



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en

## Ciencia y Tecnología de los alimentos

Análisis cromatográfico de Aflatoxina M1 en muestras comerciales de queso

Chromatographic analysis of Aflatoxin M1 in commercial cheese samples

Autor/es

Konane Tarantino Sánchez

Director/es

Teresa Juan Esteban

Susana Lorán Ayala

Facultad de Veterinaria

2025

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis docentes Teresa Juan Esteban y Susana Lorán Ayala por su ayuda, confianza y orientación constante para desarrollar el proyecto.

Asimismo, agradezco al Laboratorio de Valoración Nutritiva del CITA por su apoyo y colaboración. De forma especial, quiero agradecer a Celia Conesa Montanel por su implicación y ayuda técnica, que han sido claves en la obtención de los resultados experimentales.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Gobierno de Aragón-FEDER (Grupo de Investigación de Referencia A06\_23R "Análisis y evaluación de la Seguridad alimentaria").

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>3.1 Micotoxinas.....</b>	<b>2</b>
<b>3.2 Aflatoxinas.....</b>	<b>3</b>
<b>3.3 Aflatoxina M1.....</b>	<b>5</b>
<b>3.4 Estrategias para la prevención y control de aflatoxinas.....</b>	<b>8</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>5.1 Toma de muestras.....</b>	<b>11</b>
<b>5.3 Extracción.....</b>	<b>12</b>
<b>5.4 Purificación.....</b>	<b>13</b>
<b>5.5 Determinación cromatográfica de aflatoxina M1 (UPLC-FLD).....</b>	<b>14</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>21</b>
<b>8. CONCLUSIONS.....</b>	<b>21</b>
<b>9. VALORACIÓN PERSONAL.....</b>	<b>22</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>22</b>

## **1. RESUMEN**

Las aflatoxinas constituyen un tipo de micotoxinas producidas por varias especies de hongos del género *Aspergillus*. Estos hongos en ambientes cálidos y húmedos pueden proliferar y producir aflatoxinas en piensos y alimentos para el consumo humano. Las principales aflatoxinas son B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) y M1 (AFM1). La AFM1 es un metabolito hidroxilado de la AFB1, que se excreta a través de las glándulas mamarias de los rumiantes, contaminando así la leche. La AFM1 es una sustancia muy estable que puede permanecer en productos lácteos como los quesos.

Su presencia en los alimentos es preocupante ya que, las aflatoxinas además de presentar efectos hepatotóxicos, teratogénicos y mutagénicos, han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012) en el grupo 1 como cancerígeno para los seres humanos.

La abundante literatura científica sobre la presencia de aflatoxinas en alimentos, evidencia la presencia de AFM1 en leche y productos lácteos.

En este estudio se evaluó la contaminación por aflatoxina M1 en muestras comerciales de queso procedentes de queserías artesanales de Aragón y Cataluña mediante un análisis cromatográfico de ultra alta resolución con detector fluorimétrico (UPLC-FLD). Para ello, se analizaron 40 muestras comerciales de queso, en su mayoría madurados, a partir de leche de vaca, oveja, cabra y mezcla. En el 42,5% de las muestras se detectó AFM1 en concentraciones por encima del límite de detección, siendo la concentración media de 21,80 ng/kg, sin superar en ninguno de los casos el límite máximo establecido por la legislación (50 ng/kg de leche). Estos resultados, evidencian la necesidad de incidir en las medidas preventivas y realizar estudios adicionales para conocer el comportamiento de la AFM1 durante la elaboración de productos lácteos, lo que facilitaría el establecimiento de límites máximos específicos para estos productos.

## **2. ABSTRACT**

Aflatoxins are a type of mycotoxin produced by several species of fungi of the genus *Aspergillus*. These fungi in warm and humid environments can proliferate and produce aflatoxins in feed and food for human consumption. The main aflatoxins are B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) and M1 (AFM1). AFM1 is a hydroxylated metabolite of AFB1, which is excreted through the mammary glands of ruminants, thereby contaminating the milk. AFM1 is a very stable substance that can remain in dairy products such as cheeses.

Its presence in food is of concern since aflatoxins in addition to presenting hepatotoxic, teratogenic and mutagenic effects, have been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2012) in group 1 as carcinogenic to humans.

The abundant scientific literature on the presence of aflatoxins in food, evidences the presence of AFM1 in milk and dairy products.

In this study, aflatoxin M1 contamination in commercial cheese samples from artisanal cheese dairies in Aragon and Catalonia was evaluated by ultra-high resolution chromatographic analysis with fluorimetric detector (UPLC-FLD). For this purpose, 40 commercial samples of cheese, mostly matured, from cow's, sheep's, goat's and mixed milk, were analyzed. In 42.5% of the AFM1 samples was detected in concentrations above the detection limit, the average concentration being 21.80 ng/kg, without exceeding in any of the cases the maximum limit established by legislation (50 ng/kg of milk). These results show the need for preventive measures and for additional studies to determine the behavior of AFM1 during the production of dairy products, which would facilitate the establishment of specific maximum limits for these products.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos de forma natural por ciertos mohos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos mohos pueden proliferar en una amplia variedad de alimentos como cereales, frutos secos, frutas desecadas y especias. Su desarrollo puede ocurrir tanto antes como después de la cosecha, durante el almacenamiento y procesado, especialmente en ambientes cálidos y húmedos (OMS, 2023). De esta forma, ingresan en la cadena alimentaria una variedad muy amplia de micotoxinas que pueden afectar a la salud humana y animal. Desde el punto de vista de la salud pública, las micotoxinas más importantes son las aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1 y M2), ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol, toxinas T-2 y HT-2, fumonisina 1 y 2 pero también otras como la patulina, citrinina, alcaloides ergóticos, toxinas de alternaria, etc (AESAN, 2024).

Existen muchos factores que influyen en la proliferación fúngica y en la contaminación de los alimentos con micotoxinas. Entre los más importantes se encuentran la temperatura y humedad, el tipo de suelo, la susceptibilidad del cultivo y de la variedad de la que se trate, la madurez de los granos en el momento de la cosecha, los daños mecánicos o los producidos por insectos y/o aves.

La mayoría de las micotoxinas son químicamente y térmicamente estables, lo que implica que, una vez que están en las materias primas, persisten durante todo el procesamiento y almacenamiento, resistiendo tratamientos como el secado, la molienda o la cocción. Por ello, las medidas de control deben enfocarse en prevenir su formación desde las primeras etapas de la cadena alimentaria (MAPA, 2015).

La exposición a micotoxinas por el consumo de piensos y alimentos contaminados, puede causar cáncer y mutagenicidad, así como alteraciones en el sistema inmunológico, problemas en el metabolismo de los estrógenos, gastrointestinales o en el riñón (AESAN, 2024).

Las micotoxinas, especialmente la aflatoxina B1, constituyen una de las principales causas de notificaciones en el Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (RASFF, *Rapid Alert System for Food and Feed*) en la Unión Europea, con numerosas notificaciones mensuales. Productos importados de países como Turquía, India, Pakistán, EE.UU., China, Irán y Egipto son frecuentemente rechazados por superar los límites permitidos de estos contaminantes en los alimentos, establecidos en el Reglamento (UE) nº 2023/915. El número constante de alertas reflejan la magnitud del problema, no solo por su frecuencia, sino por los riesgos asociados a la exposición crónica, lo que la convierte en una preocupación relevante para la salud pública.

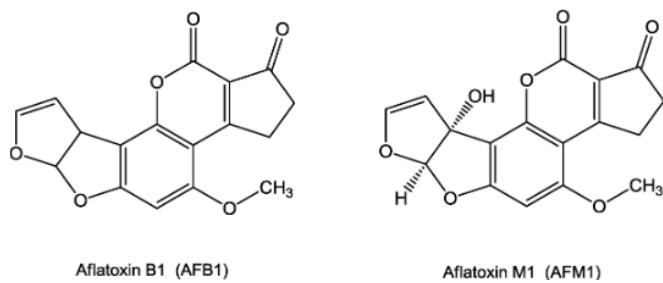
### **3.2 Aflatoxinas**

Las aflatoxinas son un grupo de aproximadamente 20 tipos de metabolitos diferentes producidos por mohos del género *Aspergillus*, especialmente por algunas cepas de *Aspergillus flavus* y por casi todas las de *Aspergillus parasiticus*. Estos mohos tienen una gran afinidad por diferentes materias primas, entre ellas los cereales destinados a la elaboración de piensos, que ofrecen las condiciones óptimas para su crecimiento, sobre todo en áreas geográficas con climas tropicales. Pueden desarrollarse en un rango de temperatura de 12-48 °C, con un crecimiento óptimo a los 36-38 °C con humedad del 80-90%. Generalmente colonizan granos dañados, pero en algunos casos pueden producir pectinasas y cutinasas, enzimas que le permiten penetrar en granos no dañados. La producción de aflatoxinas ocurre con temperaturas entre 20-30 °C. Otros factores como la humedad y la Aw del sustrato influyen tanto en el desarrollo del moho como en la producción de micotoxinas, que se ve limitada si la humedad es menor al 13% y la Aw es inferior a 0,78 (Prandini et al., 2009).

Las principales aflatoxinas son B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) y M1 (AFM1). Esta última es un metabolito hidroxilado de la AFB1 (figura 1). La toxicidad y presencia de estos metabolitos en

los alimentos varían entre sí, siendo la AFB1 la más tóxica para los humanos y con mayor prevalencia (ELIKA, 2023).

En general las aflatoxinas son una familia de compuestos clasificados como difuranocumarinas. Concretamente, la aflatoxina B1 se caracteriza por la fusión de un anillo de ciclopentenona al anillo de lactona de la estructura de cumarina (Marchese et al., 2018).



*Figura 1. Estructuras químicas de la aflatoxina B1 y la aflatoxina M1.*

Desde el punto de vista físico-químico, las aflatoxinas son sustancias cristalinas que presentan fluorescencia a la luz ultravioleta (365 nm). La letra “B” (*blue*) indica que tienen fluorescencia azul, mientras que la “G” (*green*) indica la fluorescencia verde amarillenta (AESAN, 2023). Por otro lado, la estructura química hace que las aflatoxinas sean sensibles a la hidrólisis alcalina, por el cual se han investigado tratamientos de amoniaco o hipoclorito para su reducción de aflatoxinas en productos contaminados. Sin embargo, aún quedan aspectos a aclarar como la toxicidad de los productos generados tras dichos tratamientos (MAPA, 2015).

En general, las aflatoxinas comparten propiedades similares. Son ligeramente solubles en agua, insolubles en solventes no polares y fácilmente solubles en solventes orgánicos polares. Asimismo, presentan una alta estabilidad térmica, incluso a altas temperaturas, lo que impide su degradación durante la fabricación de alimentos como por ejemplo en leches tratadas térmicamente, ya que los tratamientos térmicos son poco efectivos (Marchese et al., 2018).

Estas toxinas se detectan en frutos secos (pistachos, cacahuetes), cereales (maíz, arroz), frutas desecadas (higos, pasas), semillas, café, té y derivados. Además, la aflatoxina M1, puede contaminar la leche de rumiantes que consumen piensos contaminados con aflatoxina B1. Diversos estudios han confirmado la presencia de aflatoxinas en numerosos alimentos a nivel mundial. Según la última encuesta mundial sobre micotoxinas elaborada por DSM-Firmenich, (2024) se analizaron muestras de materias primas y piensos terminados, con una tasa global de detección de aflatoxinas del 21%. En el caso de Europa, la prevalencia de aflatoxina fue del 11% en trigo, 30% en maíz y 28% en piensos terminados.

A pesar de que la contaminación agrícola por aflatoxinas es difícilmente evitable, su prevalencia varía según factores climáticos, prácticas agrícolas, daño por plagas y manejo postcosecha. Estas toxinas predominan en climas tropicales y subtropicales donde el calor y la humedad favorecen la proliferación fúngica. No obstante, el calentamiento global modificaría su distribución geográfica, incrementando el riesgo en zonas como el sur de Europa (España, Italia, Grecia) y los Balcanes (AESAN, 2021). Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), existe una relación entre el cambio climático y la mayor prevalencia de aflatoxinas en cereales y leche.

Las aflatoxinas son metabolitos altamente tóxicos que pueden producir tanto toxicidad aguda como crónica, siendo esta última la más preocupante con el hígado como principal órgano afectado por los efectos tóxicos de la aflatoxina (Dhakal et al., 2023). La exposición aguda a altas dosis de aflatoxinas puede producir aflatoxicosis, cuyos principales síntomas son: daño hepático, cáncer de hígado, alteración mental, dolor abdominal, vómitos, convulsiones, edemas, hemorragias, alteración en la digestión de alimentos, coma e incluso la muerte. Por otro lado, la exposición crónica puede provocar inmunosupresión y cáncer hepático (ELIKA, 2023).

La IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) clasificó las aflatoxinas B1, B2, G2 y M1 como pertenecientes al grupo 1 (cancerígeno para humanos) ya que existe suficiente evidencia científica que lo avala (IARC, 2012).

Ante la ausencia de umbral seguro de exposición a estos contaminantes, debido a sus efectos cancerígenos y genotóxicos, no se han establecido valores de ingesta diaria tolerable (IDT), por lo que la estrategia recomendada es minimizar la exposición mediante el principio ALARA (*tan bajo como sea posible*). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), utiliza la Dosis Benchmark (BMD) que permite evaluar el nivel de exposición a estas aflatoxinas a través del cálculo del margen de exposición (MOE). El valor establecido de BMDL<sub>0</sub> (con un límite de confianza del 95%) es de 870 ng/kg de peso corporal y día, es decir, la ingesta diaria de esta cantidad incrementa un 10% de riesgo de cáncer (EFSA, 2020).

### **3.3 Aflatoxina M1**

La aflatoxina M1 (AFM1) es el principal derivado monohidroxilado de la aflatoxina B1 (AFB1) que se forma en el hígado por medio de enzimas asociadas al citocromo p450 (enzimas oxidases) y es excretado a través de las glándulas mamarias en la leche (Cano-Sancho et al., 2010). La conversión de AFB1 a AFM1 se considera un proceso de desintoxicación porque la carcinogenicidad *in vivo* de la AFM1 es solo el 10% de la AFB1 (Iqbal et al., 2015). La toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas

ha sido ampliamente documentada en estudios experimentales con diversas especies, mostrando especial vulnerabilidad en animales jóvenes. Por tanto, existe una gran preocupación por la salud de los niños considerando su alto consumo de leche y productos lácteos, su bajo peso corporal y su mayor vulnerabilidad fisiológica (Scaglioni et al., 2014).

La EFSA estima una tasa de transferencia de AFB1 procedente del pienso a AFM1 en la leche que oscila de 1% a 2% en ganado vacuno, aunque puede aumentar hasta el 6% si el ganado es de alta producción (Bervis et al., 2021). La transferencia en el caso del ganado ovino es generalmente menor, con valores que van de 0,08 a 0,33% en las ovejas de raza Sarda, de 0,19 a 0,34% en ovejas de raza Assaf y de 0,54% en las ovejas de raza Lacaune (Bodas et al., 2023). En el caso de las cabras, Battacone et al., (2012) observaron que un 0,17% de la dosis de AFB1 ingerida fue excretada como AFM1 en la leche y alrededor del 50% de AFM1 apareció en el primer litro de ordeño. No obstante, la tasa de transferencia puede verse afectada por diversos factores fisiológicos y patológicos, como el tipo de alimentación, el estado sanitario, su capacidad metabólica y el volumen de leche producida (Bodas et al., 2023).

En el informe anual sobre micotoxinas a nivel mundial, se detectó AFB1 en el 29% de las muestras globales de piensos terminados. Sin embargo, esta prevalencia varía según la región y el tipo de pienso (DSM-Firmenich, 2024).

A pesar de la baja tasa de conversión, son diversos los estudios que evidencian la presencia de AFM1 en muestras de leche de distintas especies y procedencia. En un meta-análisis sobre la prevalencia de AFM1 en productos lácteos de Oriente Medio, se encontró AFM1 en el 84,5% de las muestras de leche de cabras, el 78,2% de las de vacas, el 60,2% de las de ovejas y el 56% de la leche de camella. Los rebaños de ovejas, cabras y camellos se alimentan con granos almacenados durante un periodo determinado cada año, y tienen acceso ilimitado para pastar en pastizales durante el resto del año. Por lo contrario, a las vacas se les proporciona alimentación en interiores y estos alimentos pueden ser una fuente importante de contaminación por aflatoxinas (Arghavan et al., 2025).

La AFM1 es muy estable a altas temperaturas, lo que significa que puede resistir los tratamientos térmicos que se aplican a la leche. En un artículo de revisión, Jahromi et al., (2025) juntaron estudios para determinar la prevalencia y el nivel de concentración de AFM1 en la leche y los productos lácteos a nivel mundial. Se observó que la leche pasteurizada y esterilizada presentaban una mayor prevalencia de AFM1 y unos niveles de concentración más altos que en la leche cruda, mientras que la leche UHT mostraba una prevalencia menor, pero niveles de concentración mucho más elevados. No obstante, los autores señalan que estos resultados podrían deberse a otros factores como la estación del año, el clima o el sistema de cultivo, y que la mayoría de estudios afirman que calentar la

leche no reduce el nivel de AFM1. Por ejemplo, Scaglioni et al., (2014) evaluaron la presencia de AFM1 en diferentes leches (leche cruda, pasteurizada, UHT, concentrada y en polvo) y los resultados hallados en relación a la concentración fueron: UHT y concentrada > pasteurizada > leche cruda > leche en polvo.

Según los resultados de un metaanálisis en el que se analizaron productos lácteos procedentes de Oriente Medio, el 87% estaban contaminados con AFM1 (Arghavan et al., 2025). Según estos autores, la prevalencia de AFM1 en productos como la leche, el yogur, el queso y el helado, fue del 87%; 68,9%; 63,6% y 54%, respectivamente.

Entre los diferentes productos lácteos, el queso es el que habitualmente presenta unos niveles de concentración de AFM1 más elevados, probablemente debido a su afinidad con la porción hidrofílica de la caseína, lo que provoca una mayor concentración en la cuajada que en el suero (Costamagna et al., 2019). Estos autores, estudiaron los niveles de AFM1 en las muestras de suero y queso procedentes de una leche contaminada con AFM1 lo que les permitió evidenciar que en dicho estudio, el 44,6% de la AFM1 se transfirió al queso mientras que el 55,4% de la AFM1 permaneció en el suero. Esto coincide con lo reportado por Lopéz et al., (2001), que obtuvieron valores del 60% de AFM1 en suero y 40% en queso. Durante la producción de queso hay un factor de enriquecimiento haciendo que los quesos contengan una concentración más alta que la leche de la que provienen. Según Prandini et al., (2009) “estudios han demostrado que la concentración de AFM1 es aproximadamente tres veces mayor en muchos quesos blandos y hasta cinco veces mayor en quesos duros en comparación con la leche”. Además, la maduración del queso y la proteólisis de la caseína pueden incrementar la recuperación de AFM1 de la leche contaminada, ya que la proteólisis afecta las regiones hidrofóbicas de la caseína, liberando la AFM1 (Prandini et al., 2009).

En el yogur se ha visto una reducción de AFM1 respecto a la leche de partida por el descenso de pH, formación de ácidos orgánicos y la acción de bacterias ácido lácticas que modifican la estructura de la caseína (Simranjot et al., 2021). Un factor muy influyente parece ser el pH ya que un estudio realizado por Iqbal et al., (2015) observaron que, a un pH 4,6 no se producían cambios en la concentración de AFM1, mientras que a pH 4 disminuye tras varias semanas de almacenamiento, posiblemente por el efecto del ácido láctico y otros subproductos de la fermentación (Iqbal et al., 2015).

La mantequilla muestra concentraciones más bajas de AFM1, probablemente porque la toxina se encuentra unida a las caseínas en la nata, y al fabricar mantequilla, esta fracción se reduce (Simranjot et al., 2021).

Existen varios métodos para la detección y cuantificación de AFM1 en productos lácteos, cuya elección depende de factores como la sensibilidad, precisión y la fiabilidad del método, y los más frecuentes son métodos cromatográficos y bioensayos. Los métodos inmunológicos como el ELISA son muy utilizados para hacer un cribado inicial. No obstante, este tipo de métodos puede producir falsos positivos ya que pueden reaccionar con otras sustancias a pesar de que los anticuerpos sean específicos para sus antígenos. En este ámbito, las técnicas cromatográficas con detección de fluorescencia o acoplada a espectrometría de masas son consideradas método de referencia debido a su alta sensibilidad (Vaz et al., 2020).

### **3.4 Estrategias para la prevención y control de aflatoxinas**

La forma más eficaz de controlar la AFM1 en los alimentos es la prevención y reducción de la contaminación por AFB1 en las materias primas y los piensos para el ganado lechero. Sin embargo, en la práctica, esta estrategia no siempre se logra implementar con éxito. En este sentido, el *Codex Alimentarius* ofrece un Código de Prácticas de Higiene que contribuye a reducir la presencia de hongos productores de micotoxinas en los cereales, disminuyendo así el riesgo de contaminación tanto en los cultivos como en los productos derivados, como piensos y alimentos procesados. Entre las recomendaciones se incluyen prácticas como la rotación de cultivos, la selección adecuada de variedades de cereales y las condiciones de almacenamiento según la región y el tipo de materia. Estas acciones se integran en las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), estrategias básicas para prevenir el desarrollo de mohos y la producción de micotoxinas en piensos y alimentos (*Codex alimentarius*, 2016).

Para poder reducir el contenido de aflatoxinas en los productos, se han evaluado métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos de desintoxicación físicos (clasificación, descascarado, calentamiento, irradiación, tratamientos de alta presión, pulsos eléctricos y tratamiento con plasma frío) y químicos (acidificación, uso de enzimas, amoniación y ozonización), están disponibles en el procesamiento de alimentos y piensos (Sipos et al., 2021). A pesar de su disponibilidad, Heidari et al., (2025) señalan que los métodos físicos y químicos no son prácticos en la producción láctea, al menos por el momento, debido al escaso conocimiento sobre su seguridad o su impacto en la composición nutricional de los productos procesados.

Por otra parte, los métodos biológicos se basan en el uso de microorganismos capaces de unir o transformar las aflatoxinas en compuestos menos tóxicos, aunque su aplicación es limitada a ciertos productos (Sipos et al., 2021). Ante estas limitaciones, ha surgido un creciente interés en el uso de

probióticos ya que es una estrategia sostenible y rentable. Se ha demostrado la eficacia de los probióticos en la reducción de AFM1 en leche y productos lácteos mediante dos procesos diferentes, la bioadsorción física y la biodegradación. Aunque esta técnica es bastante prometedora, la desventaja más importante es la unión irreversible de la toxina a la pared celular de los microorganismos (Heidari et al., 2025).

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Nutrición (MAPA) emitió un protocolo de actuación frente a la presencia de AFB1 en materias primas destinadas a la alimentación animal. Su objetivo principal es garantizar la seguridad alimentaria mediante el control de los niveles de esta micotoxina, de acuerdo con el Reglamento (CE) 152/2009 y sus modificaciones (MAPA, 2018).

Por otro lado, el Reglamento (UE) nº 2023/915 de la Comisión Europea de 25 de abril de 2023 establece límites máximos para la AFB1, la AFM1 y para el total de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en diferentes alimentos. Para la leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos, la UE ha establecido un nivel máximo de 0,050 µg/kg de AFM1. No hay un límite máximo específico para productos lácteos. Asimismo, en algunos países como Estados Unidos o China se ha establecido un límite 10 veces superior, 0,5 µg/kg de AFM1 (Vaz et al., 2022). Es esencial que, además de aplicar medidas de prevención, se hagan controles para verificar su eficacia, conocer el nivel de contaminación de AFM1 en leche y productos lácteos y evaluar los niveles de exposición a los que puede dar lugar esta contaminación.

#### **4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La aflatoxina M1, metabolito de la aflatoxina B1, constituye un desafío para la seguridad alimentaria debido a su persistencia en la cadena alimentaria y a sus efectos carcinogénicos y hepatotóxicos, incluso a concentraciones muy bajas. La contaminación de AFM1 en productos lácteos, y en particular en quesos, es de especial relevancia al tratarse de alimentos de consumo cotidiano. Aunque la normativa europea establece un límite máximo de 0,05 µg/kg en leche, no se han establecido límites concretos para el resto de productos lácteos. Esta falta de regulación genera preocupación, ya que la concentración de AFM1 puede variar según el tipo de producto, siendo el queso uno de los productos lácteos que puede alcanzar niveles más elevados por su menor contenido de agua. Es por eso que existe una necesidad de evaluar los niveles de exposición de la población a esta toxina, tanto para garantizar la salud pública del consumidor como para orientar políticas de vigilancia y control más eficaces. El presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo una evaluación de la contaminación por AFM1 en muestras comerciales de queso, para aportar datos

actualizados sobre la incidencia de AFM1 en productos lácteos. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Analizar la información científica disponible sobre los valores de contaminación de AFM1 en leche y productos lácteos.
- Identificar y cuantificar mediante un análisis cromatográfico de AFM1 de alta sensibilidad la presencia y concentración de AFM1 en muestras comerciales de queso adquiridas en queserías artesanales de la zona de Aragón y Cataluña.
- Evaluar los resultados obtenidos por comparación con estudios previos realizados a nivel nacional e internacional.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó la contaminación de AFM1 en diferentes tipos de quesos procedentes de queserías artesanales de la zona de Aragón y Cataluña. Para realizar este ensayo se utilizó una metodología de análisis previamente optimizada y validada en el laboratorio (Guillén, 2021), basada en los trabajos de Iha et al., (2011) y Gonçalves et al., (2020) cumpliendo con los criterios de linealidad, exactitud y sensibilidad establecidos en la legislación (Reglamento de ejecución (UE) 2023/2782). La metodología analítica, constó de 5 etapas principales: toma de muestra, preparación de la muestra, extracción mediante disolventes orgánicos, purificación del extracto con columnas de inmunoafinidad (IAC, Inmunoaffinity columns) y, por último, la determinación mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución con detección fluorimétrica (UPLC-FLD) (ver figura 2).

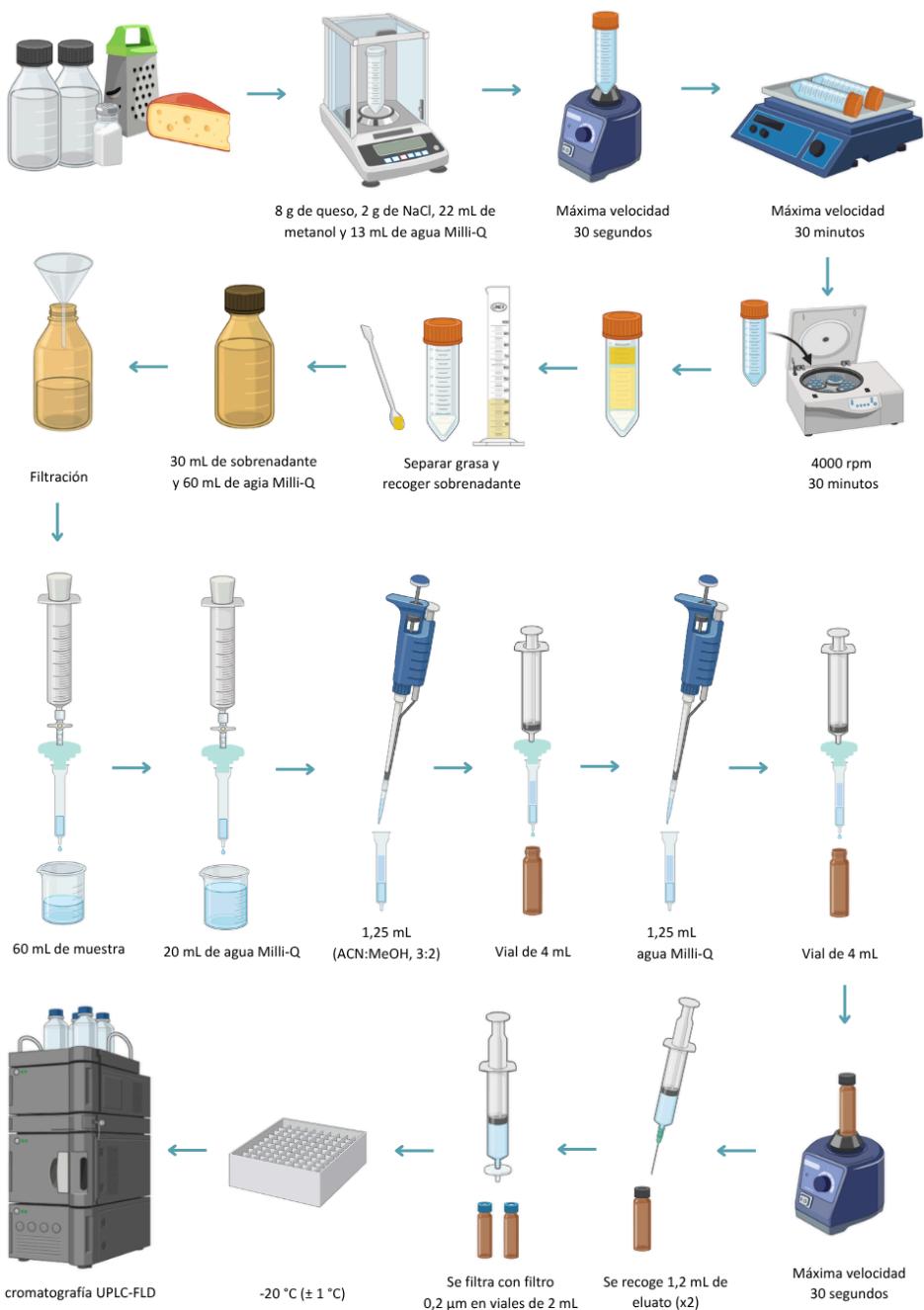


Figura 2. Etapas para el análisis de AFM1 en muestras de queso. Elaboración propia.

### 5.1 Toma de muestras

Se analizaron 40 muestras de queso en diferentes queserías artesanales de las comunidades autónomas de Aragón y Cataluña, de las cuales 13 procedían de queso de cabra, 13 de queso de oveja, 12 de queso de vaca y 2 de queso de mezcla (vaca y cabra). Las muestras procedían de quesos madurados.

Todas las muestras se codificaron y se registraron en una tabla, incluyendo fecha de extracción, nombre comercial, tipo de leche (especie; cruda o pasteurizada), tipo de queso (pasta blanda, semicurado, curado o añejo), fecha de caducidad y lote. Además, se incorporaron las observaciones durante todo el proceso de análisis y la concentración final de AFM1 cuantificada en cada muestra.

## 5.2 Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras, se ralló una porción representativa de cada muestra para favorecer la extracción de AFM1 de la matriz del queso en la siguiente etapa. Para ello, se utilizó un rallador manual con un diámetro de 2 mm (ver figura 3). Las muestras de quesos cremosos se trocearon con un tenedor cortándolo en trozos muy pequeños.



*Figura 3. Fotografía de una muestra de queso rallado.*

## 5.3 Extracción

Para el proceso de extracción se utilizó un tubo Falcon de 50 ml (Deltalab, Rubí, España), en el que, se mezclaron 8 g de muestra de queso rallada, 2 g de NaCl (Chem-lab, Zedelgem, Bélgica), 22 ml de metanol grado HPLC (Chem-lab) y 13 ml de agua ultrapura. La mezcla se homogeneizó mediante vortex (Heidolph Reax Top, Schwabach, Alemania) durante 30 segundos y posteriormente se agitó en un agitador orbital (Heidolph MultiReax) a velocidad máxima durante 30 minutos.

Tras la agitación, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min en una centrífuga (Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau, Alemania). Una vez finalizada la centrifugación, se retiró manualmente la capa lipídica superficial utilizando una espátula de acero inoxidable. Del sobrenadante obtenido, se recogieron 30 ml en una probeta de vidrio de 50 ml, los cuales se mezclaron con 60 ml de agua mili-Q en un frasco topacio para proteger las aflatoxinas de la luz solar. La mezcla se filtró con un filtro de microfibra de vidrio (Whatman, CHM GF1-125, Maidstone, Reino Unido) y el extracto obtenido se recogió en un frasco topacio para su posterior purificación (ver figura 4).



*Figura 4. Fotografía de la etapa de extracción.*

#### 5.4 Purificación

La purificación se realizó empleando un sistema de filtración a vacío (Vicam, Mildford, EE.UU.). En primer lugar, se montó el sistema conectando jeringas de 60 ml y bombas de vacío. Después, se acopló a cada jeringa una llave de paso/regulador de flujo y se unió la columna de inmunoafinidad (Vícam, IAC aflaM1™).

Posteriormente, se acondicionó la columna de inmunoafinidad insuflando aire con una jeringuilla hasta que la solución tampón de la columna alcanzase la altura del relleno. Acto seguido, se cerró la llave de paso de flujo y se vertieron 60 ml del extracto en la jeringa, se tapó con un tapón de silicona y se puso en marcha la bomba a baja intensidad. Tras encender la bomba, se inició el flujo a través de la columna abriendo la llave de flujo a una velocidad controlada de 1-2 gotas cada segundo (ver figura 5).

Cuando todo el extracto pasó por la columna, se lavó añadiendo 20 ml de agua MilliQ a la jeringa bajo las mismas condiciones de flujo, con ello se logró la eliminación de sustancias no deseadas y la adecuada retención de aflatoxinas en la fase sólida de la columna. A continuación, se dejó secar durante 5 minutos, aumentando la potencia de la bomba para quitar por completo el líquido de la columna.

Para la elución de la AFM1, se pasaron a través de la columna 1,25 ml acetonitrilo:metanol (ACN:MeOH, 3:2) seguidos de 1,25 ml de agua MilliQ a un flujo de 1 gota cada 2-3 segundos, recogiendo el eluato en un vial ámbar de rosca de 4 ml. Después, se tomaron 1,2 ml de eluato con una jeringuilla (Análisis vínicos, 2 cuerpos BD 2 ml, Ciudad Real, España), se colocó un filtro de 0,2 µm (Agilent, Econofilter PTFE 13 mm, California, EE. UU.) y se transfirieron a un vial de 2 ml con tapa precortada (con septo) (Agilent), repitiendo este proceso para tener por duplicada la muestra en otro vial de 2 ml con tapa precortada.

Las muestras purificadas, fueron etiquetadas y se conservaron a -20 °C ( $\pm 1$  °C) hasta el momento de su análisis cromatográfico.



Figura 5. Fotografía de muestras pasando por la columna a una velocidad de 1-2 gotas por segundo.

## **5.5 Determinación cromatográfica de aflatoxina M1 (UPLC-FLD)**

La determinación de AFM1 se llevó a cabo mediante cromatografía líquida utilizando un equipo Acquity UPLC Waters, el cual estaba equipado con un inyector automático, un detector de absorbancia (Waters, PDA eλ Detector, Mildford, EE. UU.) y un detector de fluorescencia (Waters, 2475 Multiλ Fluorescence Detector). La preparación de la fase móvil consistió en una mezcla de agua milli-Q, acetonitrilo y metanol (calidad HPLC, Chem-lab) en proporción de 68:24:8. Posteriormente, la mezcla se acidificó a un pH de 2 añadiendo ácido fosfórico al 85% (Analar Normapur) y para ajustar el pH se usó un pHmetro (Crison micropH 2002).

El análisis de AFM1 en las muestras de queso se llevó a cabo inyectando en el sistema cromatográfico 15 µL de cada muestra, manteniendo la temperatura del automuestreador a 5 °C ( $\pm 1$  °C), fijando el detector de fluorescencia a una λexcitación de 360 nm y una λemisión de 440 nm. Las muestras en las que se detectó AFM1 en concentraciones por encima del límite de detección se analizaron por duplicado.

La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna (Waters, Acquity UPLC HSS T3) de 150 mm de longitud, 2,1 mm de diámetro y 1,8 µm de tamaño de partícula; todo ello a una temperatura controlada de 35 °C durante la realización del ensayo. La fase móvil se hizo circular a un flujo constante de 0,2 ml/min en condiciones isocráticas.

Para la elaboración de las rectas de calibración, se prepararon soluciones patrón a partir de una solución estándar comercial de AFM1 (Sigma-Aldrich Aflatoxin M1 solution) con una concentración de 523 ng/mL. Para ello, se elaboró una disolución intermedia en fase móvil de concentración 100 ng/mL a partir de la cual se prepararon las soluciones patrón de calibración a concentraciones de 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 y 5,0 ng/mL. Tanto las soluciones patrón como las disoluciones intermedias se guardaron en congelación a -80 °C ( $\pm 1$  °C) en viales ámbar para evitar su degradación.

Al inicio del ensayo, se analizaron muestras “blancos de matriz” con el fin de ver si existían interferencias procedentes de la matriz y de los reactivos utilizados en el análisis, así como muestras control enriquecidas con AFM1 para evaluar la recuperación del método. Las muestras control se prepararon enriqueciendo muestras blanco patrón hasta obtener una concentración final de 50, 100 y 250 ng/kg, lo que permitió verificar la capacidad del sistema para detectar y cuantificar el analito en diferentes niveles de concentración (ver figura 7).

Asimismo, a lo largo del estudio, con cada lote de análisis se incluyó una muestra fortificada con AFM1 a una concentración de 100 ng/kg.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de las analíticas de las distintas muestras de queso.

Para la obtención de resultados, se inyectaron los patrones de calibración a concentraciones de 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 y 5,0 ng/mL para generar la recta de calibrado y poder interpolar los valores obtenidos de las muestras. En la figura 6 se muestra un cromatograma de los patrones de calibración analizados.

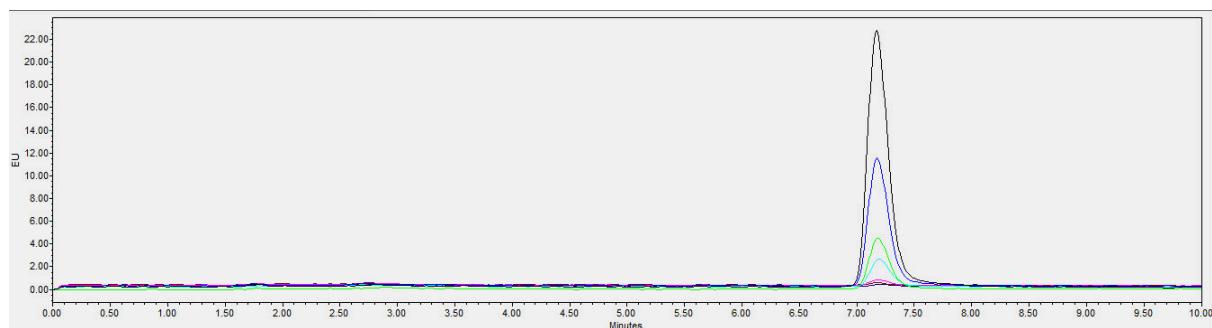


Figura 6. Cromatograma de las 5 muestras patrón.

En la figura 7 se puede ver la recta de calibrado en la que se representan los valores de fluorescencia (U.R.) frente a las concentraciones de AFM1 conocidas de las disoluciones patrón. La ecuación de la recta se realizó mediante el método de mínimos cuadrados, obteniendo en todos los casos un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) próximo a 1. El límite de detección se estableció en 9,86 ng/kg.

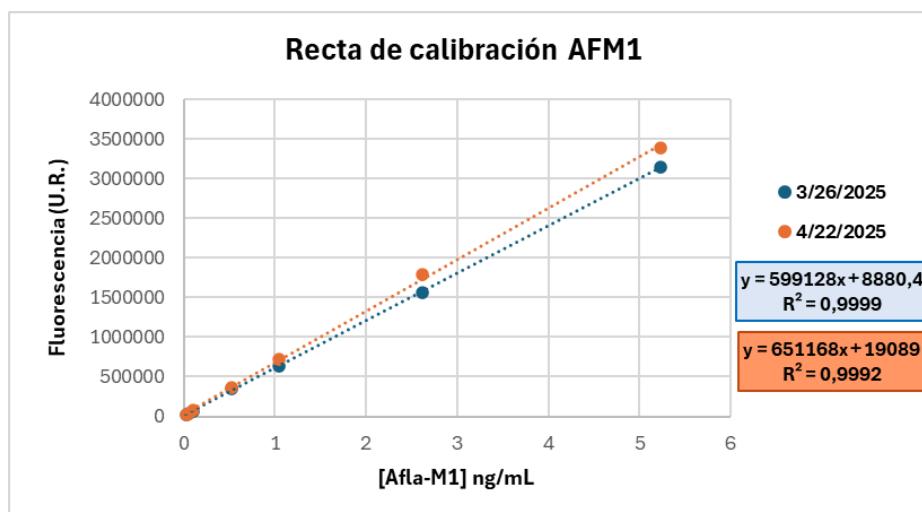


Figura 7. Rectas de calibrado de los patrones, los días que se analizaron.

Tras la realización de la recta de calibrado, los valores de AFM1 en las muestras de queso se calcularon interpolando en la ecuación. Los resultados finales se expresaron en nanogramos por kilogramos de muestra.

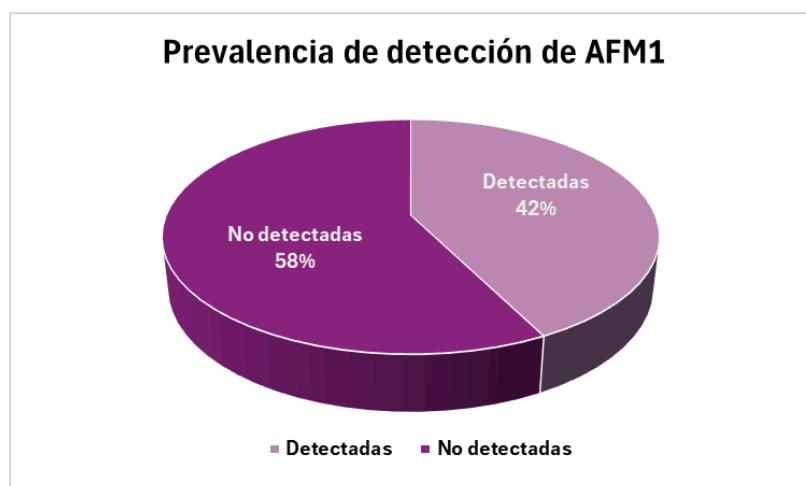
En el análisis de las muestras control se obtuvo un porcentaje de recuperación entre 74,93% y 92,7% siendo la recuperación media de 79,45% lo que puede considerarse satisfactorio.

En la tabla 1 se muestran los niveles de concentración de AFM1 en las 40 muestras de queso que se analizaron, se detectaron 23 muestras positivas por encima del límite de detección.

*Tabla 1: Concentraciones de AFM1 en muestras de queso.*

Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)	Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)	Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)
M1	< LD	M15	21,34	M29	< LD
M2	< LD	M16	< LD	M30	< LD
M3	19,96	M17	< LD	M31	< LD
M4	< LD	M18	15,49	M32	20,89
M5	20,32	M19	14,52	M33	15,05
M6	< LD	M20	11,39	M34	14,01
M7	< LD	M21	47,13	M35	< LD
M8	< LD	M22	30,01	M36	23,05
M9	< LD	M23	17,48	M37	< LD
M10	< LD	M24	< LD	M38	< LD
M11	< LD	M25	19,03	M39	34,38
M12	19,48	M26	< LD	M40	< LD
M13	< LD	M27	< LD		
M14	27,19	M28	< LD		

En la figura 8 se representa la prevalencia de detección de AFM1 con un valor de 42,5%. La contaminación en las muestras positivas osciló entre 11,39 ng/kg y 47,13 ng/kg, con un valor medio de 21,80 ng/kg.

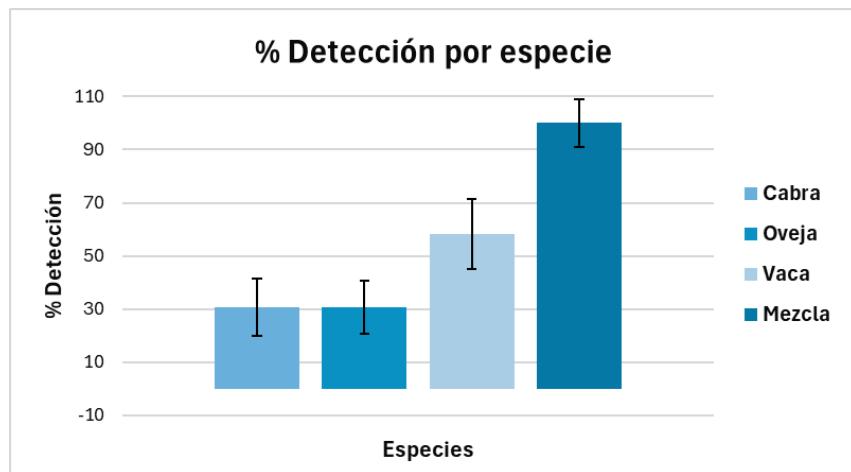


*Figura 8. Prevalencia de AFM1 en las muestras de queso analizadas.*

Ninguna de las muestras superó el límite legal de la UE de AFM1 para la leche de 50 ng/kg. El artículo 3 del Reglamento (UE) nº 2023/915 establece que, cuando no se establezcan niveles máximos específicos de la UE para los alimentos deshidratados, diluidos o procesados, el operador de la empresa alimentaria deberá proporcionar y justificar los factores de procesamiento. Los límites de AFM1 en queso deben establecerse según el factor de concentración. Stella et al., (2023) calcularon la relación entre la concentración de AFM1 en el queso y en la leche para determinar los factores de concentración de AFM1. Se encontraron factores de concentración de 2,4 para queso blando, 4 para semiblando, 4,7 para el semiduro y 4,9 para el duro. Teniendo en cuenta que las muestras corresponden a queso madurado, y que ninguna supera los 50 ng/kg, los resultados sugieren que los niveles de contaminación en la leche de partida eran bajos e inferiores al límite máximo establecido por la Unión Europea.

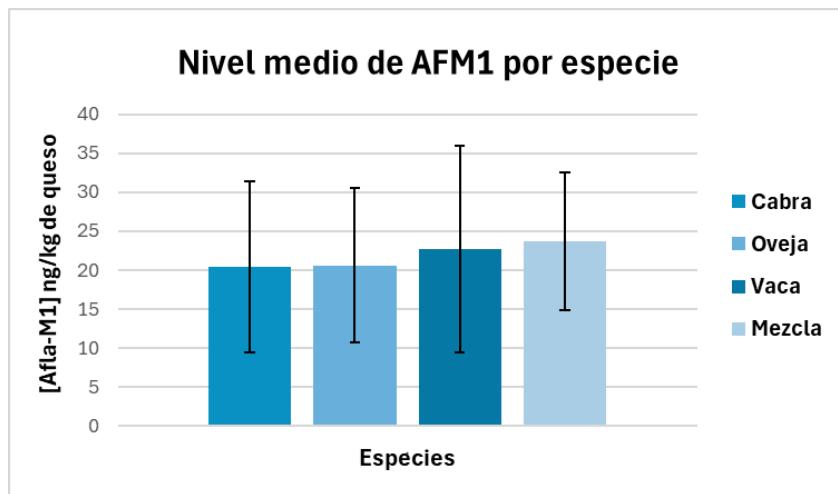
En relación a la influencia de la maduración en los niveles de AFM1 en diferentes tipos de queso, algunos autores indican que los niveles de AFM1, se mantienen estables durante la maduración y almacenamiento (Chavarría et al., 2017; Elsayed y El-Fatah, 2015). Sin embargo, otros estudios han evidenciado que la concentración de AFM1 en el queso puede aumentar, debido a la eliminación de agua, procesos como la proteólisis y lipólisis que liberan AFM1 de las proteínas (Pecorelli et al., 2019). Por lo contrario, otros trabajos apuntan a una disminución de AFM1 a lo largo de la maduración, asociada a factores como la degradación de la AFM1, los cambios de pH, su difusión hacia la salmuera o su absorción por bacterias ácido lácticas (Pecorelli et al., 2019; Khaneghah et al., 2021). La mayor concentración de AFM1 en muestras de queso fresco con respecto a los madurados, fue asociado con la mayor disponibilidad de proteínas necesarias para que la aflatoxina se una a los componentes de la leche según Khaneghah et al., (2021).

En relación al tipo de leche empleada en la elaboración de los quesos, la figura 9 muestra el porcentaje de muestras en las que se detectó AFM1 según la especie de procedencia. La leche de vaca presentó un porcentaje elevado de detección del 58,3% (n=7), seguido de la leche de oveja con un 30,76% (n=4) y de la leche de cabra con un valor del 30,76% (n=4). En cambio, la leche de mezcla tuvo el porcentaje más alto siendo un 100%, pero este valor se basa en un número muy reducido de muestras analizadas (n=2).



*Figura 9. Proporción de muestras detectadas por tipo de leche.*

También se representaron los valores medios de concentración de AFM1 para cada tipo de leche (figura 10). El nivel más bajo corresponde a la leche de cabra (20,42 ng/kg), seguido de la leche de oveja (20,63 ng/kg) y la leche de vaca (22,71 ng/kg). El valor más alto pertenece a la leche de mezcla (23,74 ng/kg). Las diferencias entre los grupos fueron mínimas y no se puede atribuir una mayor o menor contaminación a un tipo de leche.



*Figura 10. Valores medios de AFM1 en función de la especie.*

Al comparar los datos obtenidos en este estudio con los de otros autores que investigaron la presencia de AFM1 en quesos se observa que la prevalencia fue similar a la reportada en otros trabajos. Un estudio realizado en el sur de España por Barrios et al., (1996) analizaron 35 muestras de quesos comerciales con distinto grado de maduración elaborados con diferentes tipos de leche. La prevalencia de las muestras de queso madurado fue del 35,29% con un valor medio de 105,33 ng/kg. En otro estudio, se analizaron muestras de quesos procedentes de Cataluña y no se detectó AFM1 (Cano-Sancho et al., 2010). Aunque los datos disponibles en España son escasos, en el presente

trabajo se puede observar una frecuencia de detección parecida a la del estudio de Barrios et al., (1996), pero con un valor medio mucho más bajo.

En el estudio de Khaneghah et al., (2021) se analizó la prevalencia en quesos artesanales e industriales a nivel mundial para ver la prevalencia y la concentración de AFM1 en función del grado de maduración. Los quesos frescos presentaron mayor prevalencia del 53% y con un nivel medio de concentración de 33,71 ng/kg, en cambio, los quesos madurados tuvieron una prevalencia del 47% y con una concentración de AFM1 del 30,12 ng/kg. En cuanto a los valores de los quesos madurados, fueron muy similares a los resultados del presente trabajo.

Otro estudio, analizó la presencia de AFM1 en quesos italianos producidos tanto a escala industrial como artesanal, el porcentaje de muestras positivas fue del 83% con un nivel de contaminación entre el 50-150 ng/kg de queso, superando el límite máximo establecido por la UE de 50 ng/kg de leche. Se observó que los quesos industriales presentaban una menor contaminación que los artesanales. Esta diferencia podría atribuirse a varios factores, como la aplicación de controles más rigurosos y el uso de mezclas de leches procedentes de distintas fuentes, lo que disminuye el riesgo de una mayor contaminación (Anfossi et al., 2012). En la misma línea, otros autores como Khaneghah et al., (2021) y Cherkani-Hassani, Mojemmi y Mouane, (2016) también observaron que los quesos industriales mostraban niveles más bajos de AFM1 que los quesos artesanales. El procesamiento tecnológico moderno y el monitoreo constante a gran escala en regiones desarrolladas se consideran otro factor relacionado con la reducción de la concentración de AFM1 en muestras de queso (Cherkani-Hassani, Mojemmi y Mouane, 2016).

No obstante, al comparar estos datos con estudios realizados en otras regiones, se observan prevalencias incluso más bajas En un meta-análisis de Arghavan et al., (2025) se evaluó la presencia de AFM1 en muestras de productos lácteos de países seleccionados de Oriente Medio. Concretamente, se estudió para quesos frescos, artesanales, feta, procesado y queso cheddar que, en su conjunto alcanzaron una tasa del 63,6%. La clasificación de los tipos de queso según la prevalencia de AFM1 se puede resumir de la siguiente manera: fresco > artesanales > feta > procesado > cheddar. Asimismo, se observó una diferencia en función del grado de maduración, siendo de 86,7% en los quesos artesanales y de 32,3% en los quesos procesados industrialmente. Las muestras del presente trabajo, aunque procedían de queserías de pequeña producción, tienen una prevalencia similar a las muestras de producción industrial del meta-análisis de Arghavan et al., (2025).

De forma similar, en Brasil, Silva et al., (2023) analizaron muestras de quesos mozzarella y colaho, tanto artesanales como industriales. Los resultados, mostraron que todos los quesos contenían

AFM1, aunque ninguna superó el límite legal establecido en Brasil de 2500 ng/kg en queso, país de origen de las muestras. Los quesos de mozzarella artesanales presentaron niveles de AFM1 más altos que los quesos coalho industriales, pero el estudio considera que se tendría que evaluar los quesos a lo largo de las estaciones, ya que la estacionalidad puede tener un impacto en la concentración de AFM1. En el meta-análisis de Arghavan et al., (2025) se clasificaron las estaciones del año por orden de prevalencia de AFM1 en productos lácteos del Medio Oriente: primavera > invierno > otoño > verano. Estos resultados indican que consumir quesos artesanales en estas regiones representan un riesgo potencial para la salud pública. Por ello, se hace evidente la necesidad de establecer medidas de evaluación y procedimientos estrictos del control de calidad. En el caso de Brasil, por ejemplo, es uno de los principales productores de queso a nivel mundial y reconocido por su amplia variedad de quesos artesanales (Silva et al., 2023).

Por otro lado, es importante considerar otros factores determinantes en la contaminación por AFM1. En un estudio realizado por Montagna et al., (2008), se evaluó la presencia de AFM1 en 265 muestras de queso de diferentes especies y grados de maduración. Si nos centramos en los quesos de maduración prolongada (3-12 meses), se detectó AFM1 en 15 de las 88 muestras. La mayor prevalencia se observó en los quesos de vaca, con un 32,3%, seguidos de los quesos de oveja con un 12,9%, mientras que en los quesos de cabra no se detectó AFM1. En cuanto a las concentraciones medias, los valores fueron de 73 ng/kg para el queso de vaca, 111,3 ng/kg para oveja y 0 ng/kg en el queso de cabra. En el presente trabajo, se observa una tendencia similar, los quesos de vaca presentan la mayor tasa de detección, seguidos de los quesos de oveja y cabra, pero los niveles de concentración de AFM1 fueron inferiores a los de Montagna et al., (2008).

Un estudio más reciente, determinó el orden de concentración de AFM1 en quesos italianos. Los niveles más altos de contaminación se observaron en quesos elaborados con leche de vaca en comparación con los de leche de cabra, oveja o mezcla de cabra y oveja; cabra y vaca; y oveja y vaca. (Anfossi et al., 2012).

La principal razón de las variaciones de concentración de AFM1 entre especies radica en las diferencias en la tasa de transferencia. Tal y como señalan Khaneghah et al., (2021) este índice de transferencia está influenciado por varios factores como la especie animal lactante, la raza, el estado de salud, el perfil inmunológico, el linaje, edad, tipo de alimentación, la fase de lactancia, momento de ordeño, permeabilidad de las glándulas mamarias, la capacidad enzimática de desintoxicación de AFM1 y el volumen de producción de leche. Otros autores como Anfossi et al., (2012) Hussain et al., (2010) y Montagna et al., (2008) también afirman que las diferencias entre especies se deben a las diferencias entre aparatos digestivos, a los mecanismos de asimilación de AFB1 y a las diferencias en

la alimentación, ya que los forrajes destinados al ganado vacuno presentan una mayor probabilidad de estar contaminados con AFB1 que los utilizados para alimentar a ovejas y cabras.

## **7. CONCLUSIONES**

Primera: Los resultados de análisis de las 40 muestras de queso procedentes de queserías artesanales de Aragón y Cataluña, mostraron una prevalencia de detección de AFM1 de 42,5% (n= 23 muestras positivas). La concentración media de AFM1 en las muestras positivas fue de 21,80 ng/kg inferior a la media de contaminación por AFM1 en muestras de queso publicadas en otras investigaciones.

Segunda: Ninguna muestra analizada de queso superó el límite máximo establecido por la legislación del Reglamento (UE) nº 2023/915 de la Comisión Europea de 25 de abril de 2023 para la leche (0,05 µg/kg), aunque una de ellas presentó un valor cercano de 47,13 ng/kg de queso.

Tercera: Los resultados mostraron que los quesos de vaca presentaron una mayor prevalencia (58,3%) y una concentración media de AFM1 (22,71 ng/kg), seguida de los quesos de oveja y cabra. Esta tendencia coincide con los estudios previos y puede explicarse por las diferentes tasas de transferencia de AFB1 a AFM1 entre especies.

Cuarta: En comparación con otras investigaciones, las concentraciones de AFM1 de este estudio fueron inferiores. No obstante, los valores encontrados confirman la necesidad de llevar a cabo controles exhaustivos para evaluar el riesgo de exposición a esta micotoxina. Asimismo, sería necesario realizar más estudios que permitieran conocer con mayor exactitud el comportamiento de la AFM1 en el proceso de elaboración de productos lácteos, lo que también ayudaría al establecimiento de límites máximos específicos para estos productos.

## **8. CONCLUSIONS**

First: The results of analysis of the 40 cheese samples from artisanal cheese dairies in Aragon and Catalonia showed a prevalence of AFM1 detection of 42.5% (n= 23 positive samples). The mean AFM1 concentration in the positive samples was 21.80 ng/kg lower than the mean AFM1 contamination in cheese samples published in other investigations.

Second: No analyzed cheese sample exceeded the maximum limit established by the legislation of the European Commission Regulation (EU) No. 2023/915 of 25 April 2023 for milk (0.05 µg/kg), although one of them presented a close value of 47.13 ng/kg cheese.

Third: The results showed that cow cheeses presented a higher prevalence (58.3%) and mean AFM1 concentration (22.71 ng/kg), followed by sheep and goat cheeses. This trend is consistent with previous studies and may be explained by different AFB1 to AFM1 transfer rates between species.

Fourth: Compared to other investigations, AFM1 concentrations in this study were lower. Nevertheless, the values found confirm the need to carry out exhaustive controls to evaluate the risk of exposure to this mycotoxin. It would also be necessary to carry out further studies that would provide a more accurate understanding of the behavior of AFM1 in the dairy processing process, which would also help in the establishment of specific maximum limits for these products.

## **9. VALORACIÓN PERSONAL**

Este trabajo de fin de grado me ha permitido profundizar en un área de gran relevancia dentro de la Seguridad Alimentaria. Aunque, es un tema que a lo largo de la carrera no se ha profundizado tanto y el hecho de poder trabajar en el laboratorio de aflatoxinas aumentó más mi interés y me permitió desarrollarme tanto a nivel profesional, como futura tecnóloga de los alimentos, como a nivel personal.

La realización de la parte experimental me ayudó a mejorar mis habilidades, gestionar de forma eficiente los materiales y tener una mayor autonomía en el laboratorio. Por otro lado, la parte de bibliografía científica, me ha proporcionado información para tener una base, poder interpretar mis resultados y comprender mejor el mundo de las aflatoxinas. En general, este trabajo me ha servido para poder examinar, comprender y asimilar muchos conceptos introducidos a lo largo de mis años como estudiante, desde mi punto de vista, ha cumplido todas mis expectativas antes de la realización de dicho proyecto, especialmente en lo que respecta a mi objetivo principal: aprender.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

ASEAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2024). *Micotoxinas*. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm) [Consultado: 10-02-25]

ASEAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2023). “Aflatoxinas”. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Ficha\\_Aflatoxinas.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Ficha_Aflatoxinas.pdf) [Consultado: 10-02-25]

ASEAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2021). "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los efectos del cambio climático sobre la presencia de micotoxinas en los alimentos". Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/MICOTOXINAS\\_CAMBIO\\_CLIMATICO.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/MICOTOXINAS_CAMBIO_CLIMATICO.pdf) [Consultado: 05-05-25]

Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G., Passini, C., Giraudi, G. (2010). "Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese". *Elsevier*, 25 (1), pp. 125-130. DOI: [10.1016/j.foodcont.2011.10.027](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.027)

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (2017). Resolución RDC nº 138, del 8 de febrero de 2017: modifica la resolución de la junta colegiada - RDC nº 7, del 18 de febrero de 2011.

Arghavan, B., Kordkatuli, K., Mardani, H., Jafari, A. (2025). "A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis on the Prevalence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Selected Middle East Countries". *Veterinary Medicine and Science*, 11(1). DOI: [10.1002/vms3.70204](https://doi.org/10.1002/vms3.70204)

Barrios, M., Gualda, M., Cabañas, J.M., Medina, L.M., Jordano, R. (1996). "Occurrence of Aflatoxin M1 in Cheeses from the South of Spain". *Elsevier*, 59 (8), pp. 898-900. DOI: [10.4315/0362-028X-59.8.898](https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.8.898)

Battacone, G., Nudda, U., Rassu, S., Decandia, M., Pulina, G. (2012). "Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1". *Elsevier*, 95(5), pp. 2656-2661. DOI: [10.3168/jds.2011-5003](https://doi.org/10.3168/jds.2011-5003)

Bervis, N., Lorán, S., Juan, T., Carramiñana, J.J., Herrera, A., Ariño, A., Herrera, M. (2021). "Field Monitoring of Aflatoxins in Feed and Milk of High-Yielding Dairy Cows under Two Feeding Systems". *MDPI*, 13(3), pp. 201. DOI: [10.3390/toxins13030201](https://doi.org/10.3390/toxins13030201)

Bodas, R., Giráldez, F.J., Olmedo, S., Herrera, M., Ariño, A., López, S., Benito, A., Juan, T. (2025). "The Effects of Aflatoxin B1 Intake in Assaf Dairy Ewes on Aflatoxin M1 Excretion, Milk Yield, Haematology and Biochemical Profile". *MDPI*, 13(3), pp. 436. DOI: [10.3390/ani13030436](https://doi.org/10.3390/ani13030436)

Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Peris, J., Sanchis, V. (2010). "Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain)". *Science Direct*, 27(3), pp. 130-135. DOI: [10.1016/j.riam.2010.05.003](https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.05.003)

Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong, E., Cortés, M., Rodríguez, C., Granados, F. (2017). "Distribution, stability, and protein interactions of Aflatoxin M1 in fresh cheese". *Elsevier*, 73, pp. 581-586. DOI: [10.1016/j.foodcont.2016.09.005](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.005)

Cherkani-Hassani, A., Mojemmi B., y Mouane, N. (2016). "Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: A systematic literature review, 1984–2015". *Elsevier*, 50, pp. 56-69. DOI: [10.1016/j.tifs.2016.01.024](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.024)

Codex alimentarius (2016). "Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas". Disponible en: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXC%2B51-2003%252FCXC\\_051s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXC%2B51-2003%252FCXC_051s.pdf) [Consultado: 29-05-25]

Costamagna, D., Gaggiotti, M., Chiericatti, C., Costabel, L., Audero, G., Taverna, M., Signorini, M. (2019). "Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese". *Elsevier*, 6, pp. 782-787. DOI: [10.1016/j.toxrep.2019.07.004](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.07.004)

Dhakal, A., Hashmi, M., Sbar, E. (2023). "Aflatoxin Toxicity". *National Library of Medicine*. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.translate.goog/books/NBK557781/?x\\_tr\\_sl=en&x\\_tr\\_tl=es&x\\_tr\\_hl=es&x\\_tr\\_pto=sge#:~:text=Acute%20intoxication%20with%20a%20high,is%20associated%20with%20chronic%20toxicity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.translate.goog/books/NBK557781/?x_tr_sl=en&x_tr_tl=es&x_tr_hl=es&x_tr_pto=sge#:~:text=Acute%20intoxication%20with%20a%20high,is%20associated%20with%20chronic%20toxicity) [Consultado: 29-05-25]

DSM-Firmenich (2024). "The global threat January - December 2024". Disponible en: <https://www.dsm-firmenich.com/anh/news/downloads/whitepapers-and-reports/dsm-firmenich-world-mycotoxin-survey-january-to-december-2024.html> [Consultado: 8-06-25]

EFSA. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2020). "Risk assessment of aflatoxins in food". *EFSA Journal*, 18(3). DOI: [10.2903/j.efsa.2020.6040](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040)

ELIKA. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (2023). Aflatoxinas. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/aflatoxinas/> [Consultado: 29-05-25]

Elsayed, M.S. y El-Fatah, E.N. (2015). "Prevalencia de aflatoxina M1 en algunos productos lácteos de amplio consumo infantil, comercializados en Sharkia, Egipto". *Global Vet*, 14 (4), pp.560-566. DOI: [10.5829/idosi.gv.2015.14.04.9445](https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2015.14.04.9445)

Gonçalves, B. L., Muaz, K., Sengling Cebin Coppa, C. F., Rosim, R. E., Setsuko Kamimura, E., Fernandes Oliviera, C. A., Corassin, C. H. (2020) "Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid

bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese". *Food Research International*, 136, pp. 109-604. DOI: [10.1016/j.foodres.2020.109604](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109604)

Guillén, C. (2021). Puesta a punto y validación de una metodología para la determinación de aflatoxina M1 en queso de oveja. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. [Consultado: 29-05-25]

Heidari, E., Ghasemina, A., Nematollahi, A. (2025). "Reduction of aflatoxin M1 in dairy products using probiotics: A comprehensive review". *Elsevier*, 171, pp. 102-111. DOI: [10.1016/j.foodcont.2024.111102](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.111102)

Hussain, I., Anwar, J., Rafiq, M., Ali, M., Kashif, M. (2010). "Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan". *Elsevier*, 21 (2), pp. 122-124. DOI: [10.1016/j.foodcont.2008.12.004](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.004)

IARC. International Agency for Research on Cancer (2012). *Exposición humana a las aflatoxinas y fumonisinas*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponible en: [https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/4306/5dac1c15201a5c1575ebf40e64e0784cdfcf622b.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/4306/5dac1c15201a5c1575ebf40e64e0784cdfcf622b.pdf) [Consultado: 29-05-25]

Iha, M.H., Barbosa, C.B., Duarte Favaro, R.M., Trucksess, M. (2011) "Chromatographic Method for the Determination of Aflatoxin M1 in Cheese, Yogurt, and Dairy Beverages". *Journal of AOAC International*, 94(5), pp 1513-1518. DOI: [10.1093/jaoac/94.5.1513](https://doi.org/10.1093/jaoac/94.5.1513)

Iqbal, S., Jinap, S., Pirouz, A., Ahmad, A. (2015). "Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review". *Elsevier*, 46(1), pp. 110-119. DOI: [10.1016/j.tifs.2015.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005)

Jahromi, A.S., Jokar, M., Abdous, A., Rabiee, M.H., Biglo, F.H., Rahamanian, V. (2025) "Prevalence and concentration of aflatoxin M1 in milk and dairy products: an umbrella review of meta-analyses". *International Health*. DOI: [10.1093/inthealth/ihaf002](https://doi.org/10.1093/inthealth/ihaf002)

Khaneghah, A., Moosavi, M., Omar, S., Oliveira, C., Dehkordi, M., Fakhri, Y., Huseyn, E., Nematollahi, A., Farahani, M., Santana, A. (2021). "The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression". *Elsevier*, 125, pp. 107-960. DOI: [10.1016/j.foodcont.2021.107960](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107960)

Lopéz, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L., Pérez, J. (2001). "Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated". *Elsevier*, 64 (1-2), pp. 211-215. DOI: [10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X)

MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2015). "Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas".

Disponible en:  
[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015\\_completorev\\_nipo\\_tcm30-57870.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015_completorev_nipo_tcm30-57870.pdf) [Consultado: 05-05-25]

MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018). “Procedimiento de actuación de la red de alerta rápida de alimentos y piensos antes la presencia de micotoxinas (aflatoxinas B1) en piensos (materias primas para alimentación animal y piensos compuestos) - autoridades competentes y operadores”. Disponible en:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/2018pdoccnaa1\\_2018procedimientoactuacionaflatoxinab1aprobadocncaa2018-11-27\\_tcm30-499524.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/2018pdoccnaa1_2018procedimientoactuacionaflatoxinab1aprobadocncaa2018-11-27_tcm30-499524.pdf) [Consultado: 15-05-25]

Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Constantini, S., Severino, L. (2018). “Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development”. *MDPI*, 10(6). DOI: [10.3390/toxins10060214](https://doi.org/10.3390/toxins10060214)

Montagna, M., Nápoles, C., Giglio, O., Barbuti, R. (2008). “Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy”. *MDPI*, 9(12), pp. 2614-2621. DOI: [10.3390/ijms9122614](https://doi.org/10.3390/ijms9122614)

OMS. Organización Mundial de la Salud (2023). *Micotoxinas*. Disponible en:  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins> [Consultado: 10-02-25]

Pecorelli, I., Branciari, R., Roila, R., Ranucci, D., Onofri, A., Valiani, A. (2019). “Evaluation of Aflatoxin M1 Enrichment Factor in Semihard Cow's Milk Cheese and Correlation with Cheese Yield”. *Elsevier*, 82 (7), pp. 1176-1182. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-19-023](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-023)

Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, P., Laporta, M., Piva, D. (2009). “On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products”. *Elsevier*, 47(5), pp. 984-991. DOI: [10.1016/j.fct.2007.10.005](https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005)

Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1881/2006, Diario Oficial de la Unión Europea, L 119, de 5 de mayo de 2023.

Scaglioni, P.T., Becker-Algeri, T., Borracho, D., Badiale-Furlong, E. (2014). “Aflatoxin B1 and M1 in milk”. *Elsevier*, 829, pp. 68-74. DOI: [10.1016/j.aca.2014.04.036](https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036)

Silva, I., Gomes da cruz, A., Ali, S., Dionisio, L., Macedo, L., Rosim, R., Humberto, C., Barbosa, R., Fernandes, C. (2023). “Incidence and Levels of Aflatoxin M1 in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil”. *National Library of Medicine*, 15(3), pp. 182. DOI: [10.3390/toxins15030182](https://doi.org/10.3390/toxins15030182)

Simranjot, K., Jasbir, S.B., Pankaj, D., Deepthi, V., Aulakh de Rabinder, S. (2021). "Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin M1 through consumption of market milk and milk products in Ludhiana, Punjab". *Elsevier*, 126. pp. 107-991. DOI: [10.1016/j.foodcont.2021.107991](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107991)

Sipos, P., Peleas, F., Brassó, D., Beri, B., Pusztahelyi, T., Posci, I., Gyori, Z. (2021). "Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food". *MDPI*, 13(3), pp. 204. DOI: [10.3390/toxins13030204](https://doi.org/10.3390/toxins13030204)

Stella, R., Bovo, D., Noviello, S., Contieron, L., Barverio, A., Angeletti, R., Biancotto, G. (2023). "Fate of aflatoxin M1 from milk to typical Italian cheeses: Validation of an HPLC method based on aqueous buffer extraction and immune-affinity clean up with limited use of organic solvents". *Elsevier*, 157, pp. 110-149. DOI: [10.1016/j.foodcont.2023.110149](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110149)

Vaz, A., Cabral Silva, A.C., Rodrigues, P., Venancio, A. (2020). "Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products". *MDPI*, 8(2), pp. 246. DOI: [10.3390/microorganisms8020246](https://doi.org/10.3390/microorganisms8020246)

Vaz, A., Mendonca, A., Rodrigues, P., Venancio, A. (2022). "Distribution of aflatoxin M1 during production of sheep and goat cheeses". *Journal of food processing and preservation*, 46(11). DOI: [10.1111/jfpp.17093](https://doi.org/10.1111/jfpp.17093)