



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA - CCEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE MATERIAIS - PGMTR

CALISA CAROLINA DA SILVA DIAS DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ PELA COMPLEXAÇÃO COM Eu³⁺

Recife

2018

CALISA CAROLINA DA SILVA DIAS DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ PELA COMPLEXAÇÃO COM Eu³⁺

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências de Materiais da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Químico-
Física e Espectroscopia.

Orientador: Profº. Dr. Antonio Carlos Pavão

Orientador Externo: Profº. Dr. Luciano de Azevedo Soares Neto

Co-orientador: Profº. Dr. Severino Alves Júnior

Recife

2018

Catalogação na fonte
Bibliotecária Elaine Freitas CRB4-1790

O48i

Oliveira, Calisa Carolina da Silva Dias de
Identificação de aflatoxina B1 pela complexação com Eu3+ / Calisa
Carolina da Silva Dias de Oliveira . – 2018.

76f.

Orientador: Antonio Carlos Pavão
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN.
Ciência de materiais. Recife, 2018.
Inclui referências.

1. Espectroscopia. 2. Aflatoxina B1. 3. Európio. 4. Fotoluminescência. I.
Pavão, Antonio Carlos. (Orientador). II. Título

537.535 2

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2018-68

CALISA CAROLINA DIAS

IDENTIFICAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ PELA COMPLEXAÇÃO COM Eu³⁺

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências de Materiais da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre.

Data da aprovação: 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr. Antonio Carlos Pavão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a Dr. João Bosco Paraiso da Silva (Examinador
Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Leonis Lourenço da Luz (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

“...The more you know, the harder you will find it. To make up your mind, it doesn't really matter if you find...”

(MINCHIN, T., 2010)

RESUMO

Neste trabalho realizamos estudo computacional e experimental com a Aflatoxina B₁ (AFB₁), substância extremamente tóxica e carcinogênica produzida por diversos tipos de fungos, principalmente o *Aspergillus Flavus* e o *Aspergillus Parasiticus* que se reproduzem com facilidade em ambientes quentes e úmidos. A AFB₁ é diretamente relacionada com a formação do hepatocarcinoma em humanos e animais. Os métodos para detecção de Aflatoxinas em alimentos são dispendiosos e demandam esforço experimental, requerendo mão de obra especializada. A contaminação de alimentos por Aflatoxinas se constituem atualmente em um sério problema de saúde pública no Brasil e em diversos países. Além do estudo computacional fazendo uso de métodos de cálculo de Mecânica Molecular e de Química Quântica, realizamos também etapas experimentais fazendo uso de técnicas espectroscópicas com a finalidade de investigar uma possível interação entre o Európio e a molécula da Aflatoxina B1 que possa justificar a construção de um sensor para identificação dessa substância. Um dos sistemas estudados contendo o complexo de Európio confirma a sensibilidade necessária para identificar a AFB₁, porém exibindo um novo perfil espectral. Diante disso, os resultados do trabalho vislumbram a possibilidade da construção de um sensor químico ótico possuindo como componentes básicos: AFB₁ → HIB-BTC/ DAMIC → Luminescência → Resposta, análogo à Analito → Receptor → Transdução → Sinal Elétrico

Palavras-Chave: Aflatoxina B₁. Európio. Fotoluminescência. Segurança Alimentar.

ABSTRACT

In this work we performed a computational and experimental study with Aflatoxin B₁ (AFB₁), an extremely toxic and carcinogenic substance produced by several types of fungi, mainly *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Parasiticus*, which reproduce easily in hot and humid environments. AFB₁ is directly related to the formation of hepatocarcinoma in humans and animals. Methods for the detection of Aflatoxins in food are expensive and require experimental effort, requiring specialized labor. Food contamination by Aflatoxins is currently a serious public health problem in Brazil and in several countries. In addition to the computational study using computational methods of Molecular Mechanics and Quantum Chemistry, we also performed experimental steps using spectroscopic techniques to investigate a possible interaction between Europium and the Aflatoxin B₁ molecule that may justify the construction of a sensor to identify this substance. One of the studied systems containing the Europium complex confirms the sensitivity needed to identify AFB₁, but exhibiting a new spectral profile. Thus, the results of the work envisage the possibility of the construction of an optical chemical sensor having as basic components: AFB₁ → HIB-BTC/DAMIC → Luminescence → Response, analogous to Analyte → Receptor → Transduction → Electrical Signal.

Keywords: Aflatoxin B₁. Europium. Photoluminescence. Food Safety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - AGRADECIMENTOS DO BLOUNT EM SEU ARTIGO TURKEY "X" DISEASE..	16
FIGURA 2 - PROSPECÇÃO HISTÓRICA DA EVOLUÇÃO CIENTIFICA SOBRE AFB1	17
FIGURA 3 - FRUTIFICAÇÃO CARACTERÍSTICA DE UMA COLÔNIA DE A. FLAVUS, EM MEIO DE SABOURAUD.	21
FIGURA 4 - ETAPAS DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DA AFB ₁ QUE LEVAM A COMPOSTOS DISTINTOS, A CONJUGAÇÃO DE GST E AFB ₁ - 8,9 DIHIDRODIOL.	22
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS AFB ₁ -B -FAPY E AFB ₁ - A- FAPY, RESPECTIVAMENTE.	23
FIGURA 6 - (A)ESQUEMA DE TESTE EM FLUXO-LATERAL OU IMUNOCROMATOGRAFIA, (B). RESPOSTA NEGATIVA, (C). RESPOSTA POSITIVA.	24
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE LIMITES DE DETECÇÃO DOS MÉTODOS USUALMENTE EMPREGADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AFB ₁	25
FIGURA 8 - ETAPAS DO PROCESSO DE EMISSÃO FLUORESCENTE MEDIANTE A COMPLEXAÇÃO DE UM LIGANTE (CONTENDO UM GRUPO CROMÓFORO) AO ÍON EU ³⁺ ATRAVÉS DE TRANSIÇÕES INTRAMOLECULARES.....	28
FIGURA 9 - EFEITO ANTENA.	29
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DO HIB-BTC (A) E HIB-DAMIC (B).....	36
FIGURA 11 - AFB ₁ COM ENUMERAÇÃO ARBITRÁRIA ATRIBUÍDA COMPUTACIONALMENTE PELO SOFTWARE.....	40
FIGURA 12 - COMPOSTOS OTIMIZADOS, (1,2,3 AFB ₁) LIGANTES AO METAL, COM AS DISTINTAS MATRIZES À DIREITA DAMIC E A ESQUERDA BTC.	41
FIGURA 13 - ESPECTROS TEÓRICOS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS A)HIB-BTC- AFB ₁ , B) HIB-DAMIC-AFB ₁ E C) AFB ₁	43
FIGURA 14 - ESPECTRO RAMAN DA AFB ₁ AMPLIADO NA REGIÃO DE INTERESSE.	44
FIGURA 15 - ESPECTRO UV/VIS DE SOLUÇÃO METANÓLICA DE AFB ₁	45
FIGURA 16 - ESPECTRO DE FTIR DA AFB ₁ (A) E AMPLIAÇÃO (B).	46
FIGURA 17 - ESPECTROS FTIR HIB-BTC (B) E HIB-DAMIC (A).	47
FIGURA 18 - MICROGRAFIA DO HIB-DAMIC.....	49
FIGURA 19 - MICROGRAFIA DO HIB-BTC.....	50
FIGURA 20 - ESPECTROS DAS MATRIZES A) HIB-DAMIC E B) HIB-BTC COM 5DP (CINCO DEPOSIÇÕES) DE CADA MATRIZ E DA MATRIZ COM AFB ₁	51
FIGURA 21 - ESPECTROS DAS MATRIZES A) HIB-DAMIC E B) HIB-BTC COM 10DP (DEZ DEPOSIÇÕES) DE CADA MATRIZ E DA MATRIZ COM AFB ₁	52
FIGURA 22 - ESPECTROS DE EMISSÃO DO HIB-BTC (A) E HIB-DAMIC (B).....	53
FIGURA 23 - ESPECTRO DE LUMINESCÊNCIA DA MATRIZ, HIB-BTC, APÓS ADIÇÃO DE 7,9ML DE SOLUÇÕES METANÓLICAS DE AFB ₁ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. A AMPLIAÇÃO CORRESPONDE A REGIÃO TÍPICA DA TRANSIÇÃO ⁵ D ₀ → ⁷ F ₀	54
FIGURA 24 - ESPECTRO DE LUMINESCÊNCIA DA MATRIZ, HIB-DAMIC, APÓS ADIÇÃO DE 7,9ML DE SOLUÇÕES METANÓLICAS DE AFB ₁ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. A AMPLIAÇÃO CORRESPONDE A REGIÃO TÍPICA DA TRANSIÇÃO ⁵ D ₀ → ⁷ F ₀	55

FIGURA 25 - ESPECTROS DE LUMINESCÊNCIA COM AS CONCENTRAÇÕES SATURADAS DE 15 PPB E 20 PPB DA AFB ₁ , A) HIB-BTC E B) HIB-DAMIC.....	56
FIGURA 26 - RAZÃO DAS ÁREAS INTEGRADAS, BASEADAS NO ESPECTRO EXPERIMENTAL, CALCULADA PELO LUMPAC.	57
FIGURA 27 - RELAÇÃO ENTRE A LOG [I] E A QUANTIDADE DE AFB ₁ , EM AZUL HIB-BTC E EM VERMELHO HIB-DAMIC.	57
FIGURA 28 - ESPECTRO DE LUMINESCÊNCIA DA MATRIZ, HIB-BTC 25% DA CONCENTRAÇÃO ORIGINAL, COM A CONCENTRAÇÃO SATURADA 20 PPB DA AFB ₁ COM $\lambda_{EXC} = 288$ NM.....	58
FIGURA 29 - ESPECTROS DE EMISSÃO HIB-DAMIC, $\lambda_{EXC} = 324$ NM. O ESPECTRO A) COM <i>LABEL</i> DE CONCENTRAÇÕES EM PPB É A CONDIÇÃO 1 DOS ENSAIOS DE DETECÇÃO, O ESPECTRO B) COM O <i>LABEL</i> DE CONCENTRAÇÕES EM DP É A CONDIÇÃO 2 DOS ENSAIOS DE DETECÇÃO.	59
FIGURA 30 - TEMPO DE VIDA COM AJUSTE BIEXPONENCIAL PARA HIB-BTC-AFB ₁	60
FIGURA 31 - TEMPO DE VIDA COM AJUSTE BIEXPONENCIAL PARA HIB-BTC-AFB ₁	61
FIGURA 32 - TEMPO DE VIDA COM AJUSTE MONOEXPONENCIAL PARA HIB-BTC-AFB ₁	61
FIGURA 33 - TEMPO DE VIDA COM AJUSTE MONOEXPONENCIAL PARA HIB-BTC-AFB ₁	62
FIGURA 34 - PERFIL FOTOLUMINESCENTE DA AFB ₁	63
FIGURA 35 - ESPECTROS DE EXCITAÇÃO DA MATRIZ: A) HIB-DAMIC DA MATRIZ COM AS CONCENTRAÇÕES DE B) 1PPB E C) 20PPB DA AFB ₁	65
FIGURA 36 - ESPECTROS DE EXCITAÇÃO DA MATRIZ A) HIB-BTC, O ESPECTRO EXCITAÇÃO COM A ADIÇÃO DE B) 5PPB, C) 10PPB D) ATÉ 20 PPB DE AFB ₁	67
FIGURA 37 - ESPECTROS DE EXCITAÇÃO UTILIZANDO HIB-BTC COM 25% E UMA DEPOSIÇÃO (7,69UL) COM 20 PPB DA AFB ₁	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOFTWARES UTILIZADOS	36
TABELA 2 - SOLVENTE E REAGENTE UTILIZADOS NA PRÁTICA EXPERIMENTAL	37
TABELA 3 - INSTRUMENTOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO	37
TABELA 4 - PESO E FÓRMULA MOLECULAR DOS COMPOSTOS PROPOSTOS	40

LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SIGLAS

AFB₁ - Aflatoxina B₁ (C₁₇H₁₂O₆). - (6aR,9aS)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[c]furo-(3',2':4,5)furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione.

AFG₁ - Aflatoxina G₁ (C₁₇H₁₂O₇). - (7aR,10aS)-3,4,7a,10a-Tetrahydro-5-methoxy-1H,12Hfuro-[3',2':4,5]furo[2,3-h]pyrano[3,4-c][l]benzopyran-1,12-dione.

AFM₁ - Aflatoxina M₁ (C₁₇H₁₂O₇). - (6aR,9aR)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento

Conídio - Esporo Assexuado

CYP - Abreviação Citocromo

dc-ELISA - Ensaio competitivo direto

DFT - Método Funcional de Densidade

Didymia - Mistura de óxidos metais de Pr-Gd

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Esterigma, pl. Sterigmata - Estruturas de suporte dos esporos nas frutificações comuns no gênero *Aspergillus*.

Fônons - Energia Vibracional Quantizada

GEA - *Gradient Expansion Approximation*

GGA - *Generalized Gradient Approximation*

GST - Glutatиона

HBsAg - Antígeno da Hepatite

Hep G2 - Células epiteliais de tecido hepático induzido a um carcinoma Hepatocelular.

Hepteno - Antígeno conjugado a moléculas carreadoras (Proteínas)

HF - Hartree-Fock

HPLC/CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IARC - International Agency for Research on Cancer

ic-ELISA - Ensaio competitivo indireto

INB - Indústrias Nucleares do Brasil

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas

LMORF - *Luminescent Metal Organic Framework*

Ln - Lantanídeos

LSDA - *Local spin-Density Approximation*

MIP - Molecularly-Imprinted Polymer

NADPH - Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

PI - Potencial Ionizante

P₄₅₀ - Pico máximo de absorção da hemoproteína monooxigenases em 450 nm

TFD - Thomas-Fermi-Dirac

TLV - Teoria da Ligação de Valência

μ - Momento dipolo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO	16
2.1	Histórico das Aflatoxinas	16
2.1.1	Identificação e Caracterização da Aflatoxina	18
2.2	<i>Aspergillus</i>	20
2.2.1	Mecanismos de Toxicidade	21
2.2.2	Mecanismos de identificação	23
2.3	Lantanídeos	25
2.3.1	Histórico dos lantanídeos	27
2.3.2	Európio	27
2.3.2.1	<i>Transferência de energia</i>	28
2.3.2.2	<i>Sensores químicos de complexos com íons lantanídeos</i>	29
2.4	Métodos Computacionais	31
2.4.2	Métodos semi-empíricos	32
2.4.3	Teoria do Funcional da Densidade – (Método DFT)	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Materiais	36
4.2	Metodologia Computacional	38
4.3	Metodologia Experimental	39
4.3.1	Preparação dos substratos planos	39
4.3.2	Deposição dos Híbridos (HIB-BTC/DAMIC)	39
4.3.3	Ensaios de detecção de AFB ₁	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Análise Computacional	40
5.1.1	Estimativa dos estados excitados	42
5.1.2	Espectros de teóricos absorção	43
5.2	Análise Espectroscopica	44
5.2.1	Espectroscopia Uv/Vis e Raman da AFB ₁	44

5.2.2	Espectroscopia FTIR.....	45
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura HIB-BTC e HIB-DAMIC	48
5.3	Fotoluminescênci.....	50
5.3.1	Proporção e Concentração.....	50
5.3.2	HIB-BTC e HIB-DAMIC	52
5.3.3	Ensaios de detecção de AFB ₁	53
5.3.3.1	<i>Tempos de Vida para HIB-BTC-AFB₁ e HIB-DAMIC –AFB₁.....</i>	60
5.3.3.2	<i>Espectros de Excitação.....</i>	62
6	CONCLUSÕES	69
7	PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A relevância econômica e a responsabilidade social no desenvolvimento da agricultura e da agropecuária são acompanhadas pelo avanço científico, tecnológico e pelo respeito ao meio ambiente. Dentro deste panorama, Barros (2014) faz ponderações relevantes no que ele chama "um caso único no panorama acadêmico brasileiro" referindo-se à interação de instituições públicas com o setor produtivo. O autor nos traz dados relevantes e bem específicos quanto à expansão da colheita de grãos de 45 milhões de toneladas em 1975 para 187 milhões de toneladas em 2013. A Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), por sua vez, fez uma estimativa da safra de 2016 a 2017 entre 210,9/215,1 milhões de toneladas.

Diante destes dados, é de se esperar que as medidas relacionadas com a segurança alimentar da população tenham uma crescente evolução tecnológica a fim de acompanhar o crescimento da produtividade no agronegócio. Neste contexto, o controle e identificação qualitativa ou quantitativa de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por microorganismos, passa a ser também uma prática relacionada à segurança alimentar, adquirindo o caráter de proteção sanitária ao indivíduo com a finalidade de identificar possíveis contaminações em produtos de origem animal ou vegetal.

Dentre os diversos tipos de micotoxinas conhecidas destacam-se as aflatoxinas, que são produzidas por vários tipos de fungos, principalmente pelos *Aspergillus*. A detecção de aflatoxinas em produtos de origem animal ou vegetal não é simples e tem custo relativamente elevado pela quantidade de reagentes e equipamentos que são utilizados.

Em trabalhos publicados recentemente Hu *et al* (2015) e Jiang *et al* (2015) descrevem uma técnica de Impressão molecular de polímeros tomando a aflatoxina B₁ como molécula molde na tentativa de proporcionar um processo de identificação que tenha uma aplicação menos onerosa. Estas tentativas criam um panorama diversificado e favorável para novas pesquisas e possíveis procedimentos, principalmente com relação ao controle sanitário e monitoramento da ocorrência das aflatoxinas, daí veio a principal motivação para a realização desse nosso trabalho.

De olho na possibilidade de propor um método barato, eficiente e seguro para a identificação e quantificação de aflatoxinas principalmente em alimentos, investigamos a possível interação entre a AFB₁ e o európio.

2 FUNDAMENTAÇÃO

2.1 Histórico das Aflatoxinas

Em 1961, a partir de uma longa investigação envolvendo especialistas em História Natural, Farmácia, Biologia, Química entre outros. Blount, W. P. (1961) debruçou-se sobre o enigma da estranha mortandade de aves (perus, patos, faisões) na região do Reino Unido. Ao estudar as principais áreas de ocorrência da mortalidade das aves em Londres, Blount, W.P (1961) encontrou um ponto em comum entre as regiões do surto e as rações que alimentava as aves. Na quase totalidade dos casos as rações tinham sido preparadas com farinha de amendoim proveniente do Brasil. A figura 1 retrata os agradecimentos feitos por Blount, W.P (1961), às contribuições e esforços dispensados pelos especialistas neste trabalho.

TURKEY "X" DISEASE

(Continued from page 61)

to those veterinary surgeons at various veterinary investigation centres at Houghton, Lasswade and Weybridge who have also done everything possible to ease our investigations.

Our thanks are also due to the many farmers whose stock suffered from "X" Disease, for their patience and forbearance.

Finally, we would like to thank the press for their understanding of what was clearly a difficult situation.

Figura 1 - Agradecimentos do Blount em seu artigo Turkey "X" Disease.

Fonte: Blount, W.P (1961).

As inúmeras análises biológicas (toxinas bacterianas ou virais), químicas (avaliação qualitativa e quantitativa de compostos como DDT, fluoreto de sódio, sulfaquinoxalina, entre outros) e principalmente a análise forense (autópsia dos animais) revelaram que, diante das evidências persistentes de Enterite, aumento no tamanho dos rins e/ou hepatite nos animais, levou Blount a classificar a disfunção dentro de um diagnóstico já conhecido como *Turkey "X" Disease*.

Posteriormente, as avaliações dos veterinários em Houghton, Lasswade e Weybridge constatou-se não se tratar de uma epidemiologia comum, levando a

considerar diante deste relato a possibilidade de envenenamento das aves. Após um "experimento nutricional" com os incrementos provenientes do Brasil, ficou constatado que as aves alimentadas com as rações que possuíam farinha de amendoim (*Brazilian Groundnutmeal*) tinham a mortalidade em torno de 100%. Este estudo seminal em 1961 faz parte de um mapeamento cronológico feito Kensler (2010), retratado na figura 2, onde é descrita a evolução dos estudos envolvendo as aflatoxinas e especificamente a aflatoxina B1 (AFB₁).

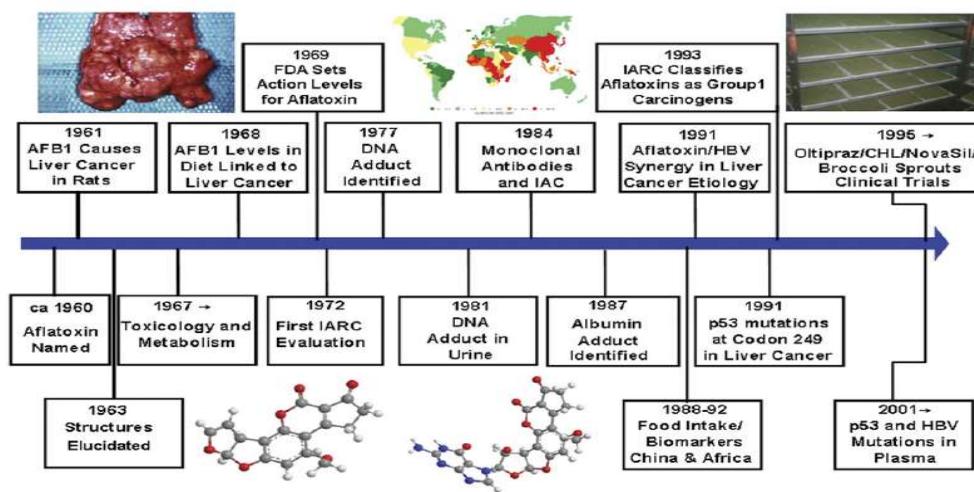


Figura 2 - Prospecção Histórica da evolução científica sobre AFB1

Fonte: Kensler (2010)

Os estudo do Lancaster *et al* (1961), após realizar autopsia em ratos de grupos distintos, no qual dois destes grupos foram alimentados com rações contaminadas por *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) provenientes do Brasil e da Índia, correlaciona a intoxicação alimentar como provável causa para o desenvolvimento de câncer hepático nos animais. Os resultados encontrados para o grupo de ratos alimentados com 20% da ração proveniente do Brasil mostrou que nove entre onze ratos possuíam lesões hepáticas tumorais e os dois restantes possuíam também metástase nos pulmões, além de nódulos característicos de processos tumorais de 1 a 2 mm em diversas regiões do fígado, deixando clara a diferença do fígado duas vezes maior que a do grupo controle. Nos dois ratinhos em metástase, foram observado inicialmente estágios avançados de pneumonia, no qual, numa observação mais detalhada pela

secção do órgão (pulmão), se pode constatar uma variedade de lesões macro e microscópicas (até 3 mm de espessura) decorrente de um processo hemorrágico na área circundante, caracterizado por uma infiltração e crescimento anormal (anaplásia) de células de um hepatoma (câncer oriundo do fígado, podendo se desenvolver no mesmo local ou também em processo metastático) desenvolvido num período de seis meses.

Em 2002 a IARC (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer) segundo Barrett *et al.* (2002), em documento (IARC *Monograph*) sobre a organização de toxinas com potencial carcinogênico dispôs que as aflatoxinas podem ser produzidas não somente pelo *A. flavus*, mas também é comum a outras espécies deste gênero: *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, e *A. australis*. No entanto a espécie em maior quantidade de casos no qual foi reportada e comprovada a contaminação ainda é *A. flavus*. Com a espécie *A. parasiticus*, que apesar de ser comum na mesma faixa geográfica de ocorrência da *A. flavus*, teve apenas um caso reportado até o presente ano de 2002 no sudeste da Ásia. O IARC ainda classifica as aflatoxinas como grupo 1 como carcinogênicos humanos. O trabalho de classificação pela IARC da aflatoxina se baseia em estudos de 1971 até o mais recente em 2009.

2.1.1 Identificação e Caracterização da Aflatoxina

Lancaster e Carnaghan (1961) são citados como referência para o protocolo de identificação de aflatoxinas. Eles descrevem um método para extração do substrato e posteriormente utilizam uma cromatografia líquida clássica (CLC), tendo a alumina como fase estacionária, a partir do extrato de grãos (amendoim) advindo do Brasil. Eles obtiveram uma substância cristalina, apesar de não completamente pura, Lancaster e Carnaghan (1961) estabeleceram que 20 µg desta substância seria uma dose letal para patos em até 24hrs. Com cromatografia em papel (CP) utilizando n-butanol e ácido acético a 5% para fase móvel, os mesmos autores obtiveram um único ponto incolor de $R_f = 0,7$ ($R_f:ds/dm$) no qual, quando submetido à luz ultravioleta emitia luz azul.

A associação de tais toxinas com metabólitos produzidos por fungos aconteceu quando rações provenientes de Uganda com uma contaminação fúngica de alta toxicidade apresentaram os mesmos efeitos em aves (LANCASTER e CARNAGHAN

1961). A espécie fúngica desconhecida até aquele momento foi isolada e mantida em meio de cultura com ágar por sete dias a uma temperatura de 27º C. O material produzido pelo fungo foi extraído com clorofórmio e submetido ao mesmo processo CLC → CP, confirmando em seus resultados a presença da mesma toxina. Por fim, a mesma "rotina" ou protocolo foi submetido a culturas isoladas de *Aspergillus Flavus* na qual a AFB₁ foi identificada como agente contaminante das amostras de grãos (amendoim) advindos de Uganda (LANCASTER e CARNAGHAN 1961).

A rotina química estabelecida foi grande divisor para diferenciar as demais associações de sintomas por intoxicação alimentar. Por exemplo, a *Senecio Jacobaea* (uma planta da família das margaridas) que, quando ingeridas por gados, reproduzem sintomas semelhantes à intoxicação por ingerir amendoim contaminado com AFB₁ (*Arachis Hipogaea*), porém não apresentam a mesma resposta ao protocolo CLC→CP.

Em processo semelhante Nesbitt *et al* (1962) relatou em seu artigo ter encontrado "impurezas" ao exercer o protocolo anteriormente estabelecido, resolvendo a solução numa coluna contendo alumina como fase estacionária (CLC²) e como fase móvel alternada de 98,5% de clorofórmio e 1,5% de metanol. Numa nova etapa de CP² o autor encontrou um *Rf* = 0.6 aproximadamente, com dois pontos incolores, em que o primeiro emitia fluorescência no azul como já estabelecido no protocolo CLC→CP e o segundo ocorrendo mais lentamente após o segundo protocolo CLC²→CP² emitindo luz verde quando expostos à luz ultravioleta.

Os compostos foram então identificados como *Aflatoxina B and G*, "afla" por conta do fungo *Aspergillus flavus* e B ou G por conta das cores emitidas após a absorção da radiação ultravioleta. Os compostos isolados por Nesbitt *et al* (1962) tiveram como resultados percentuais da análise elementar: 65,6% de Carbono, 4,4% de Hidrogênio e 30,9% de Oxigênio. Por espectrometria de massas foram encontrados as massas molares de 312 e 314 g.mol⁻¹. A massa molar de 312 gramas foi associada à Aflatoxina B1 (AFB₁).

Em outra amostra analisada, foi encontrada o que seria uma outra aflatoxina com características similares à da estrutura da AFB₁ de peso molecular 312 g.mol⁻¹ com um coeficiente de ϵ = 44500 para o pico de 363 μ m. Neste momento Nesbitt acabara de identificar a AFB₂ com massa de 314.3 g.mol⁻¹ (devido à ausência da dupla ligação na porção bifuranóide), que possui massa de 312.3 g.mol⁻¹. A análise por

espectrometria no infravermelho por sua vez, possibilitou a identificação das carbonilas pela presença de dois picos na região de 1755 e 1688 cm⁻¹ em. Por fim, os testes biológicos indicaram uma taxa de letalidade próxima e menor que 20 µg para os testes em patos para AFB₁, enquanto para aflatoxina G₁ a toxicidade diminui, ficando próximo de 60 µg para que ocorra letalidade em patos.

2.2 *Aspergillus*

A espécie *Aspergillus*, do gênero *Geotrichum*, pertencente à família *Moniliaceae*, podem ser estudas em duas classes distintas *Deuteromycetes*: quando possuem formas imperfeitas, reprodução assexuada por conídios formados no topo de uma esterigmata, ou podem também ser estudadas na classe *Ascomycetes*: quando possuem formas, perfeita e imperfeita.

Segundo Esteves *et al* (1990) estas espécies podem também serem estudadas numa sub-classe, a *Euascomycetae*, comum a fungos de estrutura filamentosa com capacidade patogênica, além disso, possuem frutificações características tanto de reprodução assexuada (figura 3) como de reprodução sexuada por ascósporos suas formas perfeitas (Ex: *Aspergillus Nidulans*). Os *Aspergillus* apresentam ampla variedade e formas, 200 já foram identificados devido a sua compatibilidade morfológica (TOMÉ 2016). Os *Aspergillus* apresentam características bem diversas, por exemplo, o *Aspergillus nidulans* e o *A. fumigatus* desenvolvem-se em regiões desérticas (Abdel-Hafez. 1982 *apud* Esteves *et al.* 1990), enquanto *A. ochraceus* já foi encontrada em secreções do trato respiratório de um paciente. No entanto, os *Aspergillus* são frequentemente associados à presença em deterioração de cereais, frutas, aparelhos eletrônicos e até mesmo na água (HEDAYATI *et al* 2007).

Abbas, 2005 *apud* Trombetta (2014) destaca, que a *A. flavus* devido a sua estabilidade térmica (Considerados termófilos) atinge uma média de resistência térmica entre 20° a 48°C, sendo a produção máxima de metabólitos secundários tóxicos como AFB₁ entre 25° a 27°C, no entanto segundo Trombetta (2014) o patologista clínico Rui Tomé esta espécie já foi isolada em temperaturas menores que 20°C na cabeceira de pacientes no Hospital Universitário de Coimbra.

Segundo as estimativas Cole, R. 1989 *apud* Monson *et al* (2014) cerca de 25% do suprimento mundial (agricultura e agropecuária) é afetado por micotoxinas, os impactos decorrentes desta estimativa leva ao comprometimento nos custos do

agronegócio, principalmente no setor de avicultura. Custos totais destas perdas somam o montante de 143 milhões ao ano, a este valor está atrelado o custo com o tratamento dos animais, comprometimento genético (resquício do processo de intoxicação), perda na produção de ovos e até com a letalidade associada. O comprometimento da saúde humana por conta da ingestão de cereais contaminados por micotoxinas, especificamente AFB₁, também eleva o custo da Saúde Pública devido ao custo elevado des tratamentos mesmo que paliativos.

O limite máximo tolerado (LMT) de 20 ppb (partes por bilhão) para produtos dos mais distintos fins seguem a Resolução da Diretoria Colegiada de Nº 07 publicada em 2011 pelo Ministério da Saúde (MS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em 2014 o limite foi redefinido pela resolução CNNPA/MS nº 34/76 da Secretaria de Defesa Agropecuária como sendo de até 30 ppb (partes por bilhão) para a totalidade das Aflatoxinas B e G para produtos diversos menos para milho em grão, farinhas ou sêmolas de milho, amendoim, pasta ou manteiga de amendoim que permanecem com o limite de 20 ppb.



Figura 3 - Frutificação característica de uma colônia de *A. flavus*, em meio de Sabouraud.

Fonte: Atlas Micologia, 2012.

2.2.1 Mecanismos de Toxicidade

Dentro deste panorama, é cabível uma explicação química que justifique o fato da AFB₁ exprimir um potencial carcinogênico tão elevado dentre os compostos produzidos pelos fungos. Segundo Biehl e Buck (1987) a AFB₁ especificamente pode ser encontrada na literatura como um pró-fármaco; um agente relativamente neutro que após a biotransformação passa ser ativo.

Guengerich (2013) descreve o processo de biotransformação em reações de fases distintas em sua finalidade, por exemplo: reações Oxidação/Redução são efetuadas com o objetivo de "tornar" o composto um metabólito com caráter hidrofílico elevado, facilitando posteriormente sua excreção. Tais reações são promovidas pelo citocromo P450 (via CYP 450) adicionando ou expondo os grupos polares na molécula. Neste processo é formada a espécie ativa da aflatoxina decorrente da epoxidação na dupla ligação na porção bi-furanóide da molécula. Essas reações por vezes competem com o processo de Conjugação/ Hidrólise como mostrado na figura 4.

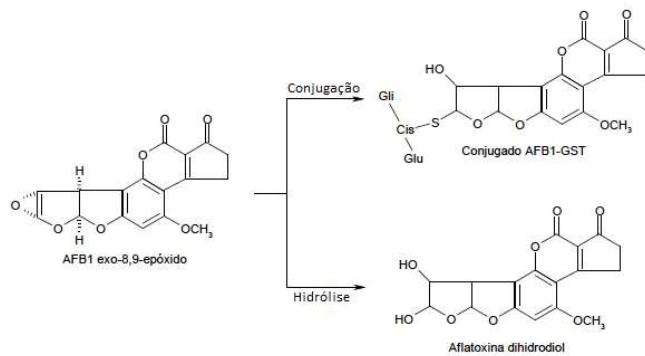


Figura 4 - Etapas do processo de inativação da AFB₁ que levam a compostos distintos, a conjugação de GST e AFB₁ - 8,9 dihidrodiol.

Fonte: Uribe-yunda e Navas (2011)

As reações no citocromo P450 são bem seletivas quanto ao composto de partida devido à presença fundamental do oxigênio (O₂⁻) nesta primeira fase por conta da seguinte reação: Composto + O₂ + NADPH $\xrightarrow{H^+}$ Composto-OH + H₂O + NADP⁺ (GUENGERICH 2013)

Segundo Stone et al (2011) O composto eletrofílico gerado neste processo (AFB₁ exo-8,9-epóxido) é facilmente reativo com porções nucleofílicas das bases nitrogenadas presentes no DNA e em proteínas, por exemplo, a albumina (AFB₁-Lisina) Na presença da base nitrogenada guanina reage formando a AFB₁-N₇-G e

posteriormente forma os enantiômeros da formamidopirimidina (AFB₁ - α - FAPY e AFB₁ - β - FAPY). A AFB₁ - β - FAPY tem maior poder genotóxico, podendo inclusive ser encontrada duplamente intercalada no DNA, este processo está exemplificado na figura 5.

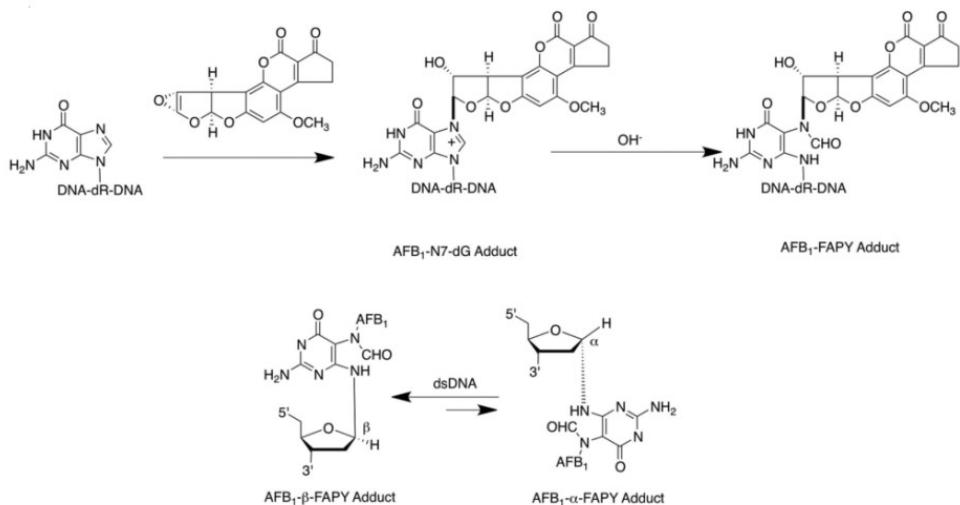


Figura 5 - Formação dos enantiômeros AFB₁ - β -FAPY e AFB₁- α - FAPY, respectivamente.

Fonte: Stone *et al* (2011).

2.2.2 Mecanismos de identificação

A detecção da AFB₁, no controle de qualidade de uma empresa pode ser feita através da catação eletrônica (uma máquina que faz a seleção e separação de grãos) é baseada na alteração da cor do bulbo (órgão responsável, pelo armazenamento de alimento) dos grãos e sementes, comum a produtos que detenham alguma contaminação por pragas em grãos, não necessariamente o fungo *Aspergillus*. De forma geral, é imprescindível para a análise de identificação e quantificação da AFB₁ ao menos um destes equipamentos: HPLC ou LC-MS, o que possuem um custo elevado e a necessidade de mão de obra especializada.

Uma alternativa é o desenvolvimento de testes que empregam o uso de imunoensaios. Ono *et al* (2016) exemplifica algumas destas técnicas como: Elisa – imunofluorescência, no qual usava anticorpos produzidos num hospedeiro (coelhos) e antígenos miceliais de *A. flavus*. Os ensaios com Elisa sanduiche realizados por

Young e Cousin *apud* Ono, (2001) exibiram um limite de detecção de aproximadamente $1\mu\text{g}/\text{ml}$. No entanto, utilizando variados ensaios imunoenzimáticos Elisa (ic-dc) juntamente com cromatografia para identificação de micotoxinas, os limites de detecção foram de aproximadamente $0,02\text{ ng}/\text{ml}$ a $5\mu\text{g}/\text{kg}$.

ONO *et al* (2016) Aponta como um derivado de baixo custo dos testes Elisa o teste de fluxo lateral ou também chamado de imunocromatografia (*dispisticks*), mostrado na figura 6, onde o extrato de uma amostra, contaminada ou não, flui por capilaridade migrando ao longo da membrana até atingir a zona teste. O teste é de detecção visual positivo-negativo (basicamente qualitativo) em que o anticorpo podendo ser conjugado com ouro coloidal irá se ligar à micotoxina presente na amostra e não estará livre para se ligar ao hepteno (micotoxina-proteína) immobilizado na membrana. Assim sendo, não há formação de uma linha visível no teste, indicando uma resposta positiva para contaminação da amostra. Em compensação, quando negativa, o conjugado anti-micotoxina-ouro fica disponível para se ligar ao hepteno immobilizado formando uma linha visível no teste.

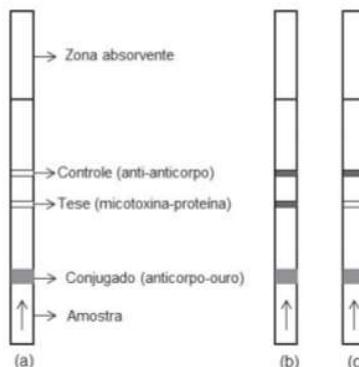


Figura 6 - (a)Esquema de teste em fluxo-lateral ou imunocromatografia, (b). Resposta Negativa, (c). Resposta Positiva.

Fonte: Ono *et al* (2016)

Por fim, dois trabalhos recentes se destacam em referência à detecção de AFB₁. O primeiro, de Jiang *et al* (2015), demonstra a concepção de um sensor de grande sensibilidade produzido por eletropolimerização utilizando a técnica de MIP (*Molecularly-Imprinted Polymer*), onde ocorre a conjugação de *p*-aminotiofenol funcionalizado com nanopartículas de ouro, na presença de AFB₁ como molécula molde. Este sensor encontra um limite de detecção de aproximadamente $0,3\text{ fg}/\text{ml}$, passível de ser o menor limite de detecção reproduzível até o momento, estes valores

de detecção são comparados com outros sistemas na figura 7. O segundo elaborado por Hu *et al* (2015) demonstra a utilização da LMORF-241 (*Luminescent Metal Organic Framework*), através da diminuição da emissão de fluorescência no azul, a medida que se aumenta a concentração de AFB₁ no sistema. Tal proposta tem um limite de detecção de até 46 ppb.

Method	LOD	Linear Range
Immunosensor on screen-printed carbon electrodes	90 pg/mL	0.1–10 ng/mL
Immunosensor on screen-printed microplate	30 pg/mL	0.05–2 ng/mL
Immunosensor on glassy carbon electrode	0.07 ng/mL	0.6–2.4 ng/mL
HPLC	0.25 ng/mL	0.5–10 ng/mL
HPLC-MSMS	0.08 ng/mL	0.3–10 ng/mL
LC-MSMS	2.4 pg/mL	0.05–2 ng/mL
LSV on molecularly imprinted MOF	0.3 fg/mL	1 fg/mL–1 µg/mL

Figura 7 - Comparação entre limites de detecção dos métodos usualmente empregados para identificação de AFB₁.

Fonte: Jiang *et al* (2015)

2.3 Lantanídeos

Os "terras raras", representados por 15 elementos lantanídeos, além de ítrio e escândio, compõem um grupo de extrema relevância econômica. Segundo Ludovico *et al* (2010), a importância econômica destes elementos químicos se deve à extensão da sua aplicabilidade, que empreende e nutre indústrias armamentistas, de telecomunicações, automobilísticas, produção de turbinas eólicas, veículos elétricos, semicondutores, produção de imãs permanentes, entre outros fins. Em 2010 a China detinha hegemonia de cerca de 95% a 97% da produção mundial e comercialização destes elementos. Devido a disputas territoriais da China com o Japão a partir do ano de 2010, países detentores de jazidas de elementos terras raras em seus territórios, assim como Brasil, África do Sul, Austrália, entre outros, se viram na necessidade de fomentar economicamente pesquisas que desenvolvessem a mineração e tratamento destes elementos.

No ano de 2013, o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE, 2013) do Brasil procurou mobilizar a atuação de pesquisadores e seus grupos de pesquisa através do financiamento de melhores estruturas laboratoriais e aperfeiçoamento pessoal. Cabe ressaltar que a mobilização para criação do PD&I-TR's (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – Terras Raras), um documento que empreende ações e

estratégias até 2030 na perspectiva de tornar o Brasil uma potência competitiva no cenário internacional, foi devido à comoção e apelo para retomada da produção de terras raras feito numa carta encaminhada ao Ministro da Ciência e Tecnologia por cientistas presentes no quarto Encontro Nacional de Terras Raras em abril de 2010 (SERRA, 2011).

Em contrapartida, o Japão, através do recente artigo disponibilizado pela revista *Nature* em Abril deste ano Takaya et al. (2018), anuncia a descoberta de aproximadamente 16 milhões de toneladas de “terras raras” na Ilha de Minamitorishima, considerada dentro da zona econômica exclusiva japonesa (EEZ). Segundo o jornal financeiro Nikkei, a jazida encontrada faz alusão a uma quantidade razoável de minerais capazes de sustentar a demanda mundial por longos períodos. Há, por exemplo, minério para fornecer európio pelos próximos 620 anos, disprósio pelos próximos 730 anos e tório pelos próximos 420 anos. No entanto, o jornal cria uma ressalva, devido à falta de tecnologia atualmente disponível para explorar estas jazidas. Por tanto, esta notória descoberta não cria um impacto imediato no mercado internacional.

Cabe aqui indicar algumas especificações dos íons lantanídeos. Com exceção do La^{3+} e Lu^{3+} , a maioria destes íons possui luminescência, sendo que o $\text{Eu} f^6$ e $\text{Tb} f^7$ apresentam emissões mais fortes. Proporcionalmente aos complexos gerados com metais do bloco *d*, os complexos com íons *Ln* possuem suas propriedades magnéticas e óticas dependentes das perturbações feitas pelos seus ligantes e íons com densidades (6 a 10 g.cm⁻³) comparáveis aos metais do terceiro período da tabela periódica (linha 3d). (SHRIVER et al. 2008).

Os íons com estados de oxidação mais estáveis dentre os lantanídeos são em geral trivalentes (La^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+}), porém também são encontrados em seus estados divalentes e tetravalentes (Yb^{2+} , Eu^{2+} , Sm^{2+}) / (Ce^{4+} , Tb^{4+} , Pr^{4+}). Possuem configuração eletrônica entre 4 f^0 - f^{14} , sendo os primeiros na tabela periódica a ocuparem o subnível *f* (MARQUES, 2014). Outras particularidades que diferenciam os lantanídeos dos demais elementos na tabela periódica são indicadas no livro de Cotton (COTTON 2006):

- Possuem menor desdobramento de campo-cristalino em comparação aos metais do bloco-*d*;

- A geometria de coordenação é massivamente direcionada por fatores estéricos dos seus ligantes;
- Possuem uma grande escala de números de coordenação (2 a 12).

2.3.1 Histórico dos lantanídeos

A obtenção e o estudo dos lantanídeos remonta o século XVIII, na Escandinávia, com a obtenção de um minério preto, nomeado por Johann Gadolin de "earth" ou Yttria, em 1794. O mesmo minério também foi isolado por Carl Axel Arrhenius, no mesmo ano, e nomeado por ele de "Iterbita". No entanto, apenas no período entre os anos de 1839 a 1843 que o sueco C.G Mosander separou e identificou os componentes óxidos, da terra ceria (minério de cerite) obtidas por M.H. Klaproth, J.J. Berzelius e W. Hisinge e os classificou como cério e lantânio misturados à "didymia" (COTTON, 2006).

Segundo Sousa Filho (2014) e Serra (2011), no Brasil a extração, separação e tratamento de monazitas (mineral fonte de terras raras) só ocorreu em 1885, na região das praias do Prado, na Bahia, pela empresa *Johnston & Co*, que tinha como destino principal para o minério a exportação para Alemanha e Áustria. Por isso, o Brasil foi um dos principais fornecedores de monazitas até 1914, quando a Índia assumiu a liderança.

Na década de 1950, a empresa ORQUIMA, até aquele momento privada, passou a extrair, separar e purificar óxidos de terras raras com um nível de pureza pioneiro, obtendo Eu_2O_3 com 99,9% de pureza. Os óxidos de európio foram exportados pela ORQUIMA para produção de barras metálicas, na finalidade de absorção de nêutrons no reator do Nautilus, o primeiro submarino nuclear do mundo. Apesar da sede da ORQUIMA se encontrar em São Paulo, a extração era feita nas costas do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Após a década de 60 a empresa se restringiu à extração de monazitas, porém, não desenvolvendo a mesma qualidade de purificação, foi desativada pela INB (Indústrias Nucleares do Brasil) em 2002. Nas décadas de 70 e 80 a China passou a ser detentora da mais ampla reserva mundial e desponente no cenário mundial com hegemonia em larga escala até 2010.

2.3.2 Európio

Considerando o objetivo deste trabalho, é necessário ressaltar características específicas deste elemento. O Európio foi descoberto pelo francês Eugène Anatole Demarçay em 1901. Possui raio iônico de 106,6 pm e pode ser encontrado no estado de oxidação de Ln^{3+} e Ln^{2+} . Tem configuração para o estado mais estável de oxidação (3+) em $4f^6$ ($7F_0$), configuração de seu estado fundamental $4f^76s^2$ ($8S_{7/2}$) e para forma elementar $[\text{Xe}] 4f^{n-1}5d^16s^2$ e $[\text{Xe}] 4f^n6s^2$ sendo n entre 1 e 14. O európio possui uma transição com característica hipersensível do estado emissor $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ na região do vermelho (610 a 625 nm), variando de acordo com o ambiente químico.

2.3.2.1 Transferência de energia

Um mecanismo eficiente de transferência de energia é a coordenação de íons lantanídeos com compostos orgânicos. A razão da preferência por compostos orgânicos deve-se às absorções de alta intensidade e ao maior coeficiente de extinção molecular por parte destas moléculas ($>104 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em comparação aos de íons Ln trivalentes ($10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que possuem absorções de baixa intensidade. Esta característica em compostos orgânicos pode ser vantajosa para que possam absorver eficientemente radiação eletromagnética. Segundo Spangler, (200) através de grupos doadores (grupos cromóforos) como O > N > S entre outros ocorre a transferência de energia para o íon através da relaxação cruzada de transições radioativas e não radioativas entre os estados excitados do ligante e do metal, o que segundo Weissman, (1942) apud Batista, (2003) define este processo como modo antena (figura 9).

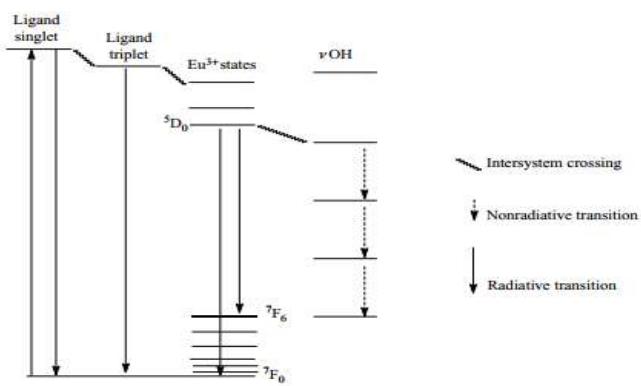


Figura 8 - Etapas do processo de emissão fluorescente mediante a complexação de um ligante (contendo um grupo cromóforo) ao íon Eu^{3+} através de transições intramoleculares.

Fonte: Cotton (2006)

Este mecanismo de transferência de energia, mostrado na figura 8 foi proposto por Crosby e Whan (1962) apud Biennemans (2009). Com a absorção da energia da radiação eletromagnética ocorre a excitação a um nível vibracional excitado de mais baixa energia $S_0 \rightarrow S_1$, em seguida ocorre uma rápida conversão interna reduzindo transições vibracionais, esse processo pode ocorrer também devido à interação com o solvente. Assim, a desativação radioativa do estado excitado singuleto ocorre pela relaxação cruzada intersistema para o estado tripleno $S_1 \rightarrow T_1$. O estado tripleno do íon pode, por fim, ser desativado radiativamente para o estado fundamental $T_1 \rightarrow S_0$. A transição por excitação indireta de um estado tripleno para o estado excitado do íon lantanídeo pode sofrer transições para um estado 4f mais baixo.

Vale ressaltar que os meios para se obter transições interconfiguracionais no produto formado são diversos, podendo ser realizadas transições *singuleto-singuleto*, *singuleto*/triplo** (estado excitado do ligante) e LMCT (Estado de Transferência de Carga Ligante-Metal) (BATISTA, 2003). De fato, é possível alterar as propriedades espectroscópicas do sistema e assim controlar a característica de luminescência destes sistemas.

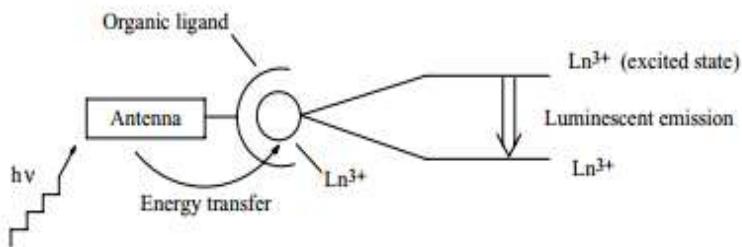


Figura 9 - Efeito Antena.

Fonte: Cotton (2006)

2.3.2.2 Sensores químicos de complexos com íons lantanídeos

A investigação do uso de complexos de lantanídeos explorando a sua característica de luminescência foi primeiramente reportada por Richardson em 1982.

Baseando-se na teoria de Pearson sobre espécies polarizáveis (ácidos e bases), as espécies catiônicas dos íons lantanídeos atuam como ácidos duros, sendo assim, possuem preferência por ligantes doadoras e bases moles (SPANGLER e SCHÄFERLING, 2000). O entendimento da eficiência dos complexos de lantanídeos como sensores é um exercício na constante tentativa de aperfeiçoar o rendimento quântico do composto final. Portanto, cabe o questionamento: o que torna um complexo com íon de lantanídeo tão eficiente no tempo de vida de fluorescência em detrimento a outros ambientes químicos que expressam semelhante capacidade? A resposta se sustenta na escolha eficiente do material sensível para transferir energia ao metal. Os ligantes no complexo devem promover uma eficiente transferência de energia para o metal através dos estados excitados tripletos (Ligante-Metal). No caso do Eu³⁺, Richardson apud Spangler (2000), pressupõe que, essa transferência de energia é realmente eficiente com ligantes onde o estado doador para nível de ressonância em número de ondas corresponda à faixa de 17000 a 25000 cm⁻¹. O fato do európio ser mais explorado como elemento pertencente ao sistema receptor de um sensor, é devido a alguns fatores, destacando-se o fato de possuirem menor nível para transferência de energia do estado emissor 5D0 → 17250 cm⁻¹ em comparação ao estado emissor do Tb³⁺ 5D4 → 20430 cm⁻¹. No európio a sensibilização do íon pode ocorrer por um estado de transferência de carga devido à possibilidade do íon Eu³⁺ ser reduzido a Eu²⁺.

Os sensores, no entanto, podem ser definidos segundo Jerônimo (2005), como dispositivos capazes de fazer identificação e registros de forma direta, contínua e reversível de um parâmetro físico ou químico. Um sensor químico pode basear-se em distintos princípios para estimar uma medida como, por exemplo, a detecção de uma espécie química em reação (princípio químico), parâmetros físicos de absorbância, temperatura, condutividade entre outros (princípio físico) (JERÓNIMO 2005). Uma segunda classificação feita por Jerônimo (2005) pode ser feita pelo mecanismo de transdução. Cabe explicar que segundo Thevenot, D. apud Spangler (2000) sensores químicos podem ser esquematizados contendo: espécie química (analito), sistema de reconhecimento (receptor) e um sinal físico-químico (transdução). Assim a transdução é a etapa em que a informação química será transformada em um sinal mensurável, este sinal pode ser ótico, eletroquímico ou piezoelétrico.

Diante disso, sensores óticos, podem ainda ser definidos pela natureza da propriedade ótica a ser estimada, um exemplo disto são sensores luminescentes

envolvendo íons In^{3+} , que podem ter seu sinal resposta baseado na intensidade da emissão ou também na posição do máximo da emissão, variação da cor e variações no tempo de vida (Luz, Leonis. 2018 – comunicação oral).

2.4 Métodos Computacionais

A solução das equações da Mecânica Quântica para descrever propriedades químicas é o objetivo central da química-quântica. O método *Hartree-Fock* (HF), teve origem em 1927, apenas um ano após a publicação da equação de Schrödinger. A proposta de Douglas Hartree aplica o método variacional na intenção de resolver a equação de Schrödinger com o hamiltoniano para muitos elétrons fazendo uso do modelo das partículas independentes. Em 1929, J. C. Slater encontrou uma maneira de construir uma função de onda de caráter antissimétrico incorporando o princípio de que na teoria quântica as “partículas” são indistinguíveis. A concepção da função é feita a partir de um conjunto de funções determinantis (BASTOS, 2015):

$$|\psi\rangle = \frac{1}{\sqrt{N!}} |\phi_{1(r1)} \phi_{2(r1)} \cdots \phi_{n(r1)}| \quad (2.1)$$

$$| \vdots \quad \vdots \quad \ddots \quad \vdots |$$

$$|\phi_{1(rn)} \phi_{2(rn)} \cdots \phi_{n(rn)}|$$

Admitindo-se a aproximação de Born-Oppenheimer para resolução da equação de Schrödinger, o hamiltoniano pode ser escrito (em unidades atômicas) como:

$$H = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.2)$$

Onde; N e M Indicam o número de elétrons e núcleos, respectivamente;

r_{ij} distância entre os elétrons e i e j

r_{iA} distância entre o elétron i e o núcleo A

Z_A número atômico do núcleo A.

A equação 2.1 concorda com o Princípio de Pauli, pois dois elétrons ocupando um estado equivalente à função de onda também são equivalentes para ambos, porém um dos elétrons tem sua posição em coordenadas trocada, o que implica que seus determinantes nesta equação inverterá o sinal e ao se sobrepor se anulará, prevendo assim que a função HF passa a ser antissimétrica. Uma forma de entender de forma prática é a abordagem utilizada por Castro e Canuto (2007) que se referem ao estado quântico desta função de onda como spin-orbital, demonstrando sua relação pelas equações:

$$\Phi(r^1) = \psi(r^1)\alpha(1) \text{ ou } \Phi(r^1) = \psi(r^1)\beta(1). \quad (2.3)$$

onde α e β são funções spins de distintas orientações e ψ a função equivalente que descreve os orbitais moleculares. A equação de HF é acessível para resolução de sistemas com poucos elétrons, porém é bastante trabalhosa para sistemas maiores. Em outra abordagem, formalizada por Roothaan e inicialmente proposta por Slater, a função de onda HF é definida em relação a um conjunto de funções de base já conhecidas Castro e Canuto (2007). A principal limitação para o método HF refere-se à previsão da energia de correlação eletrônica, que é definida a partir da energia total do sistema: $E_{\text{correlação}} = E_{\text{exata}} - E_{\text{HF}}$.

2.4.2 Métodos semi-empíricos

Os métodos semi-empíricos têm como uma das principais vantagens um baixo custo computacional em comparação aos métodos *ab initio* ou DFT (Teoria do Funcional Densidade), o que os fazem atrativos na previsibilidade de propriedades físico-químicas, especialmente quando se trata do estudo de sistemas robustos ou que contenham macromoléculas, por exemplo, sistemas bioquímicos: proteínas, enzimas, etc. Segundo Simas e Rocha (2007), em 1931 nasce o termo semi-empírico, baseado no empreendimento de Polanyi e Eyring buscando compatibilizar a Teoria da Ligação de Valência (TLV), a termodinâmica e a cinética química à Mecânica Quântica.

Num trabalho colaborativo em meados da década de 30, estudos sobre energia de ativação, superfícies de energia potencial, estados de transição e reações químicas levaram London-Eyring-Polanyi aos primeiros métodos semi-empíricos (NYE, 2006). Em seu cerne, os métodos semi-empíricos têm por intenção utilizar

parametrizações que implementem dados experimentais em substituição à diversas integrais. Os métodos *ab initio* encontram “limitações” em termos de custo computacional para prever estrutura eletrônica devido ao surgimento de um grande volume de integrais de repulsão eletrônica. Em contra partida, os métodos semi-empíricos por serem métodos “aproximados”, restringem o cálculo das integrais para no máximo até dois centros (SIMAS e ROCHA, 2007). A parametrização reside em otimizar não linearmente uma função resposta F_{resp} ,

$$F_{\text{resp}} = \sum_i (q_i^{\text{calc}} - q_i^{\text{exp}})^2 w_i^2 \quad (2.4)$$

que segundo Stewart (2007) é parametrizada num espaço de inúmeras dimensões, sendo calculada com base nos desvios de resultados prévios (q^{calc}) juntamente com os desvios de resultados experimentais (q^{exp}), sendo W o fator de ponderação (SIMAS e ROCHA, 2007). Em referência às limitações dos métodos semi-empíricos, é comum encontrar trabalhos na literatura que conjuguem a utilização destes métodos (principalmente na previsão de propriedades termoquímicas) com a utilização de métodos DFT que apresentam um custo computacional menor que um método *ab initio*, porém com resultados de boa expressão para propriedades eletrônicas e estruturais.

2.4.3 Teoria do Funcional da Densidade – (Método DFT)

Em 1927, Llewellyn Thomas and Enrico Fermi dedicaram-se ao estudo da densidade eletrônica aplicada ao sistema de um gás homogêneo de elétrons. O modelo de Thomas-Fermi foi mais tarde aperfeiçoado ao incluir a energia de troca para um gás de elétron, dando origem ao Funcional de Energia $E_{\text{(TFD)}}$:

(2.5)

$$E_{\text{TFD}} = C_F \int \rho(r)^{5/3} dr + \int \rho(r)v(r)dr + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 - C_x \int \rho(r)^{4/3} dr,$$

$$C_F = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3} \quad | \quad C_x = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3}$$

sendo os quatro termos iniciais desta equação correspondentes à energia cinética, potencial externo, potencial de Coulomb e energia de troca descrito pelo termo de densidade eletrônica $\rho(r)$. Posteriormente, em 1964, a teoria DFT foi fundamentada através dos Teoremas de Hohenberg e Kohn (HK) (DUARTE e ROCHA, 2007):

- Existe uma codependência para se determinar o potencial externo e o número de elétrons em relação à densidade eletrônica, descrevendo a energia do sistema como:

$$E = E_v[\rho] \quad (2.6)$$

- O segundo teorema descreve um funcional universal, que respeita o princípio variacional, para descrever a energia total do sistema:

$$F[\rho] = \langle \psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \psi \rangle \quad (2.7)$$

Em 1965 Kohn-Sham Duarte e Rocha, (2007) define uma nova função universal $G[\rho]$ a ser empregada à DFT, na qual inclui o termo de troca-correlação $E_{xc}[\rho]$ e um termo residual de energia cinética, $G[\rho] = T_s[\rho] + E_{xc}[\rho]$, onde $T_s[\rho]$ é o funcional de energia cinética e $T[\rho]$ a energia cinética exata $T[\rho] = T_s[\rho] + E_{xc}[\rho]$. O grande êxito atribuído à DFT, sendo hoje um dos métodos mais populares para estudo da estrutura eletrônica, se deve à diversidade de funcionais de correlação, escolhidos dentre eles o que se adequa a prever mais fielmente as propriedades de um sistema ao qual se pretende estudar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade de duas matrizes baseadas em sílica mesoporosa funcionalizadas com complexos de íon Eu³⁺ a atuarem como receptoras para detecção da Aflatoxina B₁ (AFB₁).

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver plataformas para detecção de AFB₁ a partir da deposição de HIB-BTC e HIB-DAMIC sobre substratos planos de vidro e quartzo;
- Modelar os compostos HIB-BTC-AFB₁ e HIB-DAMIC-AFB₁ através dos softwares HyperChem 7.0.5 e Gauss View 5.0.8
- Submeter os compostos modelados a simulação com os métodos semi-empíricos RM1 e PM7 e analisar a geometria adquirida, energia dos estados excitados, taxas de transferência e espectros teóricos de absorção;
- Caracterizar espectroscopicamente os reagentes através das análises de FTIR, Raman, UV/VIS e MEV;

Investigar as propriedades fotoluminescentes dos materiais produzidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizados dois materiais híbridos baseados em sílica mesoporosa previamente sintetizados pelo doutorando Leandro Azevedo (L.A) no laboratório de Terras Raras (BSTR-DQF), representados na figura 10. Os híbridos consistem de nanopartículas de sílica mesoporosa com superfície funcionalizada pelos ácidos trimésico (Híbrido-BTC) e quelidâmico (Híbrido-DAMIC), os quais estão complexados a íons Eu^{3+} . Na tabela 1 e 2 estão listados os softwares e reagentes utilizados neste trabalho, respectivamente:

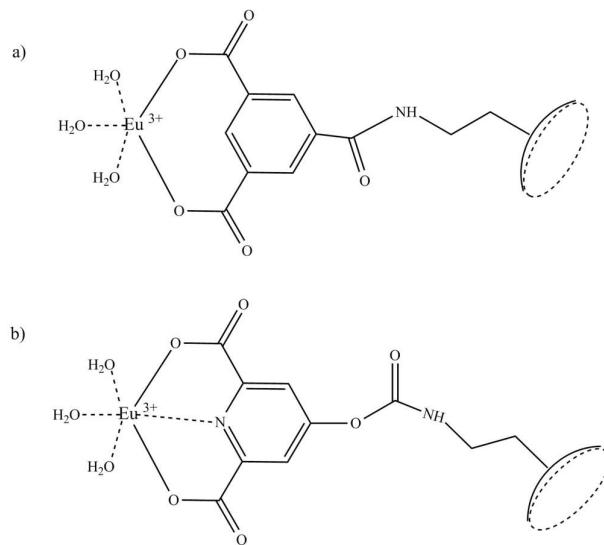


Figura 10 - Representação do HIB-BTC (a) e HIB-DAMIC (b).

Tabela 1 - Softwares utilizados.

Softwares
Gaussian 09
Gauss View 5.0.8
HyperChem 7.0.5
LUMPAC 1.3.0

Tabela 2 - Solvente e Reagente utilizados na prática experimental

Reagentes	Fórmula Molecular	Empresa de Fabricação
Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	Dinâmica
Ácido Quelidâmico (DAMIC)	C ₇ H ₅ NO ₅	Aldrich
MCM-48 – DAMIC- Eu ³⁺		Sintetizados pelo L. A
Ácido Trimésico (BTC)	C ₉ H ₆ O ₆	Aldrich
MCM-48 – DAMIC- Eu ³⁺		Sintetizados pelo L. A
Aflatoxina B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich
Etanol	C ₂ H ₆ O	Pilares
Etilenoglicol	C ₂ H ₆ O ₂	Aldrich
Metanol	CH ₃ OH	Dinâmica

A análise de espectroscopia Uv/ Vis e preparação da amostra (Pulverização Catódica) para análise no MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) foram realizadas nos equipamentos disponíveis na Central Analítica no Departamento de Química Fundamental (UFPE), a espectroscopia Raman no laboratório do professor Walter Mendes, os espectros de emissão obtidos no laboratório de Terras Raras (BSTR-Lumi). Por fim, a análise por espectroscopia FT-IR foi efetuada nas dependências do Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ - UFRPE).

Tabela 3 - Instrumentos utilizados na caracterização.

Instrumento de Análise	Empresa de Fabricação	Especificações Técnicas
Espectrofotômetro UV/Vis	ERKIN ELMER- LAMBDA 650	Detector: fotomultiplicador, com sistema ótico refletivo revestido com SiO ₂ , resolução : < 0,17 nm e faixa de λ de 190-900 nm.
Espectrofotômetro de Fluorescência	HORIBA JOBIN Yvon	Modelo Fluorolog-3 ISA, com lâmpadas contínua e pulsada (xenônio-450W e xênon 150W), e fotomultiplicadora R928P.
Espectrômetro FT-IR	Varian 640-IR	Infravermelho próximo e médio com varredura entre 11000 a 735 cm ⁻¹
Espectrômetro Raman	Ocean	Potência do laser 0.1 W, comprimentos de excitação: 532 – 785.
Pulverização Catódica (Sputtering)	SONYU ELECTRON	Deposição de ouro por 40" a 5 mA

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	TESCAN - Mira 3	
Spin-coater	Chemat Technology-KW/4 ^a	Dois controles de velocidade de 500 - 8,000 rpm e tempos de exposição alternados: mínimo de 8" e máximo de 60", operada com sistema de vácuo acoplado.

A análise de espectroscopia Uv/ Vis foi realizada com a amostra da AFB₁ solubilizada em solução metanólica, para espectroscopia FT-IR todas as amostras utilizadas eram sólidas e foram preparas utilizando pastilha de KBr, na espectroscopia de fluorescência as amostras (HIB-BTC/ DAMIC e AFB₁) estavam solubilizadas em etanol:etilenoglicol (97:3%) e metanol, respectivamente. E foram previamente preparadas por Spin-coater, num substrato plano de vidro ou quartzo. Em fim, para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura, as amostras (HIB-BTC/ DAMIC-AFB₁) depositadas em placas de quartzo, foram submetidas à pulverização catódica com ouro por 40'.

4.2 Metodologia Computacional

Em paralelo aos resultados obtidos experimentalmente, foram feitas a modelagem da AFB₁ na primeira esfera de coordenação das matrizes BTC/ DAMIC-Európio. A modelagem dos materiais foi realizada pelo Hyperchem 7.0.5 e Gaussian 09. A geometria da molécula da AFB₁ e das matrizes BTC/ DAMIC-Európio foi primeiramente otimizada com Mecânica Molecular utilizando o campo de força Amber.

Em seguida, utilizando o GaussView, as distâncias de ligação para a molécula da AFB₁ foram aproximadas "manualmente" para os resultados obtidos por Pavão *et al.* (1994). Por fim, foi novamente submetida ao cálculo de otimização da geometria com o método DFT usando o funcional B3LYP e base 6-31G**.

A molécula primária da AFB₁ foi replicada para ser reproduzida nos sistemas: 1AFB₁-HIBs, 2AFB₁-HIBs, 3AFB₁-HIBs. Feito isso, ambos os sistemas foram submetidos a cálculos de otimização de geometria, da energia dos estados excitados e de propriedades espectroscópicas utilizando o software LUMPAC com os métodos semi-empíricos RM1 e PM7.

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Preparação dos substratos planos

Os materiais híbridos suspensos em mistura de Etanol:Etilenoglicol na respectiva proporção de 97:3% (0,3 mg/L) foram depositados em lamínulas de vidro e quartzo, previamente lavados em três soluções: ácido acético a 5%, água destilada e etanol a 70%. A secagem dos substratos foi feita ao ar.

4.3.2 Deposição dos Híbridos (HIB-BTC/DAMIC)

A dispersão da suspensão foi feita pela técnica de *spin-coater*, seguindo a rotina de 18" para dispersão (1º tempo) e 60" para secagem (2º tempo), numa velocidade de 480 rpm no primeiro tempo e 1060 rpm no segundo tempo. As proporções de deposição HIB-BTC/DAMIC são de 10 e 5 deposições para as lâminas de vidro e quartzo, respectivamente.

4.3.3 Ensaios de detecção de AFB₁

- **Condição 1**

Foram adicionadas 7,69 µL de soluções metanólicas 1, 5, 10, 15 e 20 ppb de AFB₁ em placas distintas. Após as adições de 7,69 µL, as placas foram secas ao ar e submetidas a ensaios de luminescência.

- **Condição 2**

Foram adicionadas, de forma sequenciada, 7,69 µL solução metanólica 1 ppb de AFB₁ até a acumulação de 153,8 µmol de AFB₁ em uma mesma placa. Após cada adição de 7,69 µL, a placa foi secar ao ar e submetida a ensaios de luminescência.

Obs.: Durante a trajetória da pesquisa também foram realizados ensaios de complexação de AFB₁ com os metais Eu³⁺, Tb³⁺, Fe³⁺ e Cu²⁺. Esta abordagem foi desconsiderada devido ao baixo rendimento ou à sobreposição espectral da luminescência da Aflatoxina B1 nas regiões de emissão dos metais.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Computacional

A figura abaixo mostra a molécula da AFB₁ utilizando como referência a numeração atômica arbitrária feita por Pavão *et al* (1994).

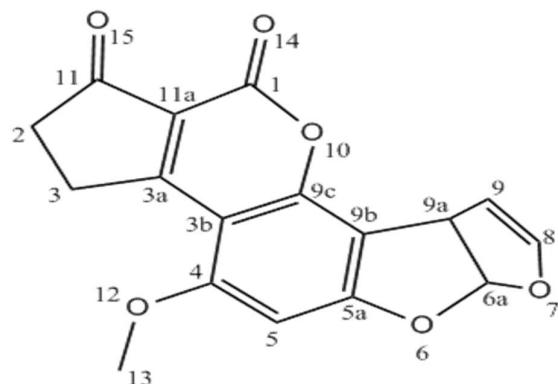


Figura 11 - AFB₁ com enumeração arbitrária atribuída computacionalmente pelo software.

Levando-se em consideração que a molécula possui os hidrogênios dos carbonos 9a e 6a saindo do plano da molécula frontalmente, o que induz ao isômero geométrico Cis -1 de menor ΔH_f , segundo Nicolás-vázquez *et al.* (2010). A tabela 4 lista o peso e fórmula molecular das estruturas simuladas.

Tabela 4 - Peso e Fórmula molecular dos compostos propostos.

Composto	Fórmula Molecular	Peso Molecular
(1AFB ₁)-BTC-Eu	C ₂₆ H ₁₆ O ₁₂ Eu	672,37
(2AFB ₁)-BTC-Eu	C ₄₃ H ₂₈ O ₁₈ Eu	984,64
(3AFB ₁)-BTC-Eu	C ₆₀ H ₄₀ O ₂₄ Eu	1296,92
(1AFB ₁)-DAMIC-Eu	C ₂₅ H ₁₅ NO ₁₂ Eu	673,35
(2AFB ₁)-DAMIC-Eu	C ₄₂ H ₂₇ NO ₁₈ Eu	985,63
(3AFB ₁)-DAMIC-Eu	C ₅₉ H ₃₉ NO ₂₄ Eu	1297,91

Foram construídos dois sistemas com a AFB₁ que mimetizam a primeira esfera de coordenação dos compostos finais. Os dois sistemas são diferentes apenas pelo

material híbrido ligado ao Eu^{3+} . Ambos os sistemas possuem diferentes números de AFB_1 ligadas ao Eu^{3+} (1, 2, 3 AFB_1 - HIBs) e com carga do sistema (3+).

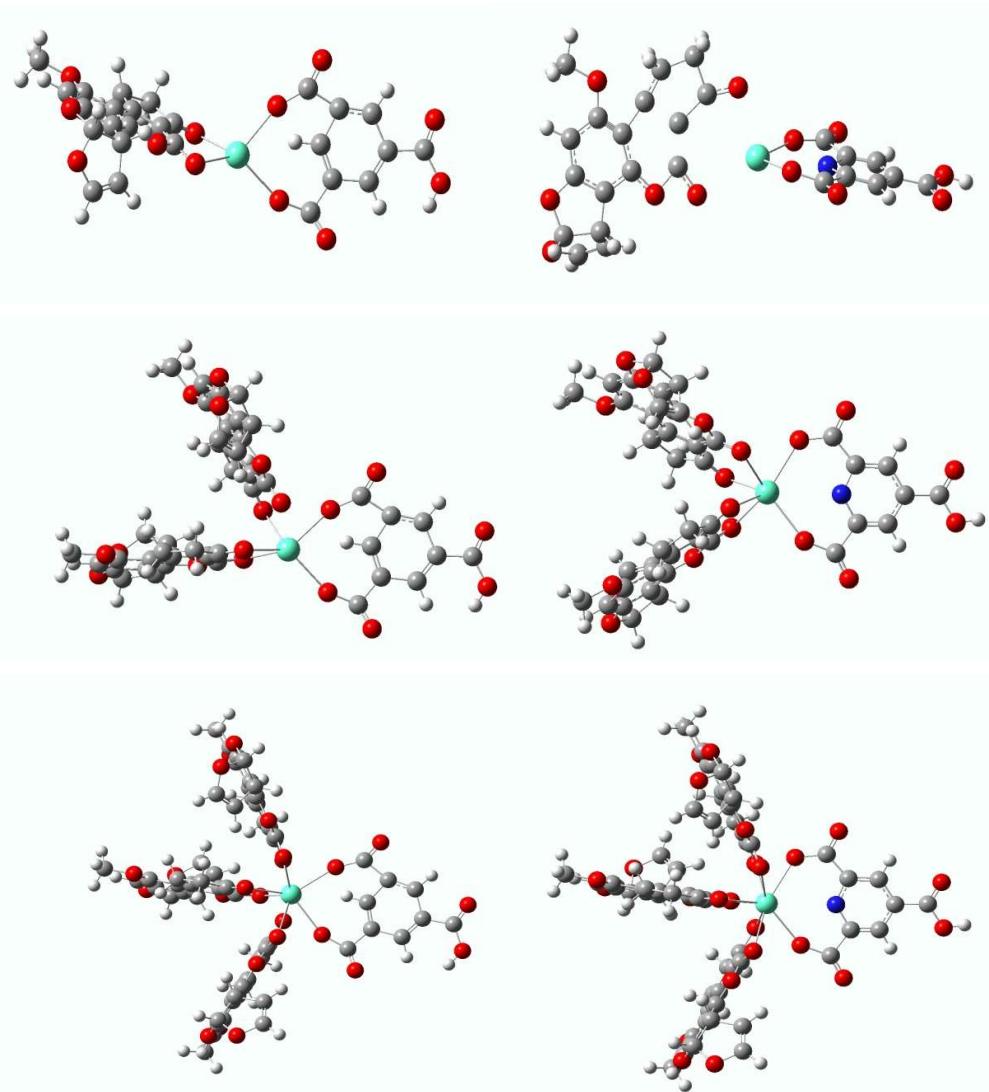


Figura 12 - Compostos otimizados, (1,2,3 AFB_1) ligantes ao metal, com as distintas matrizes à direita DAMIC e a esquerda BTC.

Mediante a modelagem dos compostos, as ligações $\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{O}$ foram ajustadas para 2.58 Å (DANGELO e SPEZIA, 2012). Então, na primeira etapa, os compostos foram otimizados em sua geometria pelo LUMPAC. Nesta etapa o sistema foi submetido a cálculos com os métodos semi-empíricos RM1 e PM7. A escolha dos métodos, dentre os demais disponíveis no LUMPAC, se deve ao avanço em suas parametrizações. O que corrobora numa possível melhora da precisão nos resultados

obtidos. Por exemplo, segundo Silva, Júnior e Freire (2016), o RM1 é supostamente uma parametrização adiante do AM1, que descreve um maior conjunto de elementos e estruturas em relação ao seu predecessor, enquanto o PM7, um aprimoramento do método PM6 lançado por Voityuk e Rösch, constitui-se numa correção na parametrização apresentada pelo AM1 reproduzindo melhor as interações fracas (Força de London e ligações de Hidrogênio).

Foi avaliada a possibilidade de três diferentes sítios de coordenação com a simulação do menor sistema, 1AFB₁-BTC através do ΔH_f . No qual, a AFB₁ poderia ser coordenada ao íon Eu³⁺ pelos oxigênios na porção lactona e ciclopentano nos oxigênios O₁₅-O₁₄, pelos oxigênios O₁₄-O₁₀ pela região do anel lactona e pela porção bi-furanóide nos oxigênios O₆-O₇.

Os sítios de coordenação pela região do anel lactona e pela porção bi-furanóide obtiveram maiores valores de ΔH_f quando, utilizando o método PM7 os valores são: O₁₄-O₁₀ → 1654.2 KJ/mol e O₆-O₇ → 1800.9 KJ/mol que indica maior ΔH_f frente a provável coordenação da AFB₁ nos oxigênios O₁₄-O₁₅ (1464.6 KJ/mol). Contudo a principal intenção de construir distintas modelagens com diferentes números coordenação, 4, 6 e 8 respectivamente para as estruturas mostradas na figura 12, é avaliar a estrutura que forneceria melhor parâmetro de transferência de energia.

5.1.1 Estimativa dos estados excitados

Após a otimização da geometria, as estruturas da figura 12 foram submetidas ao cálculo de estimativa dos estados excitados para que diante do estado de menor energia fossem estimadas as taxas de transferência. Todavia, segundo Santos *et al.* (2013) a melhor circunstância para transferência de energia ligante → metal, implica na energia de seus estados emissores de aproximadamente 1.500 cm⁻¹ acima dos estados emissores do íon, no qual, para o euroípio corresponde aos termos ⁵D₀ → 17293, ⁵D₁ → 19027, ⁵D₄ → 27586 cm⁻¹.

As melhores taxas de transferência de energia foram encontradas para as estruturas: 3AFB₁-HIB-BTC, onde o estado tripleto possui 17340.30 cm⁻¹ e singuleto 25277.80 cm⁻¹ e para estrutura 1AFB₁-HIB-DAMIC o estado tripleto possui 17026.50 cm⁻¹ e singuleto 24544.50 cm⁻¹.

5.1.2 Espectros de teóricos absorção

Levando em consideração que foi utilizado o mesmo método (PM7) para obtenção dos espectros das estruturas (1AFB₁-BTC/ DAMIC e AFB₁) na figura 13, a diferença entre o espectro experimental da AFB₁ que possui $\lambda_{\text{máx}}=361$ nm $\lambda_{\text{máx}'}=263$ nm é de aproximadamente 40 nm para comprimentos de ondas menores. Se ampliarmos essa perspectiva para os espectros dos compostos formados com a diferença de 40 nm acima ou abaixo, as transições de $\lambda_{\text{máx}} \sim 420$ nm e o desdobramento em $\lambda_{\text{máx}'} \sim 340$ -320 nm, identificam transições por exemplo, no estado emissor $^5\text{D}_3$.

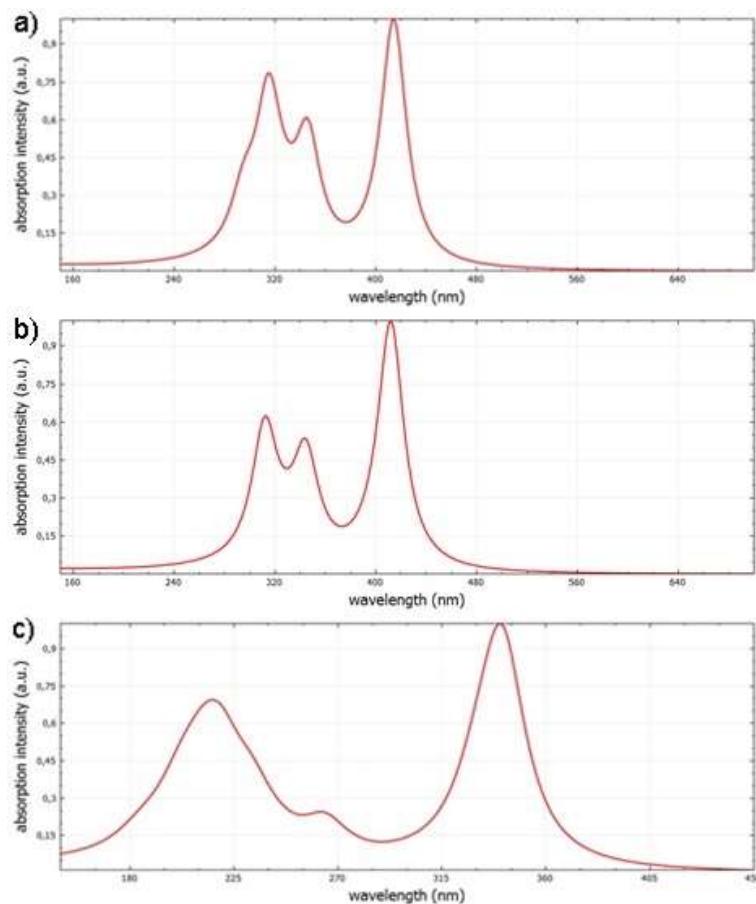


Figura 13 - Espectros teóricos de absorção dos compostos a)HIB-BTC-AFB₁, b) HIB-DAMIC-AFB₁ e c) AFB₁.

5.2 Análise Espectroscópica

5.2.1 Espectroscopia Uv/Vis e Raman da AFB₁

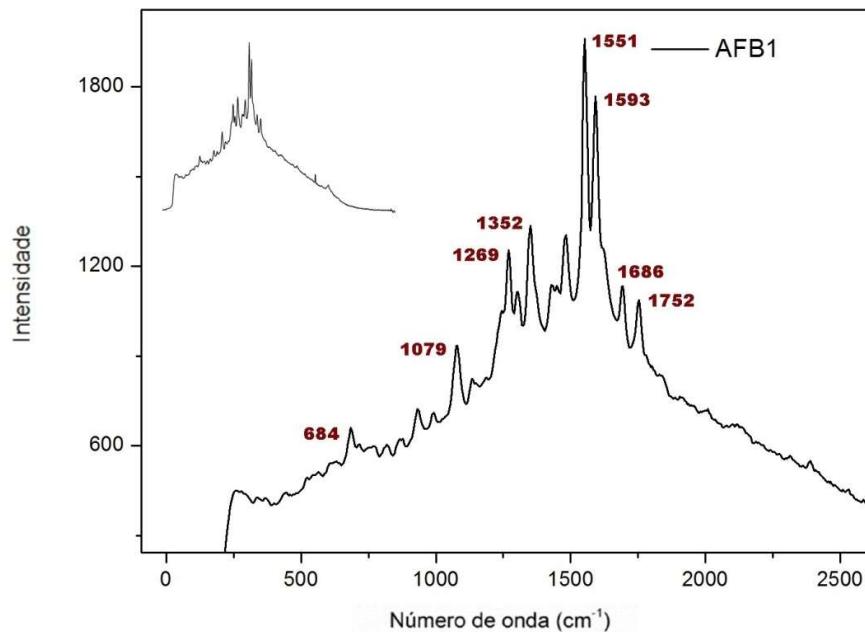


Figura 14 - Espectro Raman da AFB₁ ampliado na região de interesse.

Na figura 14 é descrito o Espectro Raman da AFB₁ ampliado na região de interesse. O espectro apresenta picos em 1551 - 1593 - 1079 cm⁻¹ que são atribuídos às deformações no anel dos grupos C-C e C-C-C respectivamente, enquanto, em 1752 cm⁻¹ é atribuído ao anel lactona e em 1686 cm⁻¹ referente ao grupo C=O no anel ciclopentano. Em 1269 cm⁻¹ teríamos a deformação do grupo C-H no anel. Em 1352 cm⁻¹ teríamos o -CH₃ e 684 cm⁻¹ relativo ao C-H no plano. O espectro está de acordo com o apresentado por Taabu (2015).

À medida que a amostra de AFB₁ para espectroscopia Uv/vis foi submetida à análise utilizando como solvente o metanol, observamos um deslocamento hipsocrômico devido à interação solvente/soluto onde o solvente pode estabilizar o estado fundamental, deslocando a transição $n \rightarrow \pi^*$ para comprimentos de ondas menores (figura 15). Portanto, a absorção característica frente a este solvente é de

361 nm, ainda no ultravioleta, o espectro evidencia a importância estrutural, num sistema conjugado da molécula: anel lactona / anel aromático, $\lambda(\text{máx}) > 210$, ~ 360 e $\lambda(\text{máx}') \sim 260$.

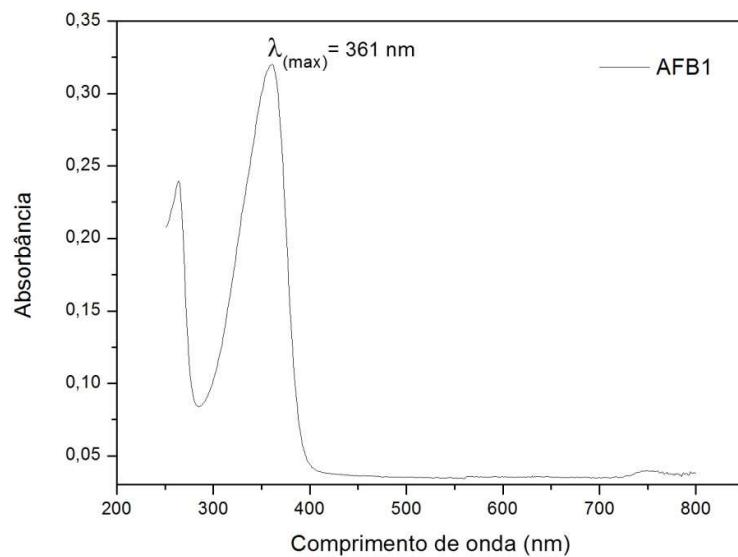


Figura 15 - Espectro Uv/Vis de solução metanólica de AFB₁

5.2.2 Espectroscopia FTIR

Os espectros obtidos na região do Infra-Vermelho para a AFB₁ são mostrados na figura 16 observamos a concordância com os descrito na literatura por (COBLENTZ, 1973).

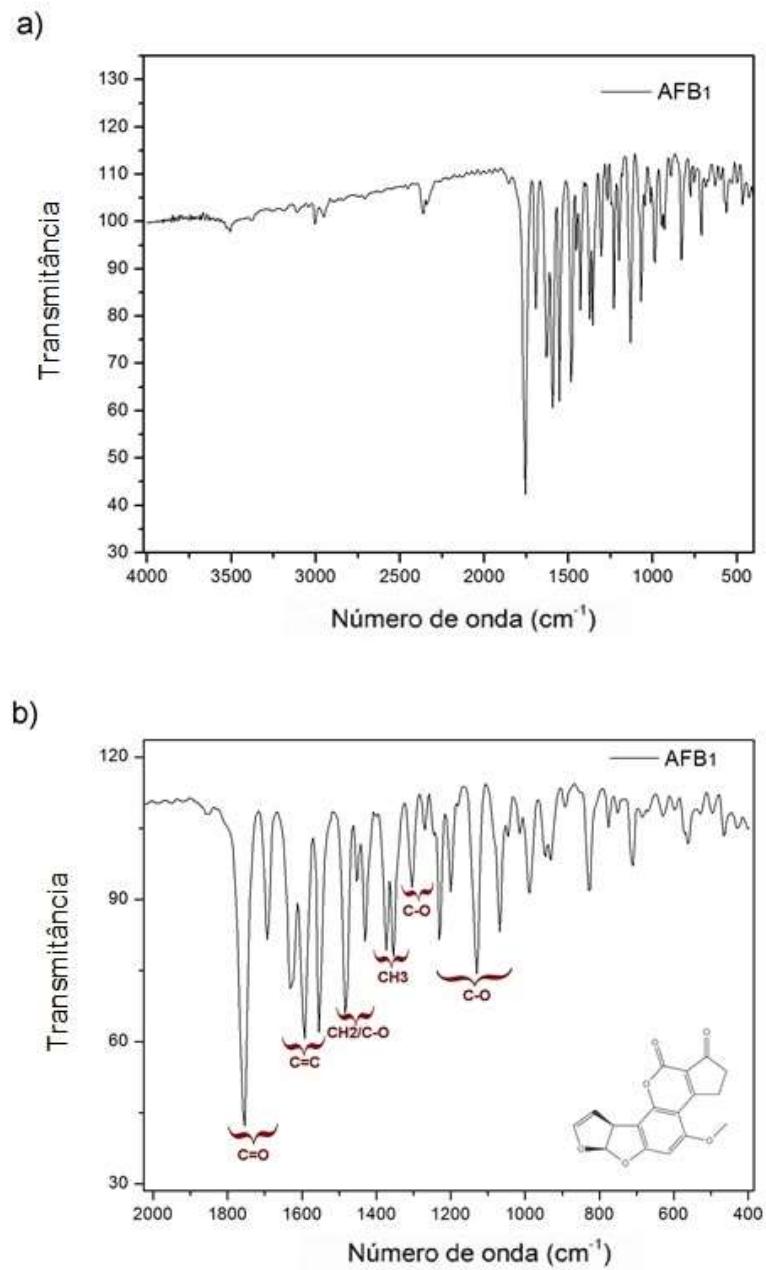


Figura 16 - Espectro de FTIR da AFB1 (a) e ampliação (b).

No espectro, descrito na figura 16, aparece a indicação de duas bandas referentes ao grupo C=O em 1755-1688 cm^{-1} , em confirmação ao espectro proposto por Nesbitt *et al.* em 1962. Também observamos três bandas na região de 1634-1554 cm^{-1} referentes às vibrações C=C do anel aromático e três bandas alusivas às deformações axiais e angulares de 1482-1428 cm^{-1} de grupos CH₂,C-O. A banda

correspondente ao dimetil geminal aparece como um duplete na região de 1375-1352 cm^{-1} e as bandas em 1304-1270 são relativas ao éster C-O. Em 1065 cm^{-1} observamos as bandas remanescentes da deformação axial e angular tanto do éster quanto dos éteres. Nas bandas ainda mais afastadas, começando em 988-708 cm^{-1} , encontramos a identificação do anel aromático, além de grupos $\text{RCH}=\text{CH}_2$, $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ até $\text{HC}=\text{CH}$ em 683 cm^{-1} .

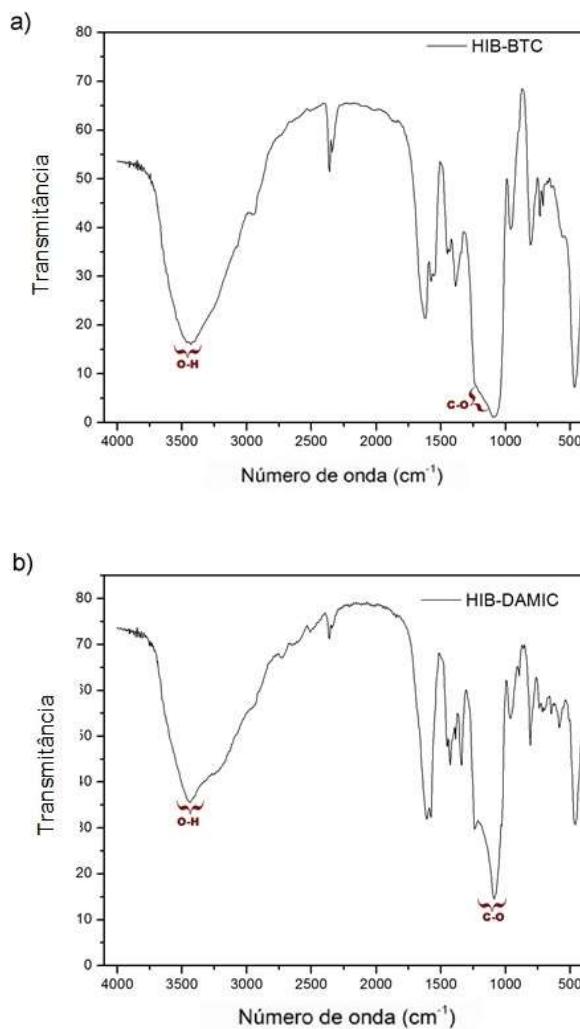
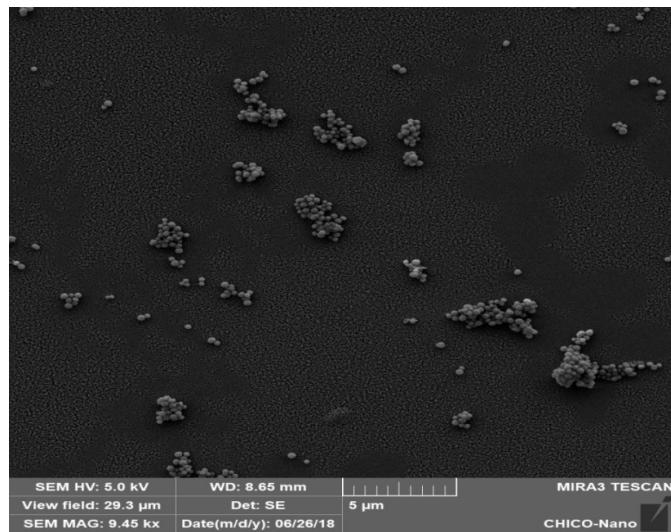


Figura 17 - Espectros FTIR HIB-BTC (b) e HIB-DAMIC (a).

Em ambos os espectros na figura 17, os compostos apresentam bandas características do grupo O-H na região de 3445-3465 cm^{-1} . No caso do ácido quelidâmico há uma banda em 1339 cm^{-1} , relacionada ao grupo C-N. Ambos possuem bandas nas regiões de 812 cm^{-1} para anéis para-substituídos. Para o HIB-DAMIC encontramos bandas na região 700 a 735 relativas aos anéis orto-substituídos, ambos apresentam bandas referentes ao grupo C-O de álcoois e fenóis na região de 1090 cm^{-1} para o DAMIC e 1103 cm^{-1} para o BTC.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura HIB-BTC e HIB-DAMIC

As Figuras 18 e 19 identificam as matrizes HIB-DAMIC e HIB-BTC, depositados em placas de quartzo. Em ambos os casos ocorre à formação de aglomerados de diferentes formas, sempre com fases morfológicas esféricas e com boa distribuição das microestruturas, porém sem uniformidade na formação de um filme.



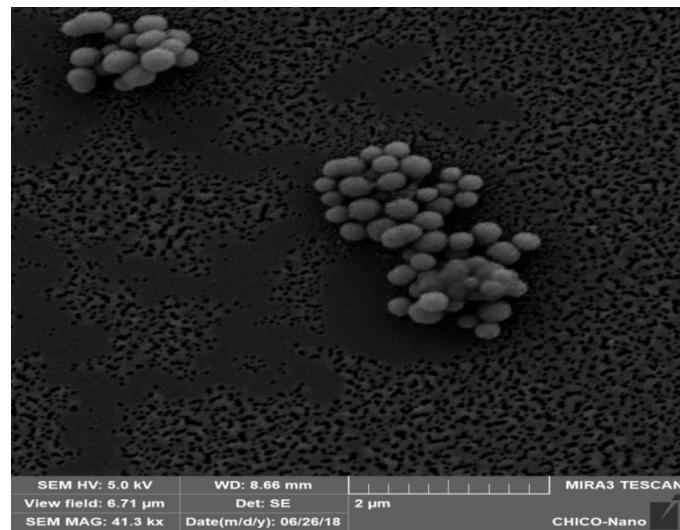
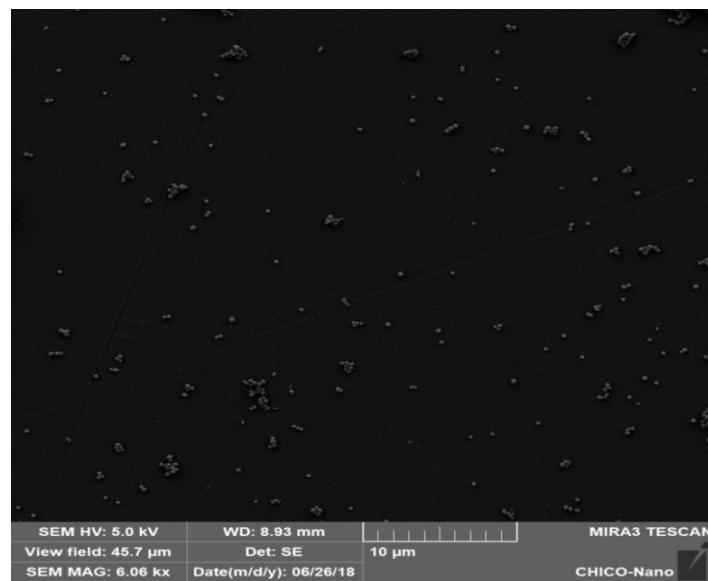


Figura 18 - Micrografia do HIB-DAMIC.



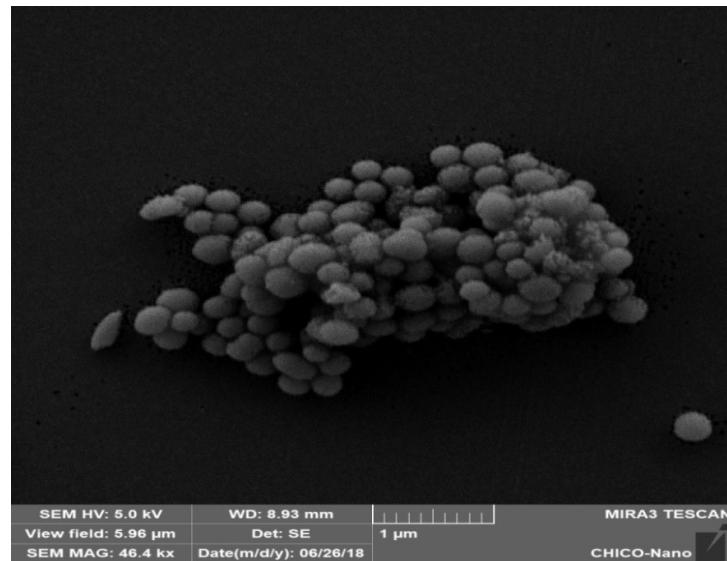


Figura 19 - Micrografia do HIB-BTC.

5.3 Fotoluminescência

5.3.1 Proporção e Concentração

Nesta análise foi utilizada a condição 1 descrita na metodologia, para os ensaios de detecção da AFB₁. Sendo assim realizamos ensaios de deposição dos híbridos HIB-BTC e HIB-DAMIC utilizando como substrato lamínulas de vidro, a fim de determinar as proporções ideais de deposição (Dp), sendo cada deposição 7,69 μL.

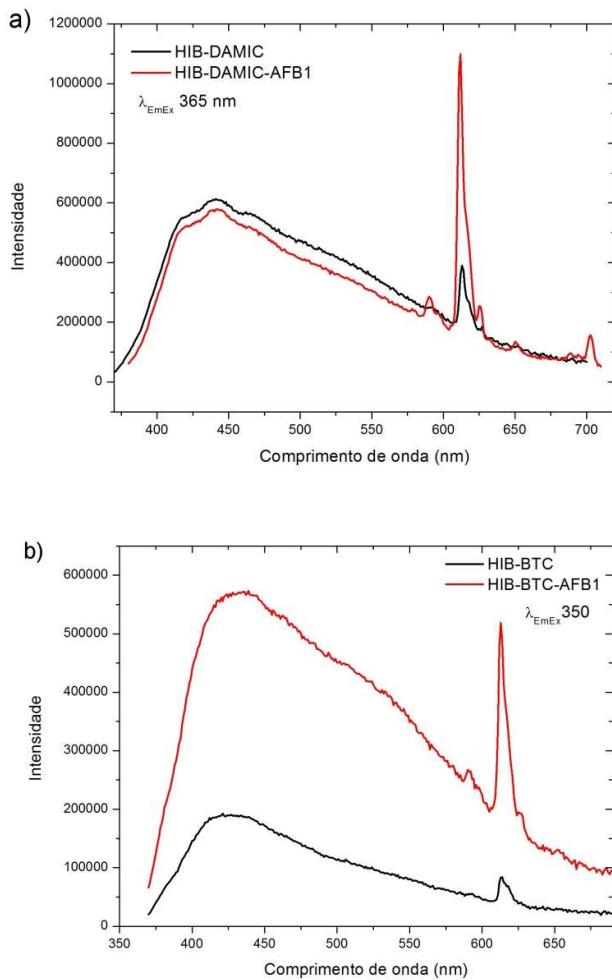
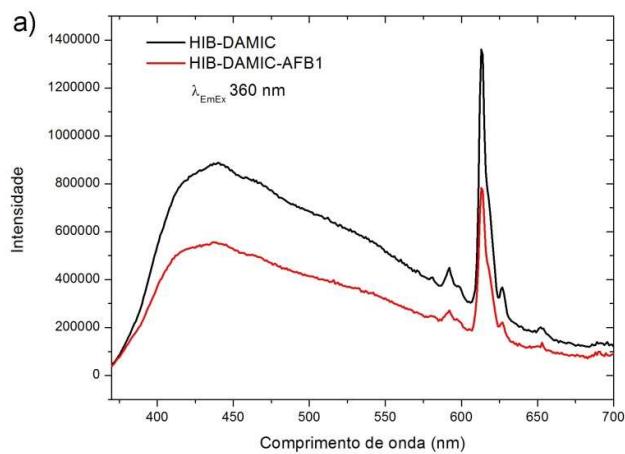


Figura 20 - Espectros das matrizes a) HIB-DAMIC e b) HIB-BTC com 5Dp (cinco deposições) de cada matriz e da matriz com AFB1.



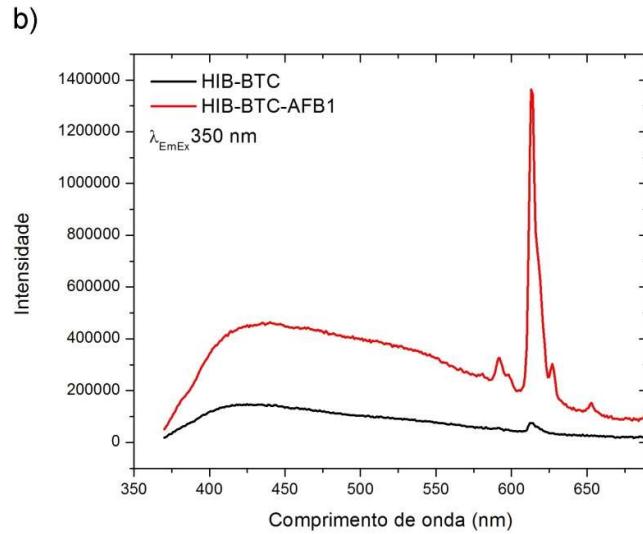


Figura 21 - Espectros das matrizes a) HIB-DAMIC e b) HIB-BTC com 10Dp (dez deposições) de cada matriz e da matriz com AFB₁.

Para avaliar a influência do número de deposições na capacidade de detecção da AFB₁, foram realizados testes com solução metanólica de AFB₁ com concentração de 20 ppb. Neste teste fica evidente através das Figuras 21 e 22, que as proporções de deposições que oferece melhor sensibilidade para identificação da AFB₁ são as de 5Dp (38,45 μ L) para matriz HIB-DAMIC e 10Dp (76,9 μ L) para a matriz HIB-BTC. Ao utilizar as lamínulas de vidro na análise, pode-se obter um falso positivo, devido à interferência causada pela emissão do vidro, por este motivo os ensaios posteriores foram utilizados com substrato plano de placas de quartzo.

5.3.2 HIB-BTC e HIB-DAMIC

Os híbridos HIB-BTC-Eu³⁺ e HIB-DAMIC-Eu³⁺ possuem em sua primeira esfera de coordenação moléculas de água, que suprimem sua luminescência. Sendo assim, foram testados para explorar a substituição das moléculas de água pela AFB₁ como ligantes do euroípio. Através desta coordenação, pretende-se promover o efeito antena numa taxa eficiente de transferência de energia para o metal, resultando numa emissão luminescente a partir do estado emissor 5D_0

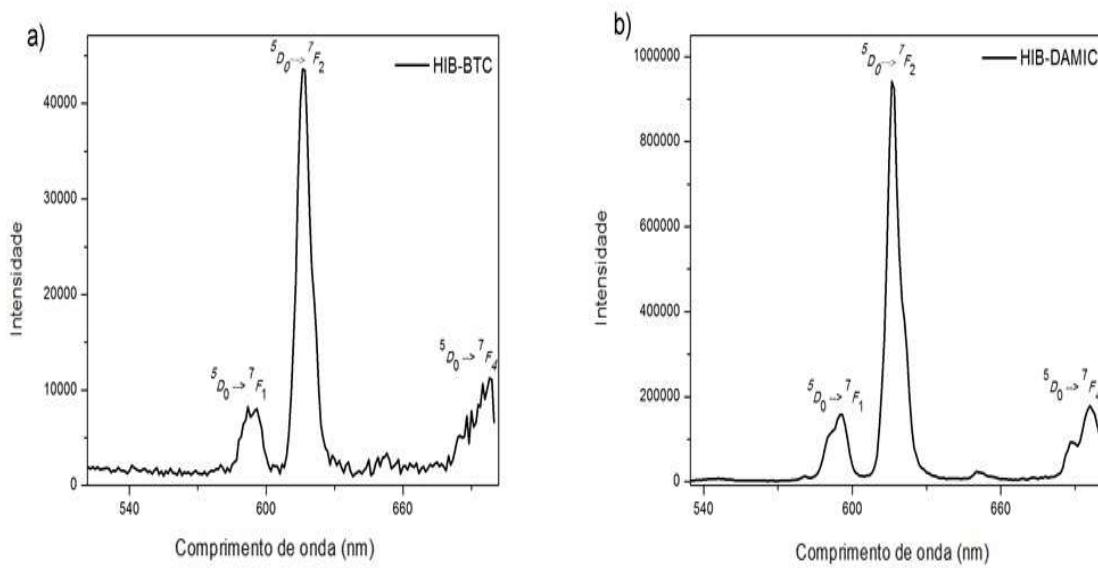


Figura 22 - Espectros de emissão do HIB-BTC (a) e HIB-DAMIC (b).

A interpretação destas transições está atrelada a possíveis grupos de simetria no seu sistema, corroborando a uma elucidação da simetria local do ambiente em que se encontra o íon. Neste caso, os espectros na Figura 20 mostram a existência da transição de alta intensidade na banda referente à transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ em relação à transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ sugerindo a existência de um ambiente de baixa simetria. Favorecendo a existência de grupos de simetria C_n , C_{nv} ou C_s (LIMA, MALTA e ALVES 2005 *apud* AZEVEDO, 2018).

5.3.3 Ensaios de detecção de AFB₁

Os níveis discretos de energia podem ser caracterizados como $^{2S+1}L_J$, onde L , S e J são respectivamente os números quânticos azimutal, de spin e de momento angular. A depender da simetria do ambiente químico, o íon lantanídeo (Eu^{3+}) pode ficar exposto e haverá a quebra da degenerescência destes níveis discretos de energia, havendo um desdobramento de campo e exposição mais bem definida dos multipletos (J) que compõem a degenerescência ($2J+1$).

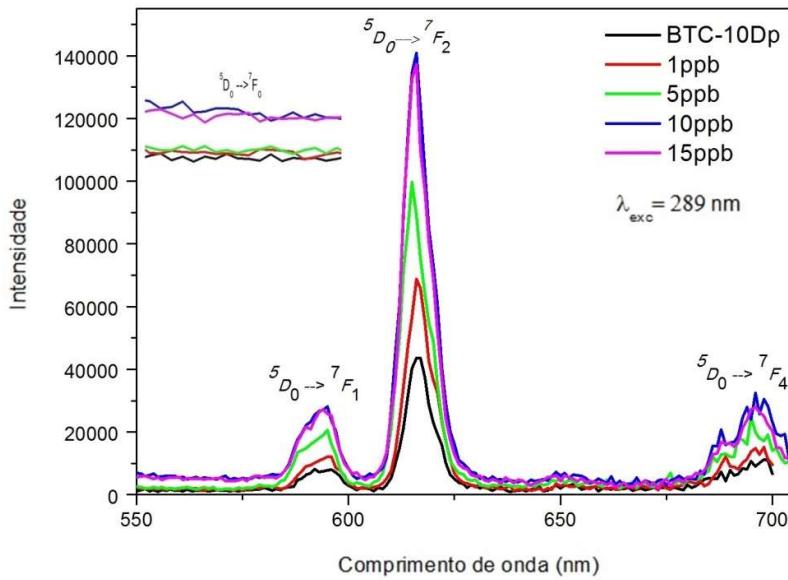


Figura 23 - Espectro de luminescência da matriz, HIB-BTC, após adição de $7,9\mu\text{L}$ de soluções metanólicas de AFB_1 em diferentes concentrações. A ampliação corresponde a região típica da transição ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$.

Os espectros da(s) Figura(s) 23 e 24 mostram o HIB-BTC e HIB-BTC-AFB₁ excitados em $\lambda_{\text{exc}} = 289$ nm e o HIB-DAMIC e HIB-DAMIC-AFB₁ excitados em $\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm, a fim de, gerar os respectivos espectros de emissão. Constatamos possíveis mudanças decorrentes da adição AFB₁ no espectro de emissão, na região sensível ao íon Eu³⁺, próxima a 616 nm.

Ao que se pode observar, para o HIB-BTC há um aumento progressivo da intensidade de emissão com o aumento da quantidade de AFB₁. Podemos atribuir este efeito a um aumento de energia transferida ao metal na medida em que se acresce AFB₁. Havendo uma saturação de deposições na matriz ao atingir 15 ppb de AFB₁.

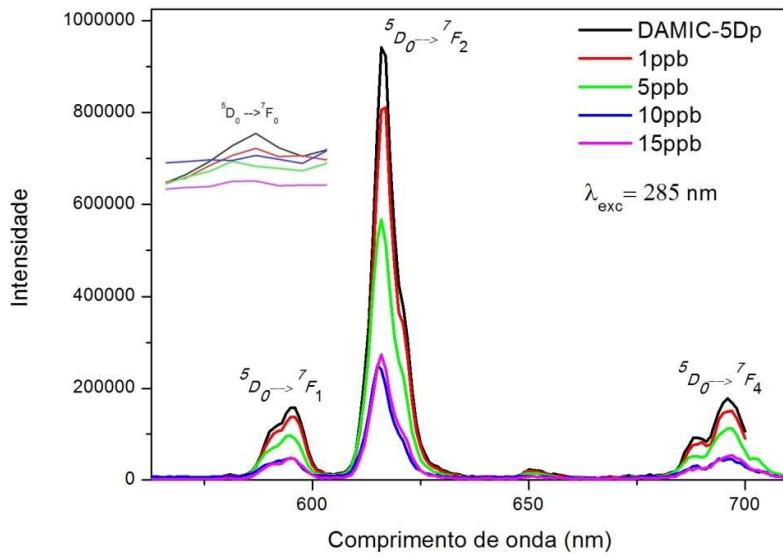


Figura 24 - Espectro de luminescência da matriz, HIB-DAMIC, após adição de $7,9\mu\text{L}$ de soluções metanólicas de AFB_1 em diferentes concentrações. A ampliação corresponde a região típica da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$.

Para o HIB-DAMIC verifica-se o processo contrário, a intensidade de emissão diminui com o aumento da quantidade de AFB_1 , como resultado da diminuição da energia transferida ao metal proporcionalmente ao aumento da concentração de AFB_1 . Neste caso, também ocorre uma saturação ao atingir a concentração de 15 ppb, Figura 25. Cabe ressaltar que uma provável justificativa para a diminuição da intensidade de emissão mostrada no espectro da Figura 24, pode ser devido à interação da AFB_1 por ligações covalentes nos átomos de hidrogênio das moléculas de água na primeira esfera de coordenação da matriz HIB-DAMIC, o que diminuiria a desativação no lantanídeo, causando como reflexo, também, as etapas em saturação (15 ppb e 20 ppb de AFB_1).

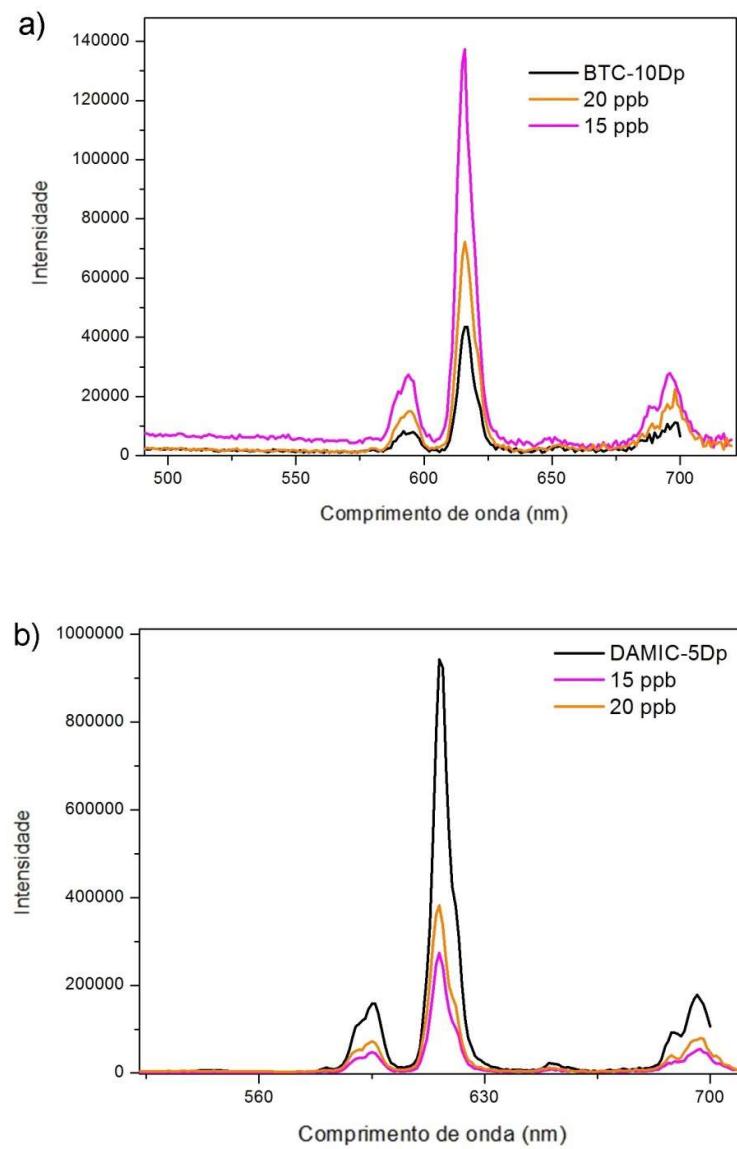


Figura 25 - Espectros de luminescência com as concentrações saturadas de 15 ppb e 20 ppb da AFB₁, a) HIB-BTC e b) HIB-DAMIC.

Transições hipersensíveis ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$, são observadas com grande intensidade em tri-tetra-complexos quelatos com európio com grupos de coordenação similares ao da AFB₁ (C=O, COO⁻...) (BINNEMANS, 2015).

Baseado na razão da integração das áreas das transições $5D_0 \rightarrow 7F_2$ / $5D_0 \rightarrow 7F_1$ é possível interpretar a simetria ao redor do íon. Neste caso, o sistema apresenta características flutuantes em distintas concentrações de AFB₁ para HIB-DAMIC e uma consistência fraca de linearidade para o BTC, Figura 26. Entretanto, como não há alterações significativas na simetria local do íon, as flutuações observadas não fornecem uma boa correlação com a quantidade de analito ou com o ambiente, ou seja, não pode ser utilizada como parâmetro analítico de detecção.

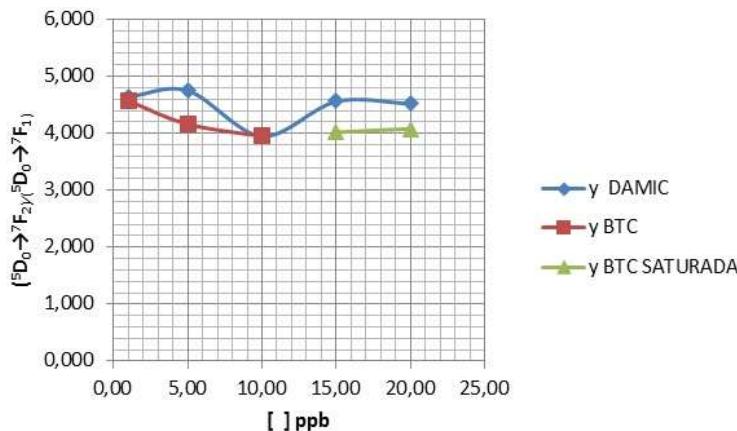


Figura 26 - Razão das áreas integradas, baseadas no espetro experimental, calculada pelo LUMPAC.

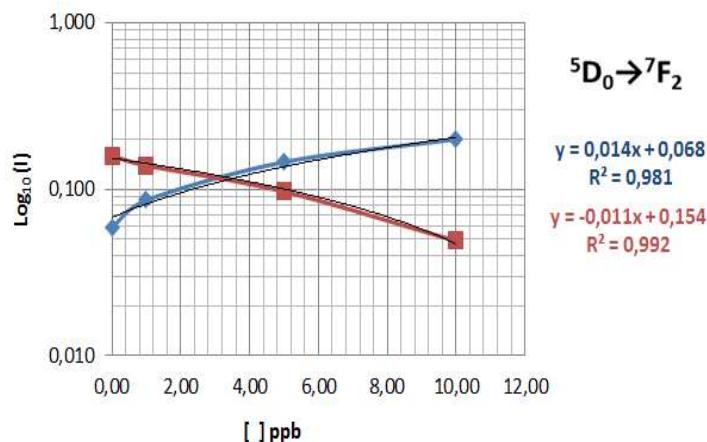


Figura 27 - Relação entre a Log [I] e a quantidade de AFB₁, em azul HIB-BTC e em vermelho HIB-DAMIC.

Entretanto, a relação entre a intensidade e a quantidade de AFB₁ avaliada mediante a intensidade das transições $5D_0 \rightarrow 7F_2$ de ambos os sistemas Figura 27,

indica um padrão proporcional entre a variação, (aumento ou diminuição da intensidade), à medida que se adiciona AFB₁ (Q). As linhas de tendência aplicada à relação (I x Q) resultou num R² entre 0,97 e 0,99 para HIB-BTC e HIB-DAMIC, respectivamente. Infere-se que o R², quando mais próximo de 1,00 descreve um padrão linear mais fidedigno do sistema.

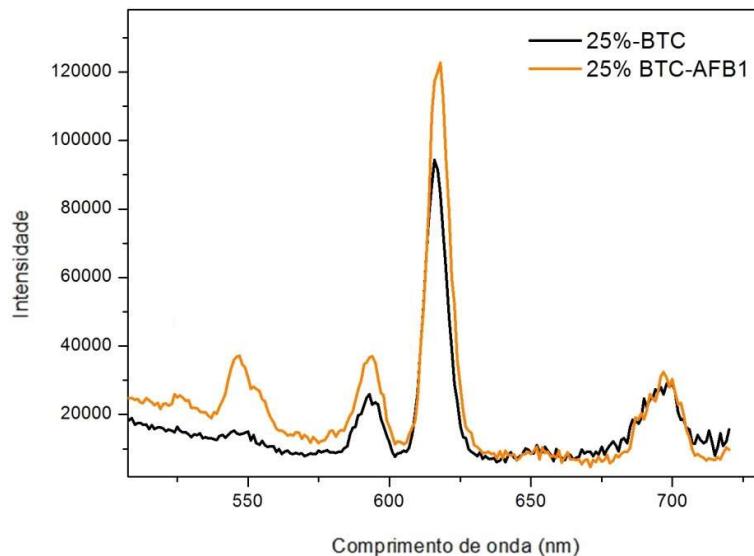


Figura 28 - Espectro de luminescência da matriz, HIB-BTC 25% da concentração original, com a concentração saturada 20 ppb da AFB₁ com $\lambda_{exc} = 288$ nm.

Por meio dos resultados apresentados na matriz HIB-BTC foi pertinente reavaliar o efeito de aumento da intensidade de emissão com a variação da concentração, porém modificando a concentração da matriz HIB-BTC (0,3 mg / L). O espectro da figura 28 teve sua amostra preparada mediante a condição 1 mostrada na metodologia. Nos ensaios de detecção com menos 25% da concentração original da matriz HIB-BTC, enquanto foi mantida a concentração da AFB₁ em 20 ppb. Além disso, são observadas transições $^5D_1 \rightarrow ^7F_J$, onde $F_J = 0,1,2$, com os respectivos comprimentos de onda $\lambda = 523$ nm, $\lambda = 546$ nm e $\lambda = 552$ nm. Essas transições, segundo Viana (2015), são atribuídas a uma alta população do estado 5D_1 e baixa taxa de desativação não radioativa para o estado 5D_0 devido a frequências moderadas de fônlons.

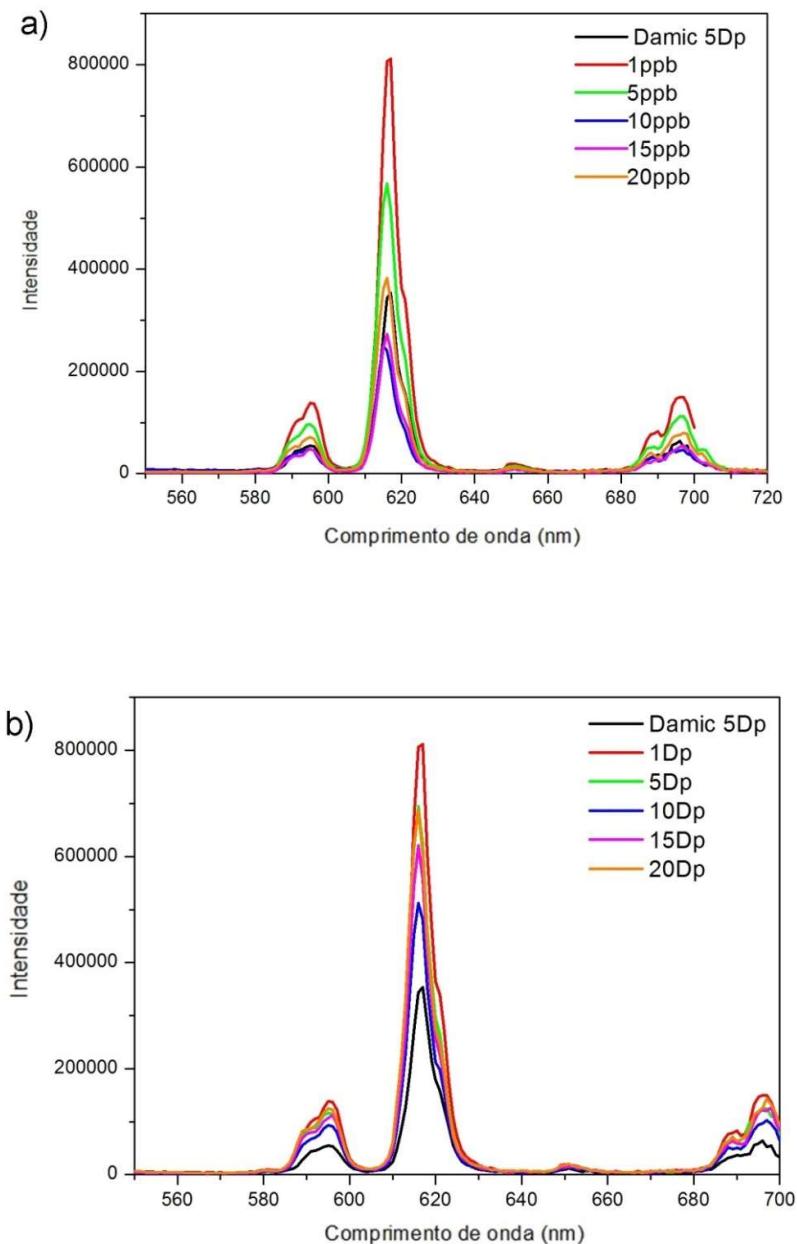


Figura 29 - Espectros de emissão HIB-DAMIC, $\lambda_{\text{exc}} = 324$ nm. O espectro a) com *label* de concentrações em ppb é a condição 1 dos ensaios de detecção, o espectro b) com o *label* de concentrações em Dp é a condição 2 dos ensaios de detecção.

O HIB-DAMIC possui ainda uma particularidade, ao ser excitado em $\lambda_{\text{exc}} = 324$ nm, exibe um perfil, Figura 29, na variação da intensidade da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$

semelhantes à exibida pelo HIB-BTC, que varia conforme o tipo de deposição da AFB₁. Quando feita uma única deposição para as distintas concentrações, o espectro não apresenta uma interpretação linear, mas, quando feitas deposições consecutivas de uma única concentração o espectro da margem a interpretar atinge a saturação em concentrações muito baixas, de até 5 ppb. Isto pode ser atribuído à ineficiente transferência de energia da AFB₁ e/ou efeito tipo “filtro” provocado pela absorção da AFB₁.

5.3.3.1 Tempos de Vida para HIB-BTC-AFB₁ e HIB-DAMIC –AFB₁

Mediante o ajuste exponencial da intensidade em relação ao tempo de decaimento foram obtidos experimentalmente os espectros das Figuras 30 e 31. Com o ajuste biexponencial para as amostras da matriz HIB-BTC-AFB₁, obtivemos tempos de vida de 0,08, 0,13, 0,47 e 0,51 ms enquanto para a matriz HIB-DAMIC-AFB₁, nas Figuras 32 e 33, os tempos de vida foram 0,45 e 0,35 ms utilizando em ambos os espectros um ajuste monoexponencial. Os ajustes monoexponencial e biexponencial foram escolhidos por apresentarem melhor acordo com os pontos experimentais.

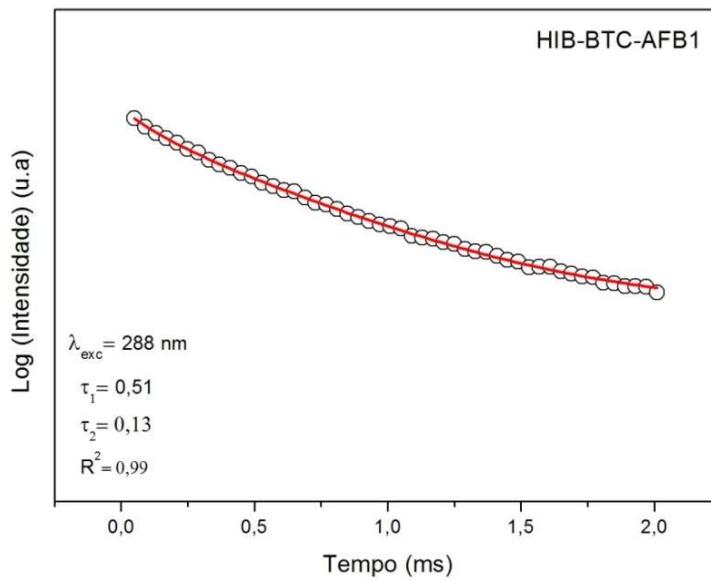


Figura 30 - Tempo de vida com ajuste biexponencial para HIB-BTC-AFB₁.

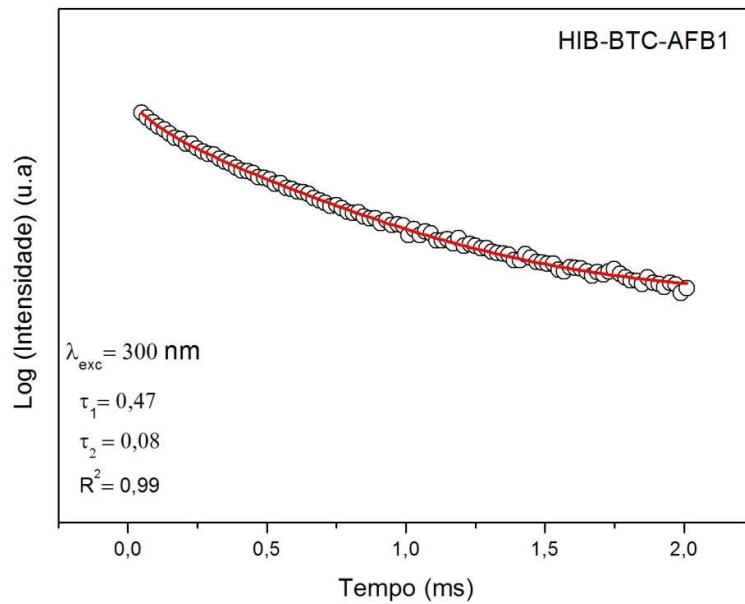


Figura 31 - Tempo de vida com ajuste biexponencial para HIB-BTC-AFB₁.

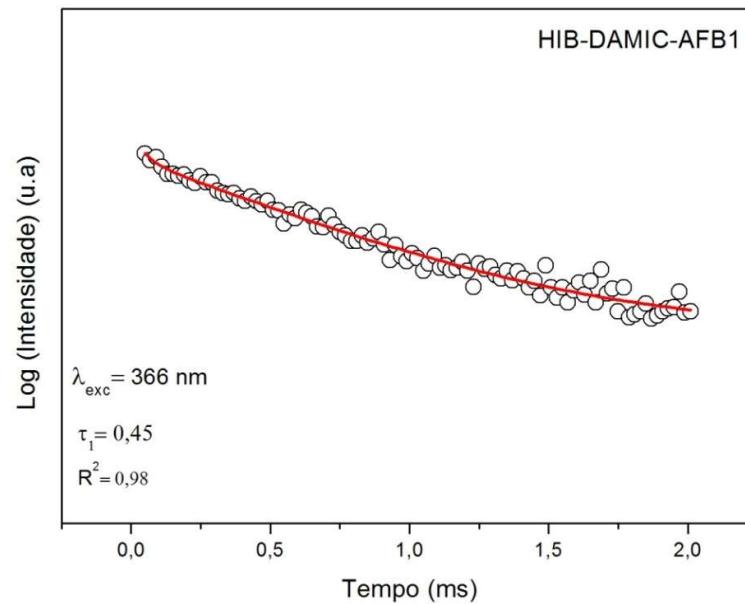


Figura 32 - Tempo de vida com ajuste monoexponencial para HIB-BTC-AFB₁.

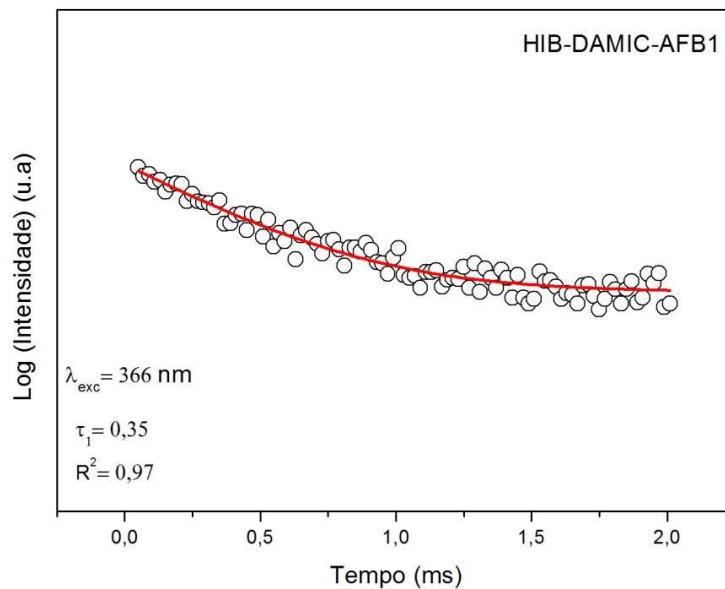


Figura 33 - Tempo de vida com ajuste monoexponencial para HIB-BTC-AFB₁.

5.3.3.2 Espectros de Excitação

A figura 34 mostra os espectros de a) excitação e b) emissão da AFB₁, estes espectros foram adquiridos com a amostra depositada em substrato plano de quartzo utilizando $\lambda_{\text{exc}} = 369 \text{ nm}$ para obter o espectro de emissão e $\lambda_{\text{emi}} = 436 \text{ nm}$ para obter o espectro de excitação. Os espectros possuem padrão característico de compostos orgânicos com uma banda larga e de alta intensidade.

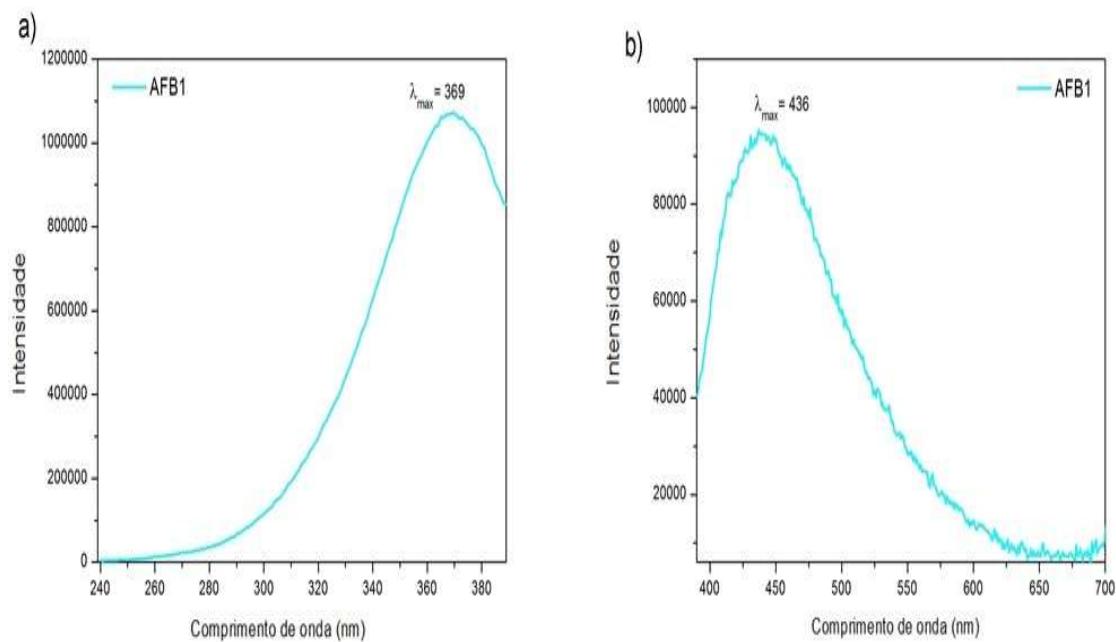
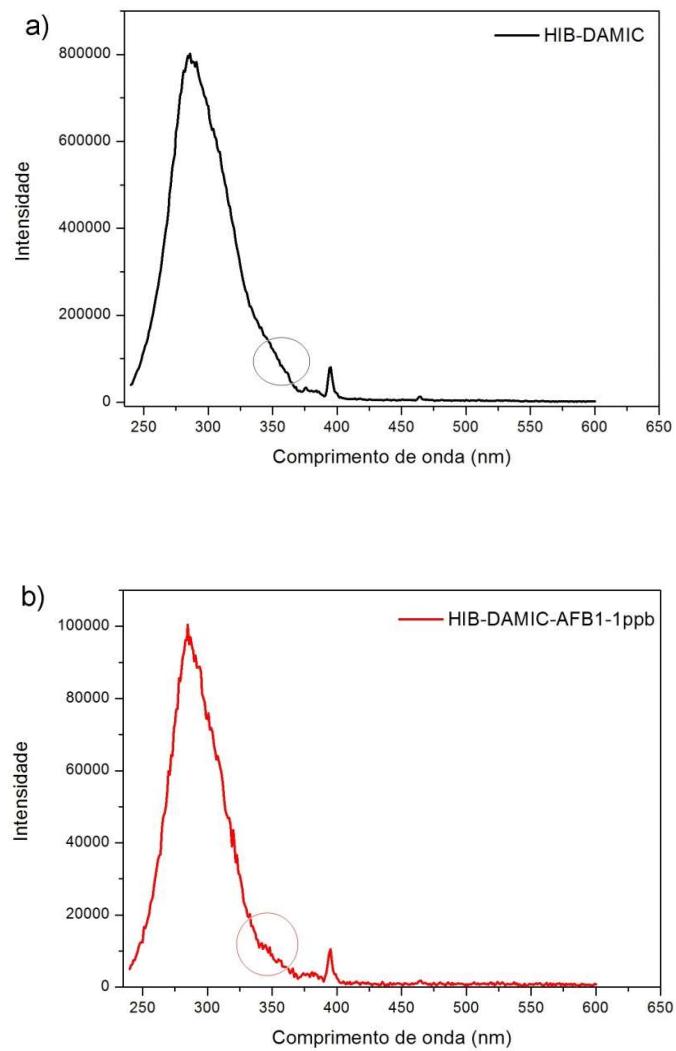


Figura 34 - Perfil fotoluminescente da AFB₁.

Nos espectros de excitação referentes às matrizes HIB-BTC e HIB-DAMIC com e sem adição da AFB₁ fizemos monitoramento a partir do comprimento de emissão do íon Eu³⁺ ($\lambda_{\text{em}} = 616$ nm).



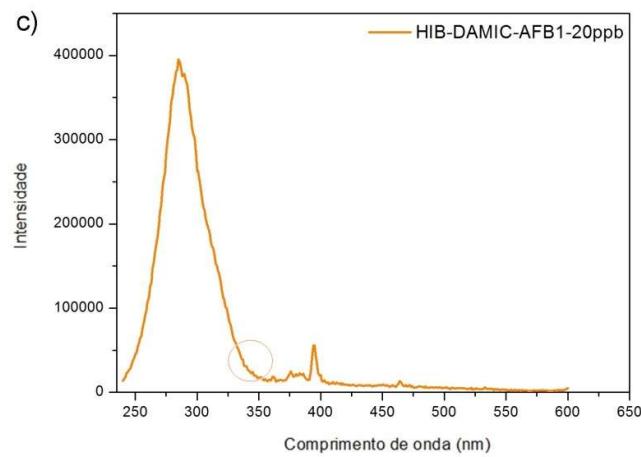
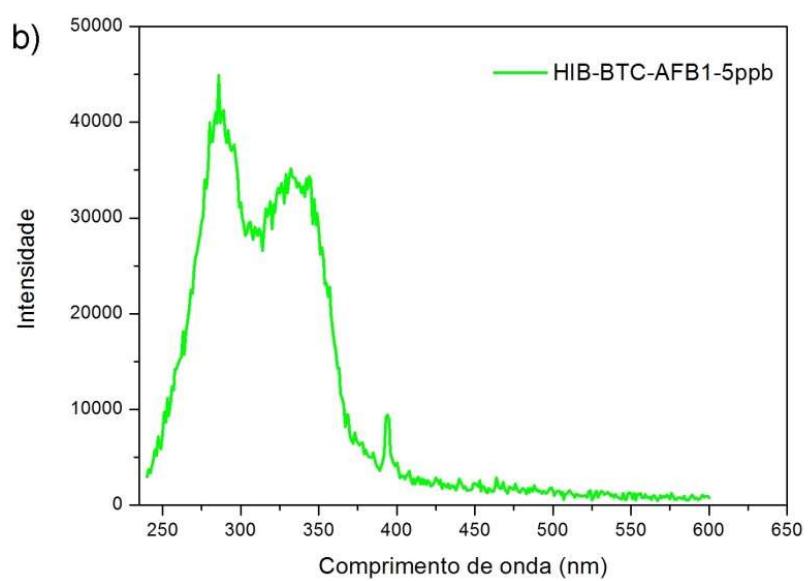
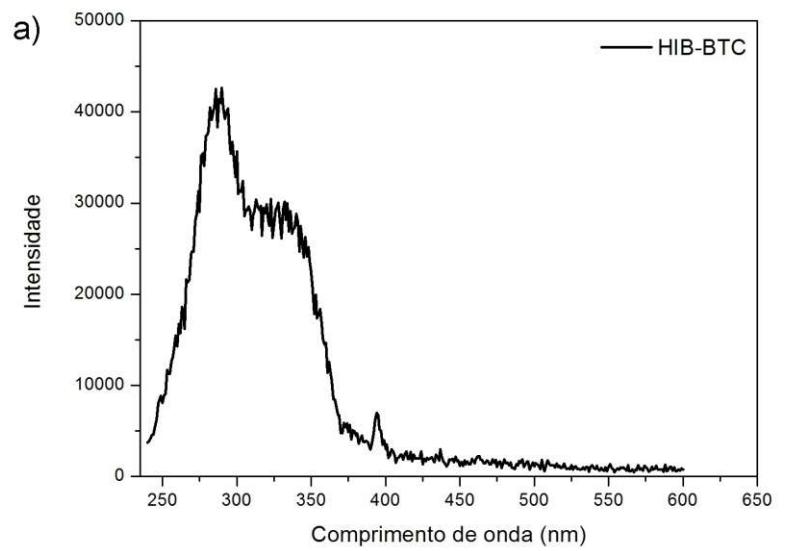


Figura 35 - Espectros de excitação da matriz: a) HIB-DAMIC da matriz com as concentrações de b) 1ppb e c) 20ppb da AFB1.

Os espectros de excitação dos sistemas baseados na matriz HIB-DAMIC manteve quase totalmente seu perfil espectral independente da adição de AFB₁, entretanto é possível observar na figura 35, na região destacada com um círculo que numa região próxima à absorção da AFB₁ ocorre uma atenuação da linha espectral à medida que se aumenta a quantidade de AFB₁. Este fato ocorre devido ao efeito filtro da absorção da AFB₁ ocorrer em região tão próxima. O espectro apresenta entre 250 nm e 350 nm, uma banda larga de absorção muito intensa, relacionada à sensibilização do íon Eu³⁺ através do resíduo –DAMIC. Além disso, também são verificadas bandas de excitação finas e de baixa intensidade entre 350 e 500 nm, relacionadas às transições intraconfiguracionais *f-f* do íon Eu³⁺.



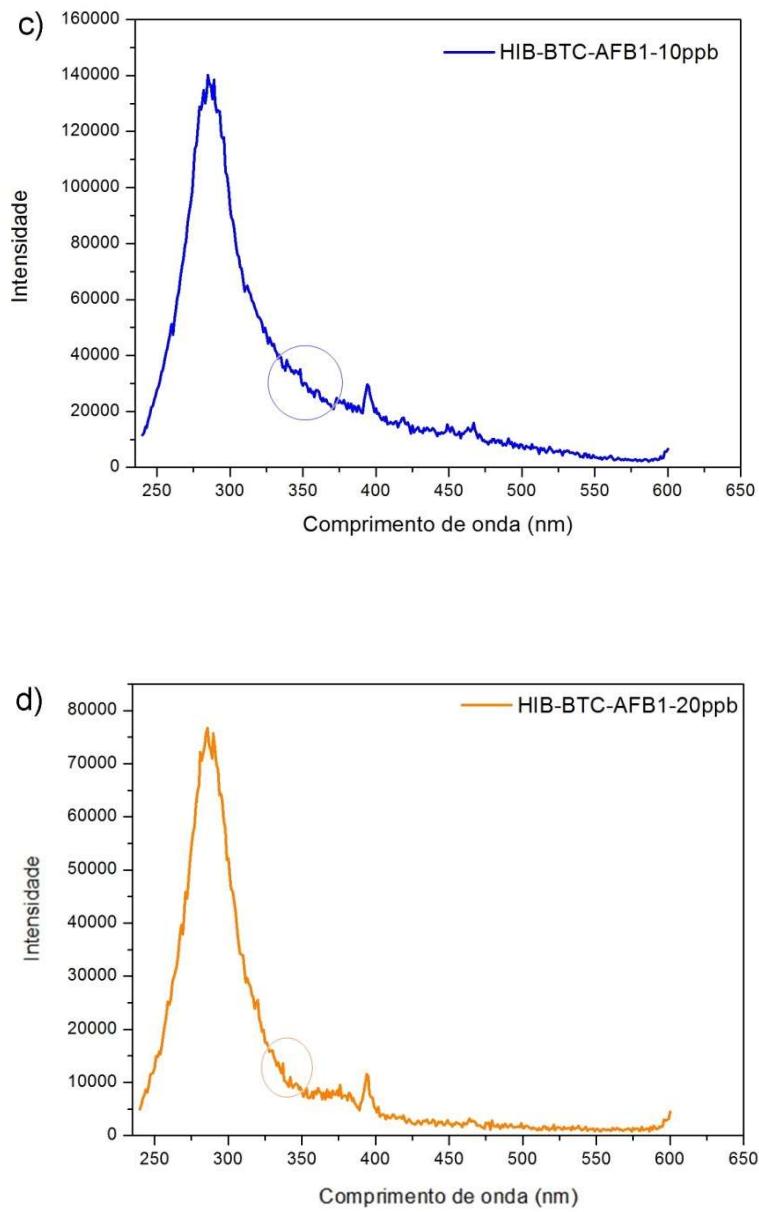


Figura 36 - Espectros de excitação da matriz a) HIB-BTC, o espectro excitação com a adição de b) 5ppb, c) 10ppb d) até 20 ppb de AFB_1 .

Utilizando a matriz HIB-BTC o perfil espectral de excitação, mostrado na Figura 36 se mantém mesmo com adição de até 5 ppb de AFB_1 . Para esta concentração a matriz possui $\lambda_{\text{máx}} = 285$ nm do ligante e $\lambda_{\text{máx}} = 393$ nm do íon. Por outro lado, o perfil

muda significativamente a partir da adição 10 ppb da AFB₁, passando a exibir apenas uma banda de absorção com máximo em $\lambda_{\text{máx}} = 285$ nm, relacionada ao resíduo -BTC

Na matriz HIB-BTC com apenas 25% de sua concentração original na Figura 37, observa-se comprimentos de onda equivalentes a $\lambda_{\text{máx}} = 290$ nm $\lambda_{\text{máx}} = 465$ nm e em $\lambda = 374 - 392$ nm com a adição da AFB₁ há um deslocamento para comprimentos de $\lambda_{\text{máx}} = 295 - 310$ nm. O estudo da variação de concentração da matriz pode ser expandido para novas porcentagens (maiores e menores) destas concentrações a fim de monitorar essas possíveis frequências de fôtons e este novo perfil espectral.

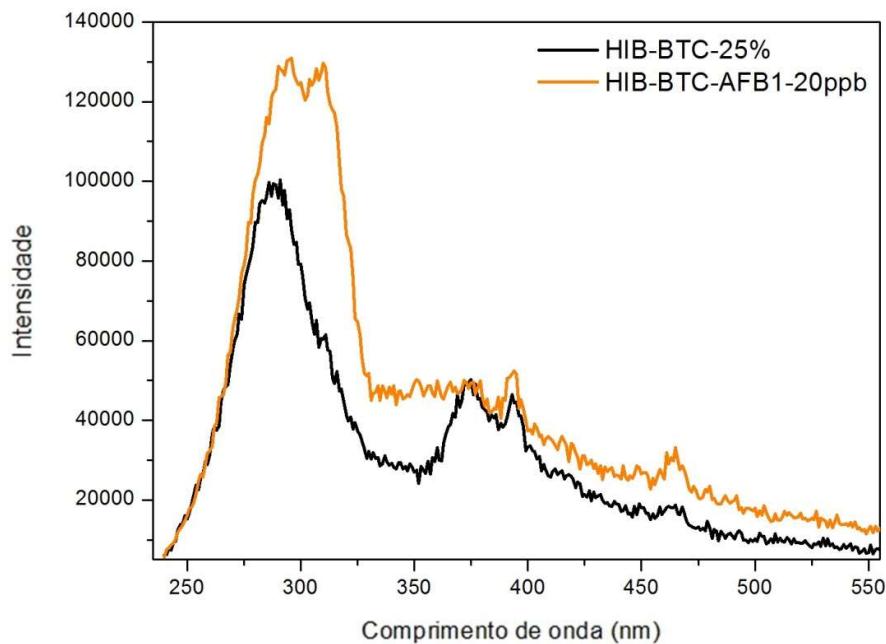


Figura 37 - Espectros de excitação utilizando HIB-BTC com 25% e uma deposição (7,69uL) com 20 ppb da AFB₁.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos confirmam haver interação da AFB₁ com as matrizes híbrido-inorgânicas HIB-BTC e HIB-DAMIC, descrevendo duas respostas distintas diante do monitoramento da luminescência para estas duas plataformas. Quando monitorado em distintos comprimentos de onda, o HIB-DAMIC só apresenta linearidade do comportamento no comprimento de onda de excitação $\lambda_{exc} = 285$ nm. A partir de $\lambda_{exc} = 324$ nm, o composto expressa um desempenho de intensidade semelhante ao HIB-BTC, porém sem um padrão bem definido para a primeira condição de deposição e com um padrão que leva à saturação a partir de cinco partes por bilhão com a segunda condição de deposição. A análise computacional sugeriu um provável sitio de coordenação na AFB₁ entre os oxigênios das carbonilas na porção lactona e ciclopentano. Baseado no cálculo dos estados excitados a análise sugere taxas de transferência de energia dentro dos limites encontrados na literatura.

O sistema em que a variação da concentração é feita na matriz HIB-BTC confirma a sensibilidade do receptor para identificar a AFB₁, porém exibindo um novo perfil espectral. Diante disso, os resultados do trabalho vislumbram a possibilidade da construção de um sensor químico ótico possuindo como componentes básicos: AFB₁ → HIB-BTC/DAMIC → Luminescência → Resposta, análogo à Analito → Receptor → Transdução → Sinal Elétrico. Usando a natureza da propriedade ótica como classificação nesse caso, o possível sensor seria classificado como um sensor de luminescência com duas respostas confirmativas pelo uso de duas plataformas que se comportam de formas diferentes. O dispositivo também deve apresentar resposta visível (luminescência).

7 PERSPECTIVAS

Como sequência deste trabalho, está em andamento a análise da seletividade das matrizes HIB-BTC e HIB-DAMIC (receptores) para os testes de seletividade frente às demais toxinas produzidas pelo *Aspergillus* (AF-B₁, B₂, G₁ e G₂). As etapas deste teste estão descrevidas, abaixo:

- Aquisição dos microorganismos da espécie *Aspergillus* de alto rendimento na produção de metabólitos secundários junto à Micoteca da UFPE;
- Inoculação dos microorganismos em ração para roedores e amostras de grãos;
- Extração, separação e tratamento dos metabólitos secundários (AF-B₁, B₂, G₁ e G₂) em amostras de grãos;
- Testar as matrizes num estudo Histopatológico dos roedores alimentados com ração contaminada;
- Testar as matrizes na identificação da AFB₁, na amostra de grãos contaminados.

Em paralelo submeter a uma nova triplicata as amostras (15 ppb e 20 ppb) que podem oferecer saturação ao sistema. Expandir a análise teórica, mediante o esclarecimento experimental da quantidade de moléculas de água ligantes na primeira esfera de coordenação do sistema.

REFERÊNCIAS

- MINCHIN,T. The Fence: Read For This? [2010]. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=DZyAdtS-7V0>>. Acesso em: 25 set. 2018.
- ABREU, Edson Martins de; STUCCHI, Elizabeth Berwerth. **Estudo dos Difenilfosfinatos de Lantânio Ativados por Cério, Európio e Térbio: Emissores Luminescentes Multicores.** 2008. 149 f. Tese (Doutorado). - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- A CASTRO, Marcos; CANUTO, Sylvio. O Método Hartree-Fock. In: MORGON, Nelson H; COUTINHO, Kaline. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.** São Paulo: Livraria da Física, 2007. Cap. 1. p. 1-27.
- BARRETT, J. Carl et al. **IARC MONOGRAPHS 100F: Chemical Agents and Related Occupations.** 2002. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-16/>>. Acesso em: 01 ago. 2018.
- BARROS, José Roberto Mendonça de. Prolegômenos: O passado no presente: a visão do economista. In: ROMEIRO, Ademar Ribeiro et al. **O mundo rural no Brasil do século 21: A formação de um novo padrão agrário e agrícola.** Brasília: Embrapa, 2014. Cap. 1. p. 16-22. ISBN 978-85-7035-336-8.
- BASTOS, Carlos Maciel de Oliveira. **Método de Hartree-Fock.** 2015. Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo.. Disponível em: <http://www.ifsc.usp.br/~strontium/Teaching/Material2015-2_SFI5814_Atomicamolecular/Seminario - Carlos - Hartree-Fock.pdf>. Acesso em: 05 set. 2017.
- BATISTA, Hélcio José. **Novos Desenvolvimentos e Aplicações de Métodos de Química Quântica para Compostos de Coordenação com Íons Lantanídeos.** 2003. 181 f. Tese (Doutorado). - Curso de Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003. Cap. 1.
- BIEHL, M.L. & BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *J. Food Protec.*, 50: 1058-73, 1987.
- BINNEMANS, Koen. Interpretation of europium (III). spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 295, p.1-45, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2015.02.015>.
- BIOUNT, W.P (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys* 9 : 52, 55–58, 61–71, 77.
- BRAIEK, Mohamed; FLOREA, Anca; CHROUDA, Amani. **Aflatoxin B1 Detection Using a Highly-Sensitive Molecularly-Imprinted Electrochemical Sensor Based on an Electropolymerized Metal Organic Framework.** *Toxins (basel)*, China-frança, p. 3540-3553. set. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4591663/>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

BRASÍLIA. Portal Brasil. Companhia Nacional de Abastecimento. **Com produção de grãos recorde, Brasil terá maior safra da história em 2017.** 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/11/com-producao-de-graos-recorde-Brasil-tera-maior-safra-da-historia-em-2017>>. Acesso em: 06 abr. 2017.

BREINHOLT, Vibeke et al. Mechanisms of Chlorophyllin Ant carcinogenesis against Aflatoxin B1: Complex Formation with the Carcinogen. Chemical **Research In Toxicology**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.506-514, jun. 1995. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx00046a004>.

CANCER, International Agency For Research On. **AFLATOXINS**. Lyon: Iarc Cedex, 2017. 24 p. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

CENTER, K. K. Deb-nci Frederick Cancer Research. **National Institute of Standards and Technology: Aflatoxina B1.** 1973. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1162658&Mask=80>>. Acesso em: 30 abr. 2018.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **ISBN 978-85-60755-64-6: Usos e aplicações de Terras Raras no Brasil: 2012-2030.** 1 ed. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2013. 258 p.

COBLENTZ. **NIST: IR Spectrum Aflatoxin B1.** 1973. Origem: K. K. DEB-NCI FREDERICK CANCER RESEARCH CENTER. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C1162658&Mask=80#IR-Spec>>. Acesso em: 03 ago. 2018.

COTTON, Simon. **Lanthanide and Actinide Chemistry:** Inorganic Chemistry a Wiley Textbook Series. England: John Wiley & Sons, 2006. 280 p.

DENT, Geoffrey; SMITH, Ewen. **Modern Raman Spectroscopy:** A Practical Approach. [s.l.]: John Wiley & Sons, 2005. 224 p. ISBN-10: 0471497940.

DONOSO, José Pedro. **Espectroscopia eletrônica:** Complexos de Metais de Transição. 2015. Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos. Disponível em: <http://www.ifsc.usp.br/~donoso/espectroscopia/electronica_metais_transicao.pdf>. Acesso em: 12 set. 2017.

D'ANGELO, Paola; SPEZIA, Riccardo. Hydration of Lanthanoids(III) and Actinoids(III): An Experimental/Theoretical Saga. Chemistry - A European Journal, [s.l.], v. 18, n. 36, p.11162-11178, 14 ago. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201200572>.

DUARTE, Hélio Anderson; ROCHA, Willian Ricardo. Teoria Funcional da Densidade. In: MORGON, Nelson H; COUTINHO, Kaline. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.** São Paulo: Livraria da Física, 2007. Cap. 3. p. 73-111.

ÉBOLI, Oscar J P. **Introdução a Mecânica Quântica**. 2004. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://fma.if.usp.br/~eboli/quantica/cap1_v5.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2017.

ESTEVES, J A; CABRITA, J D; NOBRE, G N. **Micologia Médica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. 1058 p.

EYRING, Henry; WALTER, John; KIMBALL, George e. **Quantum Chemistry**. 2. ed. Princeton: Uis, 1979. 396 p.

FERREIRA, Ana Maria da Costa. **QFL 2129 – Química Inorgânica**: Reatividade de Compostos de Coordenação, Teorias de Ligação, Compostos organometálicos e Catálise. 2014. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/amdcferr/disciplinas/QFL2129/Aula_11_Reatividade_Comp_Coordenacao.pdf>. Acesso em: 14 set. 2017.

HEDAYATI, M. T. et al. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, [s.l.], v. 153, n. 6, p.1677-1692, 1 jun. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>.

HU, Zhichao et al. Effective Detection of Mycotoxins by a Highly Luminescent Metal-Organic Framework. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 137, n. 51, p.16209-16215, 21 dez. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.5b10308>.

JERÓNIMO, Paula Cristina de Almeira. **SENSORES ÓPTICOS DE MATRIZ SOL-GEL COM INTERESSE NA ANÁLISE FARMACÊUTICA E CLÍNICA**. 2005. 209 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2005.

JIANG, Mengjuan et al. Aflatoxin B1 Detection Using a Highly-Sensitive Molecularly-Imprinted Electrochemical Sensor Based on an Electropolymerized Metal Organic Framework. **Toxins: Basel**, Lyon, v. 7, n. 9, p.3540-3553, 07 set. 2015. Doi: 10.3390/toxins7093540.

KENSLER, Thomas W et al. Aflatoxin: **A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology**. Journal Oxford: TOXICOLOGICAL SCIENCES. Pittsburgh, p. 28-48. 29 set. 2010.

LANCASTER, M. C., JENKINS, F. P., and PHILP, J. M (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature** 192, 1095–1096.

LIMA, Patrícia Pereira de; MALTA, Oscar M L; A JÚNIOR, Severino. **Estudo Espectroscópico de Complexos de Íons Lantanídeos com Ligantes Derivados de Ácidos Dicarboxílicos**. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado). - Curso de Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

MARQUES, Lippy Faria. **Novos Complexos de Lantanídeos Contendo Ânions Carboxilatos e Ligantes Nitrogenados**:: Busca por Novos Dispositivos Moleculares Conversores de Luz. 2014. 255 f. Tese (Doutorado). - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014. Cap. 02.

MONSON, Melissa S et al. Response of the Hepatic Transcriptome to Aflatoxin B1 in Domestic Turkey (*Meleagris gallopavo*). **Plos: One**. California, p. 1-13. 30 jun. 2014.

NESBITT, B. F., O'Kelly, J., SARGEANT, K., and SHERIDAN, A (1962). *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature** 195, 1062–1063.

NICOLÁS-VÁZQUEZ, Inés et al. Role of Lactone Ring in Structural, Electronic, and Reactivity Properties of Aflatoxin B1: A Theoretical Study. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.I.], v. 59, n. 3, p.393-406, 26 mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-010-9501-x>.

NYE, Mary Jo. Working tools for theoretical chemistry: Polanyi, eyring, and debates over the “semiempirical method”. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.I.], v. 28, n. 1, p.98-108, 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20527>.

OLIVEIRA, C. A. F. ; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, [S.I.], v. 31, n. 4, p.417-424, ago. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101997000400011>.

ONO, Elisabete Yurie Sataque et al. Métodos Imunológicos para detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos, alimentos e rações. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro et al. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2016. Cap. 27. p. 895-935.

PARKER, D.; BRETONNIERE, Y.. Luminescent Lanthanide Complexes as Sensors and Imaging Probes. **Molecular Imaging**, [s.I.], p.123-146, 2005. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26809-x_7.

PAVÃO, A C et al. Structure and activity of aflatoxins B and G. **Journal Of Molecular Structure (theochem)**. Recife, p. 57-60. 20 nov. 1994.

PAVIA, Donald L. et al. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PEACOCK, Robert D.. The intensities of lanthanide $f \leftrightarrow f$ transitions. **Structure And Bonding**, [s.I.], p.83-122, 1975. Springer Berlin Heidelberg. <http://dx.doi.org/10.1007/bfb0116556>.

PITT, J., HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. New York City: Springer; 2009.

SANTOS, Júlio G. et al. Theoretical Spectroscopic Study of the Conjugate Microcystin-LR-Europium Cryptate. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.236-240, 2013. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130030>.

SERRA, A O. Rare Earths - Brazil x China. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**. São Paulo. maio 2011.

SHRIVER, Duward. F. et al. **Química Inorgânica**. 04. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 848 p.

SILVA, Danylo Alves da; COSTA JÚNIOR, Nivan Bezerra da; FREIRE, Ricardo Oliveira. **Implementation of an empirical dispersion correction to semiempirical methods RM1 (Recife Model 1). and PM6 (Parametric method 6)**. 2016. 121 f. Dissertação (Mestrado). - Curso de Química, Química, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2016.

SIMAS, Alfredo Mayall; ROCHA, Gerd Bruno. Métodos Semi-empíricos de Estrutura Eletrônica em Química Quântica. In: MORGON, Nelson H; COUTINHO, Kaline. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. Cap. 2. p. 29-71.

SOUSA FILHO, Paulo C. de; SERRA, Osvaldo A.. RARE EARTHS IN BRAZIL: HISTORICAL ASPECTS, PRODUCTION, AND PERSPECTIVES. **Química Nova**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.753-760, 2014. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140121>.

SPANGLER, Corinna; SCHÄFERLING, Michael. **Luminescent Chemical and Physical Sensors Based on Lanthanide Complexes**. 7. ed. [s.l]: O.s. Wolfbeis. 28 p.

STONE, Michael P. et al. Chemistry and Biology of Aflatoxin-DNA Adducts. **AcS Symposium Series**, [s.l.], p.147-166, jan. 2011. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2011-1082.ch009>.

STEWART, James J. P.. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal Of Molecular Modeling**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1173-1213, 9 set. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-007-0233-4>.

TAABU, Simiyu Mary. **OPTICAL CHARACTERIZATION AND RAMAN SPECTROSCOPY OF AFLATOXIN B1 AND AFLATOXIN-CONTAMINATED MAIZE**. 2015. 130 f. Tese (Doutorado). - Curso de Physics, Department Of Physics, University Of Nairobi, Hons, 2015.

TAKAYA, Yutaro et al. The tremendous potential of deep-sea mud as a source of rare-earth elements. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, 10 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23948-5>.

TANIGUCHI, Cullen; GUENGERICH, Peter F. **Metabolismo dos Fármacos**. 2013. Disponível em: <[http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Metabolismo dos farmacos.pdf](http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Metabolismo%20dos%20farmacos.pdf)>. Acesso em: 03 ago. 2017.

TROMBETTA, Fracielle; FURIAN, Ana Maria; OLIVEIRA, Mauro Schneider. **Efeito da Administração Oral de Aflatoxina B1 nas Convulsões Induzidas em Ratos**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado). - Curso de Farmácia, Farmacologia: Neuropsicofarmacologia e Psicofarmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. Cap. 3. Disponível em: <http://cascavel.ufsm.br/tede//tde_arquivos/30/TDE-2015-11-04T132544Z-6689/Publico/TROMBETTA, FRANCIELLE.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2017.

URIBE-YUNDA, Diego Fernando; NAVAS, María-cristina. Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B1. **Ciêncie e Salud: Ciêncie e Salud**, Bogotá, v. 10, n. 3, p.403-419, 20 set. 2011.

VIANA, Rodrigo da Silva; ALVES JUNIOR, Severino; FALCÃO, Eduardo Henrique Lago. **NOVOS POLÍMEROS DE COORDENAÇÃO 1D UTILIZANDO O ÁCIDO 4,4'-SULFONILDIBENZÓICO E ÍONS Ln3+**: AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO ESPECTROSCÓPICO. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Materiais, Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

ZHOU, Qibing et al. Cis-Terpenones as an Effective Chemopreventive Agent against Aflatoxin B1-Induced Cytotoxicity and TCDD-Induced P450 1A/B Activity in HepG2 Cells. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.1415-1419, nov. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx0601307>.