodinamicamente estável (HAKIMI et al., 2007; VEPARI; KAPLAN, 2007).

Figura 8 – Estrutura secundária seda II do tipo β -folha antiparalela.



Fonte: Nelson e Cox (2014)

Finalmente, a estrutura seda III é descrita como sendo um arranjo hexagonal de moléculas de seda em uma conformação de cadeia tríplice helicoidal adotada pela fibroína na interface ar-água. Essa estrutura causa a separação dos resíduos serina e alanina, permitindo que a fibroína atue como surfactante na interface ar-água. Como esta conformação separa os resíduos serina e alanina, criando uma coluna hidrofílica de resíduos paralela ao eixo helicoidal, acredita-se que o comportamento surfactante da fibroína na interface ar-água desempenhe um papel na seleção da conformação e da estrutura cristalina subsequente na interface (VALLUZZI et al., 1999; VOLKOV; FERREIRA, CAVACO-PAULO, 2015).

2.2.3 Sericina

Sericina é uma proteína solúvel em água quente, com características adesivas como a gelatina. Essa proteína, apresenta uma estrutura globular, sendo responsável pela adesão dos filamentos de seda para manter a integridade estrutural do casulo durante sua formação. Além disso, a sericina contém 18 aminoácidos, onde a serina (32%), ácido aspártico (18%) e glicina (16%) são os compostos mais significativos (BARAJAS-GAMBOA et al., 2016)

A sericina possui um peso molecular que depende do seu método de extração. Por exemplo, quando é recuperada dos casulos varia de 40 a 400 kDa e quando é extraída diretamente da glândula da lagarta, varia de 80-310 kDa. (BARAJAS-GAMBOA et al., 2016). Estruturalmente a sericina consiste em 70 repetições do domínio de 38 aminoácidos: SSTGSSNTDSNSNSVGSSTSGGSSTYGYSSNSRDGSV (HANG et al. 2012, HUANG et al., 2003; KUNDU et al., 2008). Além disso, a estrutura secundária da sericina nativa das glândulas de seda do meio, bem como dos casulos, é constituída de uma mistura de estruturas: enovelamento aleatório e estruturas de β -folhas sem nenhum conteúdo de α -hélice na maioria dos casos. A presença da estrutura β -folha pode estar associada às interações da ligação de hidrogênio envolvidas entre abundantes aminoácidos polares no componente repetitivo rico em serina (KUNDU et al., 2008). Os grupos polares (grupos carboxila, hidroxila e amino) das cadeias laterais dos aminoácidos e sua composição orgânica, solubilidade, e a organização estrutural permitem reticulação, copolimerizações e combinações com outros polímeros, que juntos transmitem propriedades únicas à sericina como proteção antioxidante, hidratante, cicatrizante, antibacteriana, antimicrobiana contra radiação ultravioleta e antitumoral (KUNZ, et al., 2016). A dissolução da serina é realizada pelo processo de degomagem, no qual os casulos do bicho da seda são imersos em soluções alcalinas ou em água em alta temperatura (CAO; WANG, 2009; HAKIMI et al., 2007; MINOURA; TSUKADA; NAGURA, 1990). Além disso, apesar de possuir propriedades interessantes como resistência a radiação ultravioleta, oxidação e capacidade antibacteriana (ZHANG, 2002), a sericina foi identificada como a fonte de reações imunogênicas causadas pelos fios de seda utilizados em suturas. Embora estudos tenham demonstrado que tais reações ocorrem apenas quando a sericina está associada à fibroína (PANILAITIS et al., 2003).

2.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria (BUMBRAH; SHARMA, 2016). Os métodos espectroscópicos podem ser baseados em fenômenos de transmissão, absorção, emissão, fluorescência ou espalhamento (BUMBRAH; SHARMA, 2016; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Diferentes métodos espectroscópicos são frequentemente utilizados para a caracterização de uma ampla gama de materiais. Podemos destacar três técnicas espectroscópicas bastante difundidas, pela versatilidade, rapidez e caráter não destrutivo: a espectroscopia de fotoluminescência, a espectroscopia no infravermelho e a espectroscopia Raman. Apesar de serem baseadas em processos de interação entre radiação e matéria, cada uma dessas técnicas é fundamentada em um princípio físico completamente distinto (RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

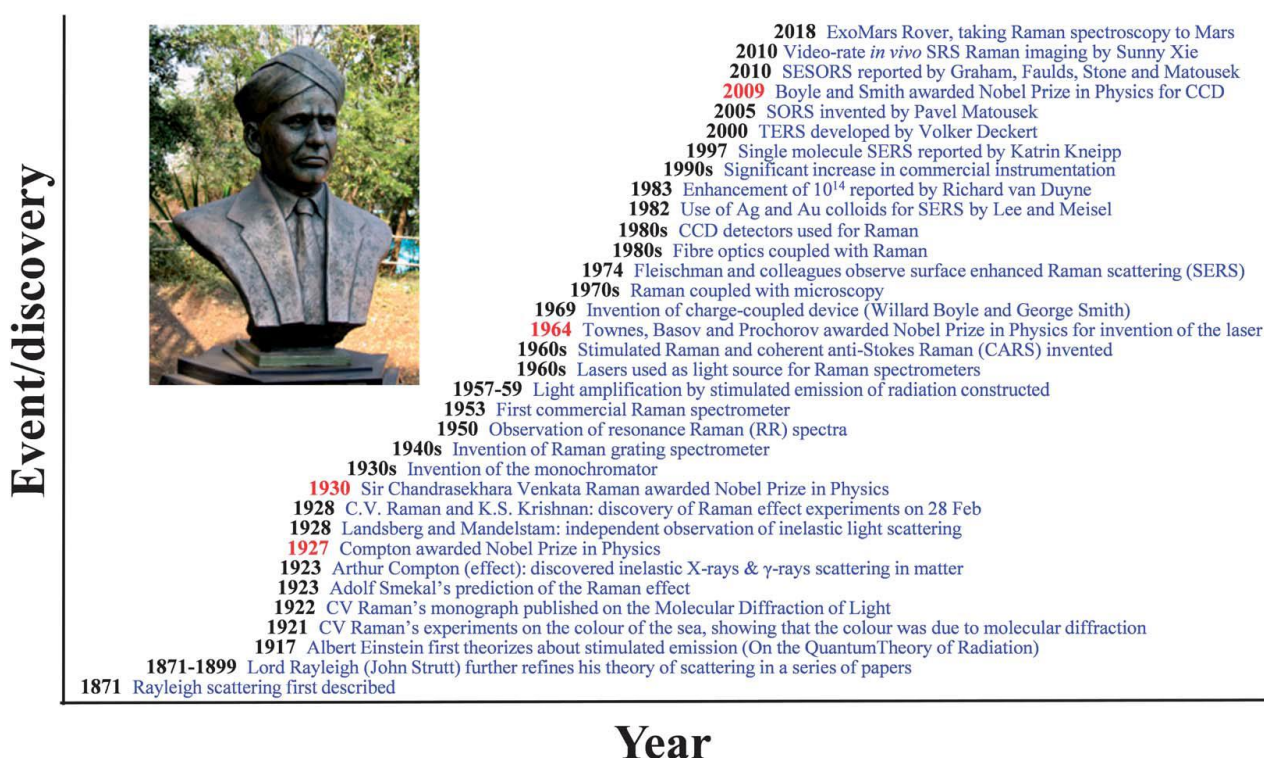
A espectroscopia de fotoluminescência está baseada no fenômeno de emissão de radiação por um meio (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). A espectroscopia de absorção no Infravermelho envolve o fenômeno de absorção da radiação, o que implica que a radiação empregada tenha que ter energia exatamente igual à diferença de energia entre dois níveis vibracionais da molécula (FREDERICCI et al., 2016). Em outras palavras, para que um modo vibracional seja ativo na espectroscopia no infravermelho é necessário que haja uma variação do momento de dipolo elétrico da molécula com a vibração (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). Isso implica que as ligações polares tendem a apresentar sinais maiores que as ligações não polares (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Por outro lado, na espectroscopia Raman, o fenômeno físico envolvido é o espalhamento inelástico da radiação, ou seja, a radiação espalhada possui energia distinta da radiação incidente (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). Desse modo, ligações não polares apresentam sinais Raman maiores que as ligações polares, assim, o que deve variar com a vibração é a sua polarizabilidade, ou seja, a capacidade de deformação da nuvem eletrônica da molécula (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

2.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman é uma técnica de espalhamento, de análise química não destrutiva que fornece informações detalhadas sobre estrutura química, fase e polimorfismo, cristalinidade e interações moleculares (KAFLE, 2020). É baseado no efeito Raman, ou seja, no espalhamento inelástico da radiação incidente através de sua interação com moléculas vibrantes (FARIA; SANTOS, 1997). É uma técnica que utiliza uma fonte de radiação monocromática, que tipicamente emprega comprimentos de onda na região do infravermelho próximo até o ultravioleta, passando pela região do visível (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019; PEREIRA, 2016; RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

O efeito Raman ou espalhamento Raman foi previsto teoricamente por Seal, em 1923, e, posteriormente, por Kramer e Heisenberg, em 1925, em trabalhos clássicos baseados na mecânica quântica. Mais tarde, o fenômeno foi observado e comprovado experimentalmente, por pesquisadores de dois grupos independentes: Raman e Krishna na Índia e Landsberg e Mandelstam na Rússia. No entanto, a descoberta desse fenômeno foi atribuída apenas ao primeiro grupo, e o efeito não foi apenas nomeado como uma homenagem a Raman, mas ele também recebeu o Prêmio Nobel de Física no ano de 1930 em reconhecimento a essa conquista (BROWNE, 2020; KAFLE, 2020; LONG, 2008; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Mais detalhes do desenvolvimento da espectroscopia Raman, tanto do ponto de vista teórico quanto instrumental, estão resumidamente descritos na Figura 9.

Figura 9 - Desenvolvimentos em instrumentação e conceitos relacionados a Raman até o século XX.



Fonte: Ellis et al., (2013)

Discussões mais aprofundadas dos princípios da espectroscopia Raman podem ser encontradas em estudos realizados pelos pesquisadores Sala (1986) e Temperine (1977), dessa forma, neste trabalho será apenas abordado uma breve exploração sobre a Espectroscopia Raman.

Quando a radiação eletromagnética interage com um meio, ela pode ser refletida, propagada ou transmitida por todo o material sem nenhuma interação. A fração da luz propagada pode sofrer refração, absorção ou espalhamento. A prevalência de um fenômeno sobre outro dependerá da natureza da radiação eletromagnética incidente (comprimento de onda, polarização, ângulo de incidência etc.) e do próprio material (composição química, estrutura interna, dimensão, entre outros). Logo, pode-se dizer que o efeito Raman surge da interação da radiação eletromagnética com a molécula através de seu campo elétrico (ALVES, 2019; KAFLE, 2020).

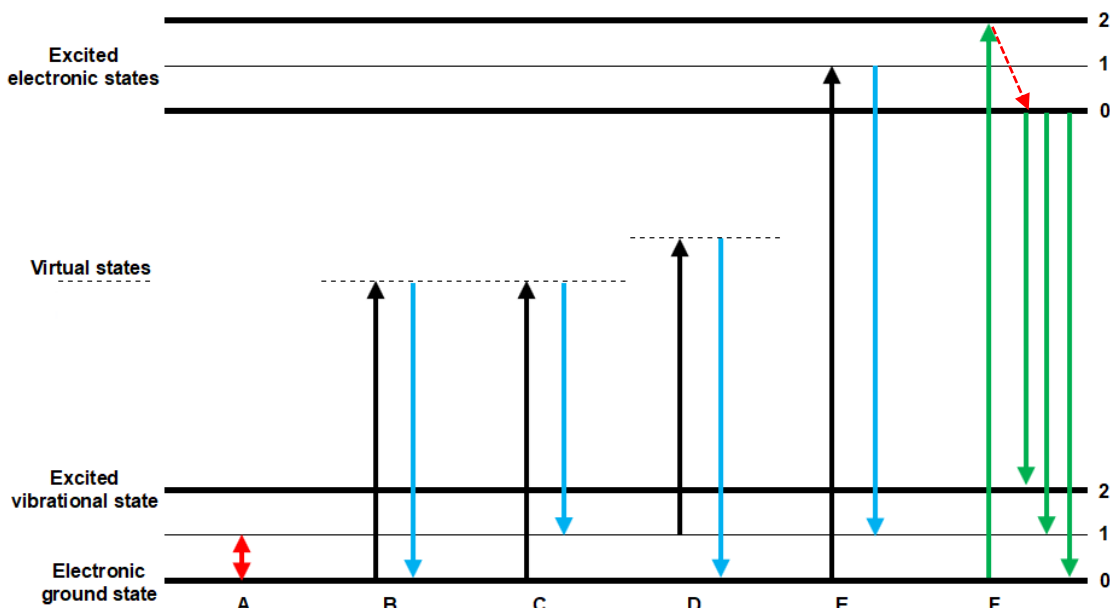
Em uma descrição abreviada, e uma melhor compreensão do fenômeno de espalhamento, é preciso lembrar a ideia da radiação eletromagnética como um dipolo elétrico oscilante que se propaga ao longo do tempo. A interação

entre o dipolo elétrico da luz e a molécula causa uma distorção da nuvem de elétrons. Como o tamanho da molécula é desprezível quando comparado ao comprimento de onda da luz, a nuvem de elétrons é altamente polarizada por essa interação. Como resultado, é formado um complexo estado de alta energia entre o fóton e a nuvem de elétrons, que por sua vez é chamado de “estado virtual ou estado excitado” (ALVES, 2019; FARIA; SANTOS, 1997). O estado virtual não é real e não se refere a nenhum estado eletrônico ou vibracional preexistente na molécula, mas é criado no momento da incidência do laser (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Muito instável, decai imediatamente emitindo um fóton na forma de radiação espalhada assim, originando o espalhamento da luz (ALVES, 2019). Esse processo de espalhamento da luz leva apenas cerca de 10^{-14} s ou menos (KAFLE, 2020).

A relaxação para o estado eletrônico fundamental pode ocorrer através do espalhamento de um fóton, onde três possibilidades existem: a molécula relaxa para (i) o mesmo estado vibracional de origem ou (ii) para um estado vibracional superior ao de origem ou ainda (iii) para um estado vibracional inferior ao de origem (RODRIGUES, 2013). No primeiro caso nenhuma troca de energia está envolvida. Em outras palavras, os fótons serão espalhados com pequenas diferenças de energia e, assim, retornarão ao estado fundamental (Figura 10). Esse fenômeno onde praticamente não há diferença de energia entre o fóton incidente e o fóton espalhado é chamado de espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

Nos outros dois casos os fótons espalhados terão frequências menor e maior do que os fótons incidentes, respectivamente, portanto, espalhados inelasticamente (RODRIGUES, 2013). Quando os fótons interagem com a molécula e causam uma polarização, há uma diferença de energia entre o fóton incidente e o fóton espalhado e, portanto, é chamado de espalhamento inelástico. Se a energia é transferida do fóton para a molécula, o fóton espalhado tem uma energia mais baixa e um comprimento de onda mais longo e é chamado de espalhamento Stokes. Se o contrário ocorre, é chamado de espalhamento anti-Stokes (Figura 10) (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

Figura 10 - Diagrama de energia de Jablonski ilustrando os diferentes processos e os estados envolvidos no processo de espalhamento Raman: absorção no infravermelho (A), espalhamento Rayleigh (B), espalhamento Raman Stokes (C), espalhamento Raman anti-Stokes (D), espalhamento Raman por ressonância (E) e fluorescência (F). As setas para cima representam a excitação, enquanto as setas para baixo indicam a emissão.



Fonte: Adaptado de Mitsutake, Poppia e Breitz (2019)

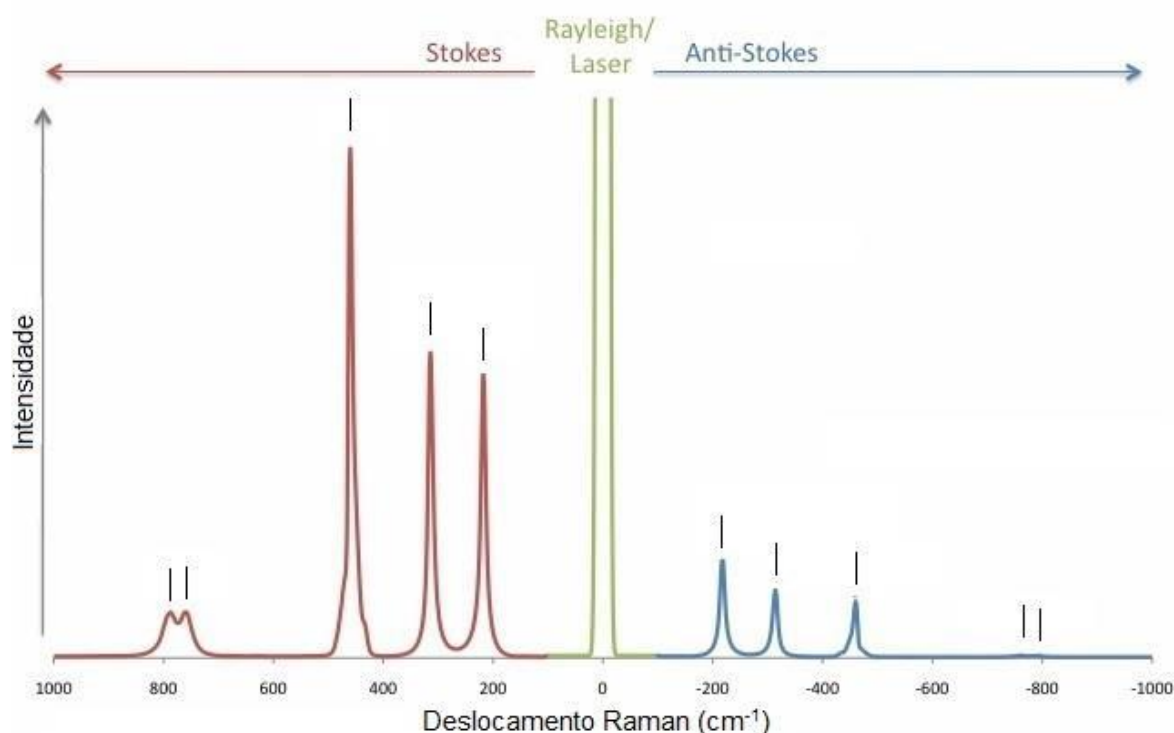
Considerando que a força do sinal Raman é proporcional à quarta potência do comprimento de onda do laser, a impressão inicial seria que o uso de lasers mais energéticos proporcionaria melhor desempenho. No entanto, isso nem sempre é favorável, pois, em vez de o fóton atingir o estado virtual, ele pode adquirir energia suficiente para atingir o estado eletrônico excitado, gerando um espectro de fluorescência (Fig. 10), cujo sinal é mais intenso e obscurece a dispersão Raman (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

Os espectros Raman são de simples aquisição, e requerem mínima ou nenhuma preparação da amostra. Geralmente os espectros Raman são apresentados em função da diferença entre o número de onda do sinal espalhado e o sinal incidente, expresso tipicamente em número de onda (cm^{-1}) conhecido como deslocamento Raman, como apresentado na Figura 11. Nesse contexto, como moléculas distintas possuem estruturas diferentes e geralmente mais de um modo vibracional, cada uma apresenta um espectro único com picos que representam as

características vibracionais desta, o que permite a identificação de compostos até mesmo em misturas (PEREIRA; 2016; VIANNA, 2017).

Em um espectro Raman bandas atribuídas ao espalhamento Rayleigh, coincidente com a frequência da fonte de excitação, é observada com alta intensidade no centro do espectro. Em valores positivos de deslocamento, são observadas as bandas atribuídas ao espalhamento Raman Stokes, e nos valores negativos correspondentes, ao espalhamento anti-Stokes. Os dois diferem somente nas intensidades de espalhamento, sendo as bandas anti-Stokes menos intensas, uma vez que a população de moléculas que se encontram nos estados vibracionais excitados é menor. Logo, para que um modo vibracional de uma molécula seja ativo e observado no espectro Raman, a vibração de determinada ligação deve, portanto, provocar variação na sua polarizabilidade (PEREIRA; 2016; VIANNA, 2017).

Figura 11 – Exemplo de um espectro Raman mostrando a linha Rayleigh (centro) e das linhas de Stokes (esquerda) e anti-Stokes (direita).



Fonte: Pereira (2016)

2.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN NA ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Dentre as muitas técnicas disponíveis que podem fornecer informações sobre a estrutura secundária da fibroína de seda, a espectroscopia Raman tem-se demonstrado uma ferramenta útil de diagnóstico ultrarrápida na caracterização estrutural de proteínas, na identificação de bandas específicas associadas a estrutura secundária, especialmente no que diz respeito a determinação de alterações conformacionais da estrutura secundária de proteínas em diferentes matrizes (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; HOANG, 2015). Nesse sentido, vários modos vibracionais podem ser usados para a análise da estrutura peptídica de proteínas. As principais bandas características são associadas ao grupo CONH, conhecido como amida A (estiramento N-H, cerca de 3500 cm^{-1}), amida B (estiramento N-H, cerca de 3100 cm^{-1}) e amida I a VII (I: $1600\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$, II: $1480\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$, III: $1230\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, IV: $625\text{--}770\text{ cm}^{-1}$, V: $640\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, VI: $540\text{--}600\text{ cm}^{-1}$, VII: 200 cm^{-1}). A atribuição dos modos peptídicos restantes é: amida IV (flexão OCN), amida V (flexão N-H fora do plano), amida VI (flexão C=O fora do plano) e amida VII (esquelético). O número de onda dos modos amida reflete a estrutura da cadeia polipeptídica principal, independentemente dos grupos laterais (MIURA; THOMAS 1995; RYGULA, et al., 2013).

Os principais modos vibracionais para a identificação de diferentes conformações de proteínas são: amida I (vibração de estiramento de C=O), amida II e amida III (ambos associados ao estiramento C-N e deformação N-H do grupo peptídeo). As bandas esperadas para a amida I e a amida III correspondem aos intervalos $1640\text{--}1680$ e $1230\text{--}1310\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. a interpretação das bandas Raman da amida é frequentemente baseada em mudanças na forma do pico, e não nas atribuições individuais da banda. Sendo assim, as frequências Raman e as formas das bandas das proteínas amida I e amida III nos respectivos intervalos dependem bastante sensivelmente da estrutura secundária da proteína. Conseqüentemente, as bandas Raman da amida são frequentemente exploradas como indicadores da estrutura secundária da proteína (MIURA; THOMAS 1995; RYGULA, et al., 2013).

Tais indicadores, fazem parte de um grande número de proteínas de estruturas secundárias e tridimensionais que sugerem as seguintes generalizações: (i) domínios α -hélice nas proteínas contribuem com as bandas de amida I e amida III

nos intervalos 1645-1655 e 1260-1310 cm^{-1} , respectivamente; (ii) para estruturas de β -folhas, os intervalos correspondentes são aproximadamente 1665-1680 e 1230-1245 cm^{-1} ; e (iii) para domínios irregulares ou desordenados, as respectivas bandas de amida I e amida III são antecipadas nos intervalos 1655-1665 e 1245-1270 cm^{-1} (MIURA; THOMAS 1995; RYGULA, et al., 2013).

Além da caracterização das bandas referentes as amidas, existem características adicionais nos espectros de Raman que permitem a descrição do ambiente de inúmeras cadeias de aminoácidos. Isso inclui os modos de cadeia lateral de aminoácidos (por exemplo, dubleto de triptofano 1360/1340 cm^{-1} , dubleto de tirosina 860/833 cm^{-1}) ou resíduos contendo enxofre nos diferentes estados físicos (C-S se esticando com H na posição trans do átomo S: 640-680 cm^{-1} e C-S esticando com C na posição trans do átomo S; 740-760 cm^{-1} , S-S estendendo-se: 508-512 cm^{-1} (GGG), 523- 528 cm^{-1} (TGT), 540-545 cm^{-1} (TGT)) (RYGULA, et al., 2013). Sendo assim, a espectroscopia Raman tem-se mostrado potencialmente útil no fornecimento de informações e identificação de proteínas, bem como para análise de sua estrutura secundária que são importantes para diversas áreas do conhecimento como na química, na engenharia, na biologia e medicina (RYGULA, et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da temperatura na organização estrutural de casulos cru e processado, visando contribuir para o melhor entendimento das propriedades desse material. Pretende-se com isso, avançar tanto na caracterização vibracional como no conhecimento das estruturas secundárias das fibras de seda dos casulos como um meio de avaliar rapidamente a conformação molecular das fibras de seda, o que pode ser útil no controle das propriedades desses materiais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avançar no conhecimento estrutural e vibracional dos casulos crus e processados por espectroscopia Raman confocal.

Investigar o efeito da temperatura na organização estrutural de casulos crus e processados, utilizando as técnicas de DSC, TGA, espectroscopia Raman confocal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os casulos do bicho-da-seda (*B. mori*) utilizados neste estudo foram fornecidos pela Empresa de Fiação de Seda Bratac, com sede em Londrina, Paraná, Brasil.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Secagem em Estufa dos Casulos Cru e Processado

Depois de classificados, os casulos foram submetidos a dois diferentes programas de secagem em estufa (FANEN, Modelo 3015 SE), a 80 e 125 °C por 60 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, as amostras obtidas foram nomeadas como casulos crus tratados e casulos processados tratados.

4.2.2 Classificação

As amostras de casulo foram inicialmente classificadas como casulos crus, antes de qualquer tratamento térmico, e casulos processados, após tratamento térmico em fornos secadores. Os casulos crus e processados foram subsequentemente cortados em pedaços de 0,5 x 0,5 cm usando uma tesoura de aço inoxidável.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CASULO CRU E PROCESSADO

4.3.1 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas (TG) foram feitas em um equipamento Shimadzu modelo TGA-50. Para tal, fragmentos dos casulos crus e processados

com massas de 7,061 mg e 5,043 mg, respectivamente foram utilizadas. As amostras foram colocadas em uma porta amostra de platina sob atmosfera de N₂ com um fluxo de 20 mL min⁻¹ e razão do aquecimento de 20°C min⁻¹ em uma faixa de 25 e 400°C. As curvas TG foram obtidas em um equipamento da Shimadzu modelo TGA-50.

4.3.2 Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

A calorimetria de varredura diferencial foi usada nos fragmentos de casulo (massa total de 1.800 mg de casulo cru e 1.600 mg de casulo processado). As amostras foram colocadas em suportes herméticos de alumínio. As curvas DSC foram obtidas em um calorímetro de varredura diferencial Shimadzu DSC-60. O calor foi aplicado a uma taxa de 10 °C min⁻¹, em uma faixa de temperatura de 25 a 300 °C. Uma taxa de fluxo de gás de 50 mL min⁻¹ foi usada em uma atmosfera de nitrogênio.

4.3.3 Espectroscopia Raman

Para análises Raman, os casulos de seda foram colocados em lâminas de microscópio de vidro com o auxílio de uma pinça metálica. Os espectros Raman e as micrografias ópticas das superfícies internas dos casulos foram obtidos usando um Sistema de Microscópio Confman Raman WITec® Alpha300 + Confocal e lente x50 ZEISS com comprimentos de onda de 532 e 785 nm. A potência do laser focada na amostra foi mantida em 7,5 e 10 mW, respectivamente, medidos inicialmente por um equipamento medidor de energia posicionado após a lente objetiva. Os espectros foram coletados acumulando-se por 3 segundos após 10 varreduras.

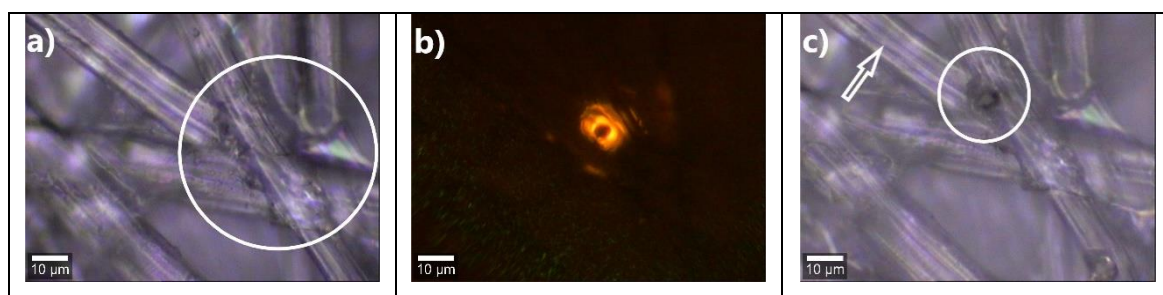
Todas as deconvoluções espectrais foram feitas no programa Origin (8.0, 2007). Um número de componentes e a geração de um ajuste razoável foram assumidos no processo, onde cada componente demonstra a dependência do tratamento feito na amostra por meio da mudança na intensidade relativa observada. Uma função Gaussiana foi usada e o controle sobre os parâmetros (posições e largura de banda) não foi realizado, e pequenas diferenças de posição e largura de banda foram toleradas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Uma das etapas do processo de industrialização do filamento de seda é a secagem dos casulos antes da transformação das crisálidas em mariposas, preservando a qualidade do filamento. A temperatura de secagem varia entre 110°C a 120° C, terminando a 40 a 50°C. A queda progressiva da temperatura acontece à medida que se vai completando a secagem, ou seja, as seções de secagem variam em escalas de temperaturas e diminuem gradativamente à medida que se atravessam as seções (SAYEG; BARUQUE-RAMOS, 2014). Dessa forma, um estudo vibracional desses materiais antes e após aquecimento é necessária.

Na Figura 12 foram apresentadas as imagens obtidas no microscópio confocal da superfície dos casulos da lagarta *Bombyx mori* (*B. Mori*), com a incidência e após a incidência de radiação laser. Como pode ser observado na Figura 12(a), os fios da seda foram organizados em camadas e apresentam regiões em que ocorrem entrelaçamentos das fibras formando algumas estruturas irregulares (região circundada), que unem os fios. Provavelmente, essas estruturas foram devidas à formação da sericina, como caracterizado por Hang et al. (2012) e Jin e Kaplan (2003). Na Figura 12(b) é apresentado a imagem com a incidência de radiação laser, em 532 nm. Foi verificado nessa região, o efeito de fluorescência dessas estruturas irregulares. Após a retirada da incidência do laser, como pode ser verificado na Figura 12(c), houve a queima do material nessa região (região circundada). Por outro lado, foi verificado que a incidência de radiação do laser em outra região da fibra, com a mesma potência de laser, não houve a queima do material (região apontada por seta).

Figura 12 - Imagens ampliadas da superfície do casulo (a), da mesma com a incidência (b) e após a incidência de radiação laser 532 nm (c). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal, com objetiva de 50 vezes.

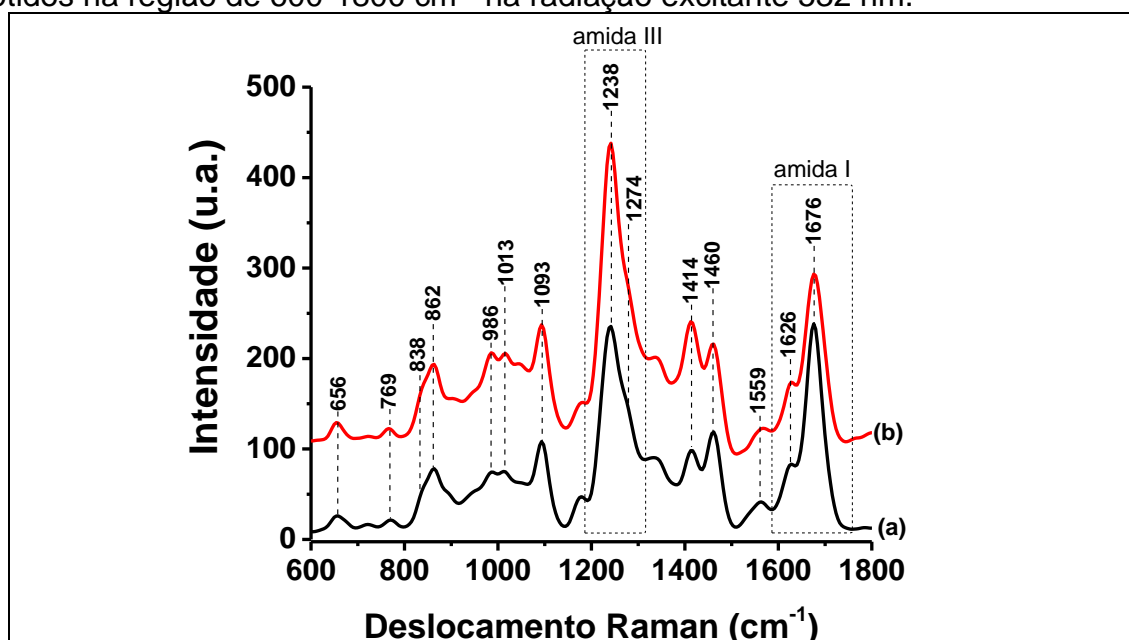


Fonte: o próprio autor

Desta forma, foram obtidos os espectros Raman desses materiais na região da fibra, distante das regiões irregulares, utilizando a radiação 532 nm. Buscou-se com esse procedimento o estudo das componentes com estruturas mais ordenadas no material, uma vez que, a espectroscopia Raman, como mencionado anteriormente, pode fornecer informações a respeito dos grupamentos amida e da conformação molecular da fibroína de seda, dependendo da posição e intensidade das bandas específicas (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; HOANG, 2015; TUMA, 2005).

A Figura 13 apresenta os espectros Raman da região entre 600-1800 cm^{-1} das amostras de casulo cru (a) e casulo processado (b) do bicho-da-seda *B.mori*, obtidos na radiação excitante de 532 nm.

Figura 13 - Espectros Raman do — casulo cru (a) e — casulo processado (b) obtidos na região de 600-1800 cm^{-1} na radiação excitante 532 nm.



Fonte: o próprio autor

Os espectros Raman das amostras de casulo cru e processado apresentaram grande semelhança, com pequenos deslocamentos das bandas identificadas. As principais bandas características dos modos vibracionais da fibroína de seda (fibras de seda), foram observadas em 1093, 1238, 1414, 1460, 1676 cm^{-1} e o ombro em 1274 cm^{-1} , que são semelhantes às apresentadas em trabalhos publicados por Monti et al., (1998), Rousseau et al., (2004), Zhang et al., (2015) e Zheng et al., (1989).

Nota-se que duas regiões destacadas na Figura 13 em 1230-1300 cm^{-1} e 1600-1700 cm^{-1} do espectro Raman apresentaram bandas mais largas e intensas. Essas regiões são de grande interesse neste trabalho por serem relacionadas as regiões das amidas I e III de proteínas e, podem ser associadas às conformações moleculares α -hélice, β -volta, enovelamento aleatório e β -folha.

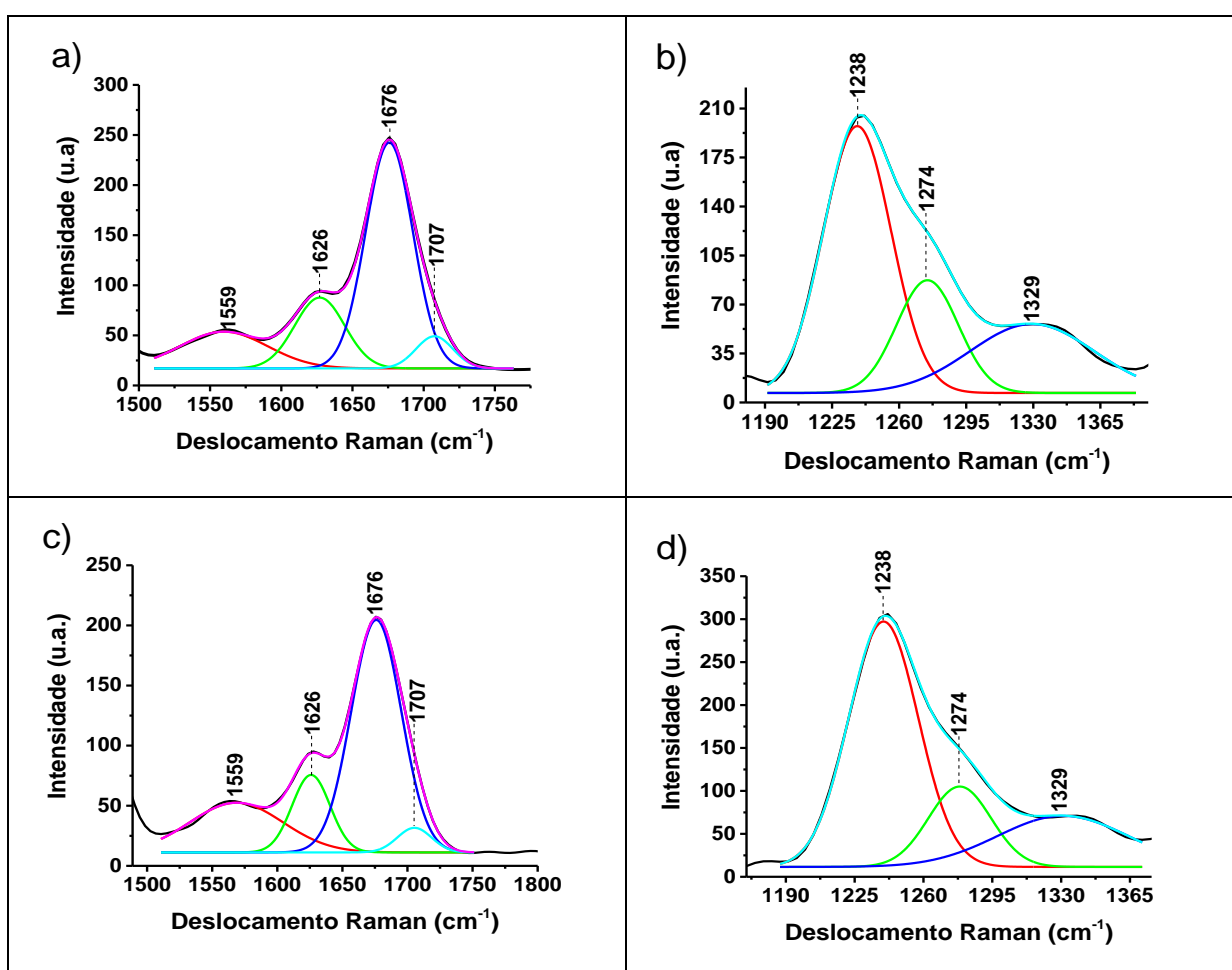
A banda da amida I possui frequência característica na faixa de 1600 a 1700 cm^{-1} e está relacionada predominantemente à contribuição do estiramento C=O (80%), e menos significativamente ao estiramento C-N (10%) e deformação angular N-H (10%). Já a região do espectro referente a 1230-1300 cm^{-1} é característica da amida III e está associada às contribuições de estiramento C-N (40%), a deformação angular N-H (30%) e CH_3CH (20%) (ARÊAS; KAWANO, 1991). Esta última região espectral (da amida III), apresenta tendências complexas, pois existem diferentes contribuições de modos vibracionais da amida e de cadeias laterais de aminoácidos que se misturam em diferentes partes dessa faixa espectral (MONTI et al., 1998, 2003).

As bandas observadas em 1093, 1238 e 1676 cm^{-1} foram atribuídas a vibração de estiramento C-C, da amida III e amida I, respectivamente. Estes resultados coincidem com os obtidos por (MONTI et al., 1998, 2001; ROUSSEAU et al., 2004; ZHANG et al., 2015; ZHENG et al., 1989), e fornecem uma clara indicação conformacional da estrutura secundária na forma de β -folha também conhecida como seda II. No entanto, podem ser encontrados trabalhos como os publicados por Edwards e Farwell (1995) e Shao et al. (2005) que sugerem que a banda em 1093 cm^{-1} seja característica da conformação enovelamento aleatório do estiramento C-C e estiramento C-N respectivamente, porém nesse trabalho, assim como relatado por Magoshi e Magoshi (1975), Monti et al. (1998) e Zheng et al. (1989), esta banda foi atribuída à conformação de β -folha. Já o ombro observado em 1274 cm^{-1} foi atribuído como sendo da amida III que é característica da conformação α -hélice também conhecida como seda I (MONTI et al., 2001; PEREIRA; SILVA; DE ZEA BERMUDEZ, 2015).

As bandas em 1414 e 1460 cm^{-1} foram atribuídas como sendo característica da sericina referente à vibração de deformação δOH da serina (MONTI et al., 2007) e atribuída ao dobramento $\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$ da poli(Ala) e dobramento δCH_2 no plano da poli(Ala-Gly), respectivamente (PREGHENELLA; PEZZOTTI; MIGLIARESI, 2007; ROUSSEAU et al., 2004; SHAO et al., 2005).

Para um melhor detalhamento e utilização da técnica Raman como ferramenta para essa caracterização, na Figura 14, foram apresentados os espectros Raman deconvoluídos da região entre 1510-1750 cm^{-1} (amida I) e 1190-1380 cm^{-1} (amida III) baseado em mudanças na forma da banda, e não nas suas atribuições individuais.

Figura 14 - Espectros Raman deconvoluídos do casulo cru das bandas em 1675 cm^{-1} (a) e 1238 cm^{-1} (b) e das bandas do casulo processado em 1676 cm^{-1} (c) e 1239 cm^{-1} (d) obtidos na radiação excitante de 532 nm.



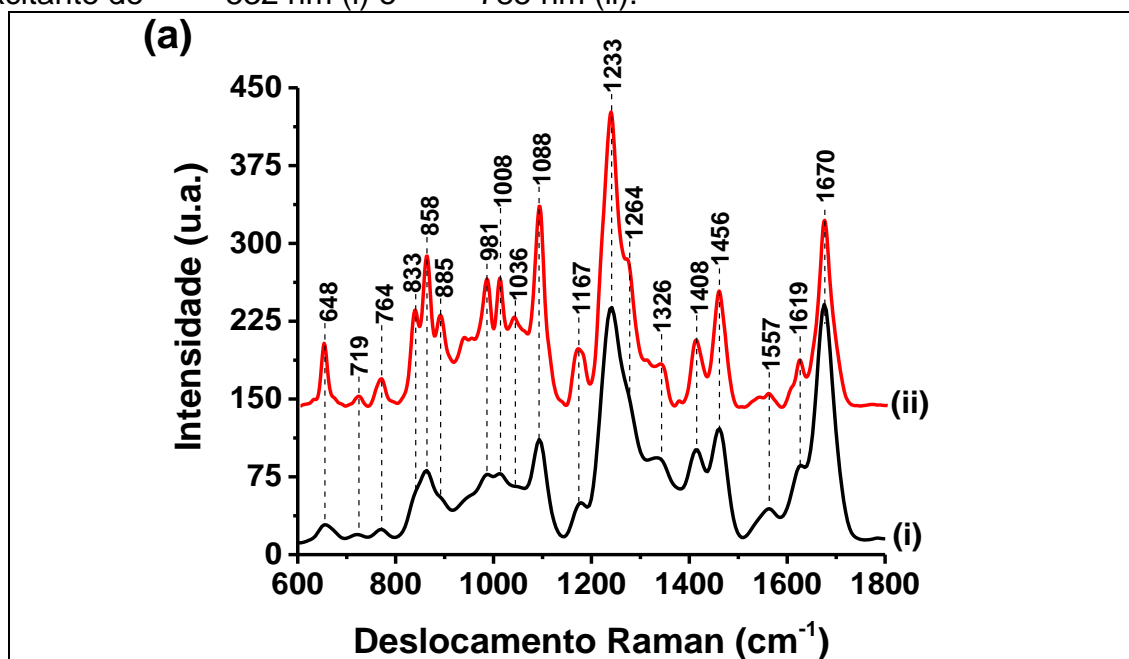
Fonte: o próprio autor

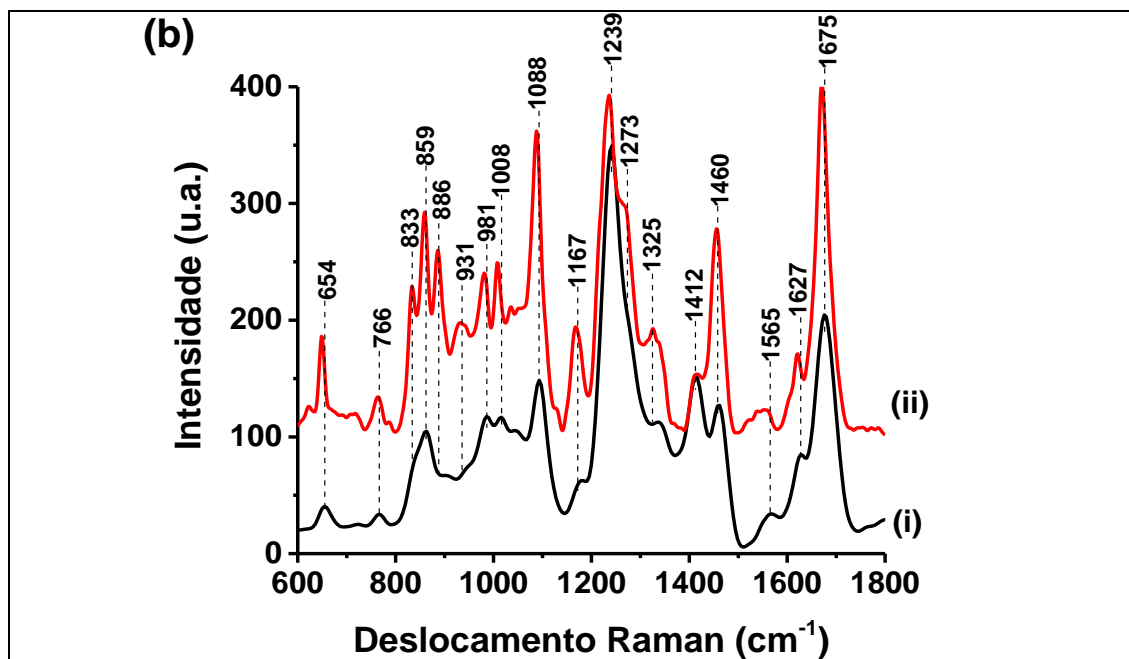
Na Figura 14(a) e 14(c), são apresentados os espectros deconvoluídos da região entre 1510-1750 cm^{-1} (amida I) do espectro Raman obtido na radiação excitante de 532 nm das amostras de casulo cru e casulo processado. Foram observadas bandas em aproximadamente 1559, 1626 e 1676 cm^{-1} . Esta última banda (1676 cm^{-1}) foi atribuída à conformação β -folha. No que se refere a

Figura 14(b) e 14(d) da região entre 1510-1750 cm^{-1} dos espectros Raman deconvoluídos da amida III do casulo cru e casulo processado, as bandas verificadas em aproximadamente em 1238 cm^{-1} e 1274 cm^{-1} foram relacionadas com a conformação β -folha (seda II) e α -hélice (seda I) respectivamente e a banda em 1329 cm^{-1} atribuída deformação δCH_3 (COLOMBAN et al., 2012; EDWARDS; FARWELL, 1995; MONTI et al., 2001; PREGHENELLA; PEZZOTTI; MIGLIARESI, 2007; ROUSSEAU et al., 2004). É interessante notar que, tanto para o casulo cru quanto para o casulo processado os espectros mostram valores de número de onda semelhantes para as bandas referentes a região da amida I e III, demonstrando que o aquecimento brando feito no casulo cru durante a secagem industrial não altera significativamente os componentes das estruturas secundárias.

Com o objetivo de verificar se ocorrem alterações nos espectros com a mudança da radiação excitante e, considerando o arranjo estrutural complexo das cadeias polipeptídicas e dos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais, além da radiação 532 nm foi utilizada a radiação excitante 785 nm para obtenção dos espectros Raman. Dessa forma, na Figura 15 foram apresentados os espectros Raman do casulo cru e processado, obtidos nas radiações excitantes 532 e 785 nm.

Figura 15 - Espectros Raman no intervalo de 600-1800 cm^{-1} do — casulo cru (a) e — casulo processado (b) do bicho-da-seda *Bombyx mori*, obtidos na radiação excitante de — 532 nm (i) e — 785 nm (ii).





Fonte: o próprio autor

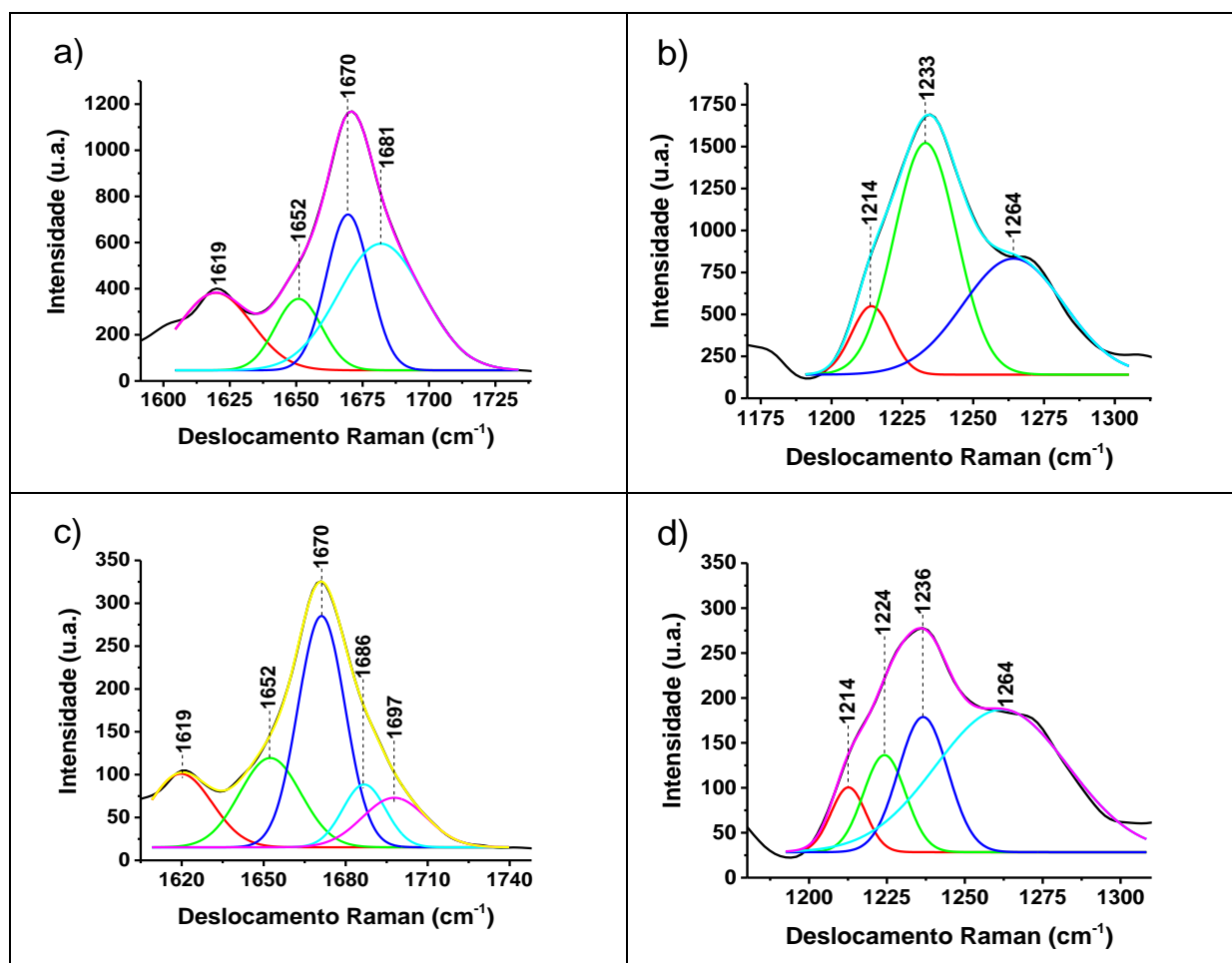
Comparando os espectros acima, nota-se que utilizando a radiação excitante 785 nm as bandas em 1670/1675, 1233/1239 e 1088 cm^{-1} tornam-se mais estreitas e intensas em relação ao espectro Raman inicial obtido em 532 nm (Fig. 13). Observa-se também o surgimento das bandas em 719, 886, 931 e 1037 cm^{-1} , características das cadeias polipeptídicas presentes na estrutura primária do casulo (da fibroína de seda) (COLOMBAN et al., 2008; HANADA; FARWELL, 1995; MONTI et al., 2001; PREGHENELLA; PEZZOTTI; MIGLIARESI, 2007; TADDEI et al., 2013). Além desses novos fenômenos observados, é possível afirmar aumentos nas intensidades das bandas em 648, 764, 835, 860, 981, 1008, 1167 e 1619/1627 cm^{-1} . Essas bandas foram atribuídas as vibrações da cadeia lateral dos aminoácidos da fibroína de seda (MONTI et al., 2001; PREGHENELLA; PEZZOTTI; MIGLIARESI, 2007; ROUSSEAU et al., 2004) e parecem ser mais sensíveis na radiação excitante de 785 nm.

Como apresentado por Asakura et al. (2002), a constituição das sequências amorfas de resíduos de tirosina presentes no casulo de seda podem ser na maioria devido a contornos distorcidos de β -voltas e β -folhas, induzindo aleatoriedade no esqueleto da fibroína. Desta forma, os resultados de deconvolução das bandas amida I, podem fornecer informações, se os casulos são ou não idênticos a nível molecular.

Com base nos resultados acima e de acordo com os estudos de Lefèvre et al. (2007) que mostrou que através da decomposição das bandas amida I e III, cuja regiões são consideradas complexas, por apresentarem diferentes contribuições de modos vibracionais que se misturam em diferentes partes dessa faixa espectral, foi identificado a presença das bandas em 1655, 1666, 1678/1693 cm^{-1} as quais foram relacionadas as estruturas α -hélices, β -folhas and β -voltas, respectivamente. Dessa forma, na Figura 16 foi realizado um estudo da decomposição das bandas da Amida I e III do casulo cru e processado.

Na Figura 16, são apresentados os espectros Raman deconvoluídos das regiões entre 1600-1730 cm^{-1} (amida I) e 1200-1300 cm^{-1} (amida III) do espectro Raman obtido na radiação excitante de 785 nm de de casulo cru e processado.

Figura 16 - Espectros Raman deconvoluídos do casulo cru das bandas 1670 cm^{-1} (a), 1233 cm^{-1} (b) e do casulo processado das bandas em 1670 cm^{-1} (c), 1236 cm^{-1} (d) obtidos na radiação excitante de 785 nm.



Fonte: o próprio autor

Para a região da amida I (Fig. 16(a) e 16(c)), além das bandas já identificadas nos espectros Raman deconvoluídos em 532 nm do casulo cru e processado, duas outras bandas foram observadas, em 1652 e 1681/1686 cm^{-1} , para ambas as amostras de casulo cru e casulo processado. A banda observada em 1652 cm^{-1} foi atribuída à conformação α -Hélice (SHAO et al., 2005). Por outro lado, nos espectros deconvoluídos da banda da amida III em 1233/1236 cm^{-1} (Fig. 16(b) e 16(d)) do casulo cru e processado obtidos em 785 nm, foram observadas as bandas em 1261/1264 cm^{-1} e as bandas em 1214 e 1224 cm^{-1} . A banda em 1224 cm^{-1} foi atribuída como sendo característica dos aminoácidos de cadeias laterais, tirosina e fenilalanina (MONTI et al., 2001; PREGHENELLA; PEZZOTTI; MIGLIARESI, 2007).

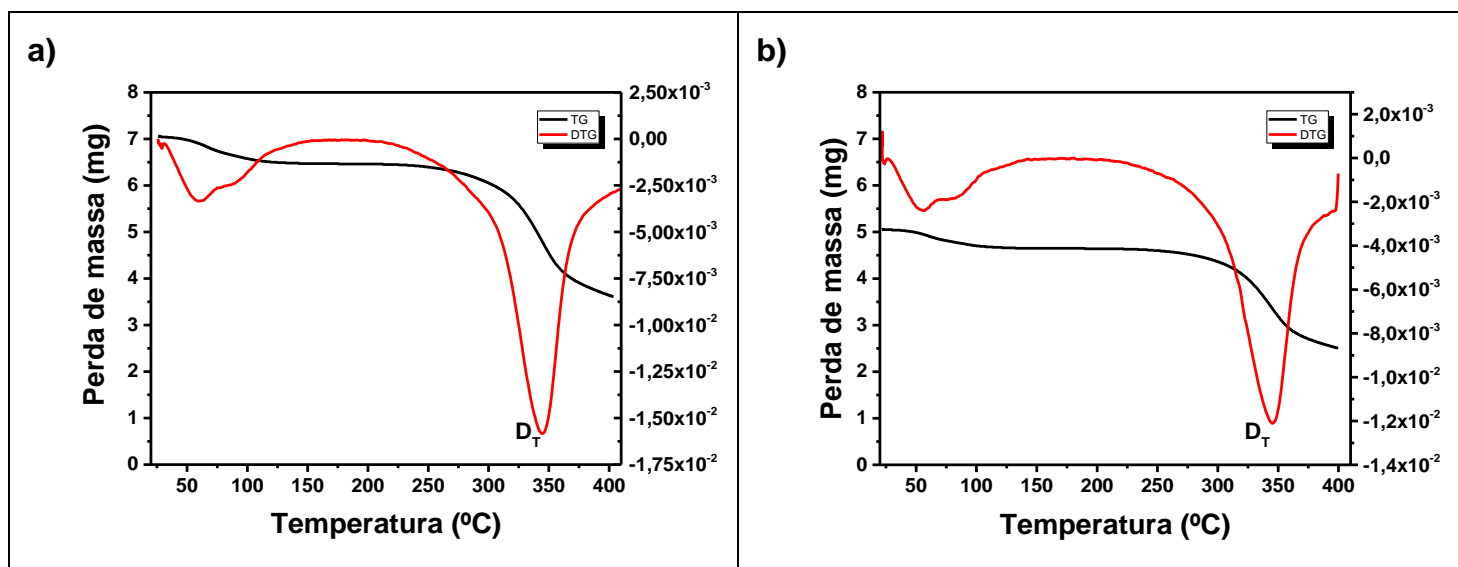
Sendo assim ao compararmos os espectros deconvoluídos obtidos em 785 nm (Fig. 16) com os espectros obtidos em 532 nm (Fig. 14), nota-se que utilizando a radiação excitante de 785 nm, um maior número de bandas é observado, principalmente em relação à região espectral correspondente à amida III, cuja região apresenta diferentes contribuições de modos vibracionais que se misturam em diferentes partes dessa faixa espectral. Desse modo, pelos resultados obtidos, as deconvoluções das regiões da amida I e III dos espectros Raman em 532 e 785 nm, demonstrou-se uma ferramenta útil para avaliar a presença das frequências relacionadas às estruturas secundárias da fibroína de seda, ou seja, às conformações moleculares β -folha (seda II) e α -hélice, β -volta e enovelamento aleatório (seda I).

Considerando a possibilidade que um aquecimento brando do casulo de seda, pode vir a promover algumas desordens estruturais na organização molecular das fibras que constitui o material, foi realizado inicialmente o estudo dos eventos térmicos que podem ocorrer por consequência das modificações desse material com a temperatura.

Na Figura 17(a) e 17(b) foram apresentadas as análises termogravimétricas (TG) dos casulos cru e processado, respectivamente. As amostras foram medidas em função de um gradiente de temperatura de 30 a 400 °C. Os termogramas das duas amostras mostraram mostrou uma tendência similar aos obtidos por Malay, et al. 2016 e Wang et al. 2017, com perda inicial de peso dos casulos dentro de um intervalo de aproximadamente 50-100 °C correspondente à perda de água adsorvida. Para a observação dos picos de degradação dos casulos, foram analisadas as derivadas das curvas termogravimétricas, como mostra a Figura

15(a) e 15(b) destacadas em vermelho. É possível observar que ambas as amostras apresentaram comportamento semelhante, com pico em torno de 345 °C (D_T), o qual foi atribuído à degradação térmica dos casulos (MALAY, ET AL., 2016).

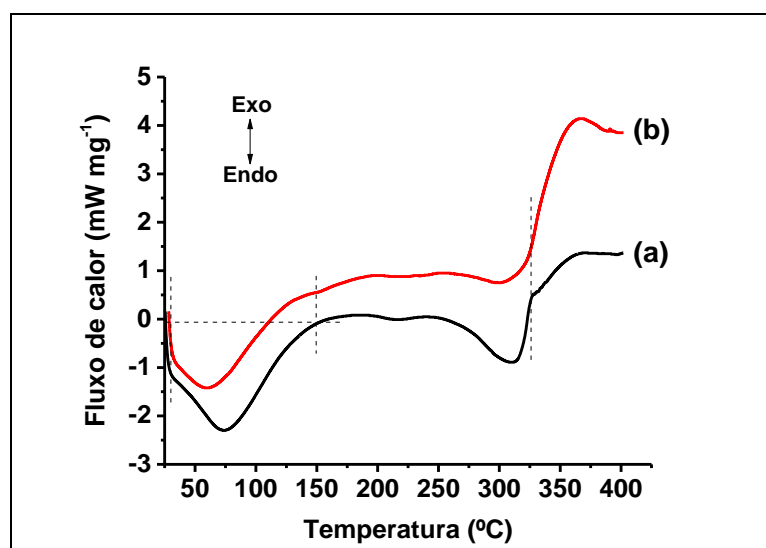
Figura 17 – Análises termogravimétricas TG (—) e derivadas das curvas termogravimétricas DTG (—), do casulo cru (a) e casulo processado (b).



Fonte: o próprio autor

Na Figura 18 foram apresentadas as curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos casulos cru e processado.

Figura 18 - Curvas de DSC do — casulo cru (a) e do — casulo processado (b).

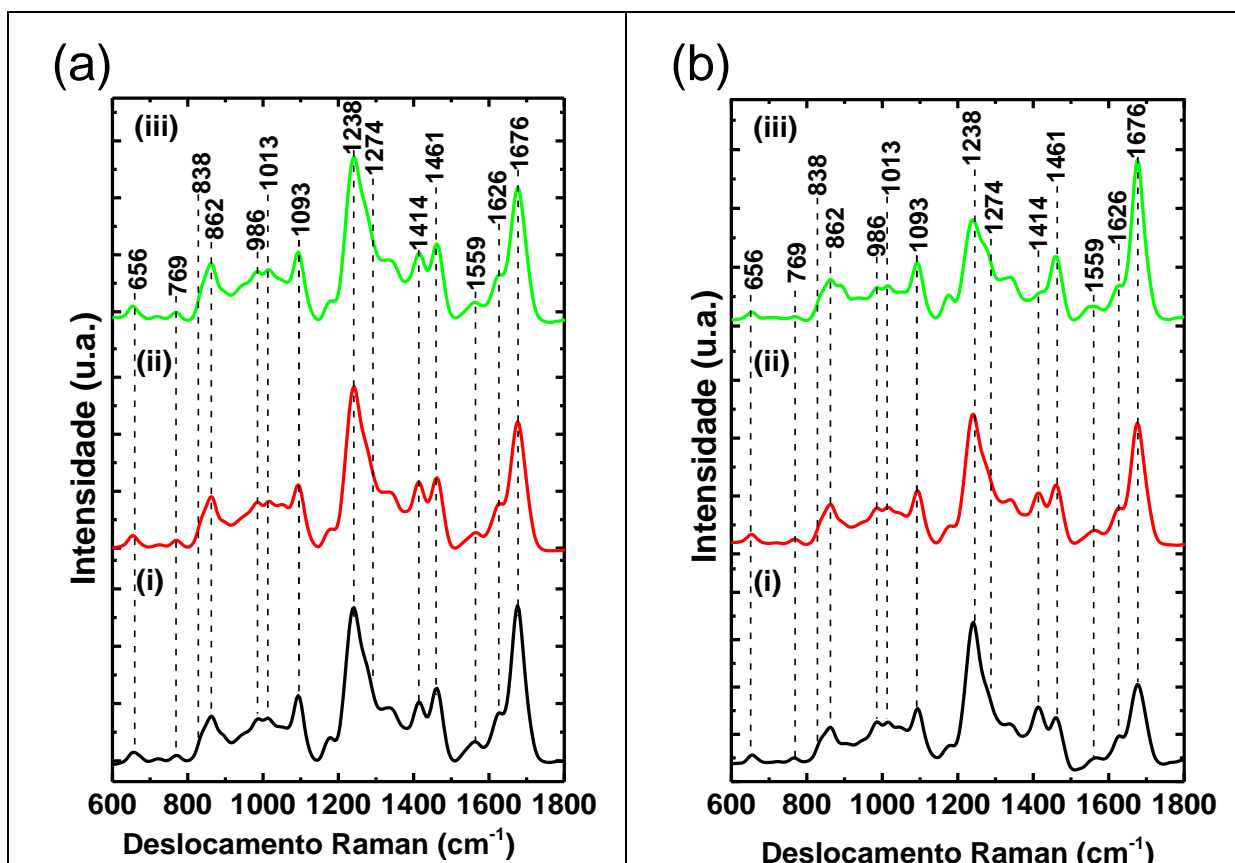


Fonte: o próprio autor

Foi verificado que entre as temperaturas de 30 e 150 °C ocorreu, em ambas as curvas, um processo endotérmico que caracteriza a vaporização da água. Entretanto, foi observada uma curva alargada, que demonstra provavelmente uma forte interação entre as moléculas de água com as moléculas constituintes no material da seda. Após 326 °C ocorreu um processo exotérmico, para ambos, relacionado à degradação dos casulos. Estes resultados mostram que o comportamento observado das curvas de DSC dos casulos cru e processado são semelhantes ao observado em trabalhos publicados por Malay, et al. (2016) e Wang et al. (2017) sobre fibras de seda dos casulos da *B. mori*.

Na Figura 19 foram apresentados os espectros Raman da superfície internas dos casulos cru e processado, como recebidos (sem aquecimento) e os tratados em estufa a 80 e 125 °C por um período de 60 minutos.

Figura 19 - Espectros Raman da superfície do casulo cru (a) e casulo processado (b) na região de 600-1800 cm^{-1} , — sem aquecimento (i); — processado em estufa à 80 °C (ii) e — 125 °C (iii), por um período de 60 minutos, obtidos na radiação excitante de 532 nm.



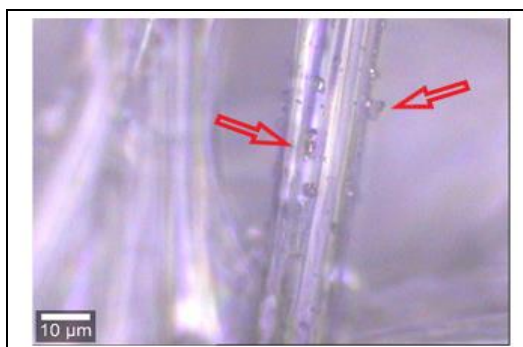
Fonte: o próprio autor

Os espectros Raman do casulo cru (Figura 19(a)) mostram que com o aumento da temperatura de secagem não houve alterações espectrais em ambas as temperaturas em relação ao casulo sem aquecimento. No entanto, nos espectros do casulo processado (Figura 19(b)) pode ser verificado que com o aumento da temperatura de secagem ocorre uma diminuição na intensidade da banda em 1412 cm^{-1} , relacionada à deformação OH da serina da sericina (MONTI et al., 2007), e um aumento de intensidade da banda em 1464 cm^{-1} atribuída ao dobramento CH_3 da poli(Alanina) e dobramento CH_2 no plano da poli(Alanina-Glicina) (PREGHENELLA; PEZZOTTI; MIGLIARESI, 2007; ROUSSEAU et al., 2004; SHAO, et al., 2005).

Além disso, foi possível observar um leve alargamento da banda da amida III em 1239 cm^{-1} , que pode indicar que esteja ocorrendo uma desordem estrutural com o aumento da temperatura. Pois, conforme relatado por Monti et al., (1998) a temperatura e a taxa de secagem desempenham um papel importante na desestabilização da conformação molecular na estrutura secundária da seda, ou seja, a temperatura pode ser considerada um parâmetro chave na desordem dessa estrutura presente inicialmente na fibroína de seda. Desse modo, as bandas em 1238 e 1093 cm^{-1} foram relacionados à conformação β -folha e a banda em 1270 cm^{-1} foi também relacionada à presença da conformação molecular α -hélices (MONTI et al., 2007).

Pelo acompanhamento das imagens obtidas pelo microscópio confocal, foi observado que com a secagem após $80\text{ }^\circ\text{C}$, foi verificado a formação de agregados de sericina sobre a superfície dos filamentos de fibroína conforme indicado com setas na Figura 20. Esse efeito foi menos percebido nas amostras de casulo cru, possivelmente pela maior quantidade de sericina ainda presente no material.

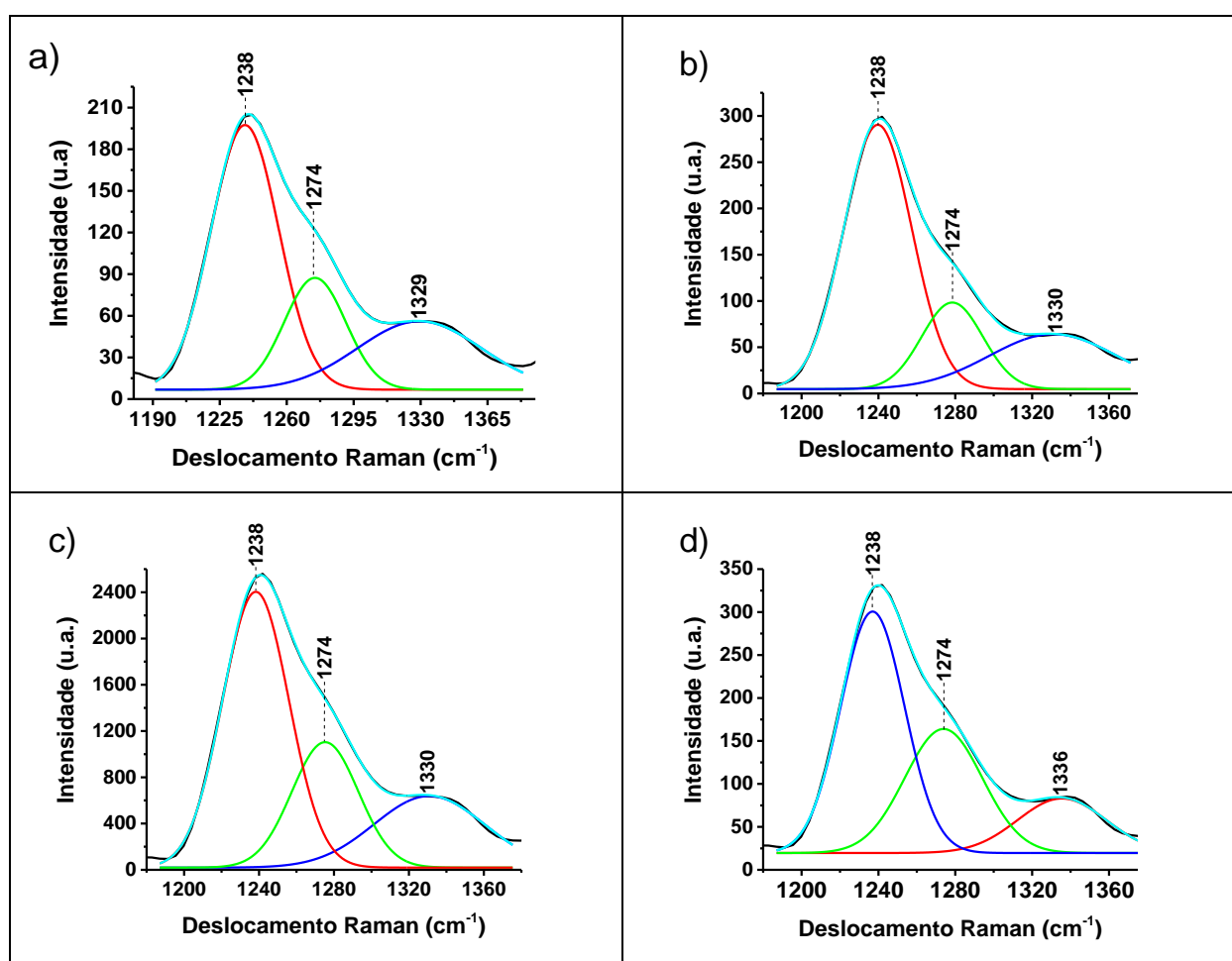
Figura 20 - Formação de agregados de sericina sobre a superfície da fibra de seda.

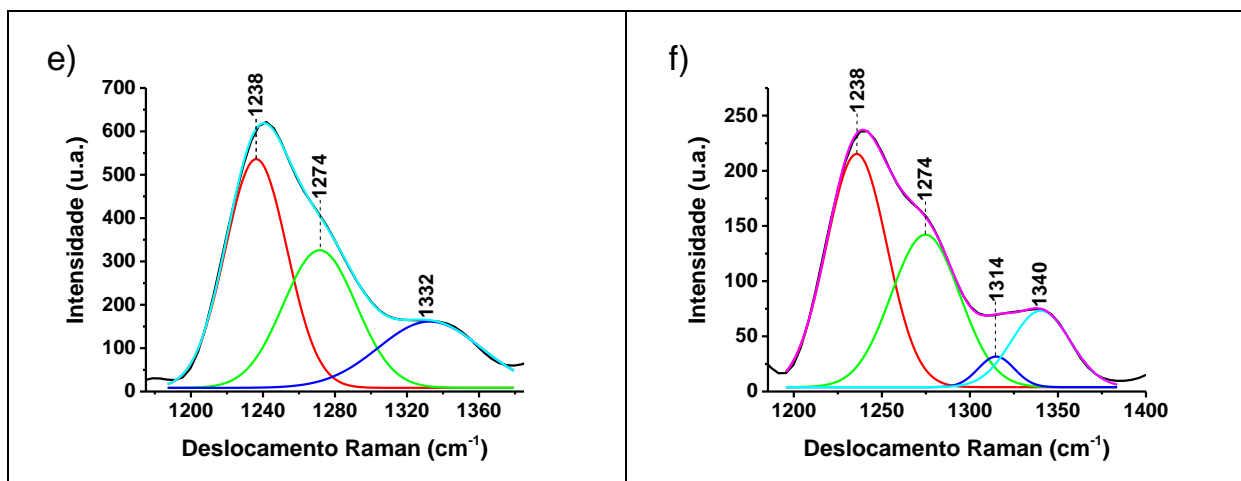


Fonte: o próprio autor

Com a finalidade de acompanhar o efeito da desordem estrutural com o aumento da temperatura nos diferentes casulos, como observados na Figura 21, foram realizadas as deconvoluções dos espectros Raman no intervalo de 1175-1390 cm^{-1} .

Figura 21 - Espectros Raman deconvoluídos obtidos na radiação excitante 532 nm no intervalo de 1175-1390 cm^{-1} , do casulo cru: sem aquecimento (a), seco em estufa à 80 °C (c), seco em estufa à 125 °C (e); do casulo processado (b) sem aquecimento, seco em estufa à 80 °C (d), seco em estufa à 125 °C (f).





Fonte: o próprio autor

Pode ser verificado nos espectros deconvoluídos que as intensidades das bandas em 1274 cm^{-1} sofreram um aumento em relação à intensidade das em 1238 cm^{-1} , avaliada através da relação $I_{(1238)}/I_{(1274)}$, conforme a Tabela 2. No casulo cru, as razões entre as intensidades diminuíram de 2.4 para 1.7 e no casulo processado, de 2.9 a 1.5, entre os materiais sem aquecimento e tratados termicamente em estufa. Essa razão demonstrou que ocorreu uma diminuição da conformação β -folha em relação à α -hélice, promovendo assim uma desordem estrutural com o aumento da temperatura. Da mesma forma, foram avaliadas a razão entre as intensidades das bandas $I_{(1093)}/I_{(1270)}$, que apresentou um comportamento semelhante ao resultado observado anteriormente.

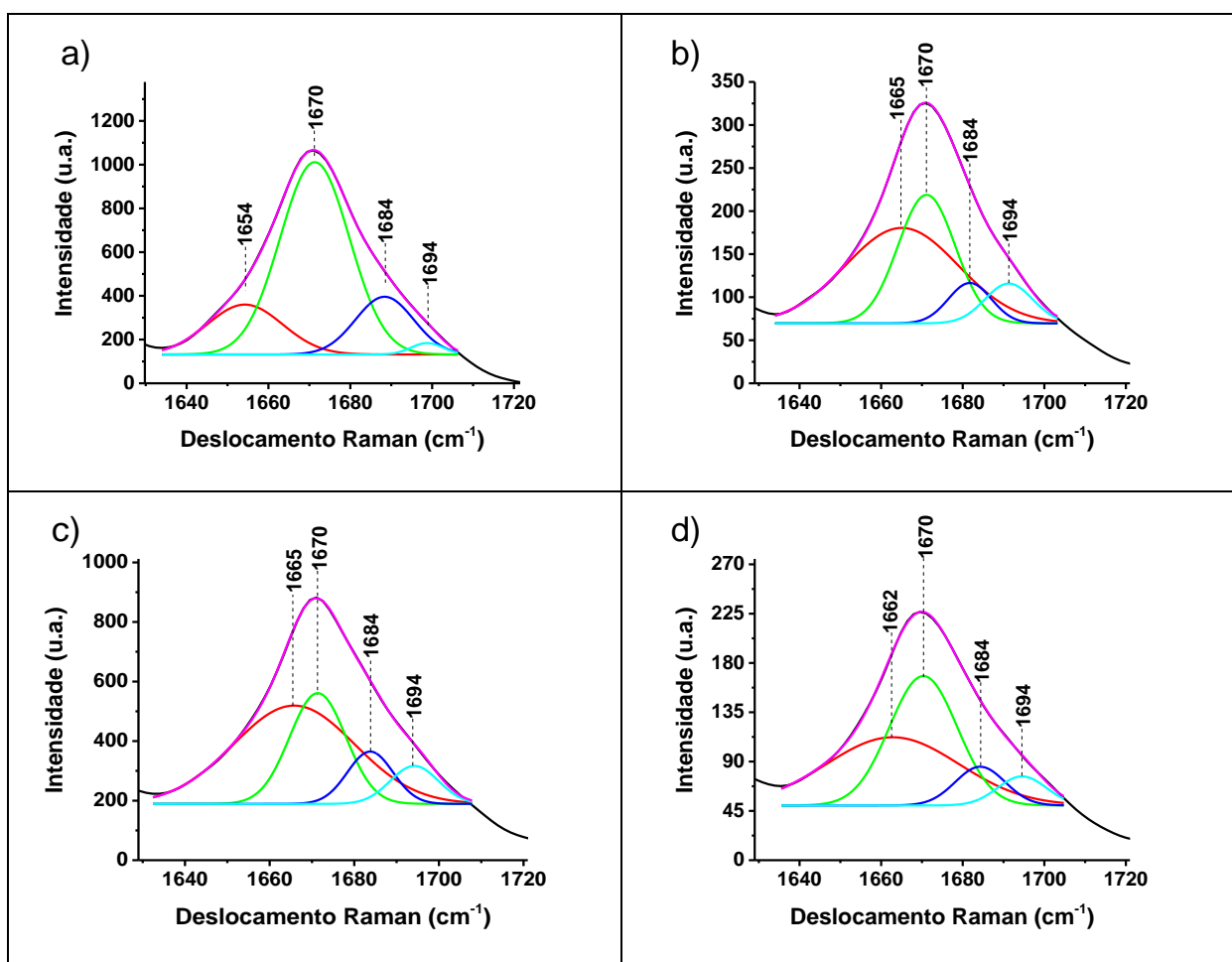
Tabela 2 - Relação das intensidades das bandas $I_{(1238)}/I_{(1274)}$ e $I_{(1093)}/I_{(1270)}$ dos casulos cru e casulos processado obtidos na radiação excitante 532 nm.

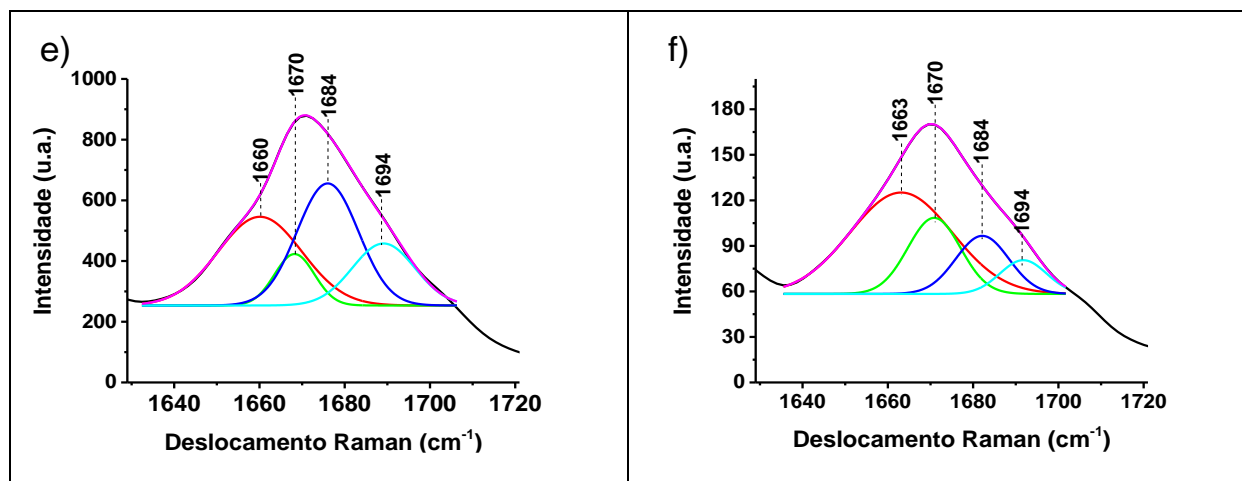
Casulo cru	Sem aquecimento	80 °C	125 °C
$I_{(1238)}/I_{(1274)}$	2.4	2.2	1.7
$I_{(1093)}/I_{(1270)}$	1.2	1.0	0.9
Casulo processado			
$I_{(1238)}/I_{(1274)}$	2.9	1.9	1.5
$I_{(1093)}/I_{(1270)}$	1.2	1.0	1.1

Fonte: o próprio autor

Na Figura 22 foram apresentados os espectros Raman deconvoluídos obtidos das amostras anteriormente descritas, no intervalo de 1629-1721 cm^{-1} . Desses espectros foram realizadas as avaliações das razões entre as intensidades $I_{(1670)}/I_{(1654)}$, $I_{(1670)}/I_{(1680)}$ e $I_{(1670)}/I_{(1690)}$ dos espectros tratados por deconvolução.

Figura 22 - Espectros Raman deconvoluídos obtidos na radiação excitante 785 nm no intervalo de 1629-1720 cm^{-1} , do casulo cru: sem aquecimento (a), seco em estufa à 80 °C (c), seco em estufa à 125 °C (e); do casulo processado sem aquecimento (b), seco em estufa à 80 °C (d), seco em estufa à 125 °C (f).





Fonte: o próprio autor

Pode ser verificado nos espectros deconvoluídos que as intensidades das bandas em aproximadamente 1654, 1684 e 1694 cm^{-1} sofreram um aumento em relação à intensidade das em 1670 cm^{-1} , conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Relação das intensidades das bandas $I_{(1670)}/I_{(1654)}$, $I_{(1670)}/I_{(1684)}$ e $I_{(1670)}/I_{(1694)}$ dos casulos cru e casulo processado obtidos na radiação excitante 785 nm.

Casulo cru	Sem aquecimento	80 °C	125 °C
$I_{(1670)}/I_{(1654)}$	3.9	1.1	0.6
$I_{(1670)}/I_{(1684)}$	3.3	2.1	0.4
$I_{(1670)}/I_{(1694)}$	16.9	2.9	0.8
Casulo processado			
$I_{(1670)}/I_{(1654)}$	1.3	1.9	0.8
$I_{(1670)}/I_{(1684)}$	3.2	3.4	1.3
$I_{(1670)}/I_{(1694)}$	3.2	4.5	2.3

Fonte: o próprio autor

No casulo cru, as razões entre as intensidades $I_{(1670)}/I_{(1654)}$ diminuíram de 3.9 para 0.6 e no casulo processado, de 1.3 a 0.8, entre os materiais sem aquecimento e tratados termicamente em estufa. Essa razão demonstrou que ocorreu uma diminuição da conformação β -folha em relação à α -hélice, comprovando a promoção da desordem estrutural com o aumento da temperatura, como anteriormente constatado utilizando os resultados dos espectros obtidos com a radiação 532 nm. Além disso, é possível observar que as razões entre as intensidades do casulo cru, $I_{(1670)}/I_{(1680)}$ e $I_{(1670)}/I_{(1690)}$, diminuíram de 3.3 para 0.4 e de 16.9 para 0.8, respectivamente e no casulo processado, de 3.2 a 1.3 e de 3.2 a 2.3, respectivamente, entre os materiais sem aquecimento e tratados termicamente em estufa. Através desse resultado pode ser demonstrado que ocorreu uma diminuição

da conformação β -folha em relação à β -turns, possivelmente pela transição entre essas estruturas com o aumento da temperatura.

Como verificado para ambas as radiações (532 e 785 nm), as razões entre as intensidades diminuem com o aumento da temperatura. Sendo assim, sugere-se conforme relatado por Jaramillo-Quiceno et al. (2017) que o tratamento térmico das fibras de seda em temperaturas brandas produz uma perda de alinhamento molecular concentrado nas regiões amorfas, afetando também, as estruturas cristalinas de folha β que são convertidas gradualmente em estruturas aleatórias.

6 CONCLUSÃO

Os espectros de Raman na região das frequências atribuídas às amidas I e III das cadeias polipeptídicas da fibroína da seda mostram uma correlação entre as proporções de intensidade das bandas deconvoluídas nos espectros a 532 e 785 nm.

Pode ser comprovado que houve uma diminuição da conformação β -folha em relação à α -hélice e a diminuição da conformação β -folha em relação à β -volta, devido a transição entre essas estruturas com o aumento da temperatura.

Desta forma, esse estudo para os casulos cru e processado, mostrou que a faixa de temperatura estudada, obtida pelo DSC, desempenha um papel determinante no impacto das estruturas secundárias das fibras de seda dos casulos. As razões entre intensidades das bandas geradas por espectroscopia Raman, fornece um meio rápida na avaliação das conformações moleculares nas fibras de seda, o que pode ser útil para fins de controle das propriedades desses materiais.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, G. H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R. L.; CHEN, J., LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401–416, 2003.
- ARÊAS, E. P. G.; KAWANO, Y. Aplicações Técnicas Espectroscópicas Vibracionais ao Estudo Conformacioanl de Proteínas. **Quim. Nova**, v. 14, n. 1, p. 31-43, 1991.
- ASAKURA, T.; OKUSHITA, K.; WILLIAMSON, M. P. Analysis of the Structure of Bombyx mori Silk Fibroin by NMR. **Macromolecules**, v. 48, n. 8, p. 2345–2357, 2015.
- ASAKURA, T.; YAO, J.; YAMANE, T.; UMEMURA, K.; ULRICH, A. S. Heterogeneous Structure of Silk Fibers from Bombyx mori Resolved by ¹³C Solid-State NMR Spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, n. 30, p. 8794–8795, 2002.
- BABU, K. M. Natural Textile Fibres: Animal and Silk Fibres. *In*: SINCLAIR, R. **Textiles and Fashion Materials, Design and Technology**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, p. 57-78.
- BABU, K. M. Structural aspects of silk. *In*: BABU, K. M. **Silk Processing, Properties and Applications**, 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019, p. 51-75.
- BARAJAS-GAMBOA, J. A.; SERPA-GUERRA, A. M.; RESTREPO-OSORIO, A.; ÁLVAREZ-LÓPEZ, A. Sericin applications: a globular silk protein. **Ingeniería y Competitividad**, v. 18, n. 2, p. 193 – 206, 2016.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to Protein Structure**. 2. ed. New York: Garland Science, 1999.
- BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; HOANG, V. D. Raman Spectroscopy for Protein Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 5, p. 377-386, 2015.
- CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Ciências dos polímeros**: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2002.
- CAO, T-T.; ZHANG, Y-Q. Processing and characterization of silk sericin from Bombyx mori and its application in biomaterials and biomedicines. **Mater. Sci. Eng C**, v. 61, n. 1, p. 940-952, 2016.
- CHEN, F.; PORTER, D.; VOLLRATH, F. Morphology and structure of silkworm cocoons. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 4, p. 772–778, 2012a.
- CHEN, F.; PORTER, D.; VOLLRATH, F. Silk cocoon (Bombyx mori): Multi-layer structure and mechanical properties. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 7, p. 2620–2627, 2012b.
- COLOMBAN, P.; DINH, H. M.; RIAND, J.; PRINSLOO, L. C.; MAUCHAMP, M. Nanomechanics of single silkworm and spider fibres: a Raman and micro-mechanical in situ study of the conformation change with stress. **J. Raman Spectrosc.**, v. 39, n.

12, p. 1749-1764, 2008.

COLOMBAN, P.; DINH, H. M.; TOURNIÉ, A.; JAUZEIN, V. Origin of the variability of the mechanical properties of silk fibres: 3. Order and macromolecule orientation in *Bombyx mori* bave, hand-stretched strings and *Nephila madagascarensis* spider fibres. **J. Raman Spectrosc.**, v. 43, n. 12, p. 1042-1048, 2012.

DEBARI, M. K.; ABBOTT R. D. Microscopic considerations for optimizing silk biomaterials. **WIREs Nanomed Nanobiotechnology**, v. 11, n. 2, p.1-9, 2018.

DYAKONOV, T.; YANG, C. H.; BUSH, D.; GOSANGARI, S.; MAJURU, S.; FATMI, A. Design and Characterization of a Silk-Fibroin-Based Drug Delivery Platform Using Naproxen as a Model Drug. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W. Raman spectroscopic studies of silk. **J. Raman Spectrosc.**, v. 26, n. 8-9, p. 901-909, 1995.

FANTONI, R. F. Como a poliamida substituiu a seda: uma história da descoberta da poliamida 66. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2012.

GIACOMIN, A, M.; GARCIA JR., J. B.; ZONATTI, W. F.; SILVA-SANTOS, M. C.; LAKTIM, M. C.; BARUQUE-RAMOS, J. Brazilian silk production: economic and sustainability aspects. **Procedia Engineering**, v. 200, p. 89–95, 2017.

HAKIMI, O.; KNIGHT, D. P.; VOLLRATH, F.; VADGAMA, P. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, p. 324–337, 2007.

HANADA, Y.; WATANABE, J. K. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Curitiba: COCAMAR, 1986.

HANG, Y.; ZHANG, Y.; JIN, Y.; SHAO, H.; HU, X. Preparation of regenerated silk fibroin/silk sericin fibers by coaxial electrospinning. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 51, n. 5, p. 980-986, 2012.

HERRERA, R. J. GARCIA-BERTRAND, R. The Silk Roads. *In*: HERRERA, R. J. GARCIA-BERTRAND, R. **Ancestral DNA, Human Origins, and Migrations**. Estados Unidos: Academic Press, 2018, p 511-557.

HOLLAND, C.; NUMATA, K.; RNJAK-KOVACINA, J.; SEIB, F. P. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 1, p. 1800465, 2019.

HUANG, J.; VALLUZZI, R.; BINI, E.; VERNAGLIA, B.; KAPLAN, D. L. Cloning, Expression, and Assembly of Sericin-like Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 46117–46123, 2003.

JARAMILLO-QUICENO, N.; ÁLVAREZ-LÓPEZ, C.; RESTREPO-OSORIO, A. Structural and thermal properties of silk fibroin films obtained from cocoon and waste silk fibers as raw materials. **Procedia Eng.**, v. 200, p. 384-388, 2017.

JIN, H-J., KAPLAN, D. L. Mechanism of silk processing in insects and spiders.

Nature, v. 424, n. 6952, p. 1057–1061, 2003.

JO, Y. N.; UM, I. C. Effects of solvent on the solution properties, structural characteristics and properties of silk sericin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 78, p. 287–295, 2015.

KOH, L.-D.; CHENG, Y.; TENG, C.-P.; KHIN, Y.-W.; LOH, X.-J.; TEE, S.-Y.; LOW, M.; YE, E.; YU, H.-D.; ZHANG, Y.-W.; HAN, M.-Y. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. **Progress in Polymer Science**, v. 46, p. 86–110, 2015.

KUMAR, S.; SINGH, S. K. Fabrication and characterization of fibroin solution and nanoparticle from silk fibers of *Bombyx mori*. **Part. Sci. Technol.**, v. 35. N.3, p. 304–313, 2016.

KUNDU, S. C.; DASH, B.C.; DASH, R.; KAPLAN, D. L. natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 10, p. 998–1012, 2008.

KUNZ, R. I.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. F. C.; NATALI, M. R. M. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-19, 2016.

LEFÈVRE, T.; ROUSSEAU, M-E.; PÉZOLET, M. Protein Secondary Structure and Orientation in Silk as Revealed by Raman Spectromicroscopy. **Biophys. J.**, v. 92, n. 8, p. 2885-2895, 2007.

MAGOSHI, J.; MAGOSHI, Y. Physical properties and structure of silk. II. Dynamic mechanical and dielectric properties of silk fibroin. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, v. 13, n. 7, p. 1347-1351, 1975.

MALAY, A. D.; SATO, R.; YAZAWA, K.; WATANABE, H.; IFUKU, N.; MASUNAGA, H.; HIKIMA, T.; GUAN, J.; MANDAL, B. B.; DAMRONGSAKKUL, S.; NUMATA, K. Relationships between physical properties and sequence in silkworm silks. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 27573, p. 1-11, 2016.

MHUKA, V. **Characterization of silk proteins from African wild silkworm cocoons and application of fibroin matrices as biomaterials**. 2014. 164 fls. Tese (Doutorado em Química) - University of South Africa, South Africa, 2014.

MINOURA, N.; TSUKADA, M.; NAGURA M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. **Biomaterials**, v. 11, n. 6, p. 430-434, 1990.

MIURA, T.; THOMAS G.J. Raman Spectroscopy of Proteins and Their Assemblies. *In: BISWAS B.B.; ROY S. Subcellular Biochemistry - Proteins: Structure, Function, and Engineering*. Boston: Springer, 1995. P. 55-99.

MONDAL, M.; TRIVEDY, K.; NIRMAL KUMA, S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 63–76, 7 2007.

MONTI, P.; FREDDI, G.; AROSIO, C.; TSUKADA, M.; ARAI, T.; TADDEI, P. Vibrational spectroscopic study of sulphated silk proteins. **J. Mol. Struct.**, v. 834–836, p. 202-206, 2007.

MONTI, P.; FREDDI, G.; BERTOLUZZA, A. KASAI, N.; TSUKADA, M. Raman Spectroscopic Studies of Silk Fibroin from Bombyx Mori. **J. Raman Spectrosc.**, v. 29, n. 4, p. 297-304, 1998.

MONTI, P.; TADDEI, P.; FREDDI, G.; ASAKURA, T.; TSUKADA, M. Raman spectroscopic characterization of Bombyx mori silk fibroin: Raman spectrum of Silk I. **J. Raman Spectrosc.**, v. 32, n. 2, p. 103-107, 2001.

MONTI, P.; TADDEI, P.; FREDDI, G.; OHGO, K.; ASAKURA, T. Vibrational ¹³C-cross-polarization/magic angle spinning NMR spectroscopic and thermal characterization of poly(alanine-glycine) as model for silk I Bombyx mori fibroin. **Biopolymers**, v. 72, n. 5, p. 329-338, 2003.

MORIN, A.; ALAM, P. Comparing the properties of Bombyx mori silk cocoons against sericin-fibroin regummed biocomposite sheets. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 65, n. 1, p. 215-220, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, A. T.; HUANG, Q.-L.; YANG, Z.; LIN, N.; XU, G.; LIU, X. Y. Crystal Networks in Silk Fibrous Materials: From Hierarchical Structure to Ultra Performance. **Small**, v. 11, n. 9-10, p. 1039–1054, 2015.

PANILAITIS, B.; ALTMAN, G. H.; CHEN, J.; JIN, H.-J.; KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. L. Macrophage responses to silk. **Biomaterials**, v. 24, n. 18, p. 3079–3085, 2003.

PARTLOW, B. P.; TABATABAI, A. P.; LEISK, G. G.; CEBE, P.; BLAIR, D. L.; KAPLAN, D. L. Silk Fibroin Degradation Related to Rheological and Mechanical Properties. **Macromol. Biosci.**, v. 16, n. 5, p. 666–675, 2016.

PEREIRA, R. F. P.; SILVA, M. M.; BERMUDEZ, V. Z. Bombyx mori Silk Fibers: An Outstanding Family of Materials. **Macromol. Mater. Eng.**, v. 300, n. 12, p. 1171–1198, 2015.

POZA, P.; PÉREZ-RIGUEIRO, J.; ELICES, M.; LLorca, J. Fractographic analysis of silkworm and spider silk. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 69, n. 9, p. 1035–1048, 2002.

PREGHENELLA, M.; PEZZOTTI, G.; MIGLIARESI, C. Comparative Raman spectroscopic analysis of orientation in fibers and regenerated films of Bombyx mori silk fibroin. **J. Raman Spectrosc.**, v. 38, n. 5, p. 522–536, 2007.

QI, Y.; WANG, H.; WEI, K.; YANG, Y.; ZHENG, R.-Y.; KIM, I. S.; ZHANG, K.-Q. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 237, p. 1-27, 2017.

REDDY, N. Structure and properties of silk fibers. *In*: REDDY, N. Silk: **Materials, Processes, and Applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020, p. 13-47.

ROUSSEAU, M-E.; LEFÈVRE, T.; BEAULIEU, L.; ASAKURA, T.; PÉZOLET, M. Study of Protein Conformation and Orientation in Silkworm and Spider Silk Fibers Using Raman Microspectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2247-2257, 2004.

RYGULA, A.; MAJZNER, K.; MARZEC, K. M.; KACZOR, A.; PILARCZYK, M.; BARANSKA, M. Raman spectroscopy of proteins: a review. **J. Raman Spectrosc.**, v. 44, n. 8, p. 1061–1076, 2013.

SANTOS, S. A.; VIDIGAL, P. G.; MERLINI, L. S. A criação do Bombyx mori (bicho-da-seda) e as principais doenças. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 14, n. 1, p. 57-64, 2011.

SANTOS, V. C.; SOUZA, K. A.; ABRANTES, R. S. X.; SANTOS, C. L. A.; SOARES, D. M. A.; LOIOLA, M. V. C.; LIMA, P. M. F.; SANTOS, E. L. A. Sericicultura: colhendo os frutos da criação do bicho-da-seda Sericulture: reaping the fruits of silkworm rearing. **INTESA – Informativo Técnico do Semiárido**, v. 10, n. 2, p. 62–68, 2016.

SASHINA, E. S.; BOCHEK, A. M.; NOVOSELOV, N.P.; KIRICHENKO, D. A. Structure and solubility of natural silk fibroin. **Russ. J. Appl. Chem.**, v. 79, n. 6, p. 869-876, 2006.

SAYEG, BURAUQUE-RAMOS, J. Seda natural e seda residual: histórico, caracterização e processo de obtenção. *In*: CONGRESSO CIENTÍFICO TÊXTIL E DE MODA, 2., 2014, São Paulo. **Anais [...]**. Rio de Janeiro: CONTEXMOD, 2014.

SEHNAL, F.; ŽUROVEC, M. Construction of silk fiber core in lepidoptera. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 666–674, 2004.

SHAO, J.; ZHENG, J.; LIU, J.; CARR, C. M. Fourier Transform Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Studies of Silk Fibroin. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 96, n. 6, p. 1999–2004, 2005.

SOARES JUNIOR, D.; ALMEIDA, E. L. D.; PÁDUA, O. S. (org.). **Inovações na sericicultura do Paraná: tecnologias, manejo e rentabilidade**. Londrina: ABRASSEDA: IAPAR, 2018.

SUZUKI, Y.; YAMAZAKI, T.; AOKI, A.; SHINDO, H.; ASAKURA, T. NMR study of the structures of repeated sequences, GAGXGA (X = S, Y, V), in bombyx mori liquid silk. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 1, p. 104–112, 2014.

TADDEI, P.; CHIONO, V.; ANGHILERI, A.; VOZZI, G.; FREDDI, G.; CIARDELLI, G. Silk Fibroin/Gelatin Blend Films Crosslinked with Enzymes for Biomedical Applicationsa. **Macromol. Biosci.**, v. 13, n. 11. p. 1492-1510, 2013.

TUMA, R. Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. **J. Raman Spectrosc.**, v. 36, n. 4, p. 307-319, 2005.

VALLUZZI, R.; GIDO, S. P.; MULLER, W.; KAPLAN, D. L. Orientation of silk III at the air-water interface. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n.

2–3, p. 237-242, 1999.

VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8–9, p. 991–1007, 2007.

VOLKOV, V.; FERREIRA, A. V.; CAVACO-PAULO, A. On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review. **Macromol. Mater. Eng.**, v. 300, n. 12, p. 1199–1216, 2015.

WANG, T.; CHENA, L.; DU, L.; SHEN, T.; LI, F.; HUANG, L.; LI, Z.; WU, D. Structure and properties of silkworm cocoon (*Bombyx mori*) treated by hot pressing. **Mater. Des.**, v. 134, p. 132–138, 2017.

ZAFAR, M. S.; BELTON, D. J.; HANBY, B.; KAPLAN, D. L.; PERRY, C. C. Functional Material Features of *Bombyx mori* Silk Light versus Heavy Chain Proteins. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 2, p. 606-614, 2015.

ZHANG, F.; LU, Q.; YUE, X.; ZUO, B.; QIN, M.; LI, F.; KAPLAN, D. L. ZHANG, X. Regeneration of high-quality silk fibroin fiber by wet spinning from CaCl₂–formic acid solvent. **Acta Biomaterialia**, v. 12, p. 139-145, jan. 2015.

ZHANG, Y.-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 91–100, 2002.

ZHANG, Y.-Q., TAO, M. L., SHEN, W. D., ZHOU, Y. Z., DING, Y., MA, Y., ZHOU, W. L. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3751–3759, 2004.

ZHENG, S.; LI, G.; YAO, W.; YU, T. Raman Spectroscopic Investigation of the Denaturation Process of Silk Fibroin. **Appl. Spectrosc.**, v. 43, n. 7, p. 1269-1272, 1989.

ZHOU, C.-Z.; CONFALONIERI, F.; JACQUET, M.; PERASSO, R.; LI, Z.-G.; JANIN, J. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. **Proteins**, v. 44, n. 2, p. 119–122, 2001.

7 CAPÍTULO II - ESTUDO SERS DE FRAGMENTOS DE CASULO NANOESTRUTURADOS COM PARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO O CRISTAL VIOLETA COMO MOLÉCULA SONDA

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do Efeito Raman, o fenômeno tem sido amplamente explorado como uma fonte poderosa para fornecer informações estruturais e composicionais sobre o material desejado. O efeito recebeu o nome de seu descobridor, o físico indiano Chandrasekara Venkataraman em 1928. A chamada espectroscopia Raman é uma técnica baseada no espalhamento inelástico da luz associado a modos moleculares de vibração. Para esse efeito, a amostra é irradiada com um feixe de luz monocromática e a mudança espectral da radiação dispersa é analisado para inferir a natureza do material (ALVES, 2019).

Existem inúmeras vantagens que a espectroscopia Raman proporciona para o estudo das vibrações moleculares, a necessidade de pouco ou nenhum preparo das amostras e que permitem a identificação de substâncias orgânicas e inorgânicas e a possibilidade de se trabalhar em meio aquoso (SANTOS et al., 2010). No entanto, a detecção de moléculas adsorvidas em superfícies metálicas por espectroscopia Raman comum é um problema muito desafiador devido à sua seção de choque ser extremamente baixa, normalmente na ordem de 10^{-28} a 10^{-30} $\text{cm}^2 \text{molécula}^{-1} \text{sr}^{-1}$ (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011). Esse obstáculo dificulta a aplicação em larga escala da espectroscopia Raman como uma técnica analítica de rotina. Por esse motivo, fica clara a necessidade de encontrar métodos eficientes para melhorar a eficiência de detecção da espectroscopia Raman (ALVES, 2019).

Em vista das vantagens expostas acima, bem como da limitação inerente à técnica, é clara a necessidade de se buscar outros meios de intensificação do espectro Raman (RODRIGUES, 2013). Esses esforços levaram nas últimas décadas, ao surgimento de várias abordagens para melhorar a resposta Raman de substâncias. Uma estratégia comum envolve a interação de espécies moleculares com nanopartículas metálicas ou superfícies metálicas rugosas. Para que o aprimoramento do sinal ocorra, as moléculas devem ser diretamente adsorvidas na superfície do metal ou separadas por apenas um espaço de alguns nanômetros. Por excitação da luz, da fonte de laser Raman, os elétrons de condução da superfície do metal oscilam de maneira concertada, um fenômeno

conhecido como ressonância plasmônica. Isso cria uma forte amplificação de luz perto da superfície do metal, o que aumenta ainda mais o espalhamento Raman das moléculas localizadas nas proximidades. Uma contribuição da natureza química também desempenha um papel no aprimoramento do sinal Raman, mas em uma extensão muito menor quando comparada ao efeito eletromagnético. Esse princípio da coleta de dados Raman deu origem à técnica conhecida hoje como espectroscopia Raman intensificada por superfície (Surface-Enhanced Raman Scattering – SERS) (ALVES, 2019).

Uma vez que a ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) e a intensificação de campo provocada dependem da geometria das nanopartículas, bem como a interação entre as mesmas dada pelo distanciamento entre partículas (SANTOS et al., 2010), muitas pesquisas têm sido realizadas na busca pelo desenvolvimento de diferentes procedimentos para a obtenção de nanopartículas metálicas com geometrias bem definidas para fabricação de substratos SERS (SUR, 2017). Os substratos SERS mais comuns usados são os coloides metálicos de Au, Ag e Cu obtidos pela redução química e as superfícies dos eletrodos metálicos rugosas por um ou mais ciclos eletroquímicos de redução e oxidação. Nesse contexto, é importante destacar que para um substrato SERS ser considerado ideal, o material deve ser econômico, facilmente acessível, quimicamente inerte e biocompatível (SUR, 2017). Para tanto, as suspensões coloidais são particularmente atraentes, pois podem ser preparadas em um processo “one-pot”. Nesse tipo de processo ocorrem reações que mesmo tendo diversas etapas, todas se passam dentro do mesmo meio reacional, sem a necessidade de realizar separações de produtos a cada etapa e nem de purificação. A abordagem é muito interessante e são baratas, mas não é de fácil execução, pois nem todos os tipos de reações permitem essa abordagem, considerando que existe uma grande possibilidade de ocorrer reações indesejadas e uma gama grande de subprodutos (SMITH; RODGER, 1999).

Recentemente avanços têm sido feitos na obtenção de coloides recém preparados, monodispersos, reproduzíveis e estáveis por vários meses. Em particular, o coloide preparado pela redução de citrato da prata pode ser produzido na forma quase monodispersa e com uma vida útil de até um ano ou mais, no entanto, o tamanho das partículas desses coloides varia (SMITH; RODGER, 1999). No entanto, as principais limitações associadas ao efeito SERS são a agregação das

nanopartículas que tornam a reprodutibilidade mais desafiadora, uma vez que, a suspensão de nanopartículas de prata deve ser misturada com a solução de analito para SERS, um requisito de amostragem que pode ser limitativo para algumas aplicações, como no exame de adsorvidos em superfícies ativas que não sejam SERS (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011). Além disso, tanto as nanopartículas como as moléculas prova estão em constante movimento, e o sinal será observado quando uma ou mais nanopartículas de prata contendo o adsorbato cruzarem a região onde o laser está incidindo (OLIVEIRA, 2015). Por esse motivo, é essencial fornecer substratos novos para o estudo SERS. Apesar dos desafios de reprodutibilidade e de amostragem em potencial, as soluções coloidais são amplamente utilizadas como substrato de SERS devido ao seu alto desempenho, boa estabilidade e facilidade de fabricação (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011).

Outro desafio nos estudos SERS, é conseguir que os sítios SERS-ativos fiquem confinados a uma região, o que acontece, por exemplo, com moléculas adsorvidas em filmes de prata depositados à vácuo ou em eletrodos de prata ativados por ciclos de oxidação redução. No entanto, em ambos os casos, o adsorbato permanece na superfície (e na solução no caso de eletrodos) podendo mudar sua localização. Assim, um dos desafios da técnica consiste em obter substratos com atividade SERS em que, tanto os sítios SERS-ativos, como os adsorbatos, permaneçam imóveis (OLIVEIRA, 2015).

Neste trabalho pretendeu-se explorar a utilização de substratos SERS utilizando como substrato a superfície interna de fragmentos de casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, nanoestruturados com partículas de prata sintetizadas via método utilizado por Lee e Meisel (1982). Com estes substratos espera-se a promoção eficiente do efeito SERS na detecção de espécies moleculares em baixa concentração quando comparados com o efeito SERS de soluções coloidais.

8 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

8.1 EFEITO RAMAN RESSONANTE (RR)

Apesar de ter sido utilizada com sucesso em diversas aplicações, o grande entrave da espectroscopia Raman é a baixa probabilidade de que um fóton seja espalhado inelasticamente, isto é, considerando que tipicamente a intensidade da radiação espalhada é da ordem de 10^{-3} a 10^{-5} vezes a radiação incidente, e o espalhamento Raman corresponde a $\approx 10^{-5}$ vezes essa radiação (VIANNA, 2017). Além disso, o que torna o fenômeno consideravelmente fraco é a baixa seção de choque para o espalhamento Raman, cerca de 10^{-30} $\text{cm}^2 \text{Sr}^{-1} \text{molécula}^{-1}$. Desse modo, impõe-se que os estudos sejam conduzidos com soluções concentradas (na ordem de 1% em massa ou maiores) ou em estado sólido, o que nem sempre é possível e/ou desejável (LE RU; ETCHEGOIN, 2009; RODRIGUES, 2013). Na Tabela 4 é apresentada uma comparação entre as seções eficazes comumente observadas em vários processos incluindo o espalhamento Raman.

Tabela 4 – Comparação da seção de choque observada em vários processos de interação da radiação eletromagnética com matéria.

Processo	Seção de choque (ρ , cm^2)
Espalhamento Raman	10^{-29}
Espalhamento Rayleigh	10^{-26}
Espalhamento Raman ressonante	10^{-24}
Absorção no infravermelho	10^{-21}
Emissão de fluorescência	10^{-19}
Absorção no ultravioleta-visível	10^{-18}
Espalhamento Raman intensificado por superfície	10^{-16}

Fonte: Villa (2018)

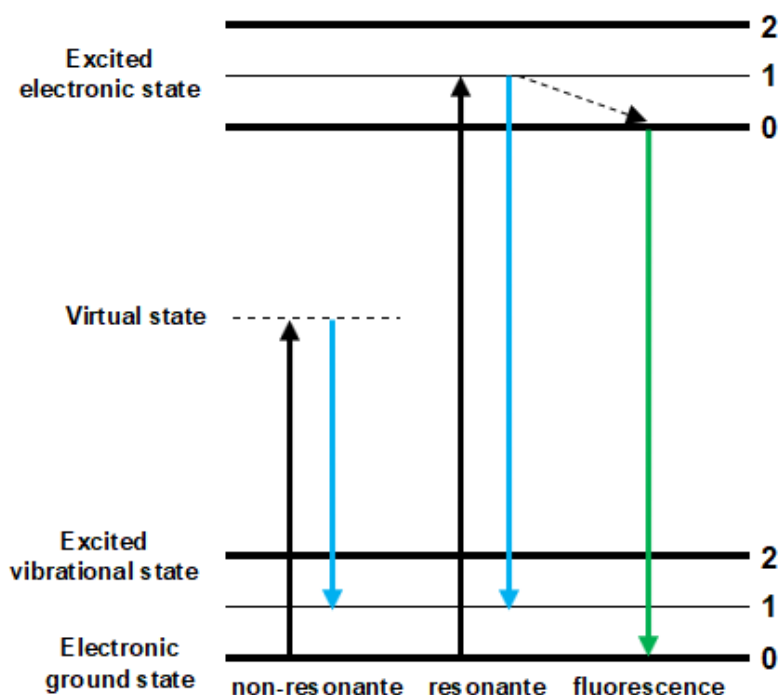
Além da baixa seção choque, a fluorescência da matriz da amostra pode limitar o uso da espectroscopia Raman, pois pode originar bandas intensas e largas e dificultar a observação das bandas Raman. Este tipo de interferência torna-se crítica quando a frequência da radiação incidente é muito energética (e.g. na região próxima do ultravioleta) e quando a matriz da amostra é rica em compostos fluorescentes. Por este motivo, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos

empregando espectroscopia Raman pode tornar-se uma tarefa complexa (VILLA, 2018). Nesse sentido, a aplicação convencional da técnica é limitada devido à baixa intensidade do espalhamento Raman, e/ou observação de fluorescência nos espectros para determinados analitos. Além disso, a técnica não apresenta sensibilidade suficiente para a investigação de compostos em baixa concentração, dificultando, por exemplo, sua aplicação para monitoramento ambiental (PEREIRA, 2016). Estes problemas têm sido contornados com o desenvolvimento de metodologias que permitam a intensificação do espalhamento Raman, possibilitando sua aplicação como método analítico, sendo duas delas exemplificadas aqui: o efeito Raman ressonante (RR) e o efeito Raman intensificado por superfícies (Surface-Enhanced Raman Scattering – SERS) (BUMBRAH; SHARMA, 2016; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

O efeito RR visa melhorar a detecção e seletividade do espalhamento Raman. Como mencionado anteriormente, o sinal Raman é inerentemente fraco, mas pode ser aprimorado em várias ordens de magnitude quando o comprimento de onda do laser estiver próximo da banda de absorção eletrônica que envolve o fenômeno da ressonância. Neste efeito, a intensidade do espalhamento Raman aumenta significativamente quando a energia do fóton incidente se aproxima ou coincide com uma banda de transição eletrônica permitida da espécie em estudo fazendo com que haja um aumento substancial na intensidade das bandas das vibrações dos grupos responsáveis pela transição eletrônica (grupos cromóforos) (EFREMOV; ARIESE; GOOIJER, 2008; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

Quanto menor a diferença entre a frequência do laser e a transição eletrônica, mais forte é o sinal. No entanto, há um risco maior de fluorescência, e apenas as vibrações acopladas aos grupos cromóforos são intensificadas. Além disso, na análise de amostras reais, a fluorescência de fundo de outros componentes ou da matriz também pode ser um grande problema. O diagrama de energia de Jablonski na Figura 23 mostra o processo de ressonância Raman e também ilustra porque se espera que a fluorescência cause interferência (EFREMOV; ARIESE; GOOIJER, 2008).

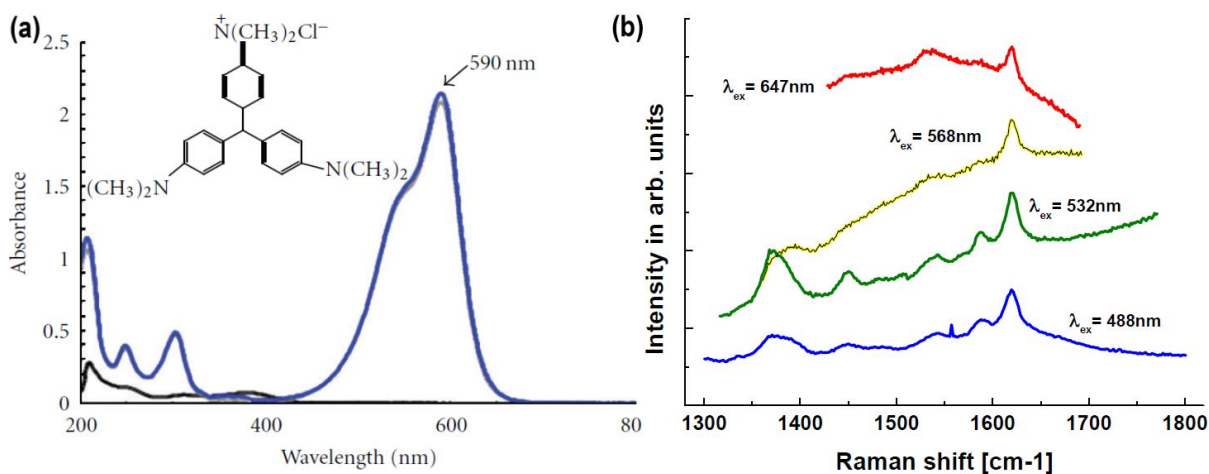
Figura 23 - Diagrama de energia de Jablonski ilustrando o processo de ressonância Raman mostrando porque se espera que a fluorescência cause interferência.



Fonte: Adaptado de Efremov, Ariese e Gooijer (2008)

Uma maneira de prevenir/reduzir a fluorescência é usar um laser de comprimentos de onda muito curtos (na faixa ultravioleta) (EFREMOV; ARIESE; GOOIJER, 2008). Conforme mostrado por Asher (1993), a fluorescência da matriz e do analito dificilmente desempenha um papel abaixo de 260 nm. Uma revisão dessa técnica foi publicada em 2008 por Efremov, Ariese e Gooijer (2008), contendo uma breve história e as principais aplicações. A Figura 24(a) e 24(b) mostra o espectro de absorção eletrônica e os espectros Raman ressonante do Cristal Violeta (CV), respectivamente. Nota-se claramente um aumento expressivo de alguns sinais Raman do cristal violeta (Fig. 24(b)) quando a radiação laser excitante se aproxima do máximo de absorção em aproximadamente 488 nm (ANGELONI; SMULEVICH; MARZOCCHI, 1979).

Figura 24 - Espectro de absorção eletrônica de cristal violeta (a) e espectros Raman de cristal violeta obtidos em diferentes radiações excitantes (b).



Fonte: (a) Cheriaa et al. (2012) e (b) Meyer, Le Ru e Etchegoin (2010)

Apesar da intensificação do efeito RR sobre o efeito Raman ser de cerca de 10^6 para 10^8 vezes (JOHN; GEORGE 2017), existe outro mecanismo ainda mais eficiente que é baseado no efeito de espalhamento Raman intensificado por superfície, ou seja, no efeito plasmônico que ocorre quando as moléculas de interesse são adsorvidas em uma superfície metálica (geralmente nanopartículas), resultando em altas intensidades de espalhamento, atingindo fatores de intensificação na ordem de 10^{14} a 10^{15} vezes em relação ao espalhamento Raman comum. A intensificação do sinal é devida a dois efeitos: efeito químico e efeito do campo eletromagnético, sendo este último dominante (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

8.2 EFEITO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIES (SERS)

Em linhas gerais, o efeito de espalhamento Raman intensificado por superfície (Surface-Enhanced Raman Scattering – SERS) consiste em uma intensificação do espalhamento Raman de uma molécula em várias ordens de grandeza (FARIA; TEMPERINI; SALA, 1999), quando uma espécie química está próxima ou adsorvida sobre uma superfície metálica nanoestruturada (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006) ou pelo menos nas suas proximidades permitindo um aumento significativo da intensidade Raman (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Esse efeito se deve, dentre outros fatores, da interação eletromagnética da radiação

incidente com a chamada ressonância de plasmon do metal (LE RU; ETCHEGOIN, 2009), em que os elétrons livres oscilam coletivamente em resposta ao campo elétrico da luz incidente (WILLETS; MAYER, 2019). Outra característica do efeito SERS é a capacidade de suprimir a emissão de fluorescência. Experimentos realizados com aminoácidos contidos no suor de impressões digitais em substratos de prata demonstram isso (SOUZA, 2018).

O primeiro relato do que seria posteriormente conhecido como efeito SERS foi feito por Fleischmann, Hendra e McQuillan (1974), nos anos setenta, ao observarem um espectro Raman extraordinariamente intenso estudando adsorção de piridina sobre um eletrodo ativado de Ag (RODRIGUES, 2013).

A intensificação observada por Fleischmann, Hendra e McQuillan (1974), foi atribuída ao aumento da área superficial devido à alta rugosidade do eletrodo de prata (maior rugosidade no eletrodo, permitiria a adsorção de um maior número de moléculas). Porém, a intensificação observada continuava sendo muito maior que a esperada considerando-se o aumento na área superficial. Assim, a explicação inicial para a intensificação observada no espectro Raman se baseava no aumento do número de moléculas adsorvidas no eletrodo ativo de Ag (VILLA, 2018). Entretanto, o efeito SERS somente viria a ser reconhecido em 1977, quando os trabalhos independentemente publicados por Jeanmaire e Duyne (1977) e Albrecht e Creighton (1977), constataram que a intensificação do sinal Raman é originada pela interação da radiação eletromagnética com a superfície metálica rugosa, o que incrementa drasticamente a magnitude do campo elétrico nas proximidades da superfície e não pelo aumento da área superficial do eletrodo de prata. (VILLA, 2018). Nesses estudos, determinou-se que a intensificação observada era da ordem de 10^6 vezes, enquanto o aumento na área superficial do eletrodo era de apenas 10 vezes (COSTA, 2012).

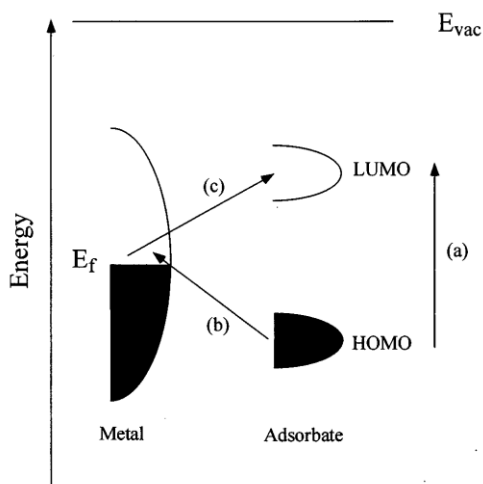
Enquanto isso, Albrecht e Creighton (1977) associaram o efeito à formação de um complexo de transferência de carga entre o metal e a molécula adsorvida. Considerando as ideias de Jeanmaire e Duyne (1977), Moskovits, (1978) foi o primeiro a explicar em 1978 intensificação SERS em termos de acoplamento a uma oscilação ressonante dos elétrons de condução do metal. Ele argumentou que pequenas saliências presentes em superfícies de metal ásperas poderiam ser interpretadas como formando um coloide bidimensional de pequenas esferas de metal, o que poderia suportar esse tipo de oscilação conhecida como plasmons de

superfície (ALVES, 2019). Moskovits (1978) também previu que o mesmo comportamento deve ser esperado para coloides de prata e cobre cobertos com adsorbato e imersos em meio dielétrico. Creighton, Blatchford e Albrecht (1978), confirmaram a validade da previsão de Moskovits (1978), enquanto trabalhavam com coloides de prata e ouro na década de setenta. Nesse sentido, as seções que seguem focam nos mecanismos de intensificação do espalhamento Raman e principais consequências dos altos níveis de magnificação do fenômeno (VIANNA, 2017).

8.2.1 Mecanismo Químico

O mecanismo químico de amplificação do espalhamento Raman, pode ser entendido como uma modificação na polarizabilidade da molécula analisada, resultante da formação de um complexo entre essa molécula e a superfície metálica, ou seja, admite-se que haja ligação química entre os dois componentes. Com isso, essa contribuição não se dá diretamente na intensificação do sinal Raman, mas sim na alteração da identidade e natureza da molécula (PEREIRA, 2016). A formação do complexo entre a molécula e o metal modifica a estrutura eletrônica das espécies envolvidas. Considera-se, como uma aproximação, que o nível de Fermi do metal esteja localizado entre os níveis ocupados de maior energia (HOMO), e os níveis não ocupados de menor energia (LUMO) da molécula, como representado no diagrama da Figura 25.

Figura 25 – Esquema ilustrativo do mecanismo de transferência de carga.



Fonte: Campion e Kambhampati (1998)

Quando a radiação incidente está em ressonância com a transição eletrônica entre os níveis da molécula, ocorre o fenômeno de Raman ressonante, discutido anteriormente. Podem ocorrer ainda dois fenômenos de transferência de carga: a transição eletrônica entre o estado fundamental da molécula e o nível de Fermi do metal, ou então entre o nível de Fermi do metal e o estado excitado da molécula. Caso a radiação incidente seja ressonante com a energia necessária para que esses processos de transferência de carga ocorram, isso pode levar ao aumento substancial no tensor de polarizabilidade do complexo, intensificando o sinal SERS (PEREIRA 2016).

Alterações na polarizabilidade molecular são consideradas o fator crucial de magnificação do sinal, e ocorrem como consequência de mecanismos de troca de carga. Devido aos diferentes mecanismos de troca de carga, o espectro Raman resultante pode apresentar discrepâncias em relação ao da molécula isolada. Além de deslocamentos nas frequências, pode-se verificar diferença nas intensidades relativas ou o surgimento de novas bandas relacionadas à mudança da polarizabilidade do sistema devido à indução de ligações químicas e mecanismos de troca de carga entre os átomos do metal e as moléculas. Acredita-se que o mecanismo químico pode contribuir com um fator de ~100 vezes no aumento da intensidade do sinal SERS, o que ainda é uma discussão aberta (PEREIRA, 2016).

8.2.2 Mecanismo Eletromagnético

Parte significativa da intensificação observada nos experimentos SERS é devida ao efeito eletromagnético. Podem ser considerados mecanismos de intensificação eletromagnética os tipos de interação do sistema com campos elétricos que causem intensificação do sinal Raman sem que precise haver sobreposição eletrônica adsorbato-substrato. Em geral, são três tipos de mecanismos mais utilizados para elucidar a intensificação do mecanismo eletromagnético: Efeito de dipolo-imagem (*imagen field*), que foi um dos primeiros modelos gerados para a explicação da intensificação com base no efeito eletromagnético observado em experimentos SERS (COSTA, 2012). Este efeito é baseado no fato de que o dipolo elétrico intrínseco da molécula adsorvida levaria ao surgimento de um dipolo induzido na superfície metálica. O Efeito de concentração de campos em regiões de alta curvatura da superfície, ou “lightening-rod effect”,

consiste na concentração do campo elétrico nas regiões de alta curvatura, ou pontas, de uma partícula esferoide. Por fim, o mecanismo de intensificação por ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR), se dá pela interação da radiação incidente com a ressonância de plasmon de superfície da nanopartícula metálica, o que leva à intensificação do campo elétrico local. É o mecanismo mais aceito, pois possui a principal contribuição entre os efeitos eletromagnéticos (COSTA, 2012; SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006).

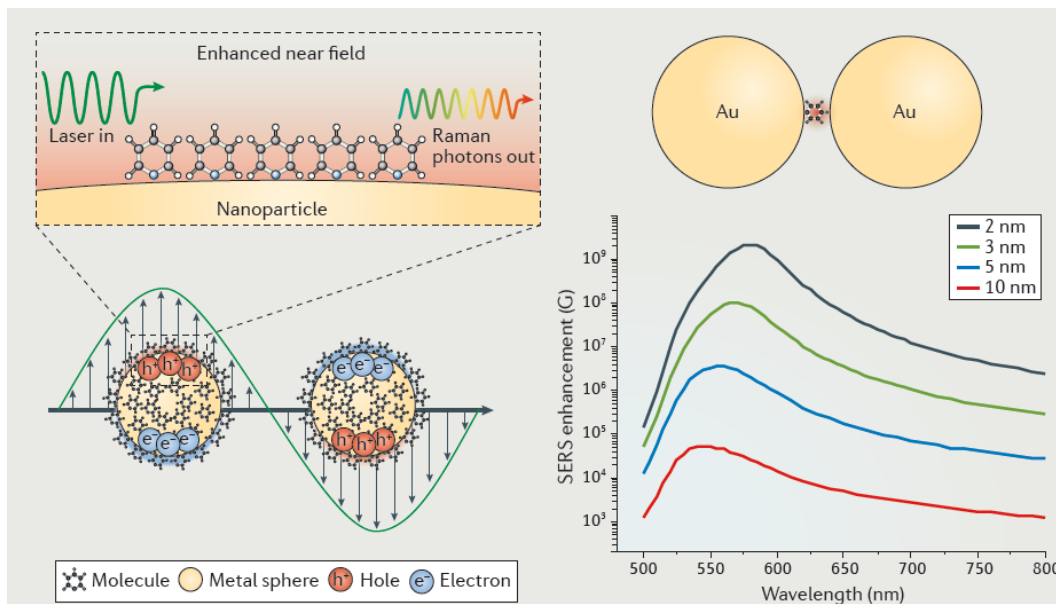
8.2.2.1 Ressonância de plasmon de superfície

O espalhamento Raman intensificado pela superfície é a principal via de intensificação do efeito SERS e decorre basicamente da indução de um movimento coerente dos elétrons superficiais de um metal com a frequência da radiação incidente de determinada energia (RODRIGUES, 2013).

Quando a radiação incide sobre as nanopartículas metálicas muito menores que o comprimento de onda desta radiação, o campo elétrico oscilante interage com os elétrons livres de condução do metal, e perturba a nuvem de elétrons, de modo que esta, é deslocada dos núcleos positivos da rede metálica (PEREIRA, 2016). Devido a esse deslocamento de carga, um dipolo é formado e uma força coulombiana surge para restaurar a posição de equilíbrio da nuvem de elétrons. Conseqüentemente, o dipolo oscila coerentemente em relação à luz incidente. A Figura 26 ilustra a oscilação da nuvem eletrônica na partícula pela atuação do campo elétrico incidente. Essas oscilações eletrônicas coletivas produzem um momento de dipolo induzido, que promove a intensificação do campo elétrico na vizinhança da nanopartícula. Essas oscilações decorrentes do movimento coerente dos elétrons na superfície do metal com a frequência da radiação incidente de determinada energia são chamadas de plasmon de superfície (ALVES, 2019).

O termo plasmon foi introduzido na literatura científica em 1956 por David Pines, em um artigo de revisão e é definido como um quantum que representa os modos de excitação das oscilações da densidade de cargas em um plasma. O plasma, por definição, se refere à movimentação dos elétrons livres em um metal, em relação aos íons positivos fixos, podendo ser chamado, neste caso, de plasma de elétrons livres, ou plasma do estado sólido (ALVES, 2019; PEREIRA, 2016).

Figura 26 – Esquema da excitação de ressonância de plasmon de superfície localizada para uma nanopartícula, mostrando o dipolo criado pela excitação coletiva da nuvem eletrônica.



Fonte: Ding et al., (2016)

A excitação do plasmon leva a um grande aumento do campo elétrico nas vizinhanças da partícula que experimentado eventualmente por moléculas, leva a um aumento da magnitude dos processos de espalhamento. A observação de ressonâncias de plasmons em nanoestruturas é uma condição necessária para a observação do efeito SERS, e define a existência desse fenômeno. Esse efeito confere às nanopartículas propriedades que são dependentes do material do qual elas são constituídas, seu tamanho, e geometria. Por ser um fenômeno de superfície, ou seja, que ocorre na interface entre o metal e o meio no qual a nanopartícula está inserida, ele depende ainda da constante dielétrica do meio (PEREIRA, 2016).

O plasmom de superfície está associado à rugosidade superficial presente nos substratos SERS-ativos. Medidas de absorção de luz pelo plasma de nanopartículas metálicas podem ser obtidas nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo. O aumento no tamanho das partículas resulta em um deslocamento da banda do plasma de superfície do metal para a região espectral de maior comprimento de onda (COSTA, 2012; SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006).

Vale ressaltar que no caso do mecanismo eletromagnético, as moléculas não precisam estar diretamente adsorvidas na superfície da nanopartícula; entretanto, a intensidade do campo decai com a décima potência a partir da superfície, fazendo com que o afastamento da molécula em relação à nanopartícula reduza rapidamente a intensificação do SERS. Já os pontos que compreendem a sobreposição dos campos eletromagnéticos de duas ou mais nanopartículas são conhecidos por proporcionar os maiores fatores de amplificação ao sinal SERS e são denominados hot spots. Acredita-se, portanto, que o mecanismo eletromagnético do SERS pode contribuir com um fator de amplificação do sinal de até 10^{12} vezes, geralmente associado aos hot spots em aglomerados de partículas que possuam geometrias com regiões de maior curvatura. Entretanto, deve-se mencionar que o valor do fator de intensificação atribuído ao mecanismo eletromagnético varia na literatura entre 10^4 e 10^{12} , dependendo dos materiais e geometrias das nanoestruturas, métodos de cálculo do fator de intensificação e técnicas experimentais utilizadas, o que ainda gera discrepâncias (VIANNA,2017).

8.3 SUBSTRATO SERS-ATIVO

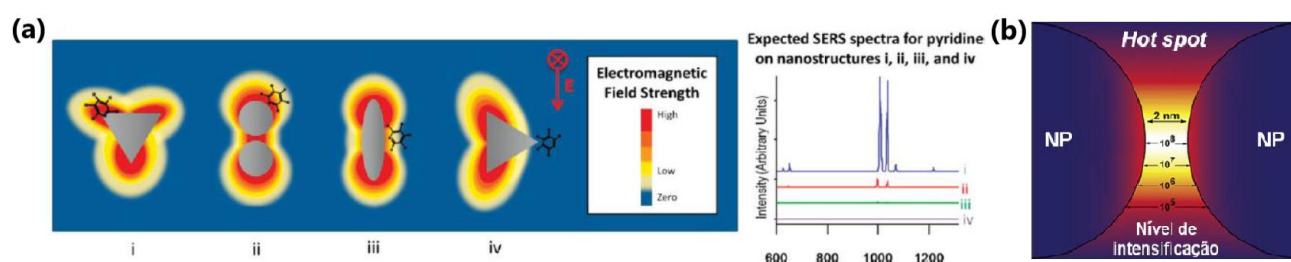
A escolha do substrato SERS é uma etapa fundamental no desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos. Idealmente, um substrato SERS deve proporcionar uma grande intensificação do sinal Raman, de forma reprodutível, e, ao mesmo tempo, ser quimicamente estável. Entretanto, na prática, alguma destas características pode ser priorizada dependendo do tipo de aplicação em que o substrato será utilizado (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011; VILLA, 2018).

Os substratos amplamente utilizados para experimentos SERS incluem superfícies metálicas tratadas eletroquimicamente (através de ciclos de oxidação e redução) e soluções coloidais. Essas abordagens por serem consideradas simples, permitem uma boa intensificação do sinal Raman para uma diversidade de amostras. Por outro lado, apresentam pouca reprodutibilidade e pouca especificidade. Para superar essas limitações, nos últimos anos vêm sendo desenvolvidas tecnologias mais sofisticadas, que permitem a obtenção de maiores fatores de intensificação, maior reprodutibilidade em sua preparação e maior especificidade (COSTA, 2012).

Estudos recentes em espectroscopia SERS concentram a atenção sobre o papel das nanoestruturas. Existe um número crescente de estudos sobre as funções das nanoestruturas em SERS, mais especificamente fabricação de nanopartículas de diferentes tamanhos, formas e arquiteturas. Portanto, para desenvolver substratos SERS ativos é necessário considerar algumas propriedades eletromagnéticas que determinam a ocorrência do fenômeno, ou seja: (a) tamanho médio das partículas metálicas; (b) arranjo periódico das partículas metálicas sobre a superfície; (c) forma e empacotamento das partículas metálicas; (d) propriedades ópticas do metal utilizado (COSTA, 2012, VILLA, 2018).

Considerando que a frequência do plasmon de superfície é altamente dependente da arquitetura do substrato SERS (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006), a síntese de coloides com uma resposta óptica favorável tem sido amplamente investigada. Assim, como mostrado na Figura 27(a), nanopartículas coloidais com diversas formas (esferas, cubos, estrelas, flores, bastões, triângulos, etc.) e tamanhos podem ser utilizadas como substratos SERS (LIN et al., 2009). Desta maneira, a condição de ressonância de plasmon de superfície localizada pode ser compatibilizada com o uso de diversos tipos de lasers Raman (excitados em 532, 633, 785 ou 1024 nm, por exemplo).

Figura 27 – Esquema de diferentes formas de nanoestruturas e concentração do campo elétrico nas regiões de alta curvatura.



Fonte: Adaptado de: Costa (2012) e Villa (2018)

Neste ponto, é importante considerar também a possibilidade da geração de regiões com intensificação de campo elétrico extremamente grande (chamados “hot spots”), que podem contribuir drasticamente na intensificação do sinal Raman (Figura 26(b)) (KLEINMAN et al., 2013). Por exemplo, nanopartículas de ouro esféricas com um plasmon de superfície localizado em 532 nm podem se aglomerar formando pequenos “clusters” e gerar um sinal muito intenso, mesmo

utilizando um laser excitado em 785 nm, como resultado do acoplamento dos plasmons de superfície individuais e, conseqüentemente, o deslocamento da condição de ressonância para comprimentos de onda maiores. Essa intensificação pode ser alcançada através da adição de pequenas concentrações de sal (por exemplo, cloreto de sódio para nanopartículas com carga superficial positiva/negativa) ou pela ação do próprio analito, promovendo a formação de clusters de nanopartículas (VILLA, 2018).

Deve-se ter em mente que para a aplicação prática de nanoestruturas metálicas em análise química é imprescindível que a sua fabricação ocorra de maneira controlada, uma vez que, a sensibilidade e reprodutibilidade na espectroscopia SERS dependem da qualidade do substrato metálico (COSTA, 2012).

Apesar da sua praticidade, o uso de substratos SERS coloidais em aplicações analíticas está limitado pela baixa reprodutibilidade, devido à possibilidade de coagulação (por exemplo, formação incontrolada ou precipitação de clusters de grande tamanho), e pela dificuldade para trabalhar em meio não aquoso. Uma alternativa para contornar essas limitações é, por exemplo, a deposição das nanopartículas em substratos sólidos quimicamente modificados (ou com elevada afinidade pelas nanopartículas utilizadas). Isto é, a conversão de substratos SERS coloidais em substratos SERS sólidos (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011; VILLA, 2018). Nesse sentido, o desenvolvimento de novos substratos com elevado desempenho vem ganhando importância na pesquisa, buscando expandir a aplicação da técnica em vários campos (COSTA, 2012).

Os coloides metálicos têm sido uma das classes de nanoestruturas mais usadas em estudos SERS. Essas partículas se tornaram centrais na espectroscopia de uma única molécula, tendo sido o palco das primeiras observações de SERS. A presença da solução tende a minimizar a queima da amostra, e se pode usar potências altas e radiação mais energética. Além disso, o uso de soluções permite a obtenção de um espectro médio e bastante representativo, devido ao movimento browniano que governa a solução coloidal (COSTA, 2012).

Diversas estratégias são utilizadas para a geração de substratos SERS-ativos. A síntese de novos coloides vem se desenvolvendo muito nos últimos anos, em função da demanda por um maior controle sobre as estruturas de

nanopartículas. Muitos estudos existem sobre como se alterar condições experimentais – como temperatura, pH, concentrações de reagentes, presença de surfactantes, natureza dos contra-íons, entre outras – de maneira a moldar o tamanho e a forma das nanopartículas geradas (COSTA, 2012; PEREIRA, 2016). O controle da forma permite modificar as propriedades ópticas, catalíticas e eletrônicas das nanopartículas (COSTA, 2012). Alguns exemplos interessantes de geometrias de nanopartículas de ouro e prata que podem ser obtidas em solução são ilustrados na Figura 28.

Figura 28 – Imagens de diferentes formas de nanoestruturas possíveis de serem sintetizadas em solução.



Fonte: Adaptado de Xia e Halas (2005) e Costa (2012)

A síntese de nanopartículas pela redução de íons metálicos em solução é um método versátil e de baixo custo se comparado a outros métodos de produção de nanoestruturas metálicas (litografia de elétrons, subdivisão mecânica de um material mássico ou eletrodeposição controlada). Uma das vantagens da produção de nanopartículas em fase líquida é o controle das propriedades e a possibilidade de manipulação, como a deposição controlada sobre uma superfície para obtenção de filmes, ou a formação de arranjos ordenados, por meios de ligantes, nos quais efeitos coletivos originados na interação entre as nanopartículas podem ser explorados (COSTA, 2012).

A estabilidade das nanopartículas depende intimamente da natureza e magnitude da interação entre as partículas constituintes e o meio. Basicamente, existem dois mecanismos de estabilização de nanopartículas coloidais: a estabilização eletrostática, na qual as nanopartículas se repelem devido à presença

de moléculas carregadas na superfície, e a estabilização estérica, na qual a presença de moléculas de cadeias longas ou polímeros impede a aproximação das nanopartículas. Ou seja, a estabilidade de nanopartículas baseia-se nas mudanças de energia quando duas partículas se aproximam através de um potencial efetivo construído pelos potenciais de atração de van der Waals (curto alcance) e a repulsão eletrostática (longo alcance) em função da distância entre as partículas (COSTA, 2012; ROUCOUX; SCHULZ; PATIN, 2002).

O controle da distribuição de tamanhos é também um fator importante quando se deseja obter nanopartículas com estreita distribuição de tamanhos. Neste sentido, busca-se realizar a síntese sob vigorosa agitação para minimizar gradientes de concentração. Assim, uma redução rápida, com um agente redutor forte, sob agitação vigorosa, pode, por exemplo, levar a uma nucleação homogênea e, conseqüentemente, à produção de nanopartículas com uma distribuição de tamanhos estreita. No entanto, a distribuição de tamanhos pode ser reduzida consideravelmente através de métodos pós-síntese, como por exemplo, precipitação seletiva por meio de ciclos de centrifugação (COSTA, 2012).

Atualmente o controle da morfologia é um grande desafio na síntese de nanopartículas de metais de transição, sendo a cinética da reação um fator crítico. Há um grande interesse no desenvolvimento de substratos com alta eficiência para aplicação em SERS, buscando maior aplicabilidade da técnica em diversas áreas, e a sua consolidação como uma ferramenta analítica. Do ponto de vista prático, um bom substrato SERS é aquele que apresenta uma intensificação uniforme e elevada do espalhamento Raman, com reprodutibilidade das medidas e baixo custo de preparação (LEE; TIAN; SINGAMANENI, 2010; ZHENG et al., 2015). Com relação à versatilidade de aplicação, diversos trabalhos têm relatado o uso de nanopartículas depositadas em papel, criando sistemas flexíveis com potencial de aplicação comercial em análises de rotina para sistemas químicos e biológicos. Dentre as vantagens desse tipo de substrato, está o baixo custo, a biodegradabilidade, a possibilidade de produção em larga escala, e a facilidade de transporte em grandes quantidades (PEREIRA, 2016).

Em princípio, o espectro SERS de qualquer molécula pode ser obtido. Entretanto, o nível de intensificação necessário para que o espectro SERS seja observável, bem como as condições experimentais, podem mudar drasticamente de uma molécula para outra (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Em outras

palavras, se uma molécula possui um sinal Raman, esse sinal pode ser intensificado através do efeito SERS. Porém, promover a adsorção do analito na superfície do substrato SERS pode tornar-se uma tarefa difícil dependendo das características do analito. Por exemplo, a glicose apresenta uma baixa afinidade por superfícies metálicas de ouro ou de prata, motivo pelo qual o seu espectro SERS é dificilmente obtido, mesmo em concentrações relativamente altas (VILLA, 2018).

Neste contexto, um analito pode ser considerado como 'bom' se o seu espectro pode ser obtido com relativa facilidade e com um nível de intensificação elevado, mesmo em concentrações relativamente baixas. Alguns exemplos de analitos utilizados como molécula prova na avaliação da atividade SERS, destacam-se, por exemplo, pireno, piridina, benzotriazol (BTAH), cianina Cy3-H, rodamina 6G (R6G) e cristal violeta (CV) (SANTOS et al., 2010; PILOT et al., 2019; SANTOS; GRASSESCHIB, 2020).

Particularmente, para os corantes, as diferenças entre seus níveis eletrônicos são similares à radiação excitante utilizada (usualmente na região do espectro visível), o que dá origem ao espalhamento Raman ressonante intensificado por superfície (SERRS – Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering). Por este motivo, os corantes têm sido popularmente utilizados para demonstrar a detecção ultrasensível no regime de uma única molécula (CAÑAMARES et al., 2008; DADOSH et al., 2009; ZRIMSEK; HENRY; VAN DUYNÉ, 2013). Neste ponto é importante mencionar que as estratégias experimentais devem adequar-se não apenas ao tipo de analito, mas também à complexidade da matriz da amostra (VILLA, 2018).

8.4 FATOR DE INTENSIFICAÇÃO SERS

Para avaliar o desempenho das nanoestruturas metálicas como substratos SERS têm-se estudado modelos para quantificar o aumento da relação sinal ruído provocado pela superfície metálica. Para tanto, visa-se um modelo matemático que se ajuste ao sistema de interesse, o qual deve descrever de maneira simples, sem muitas variáveis, além de ser viável de ser calculado tanto experimentalmente quanto por simulação computacional. Porém, devido à complexidade do efeito SERS não há um modelo singular que se aplique aos variados tipos de sistemas. A seção de choque SERS depende dos modos vibracionais do analito e, os fatores de intensificação podem ser originados da interação química ou eletromagnética, de acordo com a preponderância destes efeitos sobre a molécula sonda (LE RU et al., 2007).

Além disto, existem muitos outros parâmetros que interferem no desempenho SERS, tais como: características do laser (comprimento de onda, polarização, ângulo de incidência); propriedades do detector (ângulo de coleção sólido, detecção polarizada ou não); propriedades do substrato SERS envolvido (material, geometria, orientação, tamanho, forma, ressonância do plasmon de superfície localizado); propriedades intrínsecas do analito, como os tensores dos modos vibracionais Raman e a seção de choque Raman; propriedades de adsorção, em particular a eficiência e orientação da adsorção, distância da superfície, variações na polarizabilidade molecular oriunda da interação metal-analito; dentre outros (NEVES, 2014 e LE RU et al., 2007).

Devido a esta gama de parâmetros envolvidos no efeito SERS, não foi possível a padronização de um único modelo que atendesse a todas estas demandas. Assim, alguns estudos propuseram diferentes metodologias que se aplicam a várias situações, de maneira aproximada, entretanto, satisfatória para diferentes fins. Estas foram subdivididas na literatura recente em três classificações principais: fator de intensificação para uma única molécula (SMEF); fator de intensificação para o substrato SERS (SSEF) e fator de intensificação analítico (FIA) (NEVES, 2014).

Os modelos SMEF e SSEF se atêm às propriedades intrínsecas dos substratos SERS-ativos e, por isso, nem sempre são utilizáveis, já que, muitas vezes os experimentos não nos asseguram determinadas informações. Assim, o FIA é um

dos modelos mais utilizados, e propõe uma ideia intuitiva do aumento de intensidade; esse modelo considera uma relação entre as intensidades das bandas SERS, I_{SERS} , e bandas Raman, I_{Raman} , e as concentrações do analito utilizado nesses casos, C_{SERS} , e C_{Raman} , como apresentado na Equação 1 (LE RU et al., 2007; NEVES, 2014; WEI; HUANG, 2018). Vale ressaltar para que os resultados sejam comparáveis, é fundamental que os resultados sejam obtidos sob as mesmas condições espectrais (NEVES, 2014).

$$FIA = \left(\frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{Raman}/C_{Raman}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

O modelo acima proposto é de fato um resultado intuitivo a respeito do aumento da relação sinal ruído do espectro que, apesar de permitir a quantificação da melhoria do sinal na presença das nanoestruturas, pode-se subestimar os resultados de fator de intensificação. Isto ocorre porque o cálculo apenas considera a concentração final da solução e não que todas as moléculas presentes em solução contribuem igualmente para a intensificação. Desse modo, serão as moléculas mais próximas à superfície que contribuirão mais para o aumento do sinal, conseqüentemente, a concentração do adsorbato envolvida efetivamente no SERS é menor do que a concentração final da solução e os fatores de intensificação podem ser ainda maiores do que os obtidos por este modelo. Assim, para baixas concentrações, este erro é menor, pois a probabilidade de as moléculas estarem próximas à superfície e formarem uma monocamada é maior (LE RU et al., 2007; NEVES, 2014).

9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver substratos SERS-ativo de fácil preparo, fácil manuseio utilizando como substrato a superfície interna de fragmentos de casulo do bicho-da-seda *Bombyx mori*, nanoestruturados com partículas de prata. Pretende-se assim avançar tanto no desenvolvimento e aprimoramento da técnica de amplificação por superfície com base nos espectros das amostras descritas pela técnica Raman como na detecção de espécies moleculares em concentração nível traço.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar nanoestruturas de prata (AgNPs) a partir do método utilizado por Lee e Meisel (1982) para ser aplicado como substrato amplificador. Nesta estratégia destaca-se a nanoestrutuação da superfície interna de fragmentos de casulos do bicho-da-seda com nanoestruturas de prata;

Avaliar o efeito de intensificação do coloide de prata através da técnica Raman (SERS) utilizando o modelo FIA;

Caracterizar as nanoestruturas de prata quanto à distribuição de tamanho das partículas e espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível;

Produzir o recobrimento do substrato amplificador com as moléculas de interesse, através da adsorção das moléculas diretamente sobre o substrato;

Caracterizar o substrato amplificador via microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV) e raios X dispersivos em energia;

Estudar o comportamento (como a intensidade SERS varia em função da concentração) de CV adsorvidos nos substratos CV/AgNPs e AgNPs/CV;

Ajustar as curvas obtidas a partir das medidas SERS e SERRS utilizando os gráficos da variação das intensidades em função da concentração.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 MATERIAIS E REAGENTES

Foram utilizados nitrato de prata (AgNO_3 – Vetec); citrato de sódio tribásico - ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Synth); cristal violeta ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$ - Synth). Além disso, foram utilizados água ultrapura Milli-Q; casulos crus e casulos processados do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori* fornecidos da empresa brasileira BRATAC.

10.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

10.2.1 Procedimento de Limpeza das Vidrarias

Antes do uso, todas as vidrarias foram limpas de forma cuidadosa com solução ácido nítrico ($\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}$) na proporção 1:1 (v/v) em seguida seguido de enxagues com água destilada e posteriormente com água ultrapura Milli-Q®.

10.2.2 Síntese do Coloide de Prata

O coloide de prata foi preparado com base no procedimento descrito por Lee e Meisel (1982).

Em um balão volumétrico de 500 mL foi preparado uma solução de AgNO_3 , adicionando ao balão 90 mg de AgNO_3 e completando até o volume final com água ultrapura Milli-Q®. Em seguida, em um erlenmeyer de 500 mL, envolto em papel alumínio, toda solução de nitrato de prata foi transferida e aquecida a uma temperatura próxima de 96-98°C. Após o aquecimento, foi adicionada gota-a-gota, sob vigorosa agitação, 10 mL de uma solução a 1% de citrato de sódio. A mistura foi deixada nestas condições por 1 hora e, após retirado o aquecimento, foi mantida por 1 hora sob agitação contínua para resfriamento da solução. O volume foi completado para 500 mL com água Ultrapura Milli-Q® fornecendo uma solução de coloração cinza amarelado de aspecto leitoso, que foi acondicionada em um refrigerador.

10.2.3 Preparo de Soluções para Estudo Raman Ressonante e Estudo SERS

Foram preparadas diferentes concentrações padrões de cristal violeta (CV) em água ultrapura Milli-Q®, partindo de uma solução de estoque de concentração $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ conforme indicado na Tabela 5.

Para o estudo Raman ressonante das soluções de cristal violeta, as soluções padrões foram diluídas em tubos de vidro, adicionando 0,50 mL de solução de cristal violeta e 0,20 mL de água ultrapura Milli-Q®, cuja concentração final de estudo obtida estão descritas na Tabela abaixo.

Para o estudo SERS das soluções de cristal Violeta em coloide de prata, foram adicionados em tubos de vidro adequados para espectroscopia Raman, 0,50 mL de solução de CV e 0,20 mL de coloide de prata, cuja concentração final de cristal violeta foi determinada em $3,57 \cdot 10^{-6}$, $1,43 \cdot 10^{-6}$, $3,57 \cdot 10^{-7}$, $1,43 \cdot 10^{-7}$, $3,57 \cdot 10^{-8}$, $1,43 \cdot 10^{-8}$, $3,57 \cdot 10^{-9}$ e $1,43 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 5 – Concentrações de estudo das soluções de cristal violeta e de soluções de cristal violeta em coloide de prata para estudo Raman e estudo SERS.

Molécula investigada	Solução estoque (mol L^{-1})	Concentração solução padrão (mol L^{-1})	Concentração de CV para estudo RR (mol L^{-1})	Concentração de CV para estudo SERS (mol L^{-1})
Cristal Violeta	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$3,57 \cdot 10^{-6}$	$3,57 \cdot 10^{-6}$
		$2,00 \cdot 10^{-6}$	$1,43 \cdot 10^{-6}$	$1,43 \cdot 10^{-6}$
		$5,00 \cdot 10^{-7}$	$3,57 \cdot 10^{-7}$	$3,57 \cdot 10^{-7}$
		$2,00 \cdot 10^{-7}$	$1,43 \cdot 10^{-7}$	$1,43 \cdot 10^{-7}$
		$5,00 \cdot 10^{-8}$	$3,57 \cdot 10^{-8}$	$3,57 \cdot 10^{-8}$
		$2,00 \cdot 10^{-8}$	$1,43 \cdot 10^{-8}$	$1,43 \cdot 10^{-8}$
		$5,00 \cdot 10^{-9}$	$3,57 \cdot 10^{-9}$	$3,57 \cdot 10^{-9}$
		$2,00 \cdot 10^{-9}$	$1,43 \cdot 10^{-9}$	$1,43 \cdot 10^{-9}$

Fonte: o próprio autor

10.2.4 Preparo dos Substratos SERS-ativos

10.2.4.1 Limpeza e fabricação dos substratos

Para o preparo dos substratos, inicialmente as amostras de casulos foram cortadas com auxílio de um estilete e realizado a remoção de possíveis contaminantes presentes sobre a superfície interna dos casulos. Depois de limpos,

removendo com pinça as impurezas, foram obtidos fragmentos utilizando um punção de corte de diâmetro de 10 mm.

10.2.4.2 Preparo dos substratos para o estudo SERS

Para o estudo SERS foram produzidos substratos em duas condições de análise utilizando a superfície interna do fragmento de casulo.

Na primeira condição, foi realizada a adsorção prévia das soluções da molécula sonda (cristal violeta), adicionando-se sobre a superfície interna de cada fragmento um volume de 400 μL de solução de cristal violeta nas concentrações: $3,57 \times 10^{-6}$, $1,43 \times 10^{-6}$, $3,57 \times 10^{-7}$, $1,43 \times 10^{-7}$, $3,57 \times 10^{-8}$, $1,43 \times 10^{-8}$, $3,57 \times 10^{-9}$ e $1,43 \times 10^{-9}$ mol L^{-1} . Em seguida os fragmentos foram submetidos a secagem em estufa à 40 °C por 24 h. Esta etapa foi repetida até atingir a adição de um volume total de 1600 μL de solução de CV. Após adsorção das moléculas de cristal violeta foi realizado a nanoestruturação das fibras de seda com nanopartículas de prata através da adição de um volume de 400 μL de coloide de prata seguido de secagem em estufa à 40 °C por 24 h. Da mesma forma, como feito na etapa anterior, este procedimento foi repetido até atingir a adição de um volume total de 1600 μL de coloide de prata. Os substratos obtidos foram designados CV/AgNPs.

A segunda condição, foi feita nas mesmas condições que a primeira, porém, a nanoestruturação das fibras de seda com a adição do coloide de prata foi realizada antes da adição do CV. Os substratos obtidos foram designados AgNPs/CV.

10.2.5 Caracterização das Soluções de Cristal Violeta (CV), do Coloide de Prata e dos Substratos SERS

10.2.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

A caracterização do coloide de prata como preparado e da solução de cristal violeta $3,57 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} foi feita por espectroscopia de absorção no UV-vis utilizando espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2600.

10.2.5.2 Distribuição de tamanho de partículas

Para as análises de distribuição de tamanho de partículas do coloide de prata foi utilizado equipamento Zeta-APS que mede com precisão a atenuação acústica (dB / cm) versus a frequência do som (1 a 100 MHz) das dispersões coloidais. Essas medidas são comumente referidas como espectroscopia de atenuação acústica. A distribuição do tamanho de partícula é calculada a partir dos dados de atenuação acústica usando software desenvolvido e patenteado pela Lucent Technologies.

10.2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de MEV, foi utilizado um fragmento de casulo da parte interna sem adição de coloide de prata e outro com adição de 1600 μL de coloide de prata sobre as fibras da parte interna do casulo.

As imagens foram geradas em um microscópio eletrônico modelo FEI Quanta 200, tensão entre 25-30 kV, distância do feixe até a amostra 7,50-10,20 nm, escala de imagem de 10,00-20,00 μm em ampliações de 6000 vezes. Este equipamento encontra-se disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise de Multiusuários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.

10.2.5.4 Espectroscopia Raman

Para medições Raman, os casulos de seda foram montados em lâminas de microscópio de vidro com o auxílio de uma pinça metálica. Os espectros Raman foram obtidos usando um Espectrômetro Raman portátil Advantage[®] da DeltaNu, excitado em 532 nm com resolução de 8 cm^{-1} . Foi utilizado o software NuSpec da DeltaNU, usando recurso de linha de base, para remover a fluorescência de fundo. Os parâmetros para aquisição dos espectros foram: acumulando-se por 10 e 1 segundos após 20 varreduras e potência de laser 8,60 mW.

Todas as deconvoluções espectrais foram feitas no programa Origin (8.0, 2007). Um número de componentes e a geração de um ajuste razoável foram assumidos no processo, onde cada componente demonstra a dependência do

tratamento realizado na amostra através da mudança na intensidade relativa observada. Uma função Gaussiana foi usada e o controle sobre os parâmetros (posições e largura de banda) não foi realizado, e pequenas diferenças de posição e largura de banda foram toleradas.

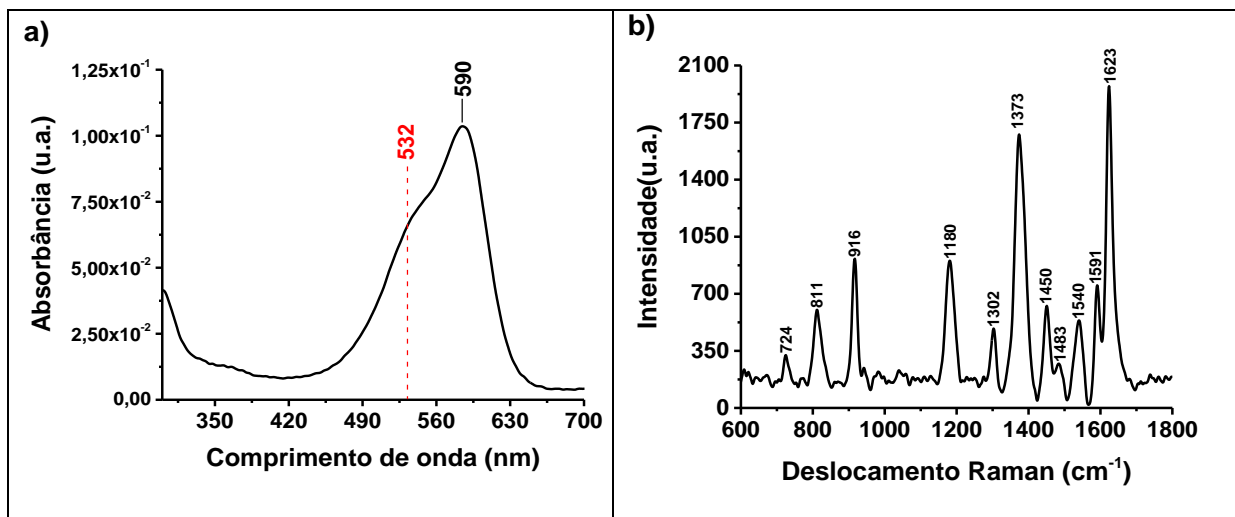
11 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A busca por substratos SERS-ativos mais eficientes tem sido alvo de intensos estudos, devido ao baixíssimo limite de detecção alcançado pelo efeito Raman, assim tem-se buscado como uma opção promissora, a utilização de matrizes poliméricas e a síntese de nanoestruturas em que seja possível controlar o seu tamanho e que sejam estáveis. Neste sentido, a seda tem chamado a atenção devido a presença de grupos funcionais amina (-NH₂) ou tiol (-SH) das cisteínas (em menor proporção) que podem interagir eletrostaticamente possibilitando a formação de “armadilha moleculares” que poderão auxiliar na adsorção das nanoestruturas de prata sobre a superfície permitindo uma melhor interação entre molécula de CV e o substrato (ANGELONI; SMULEVICH; MARZOCCHI, 1979).

Para investigar a atividade SERS dos substratos utilizados neste trabalho optou-se pelo uso de CV como molécula sonda. Devido à natureza dos materiais utilizados no desenvolvimento dos substratos SERS-ativos eficientes, como por exemplo as nanoestruturas de prata e cristal violeta, é de grande importância a caracterização destes materiais na investigação do efeito SERS produzido pela interação entre materiais.

Para a caracterização do cristal violeta (CV), na Figura 29 são apresentados o espectro eletrônico de absorção no UV-Vis e o espectro Raman obtido na radiação excitante 532 nm.

Figura 29 - Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis (a) e espectro Raman obtido na radiação excitante 532 nm (b), de uma solução aquosa de CV $3,57 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.



Fonte: o próprio autor

A Figura 29(a) mostra o espectro eletrônico de absorção no UV-Vis do CV em solução aquosa, onde observa-se uma banda larga e intensa centrada em 590 nm, característica das transições π - π^* do grupo anel aromático (GHANADZADEH; ZEINI; KASHEF, 2007; SILVA et al., 2017). Além disso, nota-se que o comprimento de onda em 532 nm, que será utilizado para excitação dos espectros Raman e determinação deste composto em diferentes condições, encontra-se dentro da banda de absorção do corante. Desta forma, deve-se ocorrer o efeito Raman ressonante, sendo adequado para a análise de soluções em baixas concentrações, devido à intensificação do sinal Raman (EFREMOV; ARIESE; GOOIJER, 2008; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019).

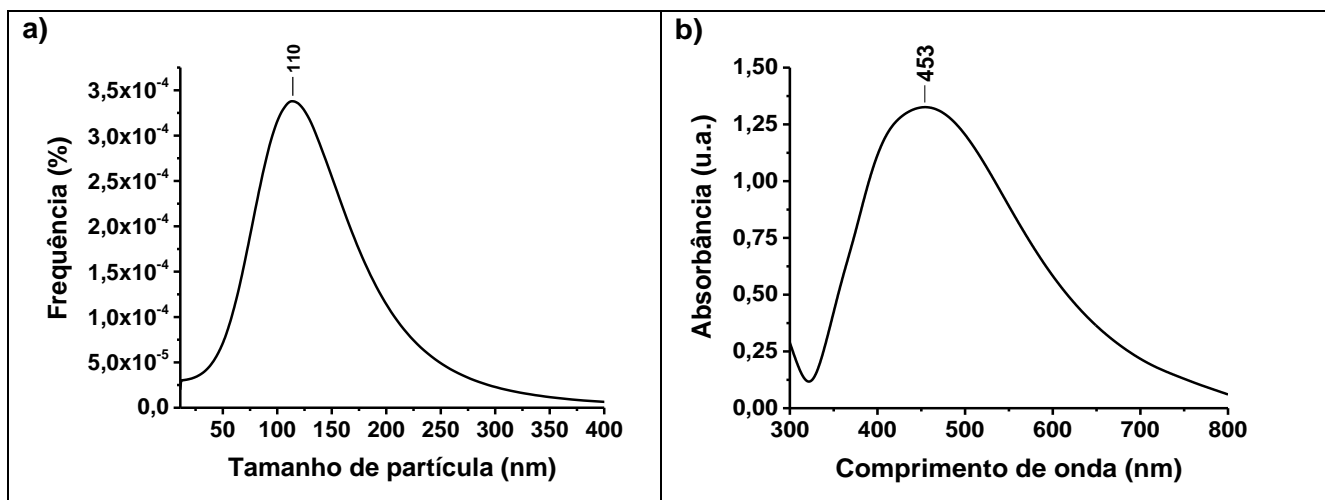
A Figura 29(b) apresenta o espectro Raman ressonante de CV em solução aquosa obtido na radiação excitante de 532 nm, na qual pode ser observado o efeito de ressonância sobre a intensidade de espalhamento Raman. Como observado, a condição de excitação do espectro Raman próximo da transição eletrônica permitida da molécula, causa o efeito Raman ressonante (RR), o que favorece uma boa relação sinal/ruído a partir da intensificação do espalhamento Raman (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006). As principais atribuições características do CV podem ser observadas em 811 cm^{-1} (deformação fora do plano C-H do anel), 916 cm^{-1} (vibração esquelética do anel com orientação radial), 1180 cm^{-1} (deformação no plano do anel C-H), 1302 cm^{-1} (estiramento C-C do anel), 1372 cm^{-1} (estiramento N-fenil) e $1540, 1591, 1623\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-C do anel) (PERSAUD; GROSSMAN, 1993; WEI; HUANG, 2018).

Para obter os espectros SERS do CV, as soluções de CV devem ser dispersas em coloide de prata ou em substratos SERS-ativos contendo nanoestruturas de prata adsorvidas. Desta forma, inicialmente foi caracterizado o coloide de prata como preparado por distribuição do tamanho de nanopartículas e espectroscopia na região do ultravioleta-visível conforme apresentados na Figura 30.

Na Figura 30(a) é apresentada a curva de distribuição do tamanho de partículas das nanoestruturas de prata formadas durante a síntese do coloide de prata, onde é possível observar uma distribuição média de partículas de prata de aproximadamente 110 nm. Este resultado encontra-se muito próximo aos valores relatados por Pillai e Kamat (2004) e Wan et al. (2013) que mostram que através do método Lee e Meisel (1982) é possível produzir uma ampla variedade de tamanho de partículas de prata com forma bem definidas de tamanho, entre 50-100 nm e 60 a

200 nm, respectivamente.

Figura 30 – Gráfico de Distribuição do tamanho de partículas do coloide de prata (a) e espectro eletrônico de absorção no UV-Vis do coloide de prata (b).



Fonte: o próprio autor

A Figura 30(b) mostra o espectro eletrônico de absorção no UV-Vis do coloide de prata como preparado, onde é possível observar a presença de uma banda larga com o máximo de absorção em torno de 453 nm correspondente à absorção do plasmon. De acordo com, Link e El-Sayed (2000), Pacheco (2017) e Pereira (2009) o alargamento da banda pode estar associados ao tamanho das nanoestruturas formadas, pois à medida que o tamanho das nanoestruturas de Ag aumenta, a polarização da nuvem eletrônica pelo campo elétrico deixa de ser homogênea, causando a excitação de outros modos multipolares.

Outro fator que pode contribuir para o alargamento da banda é a formação de estruturas complexas, uma vez que, os modos LSPR resultam da mistura (hibridação) de plasmons de modos individuais, em que a combinação desses modos, em diferentes frequências, produz modos com frequência inferior e modos de maior frequência que as iniciais (LANGER, 2015; PACHECO, 2017). Isso nos leva a acreditar na formação de nanopartículas anisotrópicas com distribuição de diâmetro relativamente ampla (PACHECO, 2017).

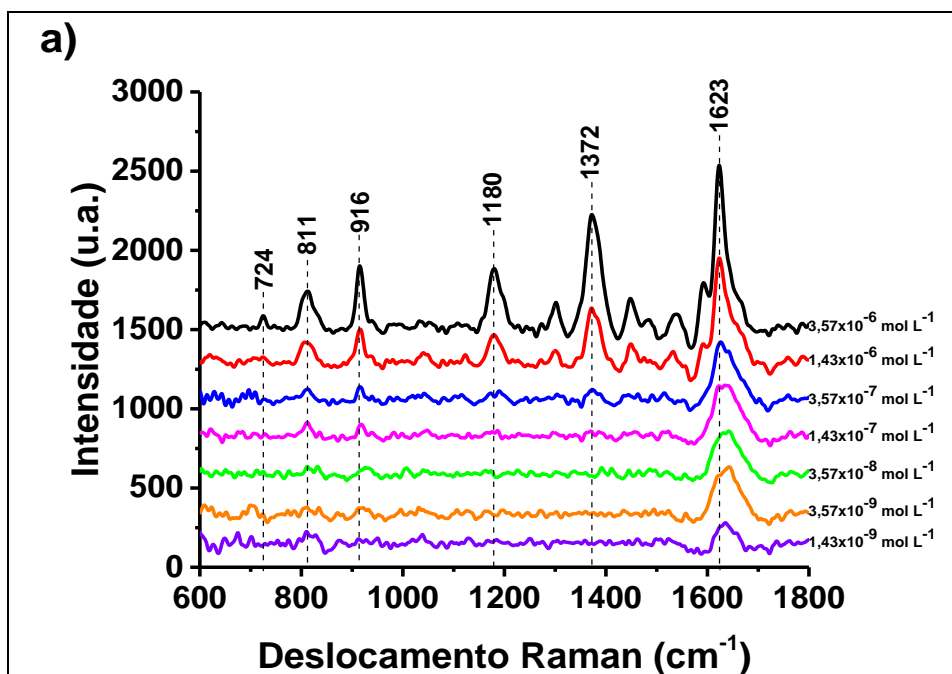
Estes resultados indicam a importância de se caracterizar as nanopartículas para a detecção molecular eficaz pelo efeito SERS (Surface-enhanced Raman Scattering), pois assim como descrito por Mao et al., 2012 e Santana et al, 2006, a morfologia das soluções coloidais de nanopartículas de prata

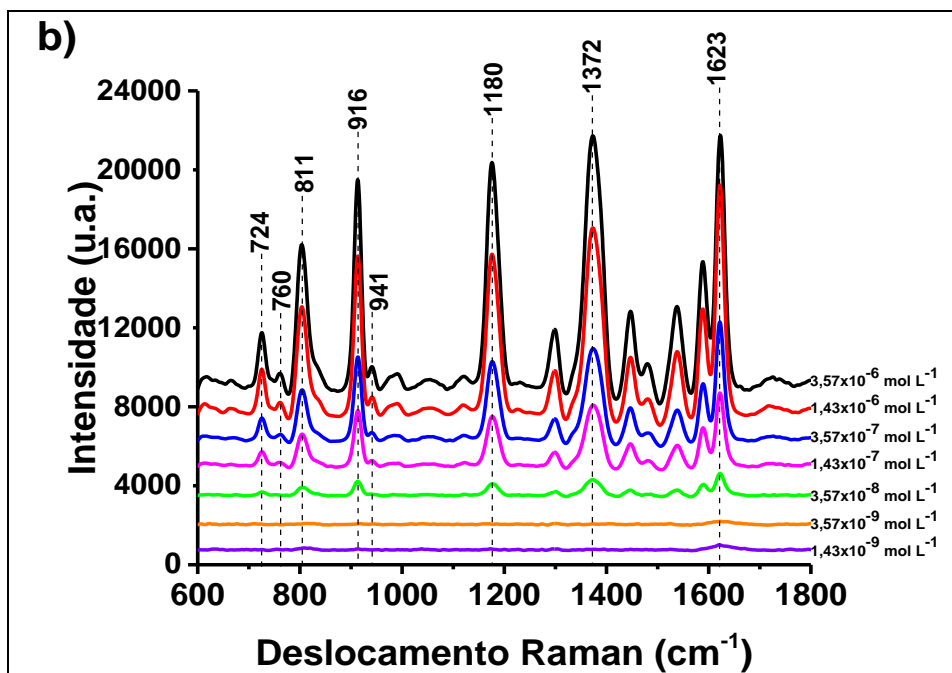
e o máximo de absorção no espectro UV-VIS de soluções coloidais estão intrinsicamente relacionadas ao tamanho médio das partículas e a largura da banda de absorção relacionada à dispersão das partículas.

Considerando que o comprimento de onda de excitação está dentro da região do comprimento de onda de absorção do CV, um efeito Raman ressonante pode ser explorado junto com o efeito SERS. Desse modo, um estudo pode ser conduzido a fim de detectar, por exemplo, CV em nível de traço próximo às superfícies plasmônicas formadas (FATEIXA; NOGUEIRA; TRINDADE, 2018).

A Figura 31 apresenta uma comparação dos espectros Raman ressonante (RR) e SERS das soluções aquosas de CV em diferentes concentrações obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 10 s. É importante ressaltar que os espectros para cada concentração correspondem a uma média de 20 espectros registrados para cada situação.

Figura 31 - Espectros Raman Ressonante das soluções aquosas de CV (a) e espectros SERS das soluções de CV em coloide de prata (b), obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 10 s.





Fonte: o próprio autor

A Figura 31(a) apresenta os espectros RR obtidos utilizando um tempo de integração de 10 s. Analisando os espectros RR, é possível verificar a presença de bandas características do CV em concentrações entre $3,57 \times 10^{-6}$ - $3,57 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Por outro lado, na presença de colóide de prata (Fig. 31(b)) é possível observar uma faixa de concentração dez vezes maior ($3,57 \times 10^{-6}$ - $3,57 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹).

Além disso, na presença de colóide de prata é observado um forte efeito de intensificação do sinal Raman (efeito SERS), pequenas mudanças são observadas nos espectros SERS, como largura, posição (pequenos deslocamentos) e intensidades relativas das bandas quando comparadas ao espectro RR do CV. De acordo com, SANTANA et al., (2006); HARRAZ et al., (2015) e ZHU et al., (2018), esse efeito de intensificação do sinal Raman do CV ocorre provavelmente devido a interação da molécula de CV com as nanopartículas de prata, onde os átomos de nitrogênio do CV podem interagir com a superfície da nanopartícula de prata de forma direta, e recebe a contribuição do mecanismo de transferência de carga na intensificação do sinal. Esse fato pode ser confirmado através do surgimento da banda em 941 cm^{-1} (deformação C-H do anel) e da intensificação das bandas em 724 , 811 , 916 , 1180 , 1372 e 1623 cm^{-1} . Além disso foi observado que através da intensificação do sinal Raman a menor concentração no espectro SERS, foi dez vezes maior ($3,57 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) quando comparados aos espectros RR ($3,57 \times 10^{-7}$).

Para melhor avaliar o efeito SERS e o desempenho das nanoestruturas de prata como substrato SERS, o modelo matemático utilizado foi o fator de intensificação analítico (FIA), conforme descrito na Equação 1 (LE RU et al., 2007). Como o modelo de cálculo do FIA considera apenas a concentração final da solução (C_{Raman} e C_{SERS}) e propõe que todas as partículas presentes em solução contribuam igualmente com a intensificação, logo, serão as moléculas mais próximas à superfície que mais contribuirão com o aumento do sinal (NEVES, 2014). Dessa forma, para o cálculo do FIA foi considerado a intensidade de pico da banda em 1623 cm^{-1} dos espectros RR (I_{Raman}) e SERS (I_{SERS}) das soluções de CV como sonda molecular em coloide de prata, pois conforme descrito por Fateixa et al. (2018), esta banda tem sido frequentemente usada em estudos SERS para calcular o fator de intensificação por apresentar a maior intensidade de pico em toda a faixa do espectro.

$$FIA = \left(\frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{Raman}/C_{Raman}} \right) \quad \text{Equação (1)}$$

A Tabela 6 apresenta os FIA calculados de acordo com a Equação 1 utilizando como referência a banda em 1623 cm^{-1} dos espectros Raman ressonante e SERS das diferentes soluções de CV.

Tabela 6 - Fator de intensificação utilizando como referência a banda em 1623 cm^{-1} dos espectros Raman e SERS das soluções de CV ($t=10\text{ s}$).

C_{Raman} e C_{SERS} (mol L ⁻¹)	I_{Raman}	I_{SERS}	FIA
$3,57 \times 10^{-6}$	1013	12496	12,34
$1,43 \times 10^{-6}$	647	11365	17,57
$3,57 \times 10^{-7}$	357	3632	10,17
$1,43 \times 10^{-7}$	311	5879	18,90
$3,57 \times 10^{-8}$	259	1093	4,22
$3,57 \times 10^{-9}$	242	147	0,61
$1,43 \times 10^{-9}$	127	245	1,93

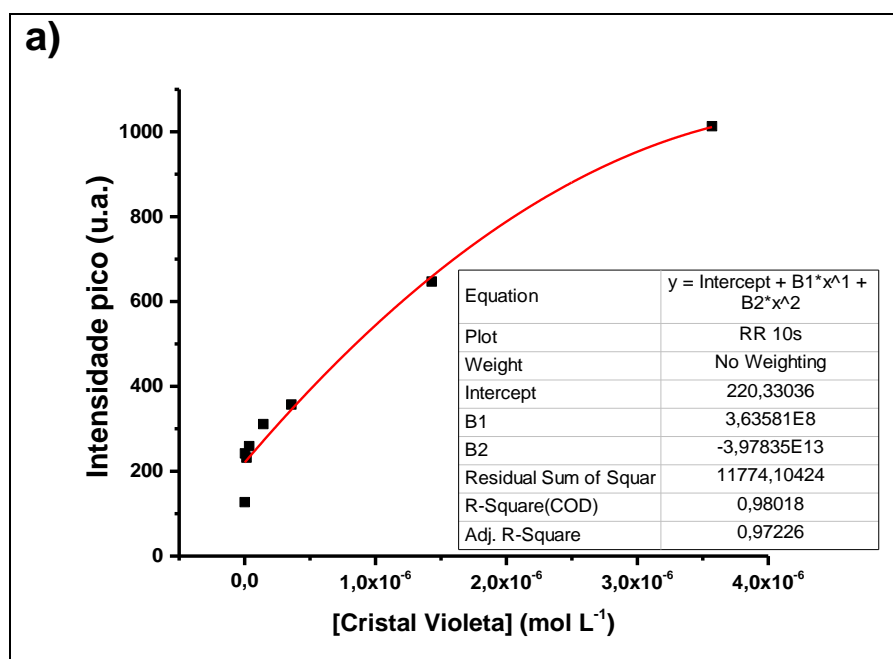
Fonte: o próprio autor

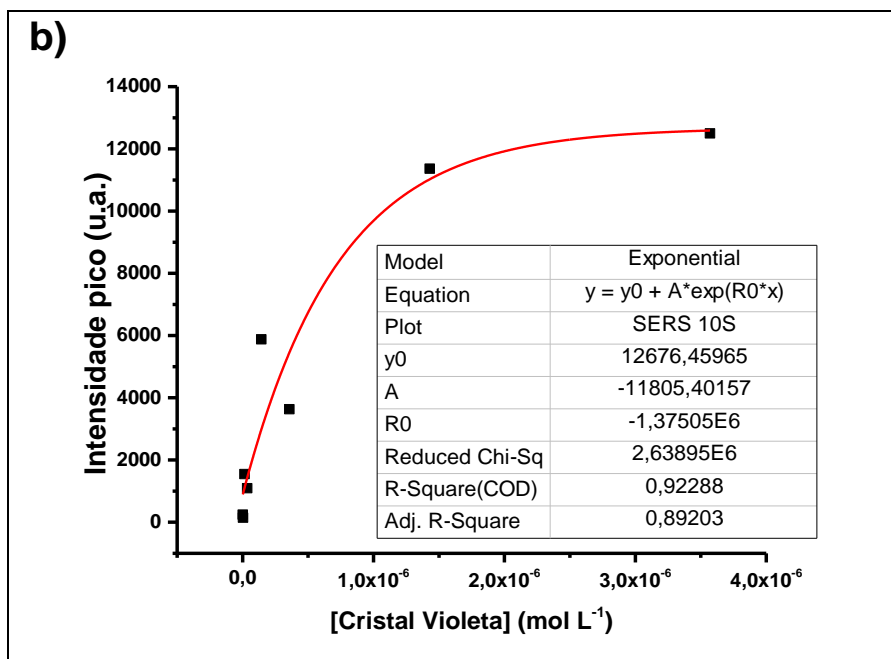
Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram diferenças significativas entre os valores dos FIA calculados para concentrações entre $3,57 \times 10^{-6}$ a $3,57 \times 10^{-7}\text{ molL}^{-1}$ e concentrações inferiores à $1,43 \times 10^{-7}\text{ molL}^{-1}$. Acredita-se que a

diminuição da atividade SERS para as concentrações inferiores à $1,43 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ pode estar relacionada possivelmente à movimentação do pequeno número de moléculas de CV existentes e/ou a desorção de moléculas de CV ao longo do tempo de exposição ao laser, uma vez que, é observado uma atividade SERS relativamente baixa ou quase nula, ou seja, não é verificada bandas referentes ao CV.

Para um maior detalhamento e compreensão dos resultados dos FIA, procurou-se investigar, a variação das intensidades RR e SERS do CV em função da concentração. Desse modo, na Figura 32 é apresentado o gráfico da variação das intensidades Raman ressonante e SERS da banda de referência em 1623 cm^{-1} em função da concentração de CV.

Figura 32 – Gráfico da variação das intensidades da banda em 1623 cm^{-1} em função da concentração de CV dos espectros Raman ressonante (a) e SERS (b) obtidos na radiação excitante de 532 nm e tempo de integração de 10 s .





Fonte: o próprio autor

Analisando ambos os gráficos, pode-se observar que os modelos propostos assumem comportamento diferentes. Para o gráfico referente aos espectros Raman ressonante (Fig. 32(a)) observa-se um comportamento que se aproxima de um modelo polinomial com um coeficiente de relação de $R^2_{RR}=0,98018$, em contra partida, o gráfico referente as intensidades dos espectros SERS (Fig. 32(b)) apresentou um comportamento que se aproxima de um modelo exponencial com um coeficiente de relação de $R^2_{SERS}=0,92288$.

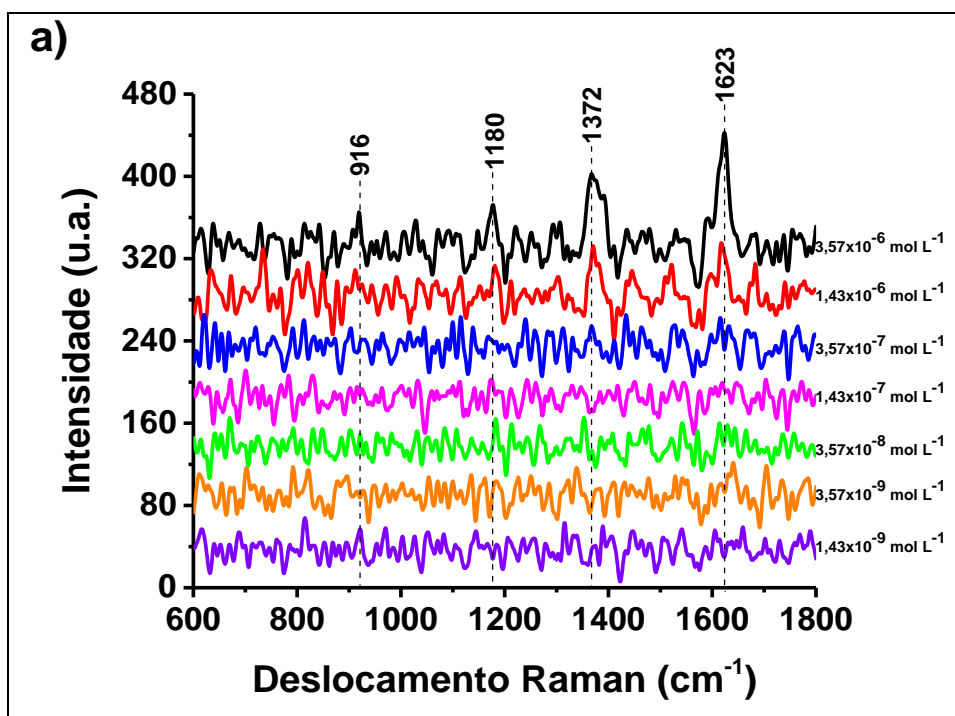
Além disso, é possível observar duas regiões distintas para as duas curvas acima. A primeira corresponde à faixa de concentrações entre $3,57 \times 10^{-6}$ - $1,43 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e a segunda corresponde a faixa de concentração entre $1,43 \times 10^{-7}$ e $1,43 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, onde se observa pouca variação da atividade SERS em função da concentração. Como em concentrações muito baixas o número de moléculas por área é relativamente baixo, a observação do espectro e identificação do CV é praticamente nula. Isso explica o fato de observamos pouca variação da intensificação em função da concentração o que implica em uma região imprópria para realização de medidas quantitativas. Entretanto, pode ser utilizada para análises qualitativas de traços de substâncias.

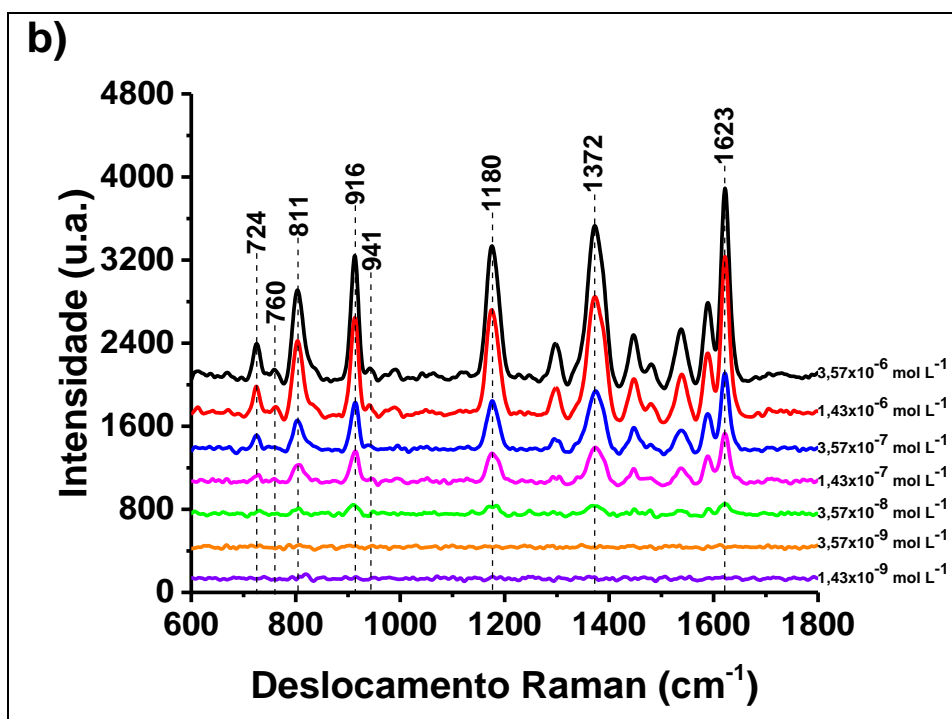
Considerando que ambos os gráficos apresentaram um coeficiente de correlação insatisfatório, pois Segundo Skoog et al., (2006), um modelo para ser considerado satisfatório deve apresentar R^2 próximo de 1, o tempo de integração de

análise foi alterado de 10 s para 1 s, a fim de se obter melhores resultados quanto ao fator de intensificação e coeficiente de correlação tanto para os espectros RR quanto para os espectros SERS das soluções de CV. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 33.

Na Figura 33 são apresentados os espectros Raman Ressonante das soluções aquosas de CV e os espectros SERS em diferentes concentrações de CV em coloide de prata, ambos obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 1 s.

Figura 33 - Espectros Raman Ressonante das soluções aquosas de CV (a) e espectros SERS das soluções de CV em coloide de prata (b), obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 1 s.





Fonte: o próprio autor

A Figura 33(a) apresenta os espectros RR obtidos utilizando um tempo de integração de 1 s. Como pode ser observado, com a diminuição do tempo de integração de 10 s para 1 s houve um maior número de eventos nulos, ou seja, de espectros dos quais se observam somente ruído, com alguns espectros de alta intensidade.

Na Figura 33(b) é apresentado os espectros SERS obtidos utilizando um tempo de integração de 1 s. Nestes espectros é possível verificar que apesar da grande semelhança com os espectros SERS obtidos utilizando um tempo de integração de 10 s (Fig. 31(b)), são observadas algumas variações nas intensidades relativas e no perfil de algumas bandas. Também foram calculados os valores FIA para esses espectros e avaliado o efeito da variação da intensidade de pico da banda em 1623 cm⁻¹ utilizando um tempo de integração de 1 s.

Na Tabela 7 são mostrados os FIA dos espectros RR e SERS utilizando um tempo de integração de 1 s.

Tabela 7 - Fator de intensificação utilizando como referência a banda em 1623 cm^{-1} dos espectros Raman e SERS das soluções de CV ($t=1\text{ s}$).

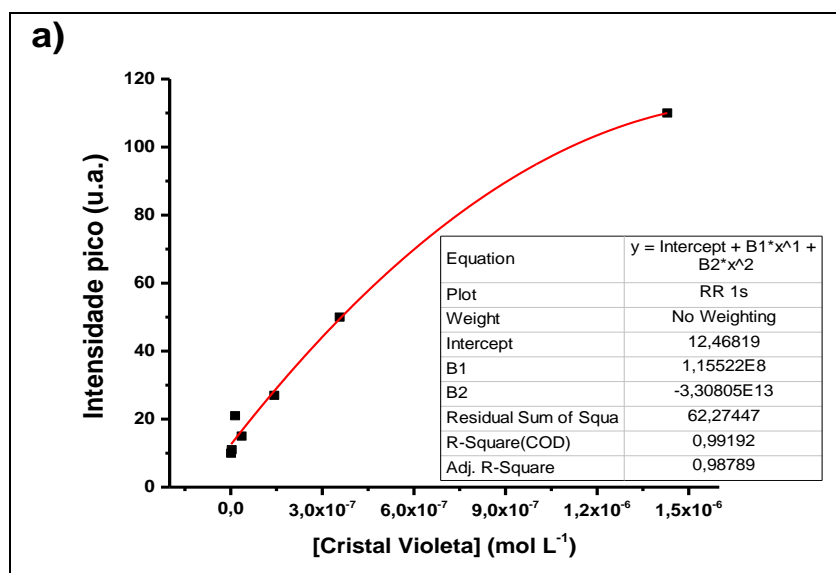
C_{Raman} e C_{SERS}	I_{Raman}	I_{SERS}	FIA
$3,57 \times 10^{-6}$	110	1801	16,37
$1,43 \times 10^{-6}$	50	1499	29,98
$3,57 \times 10^{-7}$	27	725	26,85
$1,43 \times 10^{-7}$	15	455	30,33
$3,57 \times 10^{-8}$	21	96	4,57
$3,57 \times 10^{-9}$	11	21	1,91
$1,43 \times 10^{-9}$	10	14	1,40

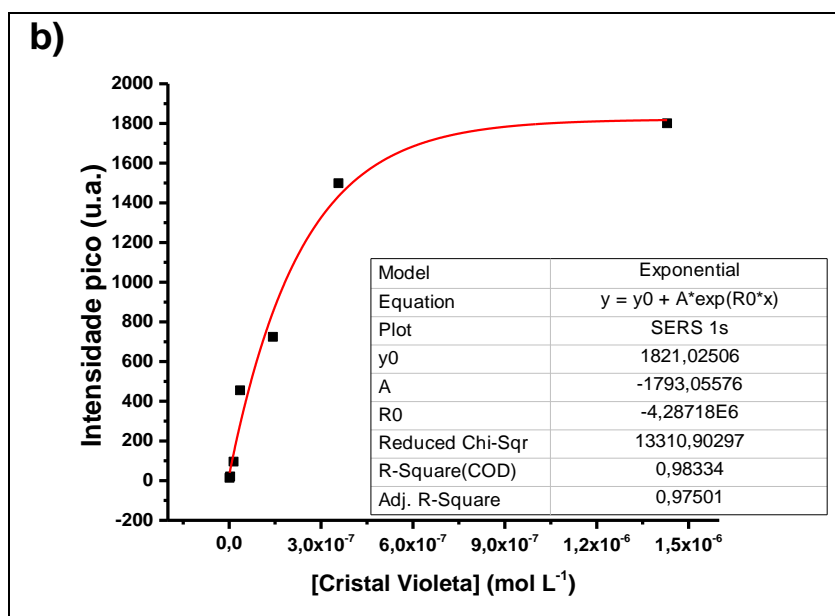
Fonte: o próprio autor

Como pode ser observado os FIA apresentados na Tabela 7 seguem o mesmo comportamento aos observados na Tabela 6 utilizando um tempo de integração de 10 s. No entanto, nota-se que os FIA obtidos na faixa entre $3,57 \times 10^{-6}$ - $1,43 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$, quando comparados aos obtidos na Tabela 7 assumem valores relativamente maiores com a diminuição do tempo de integração.

A Figura 34 ilustra os gráficos da variação das intensidades da banda em 1623 cm^{-1} em função da concentração do CV dos espectros RR e SERS obtidos utilizando um tempo de integração de 1 s.

Figura 34 – Gráfico da variação das intensidades da banda em 1623 cm^{-1} em função da concentração de CV dos espectros Raman ressonante (a) e SERS (b).





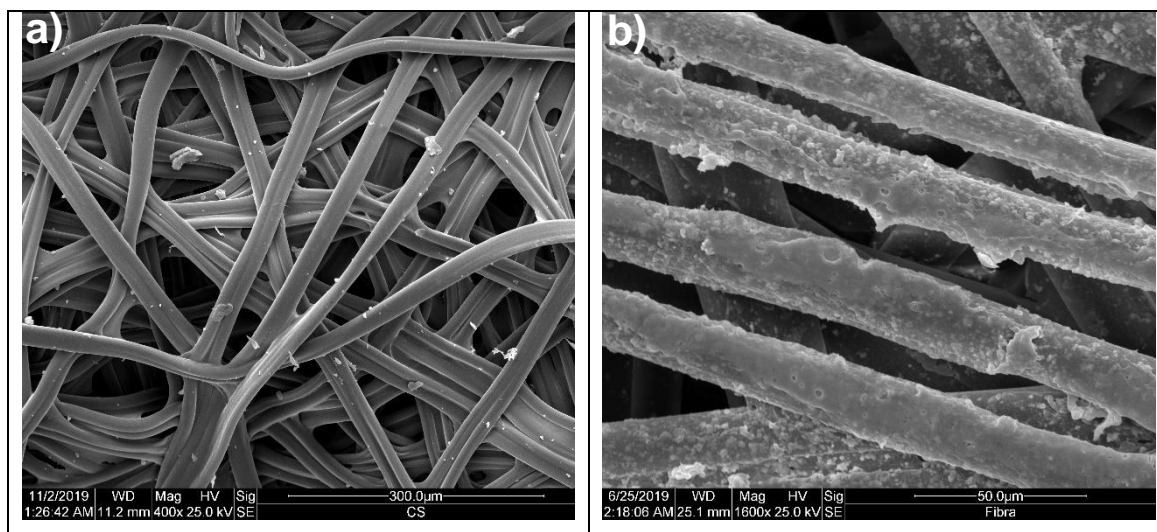
Fonte: o próprio autor

De acordo com os resultados obtidos, a dependência da intensidade SERS em função da concentração utilizando um tempo de integração de 1 s (Fig. 34) apresentou um comportamento similar aos resultados obtidos utilizando um tempo de integração de 10 s (Fig. 32). Apesar da grande semelhança, ambos os modelos apresentados acima exibiram resultados com coeficiente de relação melhores ($R^2_{RR}=0,99192$ e $R^2_{SERS}=0,98334$), que podem estar associados ao menor tempo de incidência da radiação na amostra e estado de agregação em que se encontram as nanoestruturas de prata presentes no coloide de prata.

Avaliando os resultados apresentados e considerando a possibilidade da utilização de nanoestruturas de prata adsorvidas na superfície das fibras do casulo de seda como substrato para o efeito de intensificação Raman por superfície (SERS), foi realizado um estudo utilizando fragmentos de casulo de seda nanoestruturados com prata, provenientes do coloide de prata visando alcançar um modelo em que R^2 seja o mais próximo possível de 1, além da detecção de CV em níveis de traço. Dessa forma, fragmentos de casulo de seda nanoestruturados com prata (substrato SERS-ativo) foram caracterizados utilizando a microscopia eletrônica de varredura e os resultados foram apresentados na Figura 35.

As Figuras 35(a) e 35(b) ilustram a morfologia da superfície interna do fragmento de casulo de seda sem adição de colóide de prata e com a adição de 1600 μL de colóide de prata, respectivamente.

Figura 35 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia da superfície interna do fragmento do casulo do bicho-da-seda *B. mori*, sem adição de colóide de prata (a) e com adição de 1600 μL de colóide de prata (b).

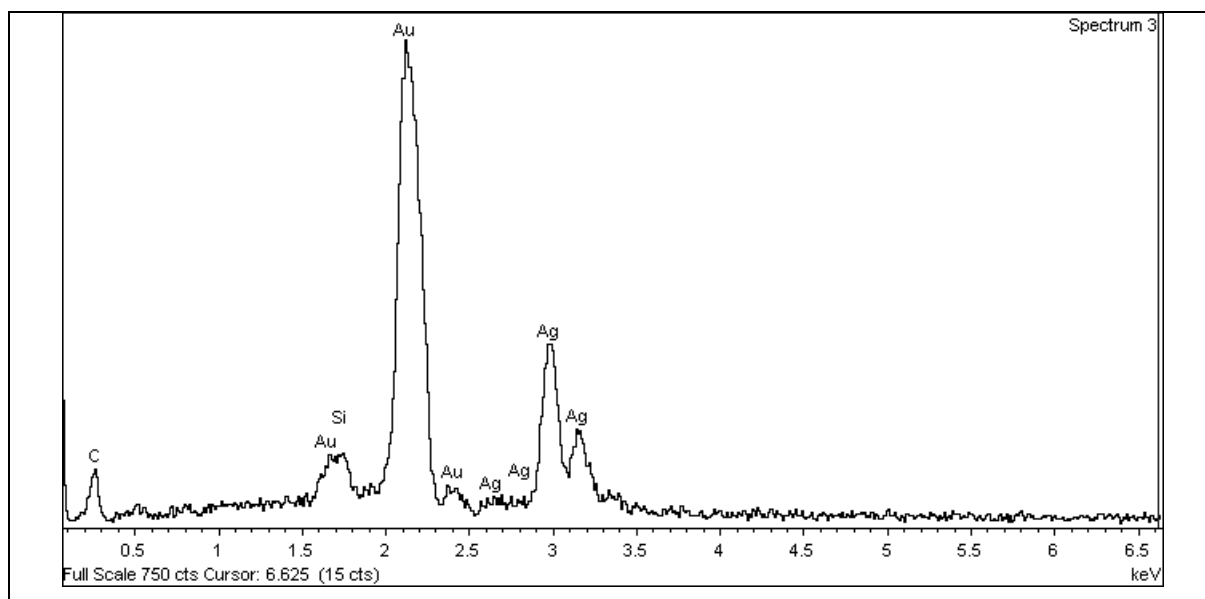


Fonte: o próprio autor

Como observado na Figura 35(a) as fibras de seda apresentam uma superfície uniforme e lisa, com presença de alguns resíduos sobre a superfície. Por outro lado, na Figura 35(b) é possível verificar a nanoestruturação da superfície das fibras de seda pela adição de 1600 μL de colóide de prata pela presença de aglomerados e também de camadas formadas pela adsorção das nanoestruturas de prata sobre a superfície das fibras de seda que podem favorecer a formação de “hot spots”, nos quais, efeitos coletivos originados na interação entre as nanopartículas e analito podem ser explorados (KLEINMAN et al., 2013; VIANNA, 2017).

Para evidenciar a presença de nanoestruturas de prata adsorvidas na superfície das fibras de seda, na Figura 36 é apresentado um espectro de raios X dispersivos em energia.

Figura 36 – Espectro de raios X dispersivos em energia da superfície da fibra de seda nanoestruturada com nanopartícula de prata.



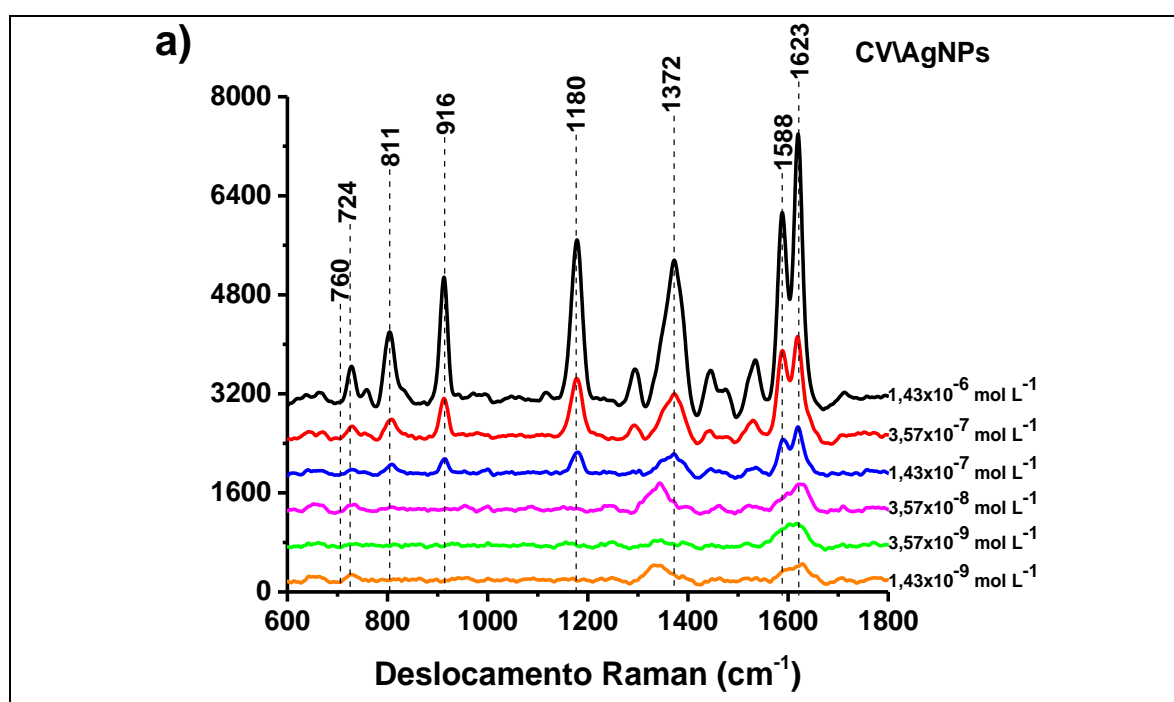
Fonte: o próprio autor

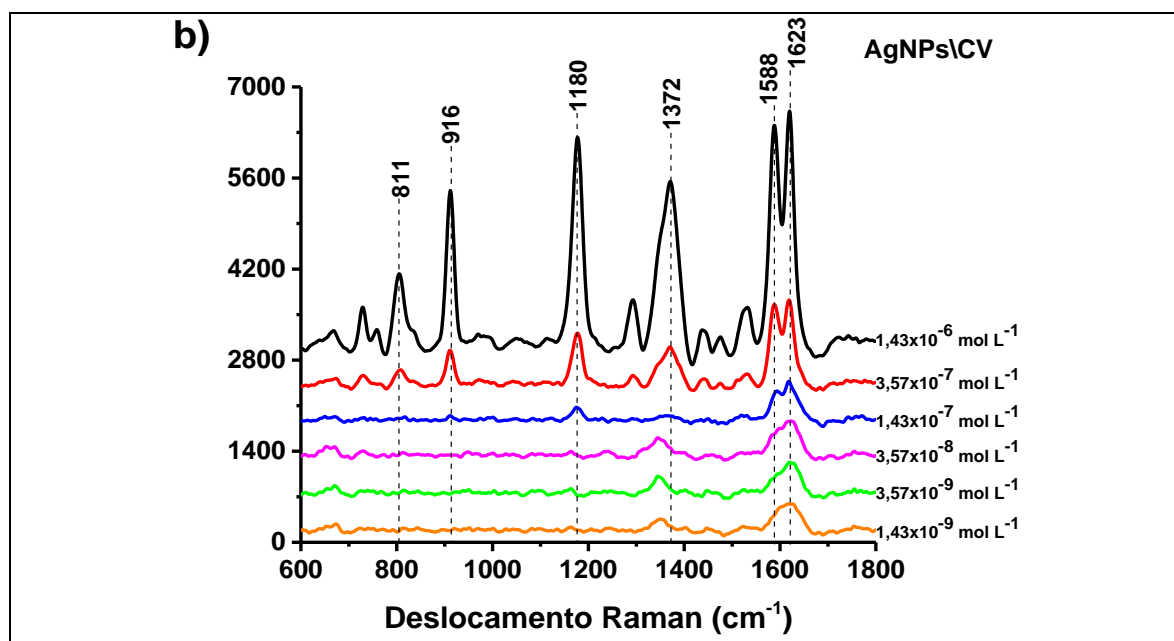
Como pode ser observado, na figura 36 o espectro de raios X dispersivos mostra os picos referentes à presença de prata, o que indica que houve a adsorção das nanoestruturas de prata sobre a superfície das fibras de seda do fragmento de casulo. A nanoestruturação da superfície das fibras de seda é fundamental para o desenvolvimento do substrato, pois criará as condições favoráveis para a observação do efeito de ressonância de plasmon de superfície localizada por meio da formação de “hot spots”, o que levará a um aumento da magnitude dos processos de espalhamento envolvidos (SANTOS; GRASSESCHI, 2020).

Com base na caracterização realizada, os substratos SERS foram desenvolvidos em duas condições de análise: a primeira com a adição prévia das nanoestruturas de Ag adsorvidas sobre o fragmento de casulo de seda seguido da adsorção de CV (denominado AgNPs/CV) e a segunda com a adsorção prévia de CV seguido da incorporação das nanopartículas de prata nesse conjunto (denominado CV/AgNPs).

A Figura 37 ilustra os espectros SERRS dos substratos CV/AgNPs e AgNPs/CV obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 1 s. Os espectros RR do CV sobre as fibras de seda não foram apresentados na Figura 37 devido à alta fluorescência gerada durante a aquisição dos espectros nas concentrações de estudo, o que também inviabilizou o cálculo do fator de intensificação dos substratos SERS e conseqüentemente as devidas comparações. Além disso, cabe ressaltar que diferentemente das Figuras 31(b) e 33(b), na Figura 37 (a-b) a aquisição dos espectros SERRS na concentração de $3,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ não foi possível de ser realizada devido a saturação do sinal Raman e, por isso, não foram apresentados.

Figura 37 – Espectros SERRS dos substratos CV/AgNPs (a) e espectros SERS das AgNPs/CV (b), obtidos na radiação excitante 532 nm e tempo de integração de 1 s.





Fonte: o próprio autor

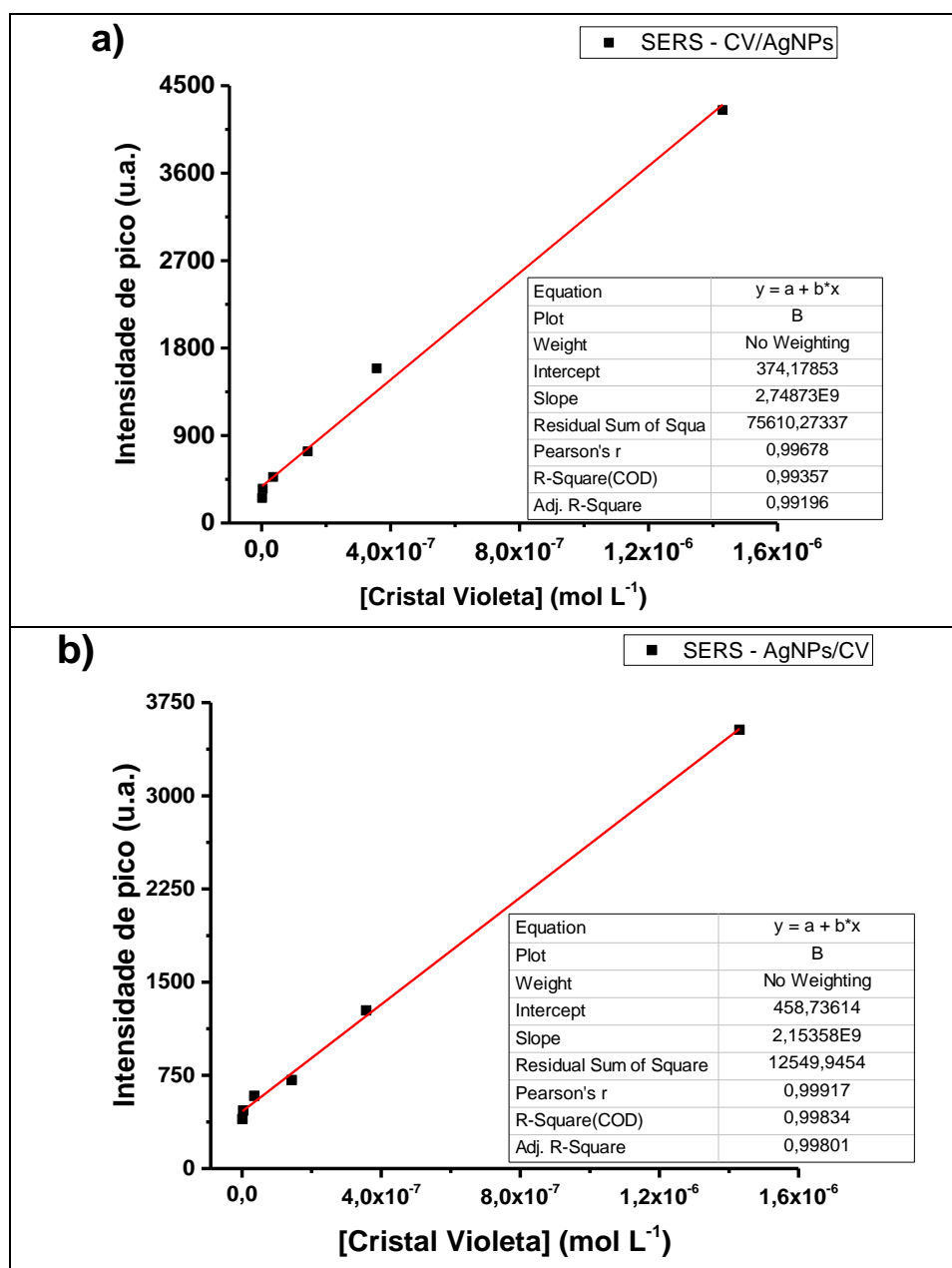
Na Figura 37(a) é apresentado o espectro SERRS do CV adsorvido sobre o substrato formado pela nanoestruturação de Ag sobre o fragmento de casulo de seda, denominado CV/AgNPs e, para efeito de comparação, o espectro SERRS com a adsorção prévia de CV seguido da incorporação das nanopartículas de prata nesse conjunto denominado CV/AgNPs (Fig. 38(b)). Como pode ser observado, os resultados apresentados mostram que independentemente de como é confeccionado o substrato, os espectros SERRS obtidos não apresentaram diferenças espectrais significativas. No entanto, foi observado um aumento significativo de intensidade principalmente da banda em 1588 cm^{-1} e das bandas em destaque, quando comparados com os espectros SERS do CV em colóide de prata obtidos em um tempo de integração de 1 s (Figura 33(b)).

Essa diferença de intensidade pode estar relacionada com a forma com que as nanoestruturas de Ag se apresentam adsorvidas sobre a superfície das fibras de seda o que restringe seu movimento e possibilita que a quantidade de sítios SERS-ativos (formação de “hot spots”) irradiados pela radiação laser excitante seja muito maior que a quantidade de sítios irradiados em colóide de prata, devido possivelmente à contribuição dos mecanismos eletromagnético (LSPR) e de transferência de carga (DING et al., 2016; LE RU; ETCHEGOIN, 2009; SANT’ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006; SANTOS et al., 2010). Poder-se-ia argumentar ainda que a maior intensidade SERS observada neste caso se deve a uma maior

concentração de dímeros de CV (OLIVEIRA, 2015).

Na Figura 39(a) e 39(b) são apresentados o gráfico do efeito da variação da concentração de CV em função da intensidade do pico da banda em 1623 cm^{-1} para os substratos CV/AgNPs e AgNPs/CV, respectivamente.

Figura 38 – Gráfico da variação das intensidades da banda em 1623 cm^{-1} em função da concentração de CV dos substratos SERS: CV/AgNPs (a) e AgNPs/CV (b), utilizando tempo de integração de 1 s.



Fonte: o próprio autor

Como Observado na Figura 38 (a e b), ambos os substratos SERS (CV/AgNPs e AgNPs/CV), apresentaram um modelo que se assemelha ao linear e um coeficiente de relação próximo de 1, com $R^2_{CV/AgNPs}=0,99357$ e $R^2_{AgNPs/CV}=0,99834$, respectivamente.

Estes resultados mostram que diferente do estudo SERS realizado em coloide de Ag, o estudo utilizando fragmentos de casulo de seda nanoestruturados com Ag como substrato SERS ativo, torna possível descrever de maneira simplificada a sensibilidade de uma curva utilizando um modelo linear. Segundo Skoog et al., (2006), a utilização desse modelo, além de permitir o emprego de um número menor de padrões e um procedimento de regressão linear, que geralmente apresenta maior simplicidade matemática, também torna mais fácil a detecção de uma resposta anômala do que a utilização de um modelo não-linear como os gráficos apresentados nas Figuras 31 e 33 o qual, por outro lado, exige o emprego de ampla faixa de padrões para se estabelecer a função de calibração, o que demandaria um grande número no preparo de padrões e uma maior complexidade matemática.

12 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados experimentais apresentados neste trabalho, as seguintes conclusões podem ser destacadas: o procedimento utilizado neste trabalho para a produção de nanoestruturas de prata mostrou ser um processo de fácil operação, relativamente rápido.

A caracterização das nanoestruturas de prata, por distribuição do tamanho de partículas do coloide de prata, mostrou que as nanoestruturas de Ag obtidas apresentam diâmetro médio de 110 nm.

O espectro no UV-vis do coloide de prata apresenta uma banda larga com o máximo de absorção em torno de 453 nm correspondente à absorção do plasmon, indicando a formação de nanopartículas anisotrópicas com distribuição de diâmetro relativamente ampla.

Com relação nanoestruturação das fibras de seda do fragmento de casulo (substratos CV/AgNPs e AgNPs/CV), ambos apresentaram a formação de agregados, os quais são importantes para investigações SERS, pois os maiores fatores de intensificação Raman são observados para moléculas adsorvidas nas regiões de fronteira entre nanopartículas agregadas, os denominados “hot spots”.

Os substratos mostraram-se eficientes, uma vez que os espectros SERRS obtidos de CV adsorvido no substrato CV/AgNPs e AgNPs/CV foram mais intensos que os espectros SERS obtidos de CV em coloide de Ag, mostrando-se um ótimo substrato SERS-ativo.

Por fim, pode-se destacar que os substratos desenvolvidos, a partir de fragmentos de casulo de seda nanoestruturados com prata, mostraram-se promissores para análises de investigação qualitativas e até quantitativas de CV em nível traço, uma vez que mostrou-se uma tendência de correlação linear entre intensidade das bandas da molécula sonda e concentração das mesmas, por Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície, o que nos leva a acreditar que o mesmo tem potencial para ser aplicado em diversas áreas da química.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 99, n. 15, p. 5215-5217, 1977.
- ALVES, R. S. **Highly-branched silver magnetic microcomposite as sers substrate for Cardiac troponin i detection**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.
- ANGELONI, L.; SMULEVICH, G.; MARZOCCHI, M. P. Resonance Raman Spectrum of Crystal Violet. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 8, n. 6, p. 305-310. 1979.
- ASHER, S. A. UV resonance Raman spectroscopy for analytical, physical, and biophysical chemistry. Part 1. **Anal. Chem.**, v. 65, n. 2, p. 59A-66A, 1993.
- BELL, S. E. J.; STEWART, A. Quantitative SERS Methods. *In*: SCHLÜCKER, S. **Surface Enhanced Raman Spectroscopy**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010: pp. 71–86.
- BROWNE, W. R. Resonance Raman spectroscopy and its application in bioinorganic chemistry. *In*: CRICHTON R. R.; LOURO, R. O. **Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry**. 2 ed. Amsterdã: Elsevier, 2020, p. 275-324.
- BUMBRAH, G. S.; SHARMA, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 6, n. 3, p. 209-215, 2016.
- CAMPION, A.; KAMBHAMPATI, P. Surface-enhanced Raman scattering. **Chem. Soc. Rev.**, v. 27, p. 241-250, 1998.
- CAÑAMARES, M. V.; CHENAL, C.; BIRKE, R. L.; LOMBARDI, J. R. DFT, SERS, and single-molecule SERS of crystal violet. **J. Phys. Chem. C.**, v. 112, n. 51, p. 20295–20300, 2008.
- CHERIAA, J.; KHAIREDDINE, M.; ROUABHIA, M.; BAKHROUF, A. Removal of Triphenylmethane Dyes by Bacterial Consortium. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- COSTA, J. C. S. **Desenvolvimento de sensores nanoestruturados para análises químicas por meio de técnicas espectroscópicas**. 2012. Tese (Doutor em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2**, v. 75, p. 790-798, 1979.
- DADOSH, T.; SPERLING, J.; BRYANT, G. W.; BRESLOW, R.; SHEGAI, T.; DYSHEL, M.; HARAN, G.; BAR-JOSEPH, I. Plasmonic control of the shape of the Raman spectrum of a single molecule in a silver nanoparticle dimer. **ACS Nano**, v. 3, n. 7, p. 1988–1994, 2009.

DING, S.-Y.; YI, J.; LI, J.-F.; REN, B.; WU, D.-Y.; PANNEERSELVAM, R.; TIAN, Z.-Q. Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 16021, p. 1-16, 2016.

EFREMOV, E. V.; ARIESE, F.; GOOIJER, C. Achievements in resonance Raman spectroscopy Review of a technique with a distinct analytical chemistry potential. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 119-134, 2008.

ELLIS, D. I.; COWCHER, D. P.; ASHTON, L.; O'HAGAN, S.; GOODACRE, R. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. **Analyst**, v. 138, p. 3871-3884, 2013.

FAN, M.; ANDRADE, G.F.S.; BROLO, A.G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. **Anal. Chim. Acta.**, v. 693, n. 1-2, p. 7-25, 2011.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: Repetindo o experimento de Raman. **Quim. Nova**, v. 20, n. 3, p. 319-323, 1997.

FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Quim. Nova**, v. 22, n. 4, p. 541-552, 1999.

FATEIXA, S.; NOGUEIRA, H. I. S; TRINDADE, T. Surface-Enhanced Raman Scattering Spectral Imaging for the Attomolar Range Detection of Crystal Violet in Contaminated Water. **ACS Omega**, v. 3, n. 4, p. 4331-4341, apr. 2018.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163-166, 1974.

FREDERICCI, C; FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, M. C. B.; PINTO, N. S. Aplicação da espectroscopia Raman na identificação de minerais asbestiformes. **Revista IPT: Tecnologia e Inovação**, v. 1, n.1, p.13-20, 2016. Disponível em: <http://revista.ipt.br/index.php/revistaIPT/article/view/14/5>. Acesso em: 26 nov. 2019.

GHANADZADEH, A.; ZEINI, A.; KASHEF, A. Environment effect on the electronic absorption spectra of crystal violet. **Journal of Molecular Liquids**. v. 133, n. 1-3, p. 61-67, mar. 2007.

HAKONEN, A.; ANDERSSON, P.O.; STENBÆK SCHMIDT, M.; RINDZEVICIUS, T.; KÄLL, M. Explosive and chemical threat detection by surface-enhanced Raman scattering: A review, **Anal. Chim. Acta**, v. 893, n. 17, p. 1-13, 2015.

HARRAZ, F. A.; ISMAIL, A. A.; BOUZID, H.; AL-SAYARI, S. A.; AL-HAJRY, A.; AL-ASSIRI, M. S. Surface-enhanced Raman scattering (SERS)-active substrates from silver plated-porous silicon for detection of crystal violet. **Applied Surface Science**, v. 331, p. 241-247, mar. 2015.

JEANMAIRE, D. L.; DUYNE, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial**

Electrochemistry, v. 84, n. 1, p. 1-20, 1977.

JOHN, N.; GEORGE, S. Raman Spectroscopy. *In*: THOMAS, S.; THOMAS R.; ZACHARIAH. A. K.; MISHRA, R. K. **Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization**. Amsterdã: Elsevier, 2017, p. 95-127.

KAFLE, B. P. Raman spectroscopy. *In*: KAFLE, B. P. **Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry**. Amsterdã: Elsevier, 2020, p. 245-268.

KLEINMAN, S. L.; FRONTIERA, R. R.; HENRY, A.-I.; DIERINGER, J. A.; VAN DUYN, R. P. Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 1, p.21–36, 2013.

LE RU, E. C.; BLACKIE, E.; MEYER, M; ETCHEGOIN, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. **J. Phys. Chem. C**, v. 111, n. 37, p. 13794-13803, 2007.

LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. A quick overview of surface-enhanced Raman spectroscopy. *In*: LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**, Amsterdã: Elsevier Science, 2009, p. 1-27.

LEE, C. H.; TIAN, L.; SINGAMANENI, S. Paper-Based SERS Swab for Rapid Trace Detection on Real-World Surfaces. **Appl. Mater. Interfaces**, v. 2, n. 12, p. 3429-3435, 2010.

LEE, P. C. MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. **J. Phys. Chem.**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982.

LIN, X.-M.; CUI, Y.; XU, Y. H.; REN, B.; TIAN, Z. Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: Substrate-related issues. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 394, n. 7, p. 1729–1745, 2009.

LINK, S., EL-SAYED, M.A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. **International Reviews in Physical Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 409-453, 2000.

MAO, A.; JIN, X.; GU, X.; WEI, X. YANG, G. Rapid, green synthesis and surface-enhanced Raman scattering effect of single-crystal silver nanocubes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1021, p. 158-161. aug. 2012.

MEYER, S. A.; LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. Quantifying Resonant Raman Cross Sections with SERS. **J. Phys. Chem. A**, v. 114, n. 17 p. 5515-5519, 2010.

MITSUTAKE, H.; POPPIA, R. J.; BREITKREITZ, M. C. Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 11, p. 2243-2258, 2019.

MOSKOVITS, M. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. **J. Chem. Phys.**, v. 69, n. 9, p. 4159-4161, 1978.

NEVES, T. B. V. **SHINERS e SHINEF: Uma nova proposta de intensificação do**

sinhal Raman e fluorescência. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

OLIVEIRA, K. V. **Desenvolvimento de Substrato para Uso com Efeito Raman Intensificado por Superfície (SERS – Surface-Enhanced Raman Scattering) e Aplicações para Compostos Modelo.** 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

OLIVEIRA, K. V.; RUBIM, J. C. Surface-enhanced Raman spectroscopy of molecules adsorbed on silver nanoparticles dispersed on agarose gel and their adsorption isotherms. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 290–301, sept. 2016.

PACHECO, L. H. **Desenvolvimento de um sistema contendo nanopartículas de ouro dispersas em material graxo e sua aplicação em espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) para Avaliação de moléculas orgânicas sulfuradas.** 2017. Tese (Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro.** 2009. Dissertação (Mestrado em Física) -Universidade Federal do Rio Grando do Sul, Porto Alegre, 2009.

PEREIRA, M. P. **Desenvolvimento de substratos SERS para detecção de poluentes ambientais emergentes.** 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

PERSAUD, I.; GROSSMAN, W. E. L. Surface-Enhanced Raman Scattering of Triphenylmethane Dyes on Colloidal Silver. **J. Raman Spectrosc.**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 1993.

PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?. **J. Phys. Chem. B**, v. 108, n. 3, p. 945-951, 2004.

PILOT, R.; SIGNORINI, R.; DURANTE, C.; ORIAN, L.; BHAMIDIPATI, M; FABRIS, L. A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. **Biosensors**, v. 9, n. 5, p. 1-99, 2019

RODRIGUES, A. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, 4309, 2012.

RODRIGUES, D. C. **Efeito da geometria de nanoestruturas de ouro na intensificação do espalhamento Raman.** 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ROUCOUX, A.; SCHULZ, J.; PATIN, H. Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts? **Chem. Rev.**, v. 102, n. 10, p. 3757-3778, 2002.

SALA, O. **Intensificação do espalhamento Raman por ressonância e por superfície: princípios e aplicações.** 1986. Tese (Doutorado de Livre-Docência) -

Universidade Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. L. A. O efeito SERS na análise de traços: O papel das superfícies nanoestruturadas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 805-810, 2006.

SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M.; CORIO, P.; EL HABER, F.; LOUARN, G. Preparação E Caracterização de Substratos SERS Ativos: um Estudo da Adsorção do Cristal Violeta Sobre Nanopartículas de Prata. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 194-199, 2006.

SANTOS, D. P.; ANDRADE, G. F. S.; SANT'ANA, A. C.; TEMPERINI, M. L. A. Produção de substratos SERS eficientes através da deposição de ouro sobre um molde de microesferas de poliestireno. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2093-2097, 2010.

SANTOS, D. P.; GRASSESCHIB, D. Nanomateriais plasmônicos: Parte II. química de coordenação de superfície e sua aplicação em sensores e catalisadores. **Quim. Nova**, v. 43, n. 10, p. 1482-1499, 2020.

SILVA, T. L.; ARAUJO, F. P.; FILHO, E. C. S.; FURTINI, M. B.; OSAJIMA, J. A. Degradation of Poly(Ethylene Oxide) Films Using Crystal Violet. **Materials Research**, v. 20, p. 869-872, 2017.

SKOOG, D. A; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed., São Paulo: Thomson, 2006.

SMITH, W. E.; RODGER, C. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), Applications. *In*: LINDON, J. C. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**, Cambridge: Academic Press, 1999, p. 2329-2334.

SOUZA, M. A. **Desenvolvimento de um método analítico para a detecção de metanfetamina utilizando Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SUR, U. K. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *In*: MAAZ, K. **Raman Spectroscopy and Applications**, London: Intech Open, 2017, p. 293-312.

SUR, U. K. Surface-enhanced Raman spectroscopy. **Resonance**, v. 15, n. 2, p. 154-164, 2010.

TEMPERINI, M. L. A. **Alguns aspectos da espectroscopia Raman ressonante**. 1977. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

VIANNA, P. G. **Nanocompósito de óxido de grafeno e nanopartículas metálicas para espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2017.

VILLA, J. E. L. **Aplicações bioanalíticas da espectroscopia Raman intensificada por superfície utilizando papel como Substrato**. 2018. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

WAN, Y.; GUO, Z.; JIANG, X.; FANG, K.; LU, X.; ZHANG, Y.; GU, N. Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 263-268, 2013.

WEI, W.; HUANG, Q. Preparation of cellophane-based substrate and its SERS performance on the detection of CV and acetamiprid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, n. 15, p. 8-13, 2018.

WILLETS, K.; MAYER, K. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) as a characterization method for metal-organic interactions. *In*: OSTROVERKHOVA, O. **Handbook of Organic Materials for Electronic and Photonic Devices**, 2 ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019, p. 421-441.

XIA, Y.; HALAS, N. J. Shape-Controlled Synthesis and Surface Plasmonic Properties of Metallic Nanostructures. **MRS Bulletin (Synthesis and Plasmonic Properties of Nanostructures)**, v. 30, n. 5, p. 338-348, 2005.

ZHENG, G.; POLAVARAPU, L.; LIZ-MARZÁN, L. M.; PASTORIZA-SANTOS, I.; PÉREZ-JUSTE, J. Gold nanoparticle-loaded filter paper: a recyclable dip-catalyst for real-time reaction monitoring by surface enhanced Raman scattering. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 22, p. 4572-4575, 2015.

ZRIMSEK, A. B.; HENRY, A.; VAN DUYNE, R. P. Single molecule surface-enhanced Raman spectroscopy without nanogaps, **J. Phys. Chem. Lett.**, v. 4, 19, p. 3206–3210, 2013.

ZHU, K.; HONG, Z.; KANG, S-Z.; QIN, L.; LI, G.; LI, X. Assembly of potassium niobate nanosheets/silver oxide composite films with good SERS performance towards Crystal violet detection. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 115, p. 69–74, 2018.

ANEXOS

Artigo Publicado Durante o Mestrado

ANEXO A - Artigo publicado durante o Mestrado



<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170413>

Quim. Nova, Vol. 42, No. 9, 1014-1019, 2019

Artigo

IMPACT OF TEMPERATURE ON THE STABILITY OF SILKWORM COCOON FIBERS

Bruno Luís Sacco^a and Henrique de Santana^{*a, b}

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990 Londrina – PR, Brasil

Recebido em 16/02/2019; aceito em 12/06/2019; publicado na web em 18/09/2019

In this study raw and processed silkworm (*Bombyx mori*) cocoons were investigated using confocal Raman spectroscopy in conjunction with differential scanning calorimetry (DSC) in order to examine the effect of temperature on the molecular conformation of silk fiber structures. Using DSC, a broad endothermic curve was observed at moderate temperatures, shedding light on the vaporization of both raw and processed cocoons, a phenomenon that could also indicate a strong interaction between silk fibroin and water molecules. Over the temperature range set for this study, Raman spectra of raw and processed cocoons were compared at different excitation radiations after drying both kinds of cocoon in an oven at 80 and 125 °C for 60 minutes. By correlating the intensity ratios of the deconvoluted Raman bands using the broad bands characteristic of amide I and III, it was possible to evaluate the conformational changes in both materials. At excitation radiation of 532 nm, the deconvoluted Raman spectra for the amide III band indicated that, for both samples, there was a reduction in β -sheet conformation compared to α -helix conformation, and this structural disruption was driven by increased temperature. At radiation of 785 nm, the bands attributed to amino acid residues in the side chains increased in intensity, and by deconvoluting the amide I band, increased temperature was found to induce a transition from β -sheets to β -turns in both materials.

Keywords: silk fibroin; Raman spectroscopy; *Bombyx mori*; silkworm cocoons; molecular conformation.

INTRODUCTION

The larvae of *Bombyx mori* (*B. mori*) are responsible for a significant portion of the global production of silk,¹ a material used mainly in the textile industry.² The silkworm cocoon comprises two proteins: 70-80% silk fibroin (SF) and 30-20% sericin, with residual contaminating fractions of 1-2%, including waxes and ash, pigments, sugars and other impurities.^{3,4} Sericin is a hydrophilic protein² unifying and enwrapping the SF filaments to form the cocoon structure.^{5,6} SF is a hydrophobic bipolymer,³ comprising two highly organized regions: the crystalline part providing mechanical strength and the amorphous part conferring elasticity and flexibility.^{7,8}

The primary structure of the silk fibers is made up of a sequence of amino acids that form the polypeptide chain, determining the shapes that these chains assume.⁹ The intermolecular structures are formed by hydrogen bonds in a sheet-like array.¹⁰ The conformation of the polypeptide chains are further elucidated in the work of Lefèvre, *et al.*,¹¹ who used polarized Raman microspectroscopy to show the molecular organization of the silk produced by *B. mori*, with a combination of different quantities of β -sheets and flexible structures (β -turns and α -helical structures).

A study of the structural stability of these materials is warranted since the silk filament industrialization process is multi-stage, and some stages involve subjecting the cocoon to moderately high temperatures. One of these stages is cocoon drying prior to the transformation of the pupae into moths, conserving filament quality. Drying begins at a temperature of 125 to 130 °C, interrupting the life cycle of the living pupae inside the raw cocoon. Drying sessions vary in terms of temperature, which is gradually lowered as the process continues. The drying time is between 6 and 7 hours and the final temperature is around 40 °C. After drying, the cocoons are stored for at least two weeks to allow the sericin to completely stabilize. In the processing stage, the cocoons are pressure-cooked in hot water

to soften the sericin gum, facilitating the unwinding operation and improving the shine and texture of the fabric.²

This study investigates the effect of temperature on the structural organization of raw and processed cocoons, with the aim of better understanding the properties of this material. Thermal analysis and Raman spectroscopy resources were used to characterize the arrangement of the segments in the polypeptide-generating matrices forming the cocoon. The results show that temperature plays a crucial role in determining the nature of SF secondary structures.

EXPERIMENTAL

Materials

The cocoons of the silkworm (*B. mori*) used in this study were supplied by Empresa Bratac de Fiação de Seda, based in Londrina, Paraná State, Brazil.

Cocoon classification

The cocoon samples were initially classified as raw cocoons, prior to any heat treatment, and processed cocoons, after heat treatment in drying ovens. Raw and processed cocoons were subsequently cut into 0.5 x 0.5 cm pieces using stainless steel scissors.

Cocoon oven drying

Once the cocoons had been classified, they were subjected to two different drying programs in an oven (FANEN, Modelo 3015 SE), at 80 and 125 °C for 60 minutes. After cooling to ambient temperature, the samples obtained were designated 'treated raw cocoons' and 'treated processed cocoons'.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry was used on cocoon fragments

*e-mail: hensan@uel.br

Currículo Vitae

Bruno Luís Sacco

23/12/1987, 33 anos

Jardim Ibirapuera - Limeira-SP – **Disponível para mudança**

Telefone para contato: (19) 3495-1952 / **Celular:** (19) 98163-5399

E-mail: bruno.quimicabac@gmail.com

LinkedIn: <https://www.linkedin.com/in/brunoluissacco/>

OBJETIVO

Químico

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química – Área: Físico-Química, Universidade Estadual de Londrina – 2021

Graduação em **Química com habilitação em tecnológica e habilitação em Licenciatura**, Universidade Estadual de Londrina – 2018

Especialização em Materiais Metálicos - COTUCA - Campinas-SP – 2009

Curso Técnico em Metalurgia - ETEC Trajano Camargo - Limeira-SP – 2008

Curso Técnico em Química - ETEC Trajano Camargo - Limeira-SP – 2007

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Arvin Meritor (Maxion Wheels) – 06/2007 – 12/2008

Cargo: Estagiário em Metalurgia/ Química

- Responsável por preparar os equipamentos e utensílios de laboratório para utilização
- Manipulação de soluções químicas e reagentes
- Realização de coleta de amostras da matéria prima e produto durante o processo produtivo
- Realização de ensaios de preparação de amostras para ensaios metalográficos (micrografia e macrografia) para análise de Microestruturas
- Realização de Ensaios Mecânicos (tração, dobramento, rigidez, dureza dos materiais) de acordo com os padrões técnicos estabelecidos
- Elaboração de relatórios e registro dos dados conforme estabelecidos
- Execução das atividades laboratoriais de acordo com as Boas Prática de Laboratório operando instrumentos e equipamentos do laboratório

Álcool Ferreira S/A - 11/2006 – 05/2007

Cargo: Estagiário em Química

- Realização de análise de produtos através de ensaios Físico-químicos de acordo com a metodologia visando a garantia da qualidade do produto
- Execução de análises no recebimento do produto
- Realização dos registros e arquivamento das análises conforme estabelecidos
- Execução das atividades laboratoriais de acordo com as Boas Prática de Laboratório operando instrumentos e equipamentos do laboratório
- Manipulação de soluções químicas e reagentes
- Realização de manutenção industrial e/ou dentro da área durante a entressafra
- Acompanhamento e tratamento da água de uso operacional e consumo humano

CURSOS E QUALIFICAÇÕES

- Entendendo a Responsabilidade Técnica – CFQ, 2021;
- Eletroquímica Ambiental – UFSCar - São Carlos-SP, 2021;
- O que é revelado quando a luz é desviada por uma amostra? – UFSCar - São Carlos-SP -2021;
- Conhecendo SAP - 2021;
- Curso Teórico-Prático de Síntese e Caracterização de Nanomateriais – UFSCar - São Carlos-SP -2014;
- Fundamental Photoluminescence Spectroscopy - UFSCar - São Carlos-SP - 2014;
- Biossensores – 2013;
- Estratégia de planejamento em síntese orgânica: uma abrangência teórico-prática de compostos ativos inéditos – UEL – Londrina-PR – 2013;
- RMN Aplicado a Materiais – UEL – Londrina-PR – 2012;
- Pacote Office – Limeira–SP – 2000.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

- Inglês: Conversação – Básico / Leitura – Intermediário;
- Espanhol: Conversação e leitura – Básico;
- Trabalho voluntário
Colaborador e Membro da comissão organizadora da VI Feira das Profissões: Conhecendo a UEL, 2017;
Junior Achievement - São Paulo-SP como Palestrante, 2008;
- CRQ Ativo;
- Conhecimento do Software Origin;
- Conhecimento do Sistema 5S;
- CNH A/B.