

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

UTILIZAÇÃO DA LUZ UV LED NO LEITE BOVINO COMO
FERRAMENTA NA REDUÇÃO DE AFLATOXINA M₁ (AFM₁)

ABRAMES FRANCISCO FERREIRA GÓES

MANAUS-AM
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ABRAMES FRANCISCO FERREIRA GÓES

UTILIZAÇÃO DA LUZ UV LED NO LEITE BOVINO COMO
FERRAMENTA NA REDUÇÃO DE AFLATOXINA M₁ (AFM₁)

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Ariane Mendonça Kluczkovski

MANAUS-AM
2023

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

- G598u Góes, Abrames Francisco Ferreira
Utilização da luz UV LED no leite bovino como ferramenta na redução de
aflatoxina M1 (AFM1) / Abrames Francisco Ferreira Góes. - 2023.
55 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Ariane Mendonça Kluczkovski.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Manaus, 2023.
1. Leite. 2. Aflatoxina. 3. Ultravioleta. 4. Alimentação humana. I.
Kluczkovski, Ariane Mendonça. II. Universidade Federal do Amazonas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título
-

“Utilização da Luz LED no leite bovino como ferramenta na redução de Aflatoxina M1”

DISCENTE: ABRAMES FRANCISCO FERREIRA GOES

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 25/05/2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA
Data: 13/05/2025 14:56:48-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski
Orientadora e Presidente da Banca (UFAM)



Prof. Dr. Salomão Rocha Martim
Membro (NILTON LINS)



Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Membro (UFAM)

DEDICATÓRIA

Quero dedicar este trabalho a minha amada mãe Maria Joanita Ferreira Góes, que mesmo distante, sempre esteve e está torcendo para que eu seja feliz e consiga conquistar tudo o que almejo. Sem suas orientações, amor e carinho eu não conseguiria realizar mais uma conquista na minha vida, que é o título de mestre.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, que somente com a ajuda dele, tudo é possível. Minha família que sempre foi a base da minha vida. E embora hoje estejam distantes de mim, foi por crescer em um lar humilde, porém cheio de amor. Pude me tornar a pessoa que sou hoje. Minha mãe Joanita que sempre me incentivou nunca desistir do que é importante, e meu pai por ser amoroso comigo. A minha irmã Adriane Góes, que sempre vai ser minha amiga de todas as horas.

A professora Dra. Ariane Kluczkovski que teve muita paciência e tentou sempre me ajudar da melhor forma possível. Às vezes rígida para que eu não perdesse o foco e que continuasse mesmo em situações complicadas. Meu sincero agradecimento, pois a senhora não me abandonou no momento que estava desolado. Obrigado do fundo do meu coração. Quero que saiba que a senhora foi além de minha orientadora, uma amiga

Aos meus colegas e amigos que estiveram ali para me apoiar e dar suporte enquanto achei que não conseguiria. No qual posso citar a Luiz Diógenes que sempre me auxiliou quando precisei. Sem ele a caminhada seria mais difícil. Ao Samir que esteve sempre disposto a me dar a mão.

Minhas amigas da faculdade no qual eu levo para a vida Allyne, Stephanie e Mayara. Amo vocês, cada um de nós sabemos o quanto a caminhada inúmeras vezes pareceu não ter fim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFAM pela oportunidade de obter este título de mestre e a nossa secretária que sempre esteve ali me auxiliando em todas as etapas, Maria Clara.

Agradeço à agência de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas- FAPEAM pela concessão da minha bolsa de mestrado.

A todos vocês muito obrigado.

RESUMO

Introdução: O leite é de fundamental importância à alimentação humana, produzido em todo o mundo e relevante inclusive em países em desenvolvimento e em sistemas de agricultura familiar. Esse alimento apresenta importância econômica como fonte de renda e sobrevivência para grande parte da população mundial, além de ser uma fonte vital de nutrição. Nesse contexto a segurança na sua produção tem levantado pesquisas para proteção da saúde dos consumidores contra agentes tóxicos. Por outro lado, as micotoxinas, substâncias cancerígenas ao homem e animais, constituem um fator que tem impacto significativo tanto no comércio quanto na exportação do leite. Por existir um determinado grupo de aflatoxinas, alguns deles são de maior interesse, pois possuem fatores de riscos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, sendo aflatoxina B₁ a mais potente. **Objetivo:** Avaliar o desempenho da Luz UV na redução dos níveis de aflatoxina M₁(AFM₁) em leite bovino produzido no Amazonas. **Métodos:** Foram adquiridas amostras de leite bovino regional do varejo da cidade de Manaus-AM. As amostras foram analisadas quanto à presença de AFM₁ antes de serem submetidas aos tratamentos com UV Led. Quantificação de AFM₁ A determinação de AFM₁ nas amostras de leite foram realizadas em triplicata, seguindo-se os procedimentos indicados pelo manual das colunas de imunoafinidade (Afla M₁ HPLC, Vicam[®], Watertown, MA, EUA). Validação do Método através da amostra de leite negativa para presença de aflatoxinas. As amostras contaminadas com AFM₁ serão submetidas à luz com comprimento de onda de 360nm a 0, 2,5 e 5J /cm² por 30, 45 e 60 minutos (Sun *et al.*,2016). O tratamento com luz UV Led foi realizado em uma bancada contendo as amostras em béqueres com volume de 300 ml de leite bovino, utilizando um feixe de luz com lâmpada UV. Para avaliar o impacto dos tratamentos nos aspectos físico-químicos das amostras, foi avaliada a acidez. **Resultados:** Após aplicação da luz UV, ocorreu a diminuição no conteúdo de AFM₁, e o resultado médio é relatado na Tabela 1, indicando a duração do diodo emissor de luz de tempo zero. Os resultados com redução de 75.5, 97.3 e 94.1%, respectivamente para as faixas de tempo de 3, 6 e 9 minutos. Considerando que o uso de luz LED UV poderia alterar outras características do leite, o teor de acidez foi analisado a cada momento do teste. De acordo com a legislação brasileira, a acidez do leite é um parâmetro de qualidade e segurança. De acordo com a legislação, a faixa de acidez é de 0,14-0,18 g de ácido láctico/100 mL e ao final do teste, a amostra de 9 min apresentou 0,16 g de ácido láctico/100mL. **Conclusão:** Foi testada a eficiência da luz UV LED na redução da concentração de AFM₁ em amostras de leite bovino usando 3, 6 e 9min. Os resultados mostraram que houve redução percentual de mais de 75% em todos os testes, mostrando a possibilidade de seu uso para diminuir o risco dessa micotoxina. Os resultados de acidez atenderam ao limite de acordo com a regulamentação brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: Leite; Aflatoxinas; Ultravioleta;; Alimentação humana.

ABSTRACT

Introduction: Milk is of fundamental importance to human nutrition, produced all over the world and relevant even in developing countries and in family farming systems. This food has economic importance as a source of income and survival for a large part of the world's population, in addition to being a vital source of nutrition. In this context, the safety of its production has been researched to protect the health of consumers against toxic agents. On the other hand, mycotoxins, substances that are carcinogenic to humans and animals, constitute a factor that has a significant impact both on the trade and on the export of milk. Because there is a certain group of aflatoxins, some of them are of greater interest, as they have carcinogenic, mutagenic and teratogenic risk factors, with aflatoxin B1 being the most potent. **Objective:** To evaluate the performance of UV Light in reducing the levels of aflatoxin M1 (AFM1) in bovine milk produced in the Amazon. **Methods:** Samples of regional bovine milk were purchased from retailers in the city of Manaus-AM. As samples, they were maintained for the presence of AFM1 before being maintained for UV Led treatments. Intuitive AFM1A quantification of AFM1 in the Milk Sample was performed in triplicate, following the procedures indicated by the immunoaffinity explanations manual (Afla M1 HPLC, Vicam®, Watertown, MA, USA). Validation of the Method through the negative milk sample for the presence of aflatoxins. Samples contaminated with AFM1 will remain in light with a wavelength of 360nm at 0, 2.5 and 5J /cm² for 30, 45 and 60 minutes (Sun et al., 2016). The treatment with UV Led light was carried out on a bench containing, as an example, beakers with a volume of 300 ml of bovine milk, using a beam of light with a UV lamp. To evaluate the impact of the treatments on the physical-chemical aspects of the samples, the acidity was evaluated. **Results:** After application of UV light, a decrease in AFM1 content occurred, and the mean result is reported in Table 1, indicating the LED duration of zero time. The results with a reduction of 75.5, 97.3 and 94.1%, respectively for the time ranges of 3, 6 and 9 minutes. Considering that the use of UV LED light can change other characteristics of the milk, the acidity content was analyzed at each moment of the test. According to Brazilian legislation, milk acidity is a quality and safety parameter. According to the legislation, the acidity range is 0.14-0.18 g of lactic acid/100 mL and at the end of the test, a 9-min sample showed 0.16 g of lactic acid/100mL. **Conclusion:** The efficiency of UV LED light in reducing the concentration of AFM1 in bovine milk was tested using 3, 6 and 9min. The results showed that there was a percentage reduction of more than 75% in all testicles, showing the possibility of its use to reduce the risk of this mycotoxin. The acidity results met the limit according to Brazilian regulations.

KEYWORDS: Milk; Aflatoxins; Ultraviolet; Human food.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evoluções na produção do leite na região norte 1974 a 2015	17
Figura 2 - (a) Amostras de leite adquiridas para a análise; (b) Amostras centrifugadas durante 15 minutos	44
Figura 3 - Extração do leite utilizando colunas de imunoafinidade	45
Figura 4 - Curva de calibração da validação do método	48
Figura 5 - Cromatograma das amostras de leite	50
Figura 6 - Cromatograma de AFM1 em diferentes tempos de aplicação de luz LED	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- A produção de leite em escala mundial 2016 – 2020	15
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos para soro de leite líquido e concentrado	18
Tabela 3 - Principais componentes do leite bovino integral	18
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos para soro de leite líquido e concentrado	22
Tabela 5 - Recuperação da validação do método para AFM ₁	49
Tabela 6 - Desempenho da aplicação da Luz UV em AFM1	50

LISTA DE QUADRO

Quadro 1- Métodos físicos encontrados na literatura para redução dos níveis de aflatoxina

26

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AFM	Aflatoxina
EU	UNIÃO EUROPEIA
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LED	Diodos emissores de luz
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
NECTA	Universidade Federal do Amazonas
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.2 Leite bovino Mundo.....	15
2.3 Produção de leite Bovino na Região Norte Brasileira	16
2.4 Composição do Leite Bovino	17
2.5 Aflatoxinas no leite bovino	22
2.5.1 Aflatoxinas.....	22
2.2.1 Biotransformação da Aflatoxina	24
2.5.2 Contaminação de AFM1 em alimentos	25
3.0 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5.0 ARTIGO	31
6.0 ANEXO	32
- CAPA DO ARTIGO PUBLICADO	32
7. 0 MATERIAIS E MÉTODOS	44
7.1 Obtenção da matéria-prima	44
7.2 Quantificação de AFM1	44
7.3 Validação do Método.....	45
7.4 Limite de Detecção	46
7.5 Linearidade e Intervalo	46
7.6 Quantificação de AFM nas amostras	46
8.0 Tratamentos das amostras com luz UV	46
9.0 Índice de acidez.....	47
10.0 Resultados	48
10.1 Validação da metodologia.....	48
11.0 Aplicação da luz UV	50
12.0 Efeito do tratamento da acidez	53
13.0 Conclusão.....	54

1.0 INTRODUÇÃO

O leite é de fundamental importância à alimentação humana, produzido em todo o mundo e relevante inclusive em países em desenvolvimento e em sistemas de agricultura familiar. Esse alimento apresenta importância econômica como fonte de renda e sobrevivência para grande parte da população mundial, além de ser uma fonte vital de nutrição (SOUZA, 2019). Nesse contexto a segurança na sua produção tem levantado pesquisas para proteção da saúde dos consumidores contra agentes tóxicos.

Com a crise na saúde no ano de 2020, devido à pandemia do covid-19 o setor laticínio se manteve resistente. Segundo a OECD-FAO a produção do leite tem como projeção o crescimento de 1,7% nos próximos anos. Alguns países como Índia e Paquistão contribuem com mais da metade do crescimento na produção mundial de leite nos próximos dez anos, o que representará mais de 30% da produção mundial em 2030. A produção do segundo maior produtor mundial de leite, a União Europeia, deverá crescer mais lentamente do que a média mundial devido a políticas de produção e demanda interna de crescimento lento. As projeções do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para a produção de leite de vaca mostra que os principais exportadores terão aumento de produção em torno de 1% em 2022, na comparação com 2021 (EMBRAPA, 2022). O Estado com maior produção de leite é Minas Gerais (26,3% de leite produzido), seguido pelo Rio Grande do Sul e Paraná. Desempenhando um papel importante no abastecimento de alimentos na criação de empregos e geração de renda para a população (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2017).

Por outro lado, as micotoxinas, substâncias cancerígenas ao homem e animais, constituem um fator que tem impacto significativo tanto no comércio quanto na exportação do leite (PALMER *et al.*, 2020). Por existir um determinado grupo de aflatoxinas, alguns deles são

de maior interesse, pois possuem fatores de riscos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, sendo aflatoxina B₁ a mais potente (VAZ *et al.*, 2020).

Esses agentes estão relacionados com a contaminação de alimentos, de forma crônica ou na forma aguda, causando surtos, além de perdas econômicas em todo o mundo. Em que após o animal ingerir o alimento contaminado por aflatoxina B₁, passa a excretar pela urina e principalmente no leite a aflatoxina biotransformada, a aflatoxina M₁ (AFM₁). A produção da toxina pelo fungo é resultado das condições da temperatura, umidade e armazenamento das plantas, rações, sementes que serão utilizadas na alimentação dos bovinos. AFM₁ pode ser encontrada no leite de animais que tenham ingerido alimentos ou ração contaminada por AFB₁. Embora AFM₁ seja menos potente do que AFB₁, exposição de bebês amamentados ou dieta, a exposição do leite de vaca é uma fonte de exposição à aflatoxina em diversas populações (SALTZMANN *et al.*, 2020).

Na região Amazônica há produção e consumo leite bovino e seus derivados e isso requer o monitoramento para avaliação do risco aos agentes tóxicos. No estado do Amazonas são escassos os trabalhos nesse sentido e podemos citar o estudo de AFM₁ em queijos produzidos com leite bovino produzido no Estado e que já levanta a hipótese da qualidade da alimentação dos animais na região influenciar na presença do leite bovino da região Norte (BARRONCAS *et al.*, 2019).

Há grande desafio quando se trata das aflatoxinas (AFM), em definir tratamentos que possam inativar ou reduzir os níveis de contaminação presentes no alimento. E que após a aplicação do método não ocorra à alteração das propriedades organolépticas do produto. Dentre as metodologias promissoras, está a aplicação da luz UV led mostrou ser de grande efetividade para o tratamento das amostras em alguns estudos.

Portanto a utilização de métodos físicos como o uso de Luz UV led na redução de AFLM₁ é um tema inovador e que pode contribuir com a qualidade dos alimentos na região Amazônica, incluindo o leite bovino.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.2 Leite bovino Mundo

O leite bovino é um alimento consumido mundialmente, todo ano, com dados em que sua produção mundial foi estimada cerca de 532,3 milhões de toneladas aumentando cerca de 1,5% frente a 2019 (Embrapa, 2021).

Embora o pico da pandemia tenha provocado impacto em várias áreas da indústria, o otimismo sobre o crescimento na retomada da economia mundial, favorece o consumo de produtos lácteos. No ano de 2020 a porcentagem de aumento foi de 1,5% em relação a 2019, representando 8 bilhões de litros. Em percentuais, os maiores destaques vão para a China, com crescimento de 3,1%, que representa 1 bilhão de litros, e para a Argentina (+4,3%), o que representa 460 milhões de litros (Embrapa, 2021).

A tabela apresenta os dados da produção de leite no período de 2016 a 2020, que consegue demonstrar, o aumento mesmo durante o impacto da pandemia. Em torno de 2019 a 2020, que foi o ápice da crise na saúde mundial (Embrapa, 2021).

Tabela 1- A produção de leite em escala mundial 2016 – 2020.

País	2016	2017	2018	2019	2020	20/19
União Européia	151,00	153,00	154,20	155,20	156,70	1,0%
EUA	96,36	97,76	98,68	99,05	100,48	1,4%
Índia	78,09	83,63	89,80	92,00	94,00	2,20%
China	30,64	30,38	30,75	32,00	33,00	3,1%

Rússia	30,51	30,93	30,30	30,56	31,00	1,4
Brasil	22,72	23,62	23,75	24,45	24,95	2,0%
Nova Zelândia	21,22	21,53	22,01	21,85	21,90	0,2%
México	11,95	12,12	12,36	12,65	12,75	0,8%
Argentina	10,19	10,09	10,83	10,64	11,10	4,3%
Outros	45,97	46,51	46,66	45,90	46,42	1,1%
Mundo	498,65	509,97	519,71	524,30	532,30	1,5%

Fonte: Embrapa (2021)

No Brasil, embora os impactos que a pandemia do Covid -19 tenha causado na econômica no início de 2020, a produção do leite aumentou cerca de 2,8% com volume muito superior que em relação ao 2019 (Embrapa, 2021). Desse aumento, cerca de 70% vieram da produção interna e 30% da importação líquida de lácteos, que é a diferença entre o volume importado menos o exportado. As importações cresceram 23,6%, atingindo 1,34 bilhão de litros, enquanto as exportações não passaram de 100,65 milhões de litros. Ou seja, o Brasil teve um volume adicional à produção doméstica de 1,246 bilhão de litros, que foi disponibilizado para o consumo dos brasileiros (Embrapa, 2021).

No Brasil apenas cinco estados são considerados os maiores produtores de leite, que totalizam um total de 70% de todo leite produzido no país inteiro. Com Minas Gerais detendo participação de 27,11%, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul, com 12,45% e 12,26%, respectivamente. Enquanto isso, a produção dos 100 maiores produtores do Brasil cresceu 8,67%, indicando movimento de concentração produtiva e de ganhos de escala (Embrapa, 2021).

A produção de leite na região norte sempre ocorreu de forma mais lenta, tendo em vista vários fatores, como a região mais afastada, animais que acabavam sendo predadores dos rebanhos e o crescimento da colonização dos outros estados até chegar em toda região norte. Além da adaptação dos animais ao clima, alimentação e o cruzamento das espécies. Por isso, há um tempo o leite produzido na região nunca foi suficiente para suprir a demanda da população local (Embrapa, 2021).

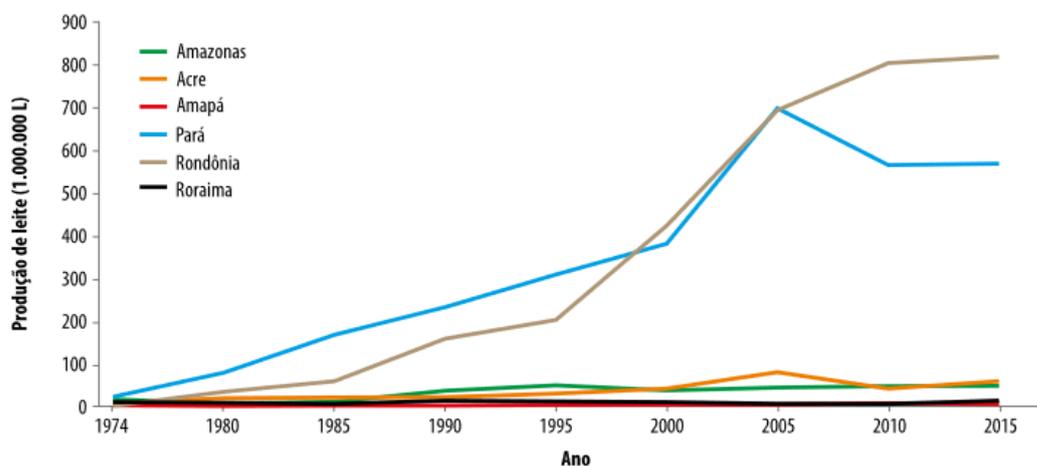
2.3 Produção de leite Bovino na Região Norte Brasileira

A produção de leite das vacas ordenhadas nos estados da região Norte evoluiu de 58,5 milhões de litros, em 1974, para 1,5 bilhão, em 2015. Esse incremento representou uma

evolução de quase 26 vezes no volume produzido, o que equivale a um crescimento médio de 8,23% ao ano.

A tabela 1 identifica o crescimento da produção do leite dos estados na região norte. O estado que mais cresceu foi o de Rondônia (18,75% ao ano), que saiu de uma produção de 711 mil litros para 817,5 milhões. Seguido do estado do Pará (8,25% ao ano) e Acre (5,24% ao ano). O Amazonas obteve crescimento médio de 2,67%, evoluindo de 16,1 milhões para 47,6 milhões de litros. Roraima passou de 10 milhões para 13 milhões de litros, crescendo a uma taxa média de 0,64% ao ano. Por último, o estado do Amapá, cuja produção leiteira é a menor entre os estados da região Norte do País, com crescimento médio de 2,04% ao ano (Embrapa, 2021).

Figura 1 – Evoluções na produção do leite na região norte 1974 a 2015.



Fonte: IBGE (2016)

No Amazonas, a produção continua sendo baixa em relação a outros estados a produção de 45,9 milhões de litros de leite em 2016 foi proveniente da ordenha de 97.104 vacas, cujo valor bruto da produção foi de 69,7 milhões de reais. A atividade é desenvolvida em 56 dos 62 municípios do estado. As maiores produções estão nos municípios de Autazes, Careiro da Várzea, Apuí, Parintins e Itacoatiara. Juntos esses municípios respondem por 72,8% da produção total de leite do estado (IBGE, 2017).

2.4 Composição do Leite Bovino

O leite bovino possui diversos nutrientes dissolvidos na água, que são os principais fornecedores de energia para a dieta do animal ou humano. Esses nutrientes estão representados como cerca 12 a 13%, enquanto a água tem o valor de 87%. São nutrientes como lipídeos,

carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Esses elementos possuem distribuições e interações que determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas (estrutura e cor) encontradas nos produtos lácteos (Alessio, *et al* 2019). A tabela 2 traz a composição de leite bovino citada por alguns autores e alguns seus dados adquiridos após análise experimental:

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos para soro de leite líquido e concentrado.

Nutrientes	Alessio, <i>et al</i> 2019	Marques, <i>et al</i> 2011
Carboidratos	4,49	4,41
Proteína	3,21	3,79
Lipídeos	3,77	5,24

A 3 tabela faz a comparação do leite bovino integral em relação ao soro leite líquido da tabela 2

Tabela 3 - Principais componentes do leite bovino integral.

Nutrientes	Valores
Água	87,6
Proteína	3,30
Lipídeos	3,40
Lactose	4,70

Carboidratos

O principal carboidrato do leite é a lactose. É produzida pelas células epiteliais da glândula mamária e é a principal fonte de energia dos recém-nascidos. Além da lactose, podem ser encontrados no leite outros carboidratos, como a glicose e a galactose, mas em pequenas quantidades. A lactose compreende aproximadamente 52% dos sólidos totais do leite desnatado e 70% dos sólidos encontrados no soro do leite. Controla o volume de leite

produzido, atraindo a água do sangue para equilibrar a pressão osmótica na glândula mamária. A quantidade de água do leite e, conseqüentemente, o volume de leite produzido pela vaca, depende da quantidade de lactose secretada na glândula mamária. A concentração de lactose no leite é de aproximadamente 5% (4,7 a 5,2%). É um dos elementos mais estáveis do leite, isto é, menos sujeito a variações (Brito, *et al* 2021).

Proteínas

As proteínas representam entre 3% e 4% dos sólidos encontrados no leite. A porcentagem de proteína varia, dentre outros fatores, com a raça e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite. Isso significa que quanto maior a porcentagem de gordura no leite, maior será a de proteína. Existem vários tipos de proteína no leite. A principal delas é a caseína, que apresenta alta qualidade nutricional e é muito importante na fabricação dos queijos. A caseína é produzida pelas células secretórias da glândula mamária e encontra-se organizada na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com cálcio, fósforo e outros sais. Cerca de 95% da caseína total do leite está nessa forma. As micelas de caseína junto com os glóbulos de gordura são responsáveis por grande parte das propriedades relativas à consistência e à cor dos produtos lácteos. A caseína não é facilmente alterada pelo calor, permanecendo bastante estável quando o leite é pasteurizado. Entretanto, quando ocorrem mudanças na acidez do leite, há rompimento da estrutura das micelas, o que faz a caseína precipitar e formar coágulos. A gordura e a caseína têm importância fundamental para a manufatura de vários derivados lácteos, sendo que representam a maior concentração de elementos sólidos dos queijos (Brito, *et al.*, 2021).

Lipídios

Os lipídeos presentes no leite se encontram em forma de pequenos glóbulos suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada formada por um componente da gordura denominado fosfolipídio. Essa camada forma uma membrana que

impede a união de todos os glóbulos. Desse modo, a gordura do leite é mantida na forma de suspensão. A maior parte da gordura do leite é constituída de triglicerídios, que são formados por ácidos graxos ligados ao glicerol. A gordura do leite está presente em forma de pequenos glóbulos em suspensão na água. A fração de gordura do leite serve de veículo para as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), colesterol e outras substâncias solúveis em gordura, como os carotenoides (provitamina A), que dão ao leite sua cor amarelo-creme. A concentração de gordura no leite varia geralmente entre 3,5 e 5,3%, em razão de diferenças entre raças, estágio da lactação e de acordo com a alimentação dos animais.

Sais minerais e vitaminas

O leite é uma fonte excelente da maioria dos sais minerais necessários para o desenvolvimento dos indivíduos jovens. O cálcio e o fósforo do leite apresentam alta disponibilidade, em parte porque se encontram associados à caseína. Por isso, o leite é a melhor fonte de cálcio para o crescimento do esqueleto dos indivíduos jovens e para a manutenção da integridade dos ossos dos adultos. O conteúdo de ferro é baixo. O leite é uma importante fonte de vitaminas, algumas se associam com a gordura (A, D, E e K), enquanto outras se associam com a parte aquosa. Dentre as últimas, estão as do complexo B e a vitamina C. Mais de dez vitaminas diferentes do complexo B são encontradas no leite. Entretanto, com exceção da vitamina B₂ (riboflavina), as outras são encontradas em quantidades pequenas. As vitaminas do complexo B são produzidas no estômago composto (rúmen) dos animais. O leite é uma fonte importante de vitamina C (ácido ascórbico), mas esta é rapidamente oxidada na presença de cobre em um produto biologicamente inativo. (Brito *et al* 2021).

Qualidade do leite

Para que o leite bovino seja comercializado, ele precisa passar por testes que garantem o seu padrão de qualidade, identidade e acidez. O ministério da Agricultura e pecuária o (MAPA), traz essa informação através da Instrução Normativa Nº 80, DE 13 DE AGOSTO DE 2020. No uso das atribuições que lhe conferem os arts. 21 e 63, do Anexo I do Decreto nº 10.253, de 20 de fevereiro de 2020, tendo em vista o disposto na Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, na Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, no Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017.

Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é muito estável. O conhecimento dessa estabilidade é a base para os testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de problemas que alteram a composição do leite. Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia levantar suspeita de adição fraudulenta de água, após a ordenha. Nesse caso, ocorrem alterações das propriedades físicas do leite, facilmente detectáveis em laboratório.

Existem alguns fatores que fazem com que a composição do leite acabe variando de acordo com o estágio de lactação: no colostro, o conteúdo de proteína é maior e o de lactose encontra-se reduzido. Outros fatores que podem interferir na composição do leite são: raça das vacas, alimentação (plano de nutrição e forma física da ração), temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária.

Índice Crióscopico

Consiste na necessidade de avaliar o ponto de exato de congelamento a fim de detectar alguma forma de adição de água que não pertençam ao leite, indicando fraude. O ponto crioscópico do leite é de $-0,005^{\circ}\text{H}$, se o valor for acima, sugere que ocorreu uma adição de água e para o leite adulterado o ponto de congelamento é acima de $-0,525^{\circ}\text{H}$ (Santos, 2010).

Fosfatase Alcalina

Visto que a fosfatase alcalina é uma enzima naturalmente presente no leite cru, o leite comercializado precisa passar por este teste para confirmar se a pasteurização do produto foi realizada gerando a inativação da fosfatase alcalina após o tratamento térmico. O resultado do teste é uma reação em cor no qual a fosfatase alcalina gera a hidrólise de timolftaleína monofosfato, gerando a liberação timolftaleína e fosfato inorgânico resultando em com coloração azul significando que a reação está inativada e que o tratamento térmico foi efetivo.

Determinação de gordura

A observação da quebra da gordura após a adição do ácido sulfúrico e álcool isoamílico com centrifugação para contabilizar a quantidade de gordura. No processo final os leites que são considerados integrais e que foram pasteurizados precisam ter um teor mínimo de 3% de gordura, já o semi desnatado entre 0,6 a 2,9% e o desnatado no máximo 0,5% de gordura (Nascimento, 2016). A tabela 4 traz parâmetros de aspectos físico-químicos do leite bovino.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos para soro de leite líquido e concentrado.

Requisitos	Soro do leite	Soro do leite ácido
pH	6,0 a 6,8	Inferior a 6,0
Acidez titulável em ácido láctico(g/100mg)	0,08 a 0,14	0,35
Sólidos totais(g/100ml)	Mínimo de 5,01	Mínimo de 5,01

Fonte: Instrução Normativa N80/202(MAPA).

2.5 Aflatoxinas no leite bovino

2.5.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFM) são micotoxinas produzidas por fungos filamentosos com difícil controle nos alimentos. São metabólitos secundários produzidos principalmente por *Aspergillus flavus*. Que são fungos endoparasitas de plantas e geralmente estão presentes em grãos como milho, amendoim e especiarias (Marquezon, *et al.*, 2023).

O risco de contaminação por AFL geralmente maior em regiões geográficas com clima tropical ou clima subtropical (Fakhri *et al.*, 2019), mas uma estação extremamente quente e seca pode promover o crescimento de *Aspergillus* spp.

Dentre as AFLs estudadas as mais conhecidas são B1, B2, G1 e G2 (Gong *et al.*, 2016). De todas as AFB1 é a mais potente encontrada nos alimentos. Aflatoxina M1 (AFM1) é o metabólito hidroxilado de AFB1, que é excretado principalmente no leite materno (LM) e na urina quando humanos consomem alimentos contaminados com AFB1 (Cantú-cornelio *et al.*, 2016; Elaridi, Bassil, Kharma, Daou e Hassan, 2017).

De acordo com Bochio *et al.* (2017), a maioria dos produtos animais podem ser contaminados a partir da ingestão das micotoxinas presentes nas rações, gerando assim um resíduo tecidual. A contaminação do leite, por exemplo, ocorre após a metabolização da toxina através de enzimas hepáticas. No fígado, a Aflatoxina B1 (AFB1), ingerida pelo animal através de rações contaminadas, ao alcançar o fígado, sofre uma biotransformação, resultando em aflatoxina M1 (AFM1), que é excretada junto ao produto lácteo (Hussein & Brasell, 2001). Uma vez no organismo, a toxina fúngica passa por uma metabolização hepática podendo se depositar nos músculos, o que acarreta sua presença em produtos cárneos, assim como ocorre a biotransformação sob micotoxinas primárias (AFB1) possibilitando a excreção via leite (AFM1) (Tittlemier *et al.*, 2020).

Há pouco monitoramento destes metabólitos em produtos lácteos no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC) verifica

anualmente, a partir de uma amostragem baseada em análise de risco, a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde humana, como resíduos de produtos de uso veterinário, agrotóxicos e outros contaminantes químicos. Neste mesmo sentido, relatos de Gonçalves *et al.* (2016) reforçam a importância das pesquisas relacionadas a AFL em produtos lácteos, ao afirmarem que 80% das amostras avaliadas apresentaram-se acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. Essa porcentagem demonstra a necessidade de se avaliar a presença de micotoxinas nos produtos de origem animal, uma vez que são conhecidos os impactos que causam à saúde humana.

2.2.1 Biotransformação da Aflatoxina

O processo da biotransformação ocorre quando o organismo transforma substâncias xenobióticas, em novos compostos químicos, com o fim de que os metabólitos produzidos sejam eliminados pelo sistema biológico. Os alimentos contaminados com AFL são ingeridos e estas são absorvidas no trato gastrointestinal. Após sua absorção, são biotransformadas no fígado pelas enzimas microssomais da família do sistema P-450.

A AFB1 quando metabolizada é ativada na forma de AFB1 epóxido através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico e, a partir de então, apresenta seu poder tóxico. As AFL são excretadas em fluidos biológicos (leite, urina e sangue), sendo detectados por mensuração de seus biomarcadores de exposição. No caso dos humanos, esses biomarcadores são os resíduos de AFM1 no leite e vísceras, AFB1 em vísceras [principalmente fígado e os adutos de proteínas séricas (albumina) DNA e RNA (NEEFF, 2016)]. Os metabólitos gerados possuem natureza eletrofílica (buscam elétrons) e são capazes de reagir com nucleotídeos (precursores do DNA e RNA) e proteínas, e o resultado desta ligação é a produção de adutos, que caracterizam a primeira lesão bioquímica. Quando o AFB1-epóxido se liga com o ácido desoxirribonucléico (DNA) hepático ocorre modificação na sua estrutura o que implica em alteração na sua atividade biológica. Os adutos se formam através da ligação do AFB1-epóxido

com uma base nitrogenada do DNA, a guanina, ocorrendo na posição N7, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 (AFB-N7-guanina) (PIEREZAN, 2013; CARÃO, 2016).

Na biotransformação primária da AFB1, ocorre a hidroxilação, com formação das aflatoxinas M1, Q1 e B2a , e a O -emetilação, para formar aflatoxina P1, compostos que apresentam o grupo hidroxila em sua estrutura, permitindo a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos. A formação de adutos de RNA e de proteínas resultam da hidrólise da AFB1-epóxido, produzindo 8,9-dihidro-8,9- dihidroxi-B1 (ou B1-diol), que se liga com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de Schiff (HAROHALLY *et al.*, 2017).

2.5.2 Contaminação de AFM1 em alimentos

Estudos mostram que aflatoxinas no leite cru podem ser transferida para produtos lácteos. Em um estudo, adicionando 1,7 a 2 microgramas de AFL ao leite e à produção de queijo, observou-se que 40% permaneceram no queijo e 60% no soro de leite (Lopez *et al*; 2001)

A medição da AFM1 por ELISA em Bursa, Turquia, mostrou que os queijos com alto teor de gordura continham AFM1 mais do que o padrão na Turquia (Sonal *et al*, 2001). Em algumas partes do mundo, apesar de a contaminação por AFM1 não ser um problema sério de saúde, a contaminação com esta toxina tem sido relatada.

Na Espanha, por exemplo, estudos de leite cru relataram contaminação em apenas 33% das amostras (Blanco *et al*; 1988). No Brasil (Ribeirão Preto-SP), em amostras de leite de supermercados, cerca de 21% das amostras estavam contaminadas com AFM1 e seu conteúdo foi de 24–50 ng/l. Os resultados deste estudo mostraram que apesar dos altos níveis de contaminação do leite pasteurizado e estéril no Brasil, isso não é um problema sério para as pessoas. No entanto, mais pesquisas e investigações são necessárias a esse respeito.

Métodos físicos na redução de Aflatoxinas

Para a redução de aflatoxinas existem diversas metodologias encontradas na literatura, porém as mais eficazes são aplicação da luz UV e o Ozônio. No estudo, a luz UV e ozônio foram aplicados em amostras de leite. O resultado obtido das duas metodologias foi um efeito sinérgico nas amostras, reduzindo de forma significativa os níveis de aflatoxinas das amostras em um nível de 95% (Hakimzadeh, *et al.*, 2020).

A utilização da luz UV tem um impacto direto nos níveis das aflatoxinas, pois, estudos relataram o mecanismo de ação do método, no qual ocorre a degradação de zearalenona, desoxinivalenol, Aflatoxina AFB1 e Ocratoxina (Moreau *et al.*, 2011).

As irradiações ultravioletas na faixa de 210 e 330nm são mais eficientes como germicidas por serem absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando o rompimento de cromossomo, mutações genéticas e inativação de enzimas e, conseqüentemente a morte da célula. As irradiações já são conhecidas e amplamente aplicadas. Porém agora, sendo testadas para as micotoxinas presentes nos alimentos com potencial risco de contaminação (CARDOZO *et al.*, 2008).

No quadro 1 estão alguns dos trabalhos que utilizaram métodos físicos na redução de AFM1 em leite bovino.

Quadro 1 - Métodos físicos encontrados na literatura para redução dos níveis de aflatoxina.

Método	País	Resultado	Limite de detecção	Autores (ano)
LUV UV Ozonização	Irã	Redução de 95% de AFM1.	0,05	Hakimzadeh et al 2020.
Ozonização	Irã	86% Aflatoxina B1.	0,05	Shahraki et al,

				2013
Ozonização	Irã	Diminuição de aflatoxinas 0,56 para 0,27 µg/kg (redução de 56%)	0,005	Mohammadi <i>et al</i> 2017.
Luz UV	Nova Zelândia	Utilizou luz 254nm e resultou da diminuição de 50% dos níveis de AFM1. Em 20 minutos de aplicação.	0,05	Nguyen et al, 2022.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da Luz UV na redução dos níveis de aflatoxina M1 (AFM₁) em leite bovino produzido no Amazonas.

3.2 Objetivos Específicos

- Validar o método de quantificação para AFM₁ em leite bovino.
- Aplicar diferentes tempos de Luz UV para degradação da AFM₁.
- Avaliar efeito dos tratamentos nos parâmetros de qualidade do leite (Acidez).

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAHLAH, N.; EL MAADOUDI, M.; BOUHRITI, N.; TRIQUI, R.; BOUGTAIB, H. Aflatoxin M1 in UHT and powder milk marketed in the northern area of Morocco. *Food Control*, p. 107262, 2020.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. Official methods of analysis. 20.ed. Gaithersburg – USA, 2016.
- BARRONCAS, J. S.; KLUCZKOVSKI, A. M.; LIMA, E. S.; FELIX, P. H. C.; VIANA, C. de S.; XAVIER, L. R.; KLUCZKOVSKI JUNIOR, A. Aflatoxin M1 in cheese samples from the Amazon Region. *African journal of pharmacy and pharmacology*, v. 13(13), pp. 163-169, 22, 2019.
- BASSANI, Ivo Daniel et al. Estrutura regulatória para a aflatoxina no amendoim brasileiro. *Revista de Política Agrícola*, v. 1, n. 1, p. 90, 2023.
- BECKER-ALGERI, T.A.; CASTAGNARO, D.; DE BORTOLI, K.; DE SOUZA, C.; DRUNKLER, D. A.; BADIALE-FURLONG, E.; Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science* v. 81 (3), R544-R552, 2016.
- DAOU, R.; AFIF, C.; JOUBRANE, K.; KHABBAZ, L. R.; MAROUN, R.; ISMAIL, A.; EL KHOURY, A. Occurrence of aflatoxin M1 in raw, pasteurized, UHT cows' milk, and dairy products in Lebanon. *Food Control*, 111, 107055, 2020.
- DOS SANTOS, J. S.; GRANELLA, V.; PIGATTO, G. M., REINIGER, L. R. S.; COSTABEBER, I. H. Aflatoxin M 1 in pasteurized and raw milk from organic and conventional systems. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, v. 11, n. 4, 299-304, 2016.
- EC- European Commission, 2010. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20200401&from=EN>
- JARDIM, A.N.O. & CALDAS, E. EXPOSIÇÃO HUMANA A SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS POTENCIALMENTE TÓXICAS NA DIETA E OS RISCOS PARA SAÚDE. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 7, 1898-1909, 2009.
- MOREAU, M.; LESCURE, G.; AGOULON, A.; SVINAREFF, P.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation. *Journal of Applied Toxicology*, v.33, n.5, p. 357-363, 2011.
- MOHAMMED-AMEOUR, S.; DAHMANE, M.; BRERA, C.; KARDJADJ, M.; BEN-MAHDI, M.H. Occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in raw cow milk collected from different regions of Algeria *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
- MOUDGIL, P.; BEDI, J. S.; AULAKH, R. S.; GILL, J. P. S. Antibiotic residues and mycotoxins in raw milk in Punjab (India): a rising concern for food safety. *Journal of food science and technology*, v. 56, n. 11, p. 5146-5151, 2019.
- SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Occurrence of aflatoxin M1 in

bovine milk commercialized in the Parana State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35 (1), p. 371-374, 2014.

VAZ, A.; CABRAL SILVA, A.C.; RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A. Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms* 8, 246, 2020.

SALTZMANN, J.; XU, Y.; GONG, Y. Y.; LINDAHL, J.; KERSTEN, S.; ANICKE, S.; ROUTLEDGE, M.N. Preliminary study on the relationship between aflatoxin-bovine serum albumin adducts in blood and aflatoxin M1 levels in milk of dairy cows. *Mycotoxin Research*, 36:207–211, 2020.

SECRETARIA DE PRODUÇÃO RURAL. Portaria nº 50/2019, de 01 de JANEIRO de 2019. Edição 33.911, 01 de janeiro de 2019. Diário oficial do Estado do Amazonas Manaus, 2019.

SIQUEIRA, KENNYA BEATRIZ. O mercado consumidor de leite e derivados. Circular técnico, Juiz de Fora, 2019.

ZAHRA, N.; JAMIL, N.; AHMAD, S. R. ; KALIM, I.; SAEED, M.K.; AHMED, I.; SYUED, Q.; MUNIR, S. Assessment of Milk Quality by Analyzing Aflatoxin M1 in Branded and Non Branded Milk Samples Collected from Different Shops/Areas in Lahore, Pakistan. *Pakistan J. Zool.*, v. 52(1), p. 373-375, 2020

POKHAREL, Ashish et al. Prevalence and associated factors of breastmilk aflatoxin M1 levels in mothers from Banke, Nepal. **Food Control**, v. 126, p. 108069, 2021.

C. LOPEZ, L. RAMOS, S. RAMAD AN, L. BULACIO E J. PEREZ, “Distribuição de aflatoxina M1 em queijo obtido a partir de leite contaminados artificialmente”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 64, nº. 1-2, pp. 211-215, 2001.

HH ORUC E S. SONAL, “Determinação dos níveis de aflatoxina M1 em queijo e leite consumidos em Bursa, Turquia, *Toxicologia veterinária e humana*, vol. 43, pp. 292-293, 2001

U. GUNSEN E I. BUYUKYORUK, “Aflatoxins in Retail Food Products in Bursa, Turkey,” *Veterinary and human toxicology*, vol. 44, pp. 289-290, 2002.

L BLANCO, L. DOMÍNGUEZ, E. GÓMEZ-LUCÍA, JF GARAYZABAL, JA GARCÍA E G. SUÁREZ, “Presença de aflatoxina M1 em comercial ultra-alta temperatura leite tratado”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, nº. 6, pp.1622-1623, 1988.

NGUYEN T, PALMER J, LOO T, SHILTON A, PETCU M, NEWSON HL, FLINT S. Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim milk and degradation products after treatment. *Food Chem.* 2022.

5.0 ARTIGO**UV LED Light Efficiency in Aflatoxin M1 Reduction in Bovine Milk**

6.0 ANEXO

- CAPA DO ARTIGO PUBLICADO



Journal of Agricultural Studies
ISSN 2166-0379
2023, Vol. 11, No. 2

UV LED Light Efficiency in Aflatoxin M1 Reduction in Bovine Milk

Ariane Mendonça Kluczkovski (Corresponding Author)

Federal University of Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Otavio, J. Ramos, 6200,
Manaus-AM-Brazil. E-mail: ariane@ufam.edu.br

Abrames Góes

Federal University of Amazonas, Brazil. E-mail: abramesfg@gmail.com

Karolina Santos

Federal University of Amazonas, Brazil. E-mail: limaakaroliny@gmail.com

Luiz C. G. Diogenes

Federal University of Amazonas, Brail. E-mail: lcgdiogenes@gmail.com

Lúcia Corrêa

Federal University of Amazonas, Brail. E-mail: luciabcorreia@outlook.com

Claudio F. Araújo

Amazonas Health Surveillance Foundation, Brail. E-mail: lacen@fvs.am.gov.br

Augusto K. Junior

Amazonas Health Surveillance Foundation, Brail. E-mail: augustokjr@hotmail.com

Received: February 15, 2023 Accepted: May 14, 2023 Published: May 16, 2023

doi:10.5296/jas.v11i2.20745

URL: <https://doi.org/10.5296/jas.v11i2.20745>

UV LED Light Efficiency in Aflatoxin M1 Reduction in Bovine Milk

RESUMO

O leite bovino é um alimento consumido por pessoas de diversas faixas etárias e principalmente por crianças, pois fornece nutrientes essenciais à dieta. No Brasil, o leite é um dos produtos mais importantes da agricultura brasileira, sendo essencial na geração de emprego e renda. Porém, quando há contaminação por agentes tóxicos, como a aflatoxina (AFL) que é cancerígena para humanos e animais, há risco à saúde do consumidor. As micotoxinas mais importantes nos alimentos são as aflatoxinas (AFL), produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, por exemplo. A aflatoxina B1 (AFB1) é considerada a mais potente com ação mutagênica, teratogênica e carcinogênica. Quando os animais ingerem alimentos contaminados, os AFL são metabolizados, biotransformados e transferidos para produtos, como o leite, na forma de aflatoxina M1 (AFM1), tornando-se um risco para a saúde humana. A quantificação dessa transferência fornece informações sobre a relação dos níveis de contaminação na ração e a contaminação resultante no leite (Zentai et al., 2023). Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a eficiência da aplicação de luz LED UV como ferramenta para reduzir a aflatoxina M1 (AFM1) no leite bovino produzido no estado do Amazonas, Brasil. Quanto ao tempo em 3, 6 e 9 minutos, foram observadas taxas de redução de 75,5, 97,3 e 94,1%, respectivamente. O uso da luz LED UV foi eficaz na redução da concentração de AFL estudado para ser avaliado em escala de produção.

Palavras-chave: HPLC, micotoxina, alimentos lácteos.

Abstract

Bovine milk is a food consumed by people of different age groups and especially by children, as it provides essential nutrients to the diet. In Brazil, milk is one of the most important products of Brazilian agriculture, being essential in the generation of employment and income. However, when there is contamination by toxic agents, such as aflatoxin (AFL) which is carcinogenic to humans and animals, there is a risk to the health of the consumer. Therefore, the objective of this work was to analyze the efficiency of the application of UV LED light as a tool to reduce aflatoxin M1 (AFM1) in bovine milk produced in the state of Amazonas, Brazil. Concerning time in 3-, 6- and 9-minutes, the reduction rates of 75.5, 97.3, and 94.1% were observed, respectively. The use of UV LED light was effective in reducing the concentration of AFL studied to be evaluated on a production scale.

Keywords: HPLC, mycotoxin, dairy food

Introduction

Bovine milk is an important source of protein in human nutrition, as it provides macro and micronutrients for growth and maintenance of health. The composition of bovine milk is influenced by genetic factors, stage of lactation, health and nutritional status of the animal and type of technological treatments (Ghafoori et al., 2022). It has economic importance as a source of income and its quality must meet health safety parameters, such as the presence of toxic agents. Safety in its production has raised research for health protection, as both the domestic market and exports can be affected by mycotoxins, which are carcinogenic substances for humans and animals. It is estimated that more than 25% of world agricultural production is contaminated with mycotoxins and the occurrence of mycotoxins in milk has been studied over the world (Hasninia et al., 2022; Hassan et al., 2018). The most important mycotoxins in food are aflatoxins (AFL), produced by species of the genus *Aspergillus*, for example. Aflatoxin B1 (AFB1) is considered the most potent with mutagenic, teratogenic, and carcinogenic action. When animals ingest contaminated food, AFL are metabolized, biotransformed and transferred to products, such as milk, in the form of aflatoxin M1 (AFM1), thus becoming a risk to human health. The quantification of this transfer provides information about the relationship of the levels of contamination in feed and the resulting contamination in milk (Zentai et al., 2023). In this way, the studies of interest in AFM1 in milk identified that the pasteurization, sterilization, preparation, and storage of products derived from milk is stable. In Brazil, there is little research on AFM1 in bovine milk, with studies in the states of São Paulo and Paraná (Dos Santos et al., 2016; Shundo et al., 2016). In pure state, AFL are extremely stable at temperatures up to 200°C and are not affected by cold. Therefore, when subjected to various heat treatments, these were not efficient for the degradation of these mycotoxins. However, the literature describes the ability of an optical source such as light emitting diode (LED) to decrease the concentration of AFM1 in milk

samples as a promising alternative for the reduction of AFL in contaminated food (Nguyen et al., 2022).

Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficiency of UV led light in contaminated samples of bovine milk as a pilot evaluation for future application on an industrial scale.

Method

Sampling: bovine milk samples, free of AFM1, obtained directly from producers in the state of Amazonas-Brazil, with previous analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) were analyzed. The samples (N=3) in triplicate were contaminated with AFM1 standard, divided for three different times of duration of application of the UV LED light, corresponding to 3, 6 and 9 minutes. After application of the UV LED light system, the samples were quantified using high performance Liquid Chromatography (HPLC). The temperature was monitored using ice, placed on the base of the container to a depth of approximately 5 mm underneath the milk samples. In 3 and 6 min the temperature stayed between 20 and 25°C, and in 9min it reached 35° C.

2.1 AFM1 Quantification:

The samples were analyzed in triplicate, according to AOAC (2016): for extraction 100mL of the filtered and centrifuged sample. Then, the fat layer was removed, and the skimmed milk submitted to the Aflastar immunoaffinity column (Romerlabs®). In the columns, the samples were washed twice with 10 mL of water and pressed air to remove residual water from the column. The eluent solution used was Acetonitrile 1 mL – Methanol 50%-50% and the solvent was evaporated under nitrogen flow at 50 °C in an evaporator and the residue reconstituted in 0.5 mL of mobile phase to be injected into the liquid chromatograph. The chromatogram of the AFM1 standard is shown in Figure 1.

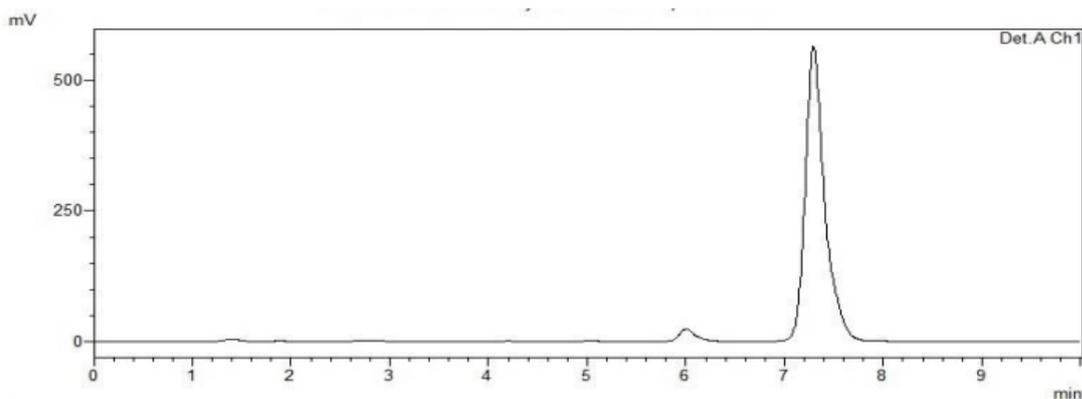
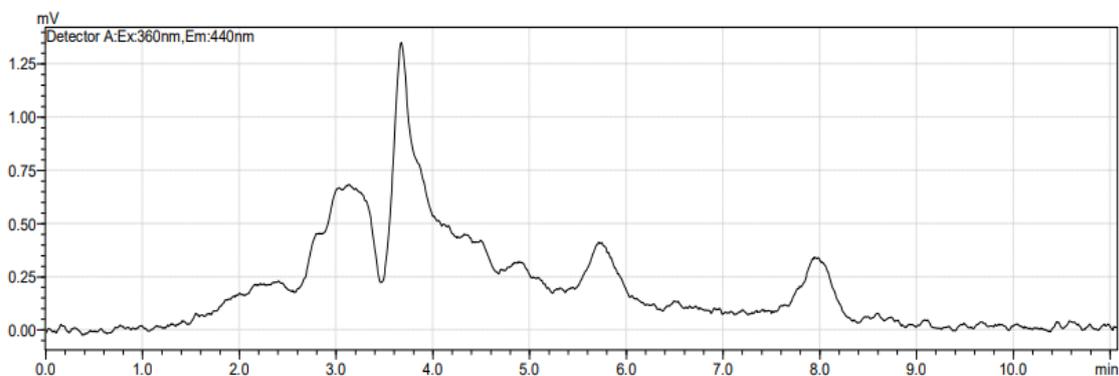


Figure 1. Chromatogram of AFM1 standard

2.2 Validation

A calibration curve was created to determine linearity and interval, with all injections performed in duplicate. Solutions were prepared at concentrations of 0.125, 0.5, 1.9, 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$. According to Brazilian legislation (Brasil, 2017), the correlation coefficient must be > 0.990 , and in we obtained a value of 0.9966 being, which is therefore in accordance with the recommendations.

The working range at standard concentrations from 0.125 to 10 $\mu\text{g/mL}$ enabled the detection of AFM1 within the limits of interest. The limit of detection (LD) was obtained with successive known concentrations of standard solution, injected in decreasing order to obtain the limit of detection, which was 0.0625 $\mu\text{g/ml}$. Figure 2 shows the LD in the chromatogram.



2.3 UV LED Light

The adapted method of Stanley (2020) was applied, with 50 ml added in 250 ml glass beakers to provide greater possibility of contact (depth=5 mm). For light radiation, a beam system was used as an UV LED light source producing a radiation of 365nm. Measured by a high sensitivity system to measure the irradiance of the UV LED light system on the surface of the test solution.

2.4 Acidity %

The milk acidity was quantified by titration with NaOH according to the AOAC 947.05 method (AOAC, 2016), to assess whether the variable would be altered in such a way as to impair the quality characteristics of bovine milk.

3.Results and Discussion

3.1 UV LED Light

There was a decrease in the AFM1 content, and the average result is reported in Table 1, indicating the duration of the zero-time light-emitting diode. The results with a reduction of 75.5, 97.3, and 94.1%, respectively for the time ranges of 3, 6 and 9 min.

Table 1. Performance of UV LED application in AFM1 decreasing in bovine milk.

Variable	Time (min)			
	0	3	6	9
AFM1 Concentration ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	1352.8	331.4	36.5	37.34

To illustrate the contamination of the study, figure 3 shows the chromatogram of AFM1 at times 0 and the time of 3 min. of application of the UV LED light.

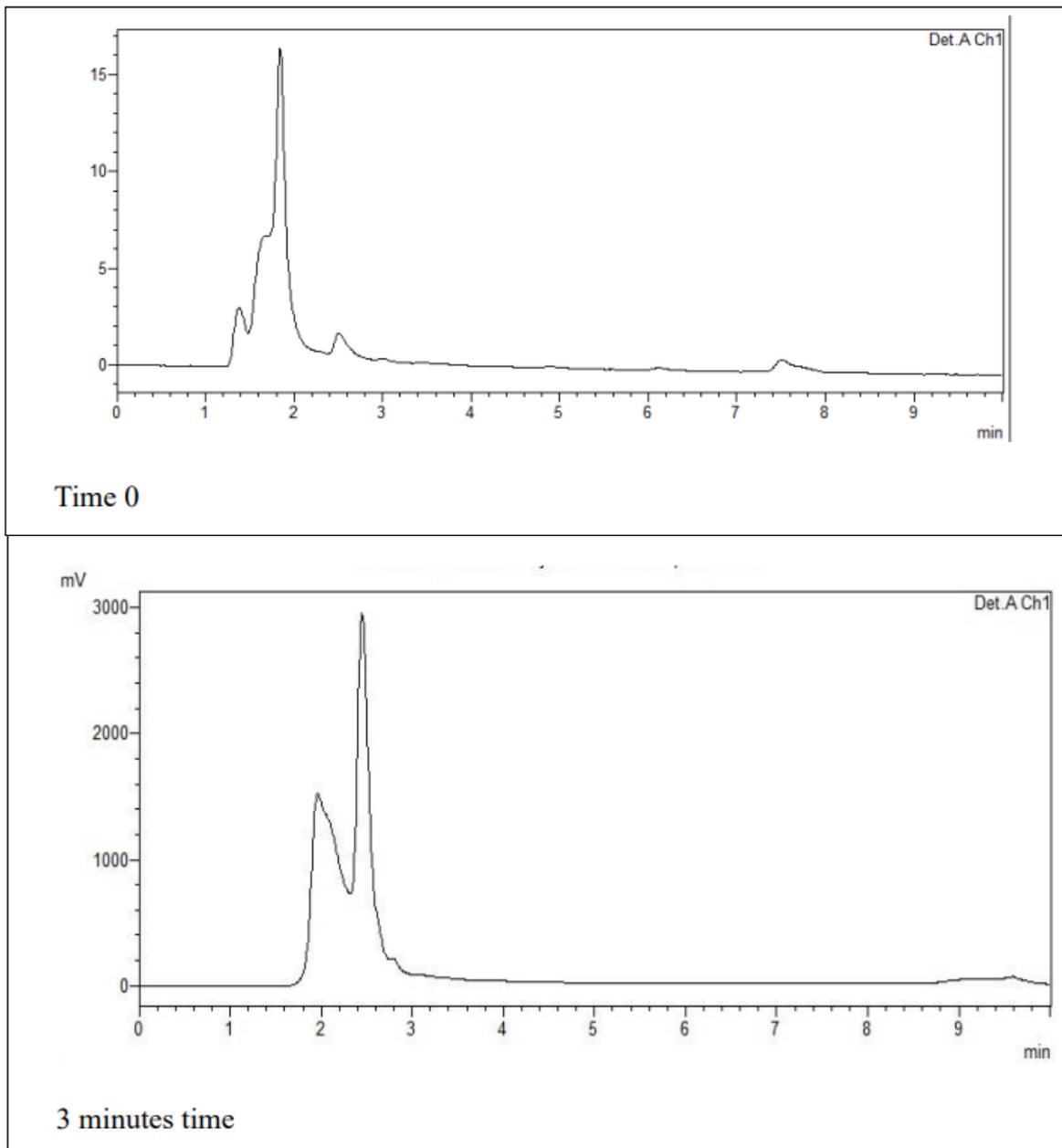


Figure 3. Chromatogram of AFM1 in different time of UV LED light application

The data obtained were more efficient than reported by Kurup et al. (2022) who applied the UV LED light technique (365 nm) in whole bovine milk and obtained a reduction of AFM1 of $65.7 \pm 1.65\%$ (at 857 mJ/cm^2), in relation to control. In the work by Nguyen et al (2022) the authors used UV light at 254 nm and it was found that short-wave ultraviolet radiation (UVC) reduced up to 50% of AFM1 in milk after 20 min of treatment regardless of the initial AFM1 contamination level. Treatment time, depth of samples, and stirring were all found to significantly ($p < 0.05$) enhance the reduction of AFM1.

Other methods have also been used to mitigate AFM1 contamination in milk such as the use of lactic acid bacteria. Seyedjafarri (2021) used *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (1:1) and bacteria showed the higher binding ability between 90- 100% AFM1 in milk samples. Wochmer et al. (2019) used the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to reduce AFM1. Comparing with the positive control, the AFB1 bioaccessibility ranged from 23.68 to 72.67% and for AFM1 was 0%. The probiotic, isolated or combined with prebiotics, was efficient in mycotoxin reduction. In addition, research by the authors cited above needed about of treatment/incubation to obtain the reduction of AFM1, while using the light emitting diode brings efficient rates using 3min.

The UV LED light technique as an AFM1 mitigation method can help contamination prevention actions based on data that there is AFM1 contamination in bovine milk in Brazil. Becker-Algeri et al. (2020) analyzed samples from southern Brazil and detected AFM1 in 13.2% of the samples. Goncalves et al. (2017) indicated that AFM1 is present in bovine milk in 40.4% of samples from small rural properties in southern Brazil. Considering that AFM1 contamination may be present in different Brazilian geographic regions, mitigation actions are necessary, such as good practices in animal feeding management (Jiang et al., 2021).

3.2 Acidity%

Considering that the use of LED UV light could change other characteristics of the milk, the acidity content was analyzed at each time of the test. According to Brazilian legislation, milk acidity is a quality and safety parameter that must be between 0.14 and 0.18 expressed in grams of lactic acid/100 mL (Brasil, 2018). According to the legislation, the range for acidity in is 0.14-0.18 g of lactic acid/100 mL and at the end of the test, the 9-min sample showed 0.16 g of lactic acid/100mL. The fact that there is a change in the acidity values can be attributed to the heat treatment to which the milk was indirectly submitted during the application of the LED UV light. On the other hand, when milk has its temperature

increased and is stored, the carbohydrate present is degraded and converted into acids, which explains why the change in the titratable acidity value occurred. Also, since LED UV light could make environments and products free of contaminants, when applied to milk samples, it is possible that there was a decrease or not of microorganisms present, interfering with acidity (Mubeen et al., 2020). As recommendation, we suggest a systematic control program for safe livestock feed to be introduced by public health authorities (de Freitas et al., 2018). By monitoring the analysis of the samples, it will be possible to express the level of contamination of AFL present in milk and its derivatives from samples collected according to the region, milk producer, before and after treatment with UV LED light in bovine milk to the reduction of AFM1 without altering its properties such as acidity and protein content.

Conclusion

The efficiency of UV LED light in reducing the concentration of AFM1 in samples of bovine milk using 3, 6 and 9min was tested. The results showed that there was a percentage reduction of over 75% in all tests, showing the possibility of using it to reduce the risk of this mycotoxin. The results for acidity attended the limit according to the Brazilian regulation.

However, there are few works associated with ways to reduce AFM1 in milk and its derivatives, with a proposed method using exposure to UV LED light. Therefore, further studies are needed to assess the level of mycotoxin degradation in modified mycotoxins as future work.

References

AOAC- Association of Official Analytical Chemists (2016). Acidity of Milk, Titrimetric Method AOAC Official Method 947.05 Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Becker-Algeri, T. A., Souza, C., Bortoli, K., Castagnaro, D., Scaglioni, P. T., Drunkler, D. A., Dors, G., Valderrama, P. & Badiale-Furlong, E. (2020). Seasonal variation of milk quality: Physicochemical, microbiological, and toxicological, *J. of food safety*, 40, 12662. <https://doi.org/10.1111/jfs.12796>.

Brasil (2019). Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 76, de 26/11/2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Edição 230 Seção 1, p. 9., Brasília (DF). 30/11/2019, 6p.

de Freitas, C. H., Gonçalves, C. L., & Nascente, P. S. (2018). Aflatoxins B1 and M1: risks related to milk produced in Brazil. *Annals of Microbiology*, 68, 793-802. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1395-2>

Dos Santos J. S., Granella, V., Pigatto, G. M., Reiniger, L. R. S., & Costabeber, I. H. (2016). Aflatoxin M 1 in pasteurized and raw milk from organic and conventional systems. *J. für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 11, 299-304. <https://doi.org/10.1007/s00003-016-1039-z>.

Ghafoori, Z., Tehrani, T., Pont, L., & Benavente, F. (2022). Separation and characterization of bovine milk proteins by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Asian J. of Dairy and Food Research.*, 40, 30-34. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200423>

Gonçalves, L., Dalla Rosa, A., Gonzales, S. L., Feltes, M. M. C., Badiale-Furlong, E., & Dors, G. C. (2017). Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. *Food Sci. Technol.*, 37, 11-15. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.06317>

Hasninia, D., Salimi, G., Bahrami, G., Sharafi, K., Omer, A. K., Rezaie, M., & Kiani, A. (2022). Human health risk assessment of aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk from the Kermanshah province, Iran. *J. of Food Composition and Analysis*, 110, 104568.

Hassan, Z. U., Al-Thani, R., Atia, F. A., Almeer, S., Balmas, V., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2018). Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar. *Food control*, 92, 25-29.

Jiang, Y., Ogunade, I.M., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2021). Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. *Toxins*, 13, 283. <https://doi.org/10.3390/toxins13040283>

Mubeen, R., Hassan, A., Rashid, Z., Nisa, S. U., Saeed, F., Afzaal, M., & Tufail, T. (2020). Comparative Analysis of UV Treatment and Heat Treatment on Fatty Acids Profile of Milk. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-42271/v1>

Nguyen, T., Palmer, J., Loo, T., Petcu, M., Newson, H. L., & Flint, S. (2022). Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim milk and degradation products after treatment. Food Chemistry, 390, 133165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133165>

Seyedjafarri, S. (2021). Detoxification of Aflatoxin M1 in Milk by Lactic Acid Bacteria. Asian J. of Dairy and Food Research, 40, 30-34. <https://10.18805/ajdfr>

Shundo, L., Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C. A., Navas, S. A., & Ruvieri, V. (2016). Occurrence of aflatoxin M1 in bovine milk samples consumed in different regions of Brazil. Rev Inst Adolfo Lutz, 75, 1704.

Stanley, J., Patras, A., Pendyala, B., Vergne, M. J., & Bansode, R. R. (2020). Performance of 607 a UV-A LED system for degradation of aflatoxins B 1 and M 1 in pure water: kinetics 608 and cytotoxicity study. Sci. Rep., 10, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70370-x>

Wochmer, K. F., Moreira, M. C. C., Kalschne, D. L., Colla, E., & Drunkler, D. A. (2019). Detoxification of Aflatoxin B1 and M1 by Lactobacillus acidophilus and prebiotics in whole cow's milk. J. of Food Safety, 39. <https://doi.org/10.1111/jfs.12670>

Zentai, A., Józwiak, A., Süth, M., & Farkas, Z. (2023). Carry-Over of aflatoxin B1 from feed to cow milk- a review. Toxins, 15, 195. <https://doi.org/10.3390/toxins15030195>

7.0 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Obtenção da matéria-prima

Foram adquiridas amostras de leite bovino regional do varejo da cidade de Manaus-AM. As amostras foram numeradas e identificadas, anotando-se: marca, procedência (local de sua produção e coleta), data de fabricação, data de validade, peso aproximado e lote, quando estas apresentaram identificação. As amostras foram analisadas quanto à presença de AFM₁ antes de serem submetidas aos tratamentos com UV Led.



Figura 2 – (a) Amostras de leite adquiridas para a análise; (b) Amostras centrifugadas durante 15 minutos.

7.2 Quantificação de AFM₁

As análises foram realizadas no laboratório do Núcleo de composição e toxicologia de alimentos da Universidade Federal do Amazonas (NECTA). A determinação de AFM₁ nas amostras de leite foi realizada em triplicata, seguindo-se os procedimentos indicados pelo manual das colunas de imunoafinidade (Afla M₁ HPLC, Vicam[®], Watertown, MA, EUA). As amostras foram colocadas em banho-maria em torno de 5 minutos, em seguida colocadas em tubos para centrifugação por 15 minutos. Após a centrifugação a camada gordurosa formada na parte superior foi desprezada e o leite desnatado foi filtrado em papel de filtro e colhendo 10 mL de extrato filtrado. O filtrado coletado no Becker foi adicionado na coluna de imunoafinidade, que contém anticorpos monoclonais específicos que

formam com a AFM₁ um conjugado antígeno-anticorpo. Após todo o volume de amostra ter passado pela coluna. A coluna foi lavada com 20 mL de água destilada. Em seguida, com 5mL de acetonitrila . O resultado da lavagem foi colocado para secar, e posteriormente reconstituído com a fase móvel para ser levado ao HPLC.



Figura 3 – Extração do leite utilizando colunas de imunoafinidade.

7.3 Validação do Método

Para a realização da validação foi utilizado amostra de leite negativa para presença de aflatoxinas. Foram realizadas em triplicatas. Três amostras diferentes foram fortificadas, em duplicata, com 1 mL de solução padrão de AFM₁ em três concentrações: 1,0, 2,5 e 3,0 µg/mL, sendo uma delas o limite máximo permitido pela legislação vigente, uma abaixo e outra acima deste valor. Em seguida, foi feito a extração e purificação com coluna de imunoafinidade como descrito no item 4.2 para em seguida proceder a separação e quantificação em HPLC. Para obtenção do nível de recuperação e caracterizar assim a eficiência do método analítico.

7.4 Limite de Detecção

Para a determinação do limite de detecção, foram injetadas diferentes concentrações de solução padrão de AFM₁ de forma decrescente, partindo de 10 até a concentração até não ser mais possível obter a área exata do pico.

7.5 Linearidade e Intervalo

A curva de calibração foi feita a partir de uma solução mãe de concentração de AFM₁. A partir desta, foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 0,125, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 µg/mL, sendo este o intervalo definido. De cada ponto da curva foram realizadas duas injeções (duplicata), obtendo-se a média das leituras dos mesmos para a construção da curva de calibração. O volume de injeção foi 50 µL partindo de maior para a menor concentração.

7.6 Quantificação de AFM nas amostras

As amostras foram colocadas em banho-maria em torno de 5 minutos, em seguida colocadas em tubos para centrifugação por 15 minutos. Após a centrifugação a camada gordurosa formada na parte superior será desprezada e o leite desnatado será filtrado em papel de filtro e colhendo 10 mL de extrato filtrado. O filtrado coletado no Becker será adicionado na coluna de imunoafinidade, que contém anticorpos monoclonais específicos que formam com a AFM₁ um conjugado antígeno-anticorpo. Após todo o volume de amostra ter passado pela coluna. A coluna foi lavada com 20 mL de água destilada. Em seguida, com 5 mL de acetonitrila. O resultado da lavagem será colocado para secar, e posteriormente reconstituído com a fase móvel para ser levado ao HPLC. Aplicação do método igual ao item 4.2.

8.0 Tratamentos das amostras com luz UV

As amostras contaminadas com AFM₁ foram submetidas à luz com comprimento de onda de 360 nm a 0, 2,5 e 5 J/cm² por 30, 45 e 60 minutos (Sun *et al.*, 2016). O tratamento

com luz Uv Led foi em uma bancada contendo as amostras em béqueres com volume de 300 ml de leite bovino, utilizando um feixe de luz com lâmpada UV de 1000W. Foi utilizado agitador magnético para manter as amostras com maior contato com a luz, melhorando a radiação no sistema do experimento.

9.0 Índice de acidez

Para avaliar o impacto dos tratamentos nos aspectos físico-químicos das amostras, foi necessário avaliar a acidez.

Para o método foi utilizado uma proveta de 100 ml para medir o volume de 20 ml de leite e outra proveta para medir 40 ml de água destilada. Somando um total de 60 ml adicionadas a um Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida de duas gotas de fenolftaleína, como indicador. Foi realizada titulação com solução de hidróxido de sódio 0,01 M previamente padronizada até o aparecimento da coloração rósea, a qual deverá persistir por 30 segundos. Este teste foi realizado em triplicata. O cálculo foi realizado da seguinte forma:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \times f \times M \times 56,1}{P}$$

, onde:

v = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M gasto na titulação

f = fator da solução de hidróxido de sódio

M= Molaridade da solução de NaOH

P = nº de g da amostra (LUTZ, 2008).

As análises foram feitas em triplicata, após o recebimento das amostras. Estas foram analisadas conforme AOAC (2016): para extração serão utilizados 100 mL da amostra, no qual será filtrado e centrifugado. Em seguida, a camada de gordura eliminada utilizando uma espátula e no leite desnatado será passado em uma coluna de imunoafinidade. As colunas

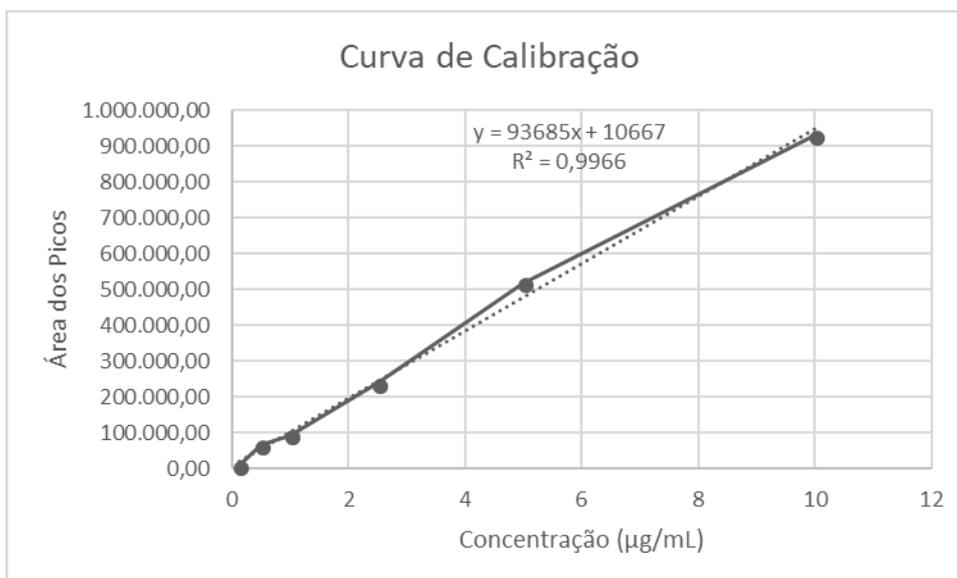
foram lavadas duas vezes com 10 mL de água e ar pressionado para a coluna para remover água residual. Acetonitrila de 1 mL- Metanol 50%-50% será usado como eluente de AFM₁. O solvente será evaporado na escuridão sob fluxo de nitrogênio em 50 °C em um evaporador e o resíduo reconstituído em 0,5 mL de fase móvel a ser injetado no cromatógrafo líquido. Antes da quantificação por cromatografia será realizada a validação do método.

10.0 Resultados

10.1 Validação da metodologia

Uma curva de calibração foi elaborada para a determinação da linearidade e intervalo, sendo as injeções todas realizadas em duplicata. Segundo a RDC n° 166 de 2017, da ANVISA (BRASIL, 82017), que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos, o coeficiente de correlação (r) deve estar acima de 0,990, sendo obtido no experimento um valor de 0,9966, logo se encontra de acordo com o preconizado. A faixa de trabalho nas concentrações do padrão de 0,125 a 10 µg/mL possibilitaram a detecção de AFM₁ dentro dos limites de interesse. A curva obtida correlacionou a área dos picos dos cromatogramas com as respectivas concentrações de AFM₁

Figura 4 – Curva de calibração da validação do método.

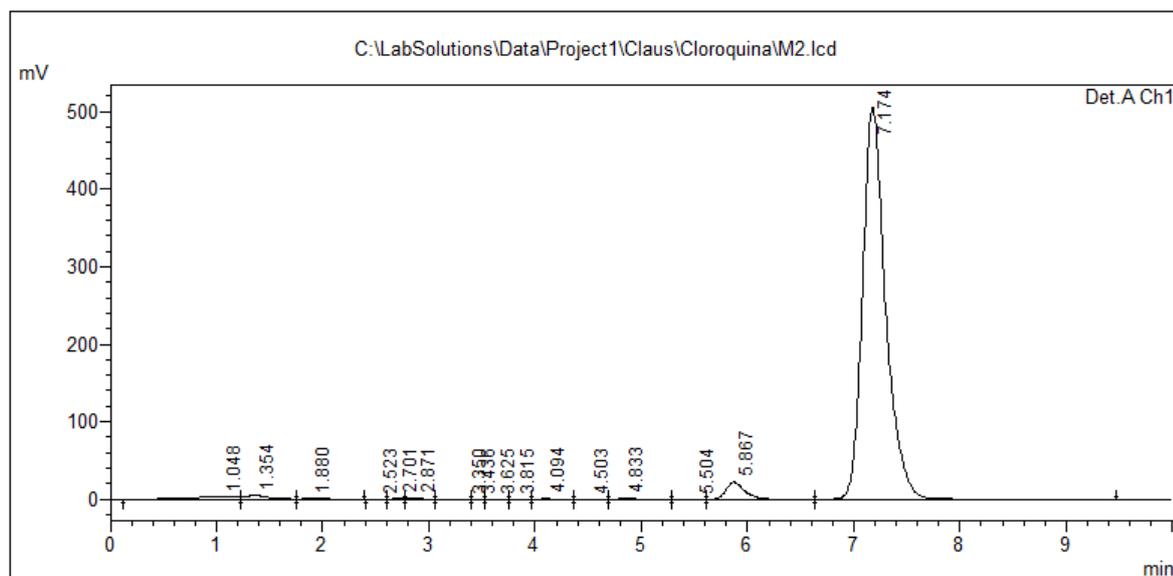


Para determinar a exatidão ou recuperação, os métodos analíticos empregados no experimento foram previamente avaliados com a utilização de amostras de leite experimentalmente com soluções padrões de AFM₁. As amostras chegaram a ser contaminadas com AFM₁ nas concentrações necessárias, foi realizada a extração para que fossem passadas no CLAE sendo possível realizar o cálculo da recuperação.

Tabela 5 – Recuperação da validação do método para AFM₁.

Tempo	Área	Concentração	Recuperação
4008	2759132	29,3373	85.5281481
7174	7641190	81,4487	83,1518757

O limite de detecção sendo de 0,0625 µg/mL, e o intervalo determinado seria suficiente para detectar níveis de contaminação inferiores ao limite permitido pela legislação brasileira vigente, que estabelece como limite máximo tolerado de AFM₁ para o leite de 0,5 µg/kg. O cromatograma abaixo indica o tempo do pico de concentração que corresponde à concentração de aflatoxina presente na amostra padrão da validação do método, que será realizado em comparação com as demais amostras estudadas. As 30 amostras de leite recebidas e analisadas terão seus valores comparados com o limite de detecção para concluir quais entre todas elas possuem contaminação de aflatoxina para realizar o tratamento com luz UV, com propósito de reduzir os níveis de contaminação de AFM₁.

Figura 5 – Cromatograma das amostras de leite.

11.0 Aplicação da luz UV

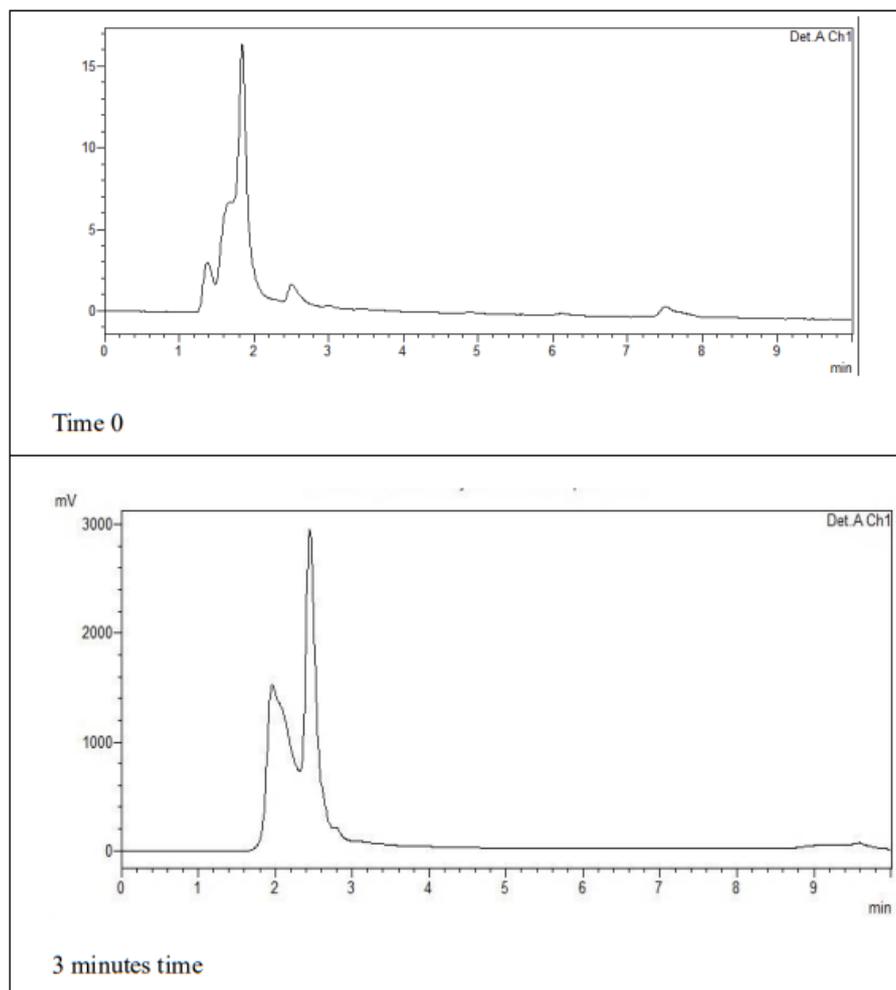
Após aplicação da luz UV, ocorreu a diminuição no conteúdo de AFM1, e o resultado médio é relatado na Tabela 6, indicando a duração do diodo emissor de luz de tempo zero.

Tabela 6 - Desempenho da aplicação da Luz UV em AFM1.

Variável	Tempo (minutos)			
Concentração AFM1	0	3	6	9
($\mu\text{g/Kg}$)	1352,8	331,4	36,5	37,34

Para visualizar a contaminação do estudo, a figura 6 mostra o cromatograma do AFM1 nos tempos 0 e no tempo de 3 min. de aplicação da luz LED UV.

Figura 6 - Cromatograma de AFM1 em diferentes tempos de aplicação de luz LED.



Os dados obtidos foram mais eficientes do que os relatados por Kurup *et al.* (2022) que aplicaram a técnica de luz LED UV (365 nm) em leite bovino integral e obtiveram uma redução de AFM1 de $65,7 \pm 1,65\%$ (a 857 mJ/cm^2), em relação ao controle. No trabalho de Nguyen *et al* (2022) os autores usaram luz ultravioleta a 254 nm e verificou-se que a radiação ultravioleta de ondas curtas (UVC) reduziu até 50% de AFM1 no leite após 20 min de tratamento independentemente do AFM1 inicial nível de contaminação. Verificou-se que o tempo de tratamento, a profundidade das amostras e a agitação aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a redução de AFM1.

Outros métodos também têm sido usados para mitigar a contaminação de AFM1 no leite, como o uso de bactérias lácticas. Seyedjafarri (2021) utilizou *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (1:1) e bactérias mostraram a maior capacidade de ligação entre 90-100% AFM1 em amostras de leite. Wochmer et ai. (2019) utilizou o probiótico *Lactobacillus acidophilus* para reduzir o AFM1 Comparando com o controle positivo, a bioacessibilidade do AFB1 variou de 23,68 a 72,67% e para o AFM1 foi de 0%. O probiótico, isolado ou combinado com prebióticos, foi eficiente na redução de micotoxinas. Além disso, as pesquisas dos autores citados acima precisavam de tratamento/incubação para obter a redução de AFM1, enquanto o uso do diodo emissor de luz traz taxas eficientes usando 3 minutos.

A técnica de Luz LED UV como método de mitigação de AFM1 podeauxiliar ações de prevenção de contaminação com base nos dados de que se sabe que diversos leites comercializados possuem contaminação de AFM1 no Brasil. (2020) analisaram amostras do sul do Brasil e detectaram AFM1 em 13,2% das amostras. Gonçalves e cols. (2017) indicaram que o AFM1 está presente no leite bovino em 40,4% das amostras de pequenas

propriedades rurais no sul do Brasil. Considerando que a contaminação por AFM1 pode estar presente em diferentes regiões geográficas brasileiras, ações de mitigação são necessárias, como boas práticas no manejo da alimentação animal (Jiang et al., 2021).

12.0 Efeito do tratamento da acidez

% de acidez

Considerando que o uso de luz LED UV poderia alterar outras características do leite, o teor de acidez foi analisado a cada momento do teste. De acordo com a legislação brasileira, a acidez do leite é um parâmetro de qualidade e segurança que deve estar entre 0,14 e 0,18 expresso em gramas de ácido láctico/100 mL (Brasil, 2018). De acordo com a legislação, a faixa de acidez é de 0,14-0,18 g de ácido láctico/100 mL e ao final do teste, a amostra de 9 min apresentou 0,16 g de ácido láctico/100mL.

O fato de haver alteração nos valores de acidez pode ser atribuído ao tratamento térmico ao qual o leite foi submetido indiretamente durante a aplicação da luz LED UV. Por outro lado, quando o leite tem sua temperatura elevada e é armazenado, o carboidrato presente é degradado e convertido em ácidos, o que explica a alteração no valor da acidez titulável. Além disso, como a luz LED UV poderia tornar ambientes e produtos livres de contaminantes, quando aplicada em amostras de leite, é possível que tenha ocorrido diminuição ou não de microrganismos presentes, interferindo na acidez (Mubeen *et al.*, 2020).

Como recomendação, sugerimos um programa de controle sistemático para alimentação animal segura a ser introduzido pelas autoridades de saúde pública (de Freitas et al., 2018). Com o acompanhamento da análise das amostras, será possível expressar o nível de contaminação de AFL presente no leite e seus derivados a partir de amostras coletadas de acordo com a região, produtor de leite, antes e depois do

tratamento com luz UV LED no leite bovino a redução de AFM1 sem alterar suas propriedades como acidez e teor de proteína.

13.0 Conclusão

Existem fortes evidências de que as aflatoxinas estão presentes em grande parte nos alimentos como grãos e leite. E que a forma de estocagem e armazenamento ainda é insuficiente, pois depende das boas práticas de manipulação. Visto que atualmente existem alguns métodos já aplicados para reduzir as micotoxinas em determinados alimentos, a maioria só é viável para produtos sólidos. Por o leite ter uma maior concentração de água, é mais perecível. Por isso, foi testada a eficiência da luz UV LED na redução da concentração de AFM1 em amostras de leite bovino usando 3, 6 e 9min. Os resultados mostraram que houve redução percentual de mais de 75% em todos os testes, mostrando a possibilidade de seu uso para diminuir o risco da micotoxina. Os resultados de acidez atenderam ao limite de acordo com a regulamentação brasileira, não sendo considerado um impacto significativo nas propriedades organolépticas e físico-química do produto.