



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Evaluación de la contaminación por aflatoxina M1 en productos lácteos.

Assessment of aflatoxin M1 contamination in dairy products.

Autor/es

Víctor Lafuente Aso

Director/es

Teresa Juan Esteban
Susana Lorán Ayala

Facultad de Veterinaria

2024

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Gobierno de Aragón (grupo A06_20R: Análisis Y Evaluación De La Seguridad Alimentaria).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Micotoxinas	3
1.2. Aflatoxinas	4
1.3. Aflatoxina M1	6
1.4. AFM1 en Queso.....	7
1.5. Prevención y control de aflatoxinas	10
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. Toma de muestras.....	14
3.2. Preparación de la muestra	14
3.3. Extracción.....	14
3.4. Purificación.....	15
3.5. Determinación cromatográfica de AFM1 (UPLC-FLD)	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5. CONCLUSIONES	24
CONCLUSIONS	25
6. VALORACIÓN PERSONAL	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27
8. ANEXOS	30

RESUMEN

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas generadas por hongos del género *Aspergillus*, que en determinadas condiciones de temperatura y humedad pueden proliferar, contaminando piensos y alimentos para consumo humano. Entre las más importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria se encuentran las aflatoxinas B1 y B2 (producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*), las aflatoxinas G1 y G2 (producidas por *A. parasiticus*) así como las aflatoxinas M1 y M2, productos del metabolismo de las aflatoxinas B1 y B2 respectivamente, que son excretados en la leche de los rumiantes tras la ingesta de piensos contaminados.

Debido a su termorresistencia y estabilidad, la aflatoxina M1 también se encuentra en los productos lácteos elaborados con leche contaminada por esta toxina. Asimismo, algunos estudios han evidenciado, en el caso del queso, un aumento de la concentración en función de la variedad, las tecnologías utilizadas en su procesado y la cantidad de agua eliminada durante el mismo. Es por ello que, para evaluar el riesgo de exposición a AFM1, es necesario igualmente conocer la contaminación de los productos lácteos por esta micotoxina. En este trabajo se ha planteado como objetivo general evaluar la contaminación por AF M1 en muestras comerciales de quesos con diferentes características.

Las muestras se han analizado siguiendo un método previamente validado en nuestro laboratorio, basado en el acondicionamiento de las muestras, seguido de una etapa de extracción de la aflatoxina M1 con disolventes orgánicos y posterior purificación del extracto utilizando columnas de inmunoafinidad (Vicam, IAC afluM1™M). Por último, se ha llevado a cabo una determinación del contenido de aflatoxina M1 mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), acoplada a un detector de fluorescencia (FLD).

Se analizaron un total de 61 muestras, de las cuales, se detectó presencia de aflatoxina M1 en 33 de ellas, lo que supone un 54,10% del total de muestras. Estas muestras contenían una concentración de entre 8,05 y 470,70 ng/kg de queso de toxina, lo que confirma la necesidad de la realización de controles para evaluar la presencia de AFM1 en productos lácteos.

ABSTRACT

Aflatoxins are a group of mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*, which can proliferate under certain temperature and humidity conditions, contaminating feed and food for human consumption. Among the most important from a food safety perspective are aflatoxins B1 and B2 (produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*), aflatoxins G1 and G2 (produced by *A. parasiticus*), as well as aflatoxins M1 and M2, which are metabolic products of aflatoxins B1 and B2 respectively, excreted in the milk of ruminants after ingesting contaminated feed. Due to its heat resistance and stability, aflatoxin M1 is also found in dairy products made from milk contaminated with this toxin. Moreover, some studies have shown that in the case of cheese, the concentration increases depending on the variety, the technologies used in processing, and the amount of water removed during processing. Therefore, to assess the risk of exposure to AFM1, it is also necessary to know the contamination of dairy products by this mycotoxin. The general objective of this work was to evaluate the contamination of AFM1 in commercial cheese samples with different characteristics.

The samples were analyzed following a method previously validated in our laboratory, based on the conditioning of the samples, followed by an extraction stage of aflatoxin M1 with organic solvents and subsequent purification of the extract using immunoaffinity columns (Vicam, IAC afaM1™M). Finally, the determination of the aflatoxin M1 content was carried out by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC), coupled to a fluorescence detector (FLD).

A total of 61 samples were analyzed, of which aflatoxin M1 was detected in 33, representing 54.10% of the total samples. These samples contained a concentration of between 8.05 and 470.70 ng/kg of cheese toxin, confirming the need for controls to assess the presence of AFM1 in dairy products.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos tóxicos producidos de forma natural por el metabolismo secundario de algunos tipos de mohos perteneciente fundamentalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos mohos pueden crecer en numerosos alimentos, tales como cereales, frutas desecadas, frutos secos, semillas oleaginosas y especias, especialmente en entornos cálidos y húmedos. Su crecimiento puede tener lugar tanto antes como después de la cosecha, durante las etapas del almacenamiento y el procesado (OMS, 2023).

De entre las más de trescientas micotoxinas descritas, debido a su frecuencia de aparición y a sus efectos adversos sobre la salud humana y animal, se destacan las siguientes:

Aflatoxinas: metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por especies de *Aspergillus*, como *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estas micotoxinas son conocidas por su potente actividad carcinogénica y han sido asociadas con el desarrollo de hepatocarcinoma en humanos y animales.

Ocratoxina: La ocratoxina A es producida por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* y puede contaminar una variedad de alimentos, incluyendo granos, uvas y productos cárnicos. El efecto más sensible y notable es el daño renal, pero la toxina también puede tener efectos en el desarrollo fetal y el sistema inmunitario.

Zearalenona: producida principalmente por especies de *Fusarium* y puede contaminar granos, especialmente maíz. Esta micotoxina tiene propiedades estrogénicas y puede causar trastornos reproductivos en animales.

Deoxinivalenol (DON): producida por diferentes especies de *Fusarium*, y puede encontrarse en cereales como trigo, cebada y avena. Esta micotoxina puede tener efectos inmunosupresores y gastrointestinales en animales y humanos.

Las micotoxinas pueden encontrarse en diversos productos agrícolas y alimentos, influenciadas por factores como la humedad, temperatura, pH, composición de la matriz del alimento y presencia de esporas de moho. Debido a su estabilidad y resistencia a procesos industriales como el secado y la molienda, no es posible asegurar su ausencia en los alimentos, aunque se puede incidir en la prevención y el control con el fin de mantenerlas por debajo de los límites máximos que marca la legislación. Las micotoxinas no se eliminan con el procesado o cocinado de los alimentos, por lo que es esencial mantener una gestión estricta en toda la cadena de producción y almacenamiento de alimentos (AESAN, 2024).

1.2. Aflatoxinas

Las Aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios bioactivos que pertenecen a la clase de los policétidos producidos principalmente por ciertas cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus*. En la imagen 1 se puede observar la estructura química de algunas de las AF más conocidas, que son las AFB₁, AFB₂ (del grupo B), AFG₁, AFG₂ (del grupo G), AFM₁ y AFM₂ (metabolitos de las AFB₁ y AFB₂ respectivamente) (Martí Solé, Alonso Espadale y Constans Aubert, 1994).

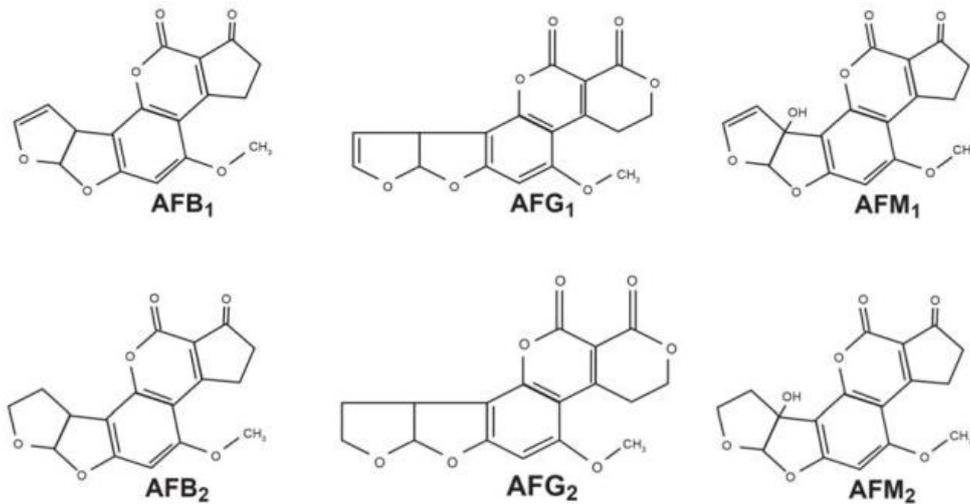


Imagen 1: Estructura química de aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1 y aflatoxina G2.

Fuente: Carvajal, 2013.

La denominación de B y G viene dada por la capacidad de emitir fluorescencia bajo la luz UV: B, color azul (Blue) y G, color verde (Green) (Cano-Sancho et al., 2010).

Por otro lado, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁ en el Grupo 1 como carcinogénicas para los humanos (IARC, 2012).

Las principales especies productoras de aflatoxinas, *A. flavus* y *A. parasiticus*, crecen a temperaturas que oscilan entre 10-12 °C y 42-43 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 32-33 °C, y de síntesis de aflatoxinas entre 12 y 40 °C (ICMSF, 1996). La actividad de agua (Aw) óptima para su crecimiento es de 0,99, siendo su límite más bajo registrado de 0,80-0,83.

Aunque ambas especies crecen en un amplio rango de pH de entre 2 y 10, la producción de aflatoxinas para *A. parasiticus* oscila entre pH 3 y 8, con un pH óptimo cercano a 6. En el caso de

A. flavus, se encuentra en un pH entre 2 y 11, con un pH óptimo alrededor de 7,5 (Pitt y Miscamble, 1995).

Uno de los productos agrícolas más susceptibles a la contaminación con aflatoxinas son los cereales como maíz, trigo y cebada. Según los datos mundiales recogidos por la empresa de alimentación animal Biomin, en 2018 detectó que un 67% las muestras de productos destinados a la alimentación animal contenían al menos una micotoxina, dato que disminuye al 47% en las muestras donde se encontraron como mínimo dos micotoxinas. El maíz en grano era el cereal con mayores concentraciones de AF, con un 18% de muestras positivas. En el caso de otros cereales destinados a consumo animal (trigo, cebada, avena, arroz, sorgo y mijo) este porcentaje disminuye a un 11%. (Biomin World Mycotoxin Survey, 2014 y 2018).

En productos destinados a la alimentación animal (materias primas y piensos) se han establecido límites máximos de aflatoxina B1 en piensos compuestos para vacas lecheras es de 5 µg/kg (Directiva 2002/32/CE).

A consecuencia de la ingesta de piensos contaminados por AFB1 y AFB2, como consecuencia se puede encontrar AFM1 y AFM2 en la leche excretada de animales, como vacas, ovejas y cabras (Santos Pereira et al., 2019).

La tasa de transferencia de aflatoxinas desde el pienso (AFB1) a la leche (AFM1), depende del nivel de contaminación, la cantidad ingerida, la duración de la exposición, el tipo de alimentación y el metabolismo, entre otros factores. La EFSA ha estimado que la tasa de transferencia de aflatoxinas de las raciones del ganado bovino a la leche es del 1-2% como media, aunque en ganado de alta productividad puede aumentar hasta el 6% o más (EFSA, 2004). Sin embargo, en ganado ovino, Bodas et al (2023) observaron valores de 0,23% en raza Assaf, mientras que Battacone et al (2012) describieron valores de 0,17% en ovejas de raza sarda.

Las aflatoxinas actúan en las personas igual que en los animales, ligándose al ADN, ARN y proteínas, alterando sus síntesis. Cuando se ingieren en grandes cantidades producen vómitos, diarrea, hemorragias, abortos y muerte. Cuando son ingeridas en bajas concentraciones por tiempo prolongado ocasionan inmunosupresión, mutagénesis, teratogénesis y diferentes carcinomas siendo el hepático el más común (Carvajal, 2013).

1.3. Aflatoxina M1

La aflatoxina M1 (AFM1) es el principal metabolito hidroxilado generado en el hígado después de la exposición a AFB1. Investigaciones desarrolladas por Kuilman et al. (2000) descubrieron que AFM1 era el metabolito más destacado formado dentro de las primeras 2 a 8 h de incubación de AFB1 en hepatocitos bovinos.

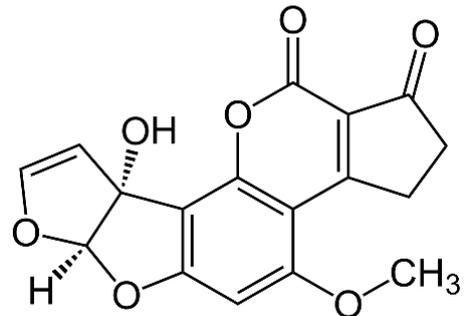


Imagen 2: Estructura química de Aflatoxina M1.

Fuente: Arimboor, 2023.

En el caso de la leche de oveja, un estudio mostró que la AFM1 aparece en la leche pasadas 12 horas de la ingestión de AFB1, y que una vez cesa el aporte de AFB1, la concentración de AFM1 desciende rápidamente, dejando de detectarse pasados 2-3 días (Battacone et al, 2012). En cambio, en un estudio realizado en ovejas de raza assaf (Bodas et al., 2023) se detectó un descenso de hasta el 90% de los niveles de AFM1 en la leche en las primeras 24 horas desde el cese de la ingesta de AFB1.

Debido a los casos observados de aflatoxicosis, la AFM1 en la leche adquiere un papel importante dentro de las causas más probables de su desarrollo (Govati et al., 2015). Además, puede inducir mutaciones genéticas, daños en el ADN, anomalías cromosómicas y transformación celular en células de mamíferos in vitro (Prandini et al., 2009).

La exposición a AFM1 también se puede producir por el consumo de productos lácteos ya que, debido a la estabilidad de esta micotoxina, se puede seguir detectando en los productos elaborados a partir de leche que ya la contenía, pero siendo susceptible a posibles cambios en su concentración.

1.4. AFM1 en Queso

Según el Real Decreto 1113/2006 el queso se define como: “producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.”

Como se puede observar en la Imagen 3, las etapas básicas en la elaboración del queso son las siguientes (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en 2024):

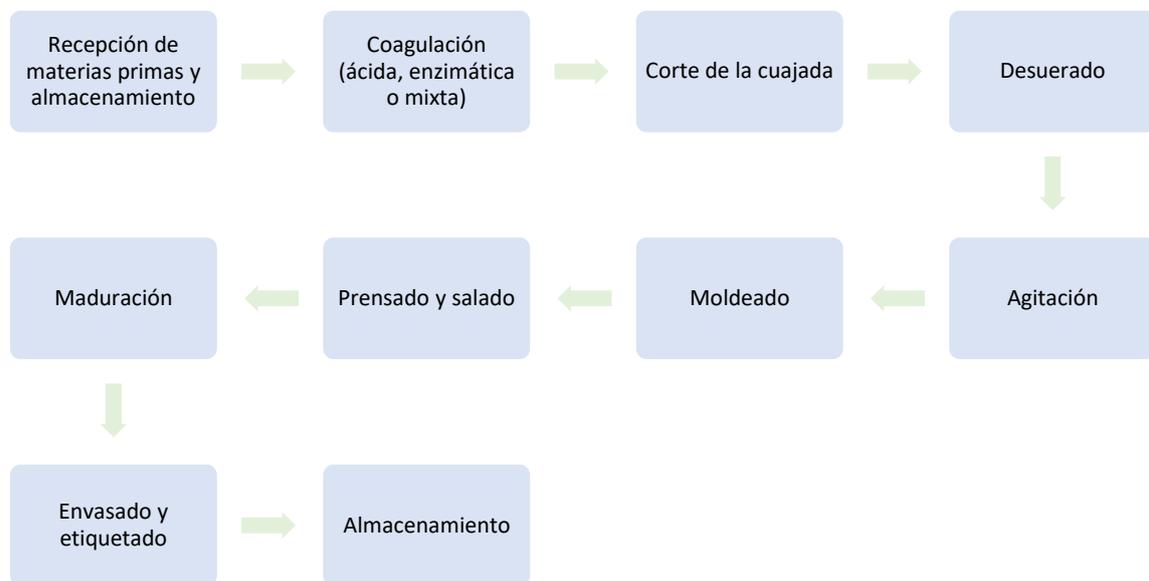


Imagen 3: Etapas básicas de elaboración del queso.

Además, se pueden llevar a cabo una serie de etapas complementarias a este proceso, como son el tratamiento térmico o el aumento de la temperatura en el desuerado, el lavado del grano de cuajada o el prensado.

Para su clasificación, se pueden establecer varios criterios de diferenciación según origen de la leche, mezcla de leches utilizadas para su elaboración, tiempo de maduración...

Uno de los criterios de clasificación, es el que se establece según sea su maduración y que está descrito en el Real decreto 1113/2006:

- **Queso fresco:** es el que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación.

- **Queso blanco pasteurizado:** es aquel queso fresco en el que el coágulo obtenido se somete a un proceso de pasteurización, quedando dispuesto para el consumo al finalizar su proceso de fabricación.
- **Queso madurado (tierno, semicurado, curado, viejo y añejo):** es el que, tras el proceso de fabricación, requiere mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en condiciones tales que se produzcan los cambios físicos y químicos característicos del mismo. Tiempo mínimo de maduración para cada tipo de queso:
 - Tierno: 7 días
 - Semicurado: 20 días (peso ≤ 1.5 kg)- 35 días (>1.5 kg)
 - Curado: 45 días (peso ≤ 1.5 kg)- 105 días (>1.5 kg)
 - Viejo: 100 días (peso ≤ 1.5 kg)- 180 días (>1.5 kg)
 - Añejo: 270 días
- **Queso madurado con mohos:** es aquel en el que la maduración se produce, principalmente, como consecuencia del desarrollo característico de mohos en su interior, en la superficie o en ambas partes. Dicha denominación podrá sustituirse por la de «queso azul» o «queso de pasta azul», cuando corresponda.

Por otro lado, la clasificación también se puede establecer según el contenido de agua en el queso desnatado (Códex Alimentarius, 1978; Decisión de la Comisión 97/80/CE), o MFFB, de sus siglas en inglés “*Moisture content of fat-free basis*”. Este dato se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$CAQD(\%) = \left(\frac{\text{Peso del contenido en agua del queso}}{\text{Peso total del queso} - \text{materia grasa en el queso}} \right) \times 100$$

Dicha clasificación de los quesos en función de su porcentaje de agua en el queso desnatado (CAQD) se muestra en las tablas 1 y 2:

CAQD (%)	Denominación según firmeza	CAQD (%)	Denominación según grado de maduración
< 47	Extradura	< 47	Maduro
[47-55)	Dura	[47-55)	Madurado con moho
[55-62)	Semidura	[55-62)	No maduro/Fresco
[62-67)	Semiblanda	[62-67)	
>67	Blanda	>67	En salmuera

Fuente: Decisión de la Comisión 97/80/CE.

A la hora de hablar del nivel de contaminación del queso por AFM1, este va a depender de multitud de factores, entre los que se encuentran: el grado de contaminación y calidad de la leche empleada, el tipo de queso, las estrategias tecnológicas empleadas durante el proceso de fabricación, cantidad de suero eliminado durante el procesado, temperatura de cuajado, tamaño del grano tras el corte de la cuajada, tiempo de prensado de la cuajada y, también, de la metodología empleada para la cuantificación (Campagnollo et al, 2016).

Piva et al. (1988) analizaron muestras provenientes de Francia, Alemania e Inglaterra y obtuvieron un 19,50%, 26,50% y 53,50% de muestras positivas, respectivamente; detectando hasta 250 ng/kg de queso en dos de las muestras. En el caso de Montagna et al. (2018), de 265 muestras analizadas, se detectó AFM1 en un 16,6% de ellas: el 31,3% de muestras de queso de oveja y cabra, el 27,2% de muestras de queso de vaca y el 12,8% de muestras de queso de oveja.

Durante la elaboración del queso, la AFM1 presente en la leche puede sufrir cambios por dilución o concentración debido al proceso productivo, maduración u otros factores. Para poder estimar la concentración final de esta toxina en el producto final, diversos autores han estudiado los distintos factores de concentración aplicables a cada tipo de queso en función de sus características. Se establecieron factores para los quesos elaborados a partir de leche de vaca que iban desde 3 para quesos de pasta blanda, 4 para pasta semiblanda, 5 en el caso de pasta semidura y 6 para los quesos de pasta extradura. En el caso de los quesos elaborados con leche que no provenga de ganado bovino, se establecieron dos factores de enriquecimiento, 3 para los quesos de pasta blanda y 5,5 para los quesos de pasta dura (Ministerio de Salud Italiano, 2019; Stella et al., 2023).

No solo se encontraron distintos factores de concentración según la firmeza, sino que, en el caso del estudio realizado por Pecorelli et al. (2019), estudiaron la evolución de la concentración a lo largo de la maduración del queso. Este estudio determinó este factor como la relación entre la concentración de toxina en queso en relación con la concentración en leche, el cual se evaluó en las muestras a los 7, 15, 39 y 45 días de maduración. Se determinó que, en un queso con 7 días de maduración, el factor de concentración era de 4,70 ($\pm 0,30$), a los 15 días permanecía en 4,66 ($\pm 0,41$), a los 30 días ascendía hasta 5,12 ($\pm 0,41$) y a los 45 días era de 5,16 ($\pm 0,37$).

1.5. Prevención y control de aflatoxinas

Dentro de las medidas que pueden ayudar a controlar y reducir la exposición a las AF en alimentos, algunas de ellas se centran en desarrollar buenas prácticas agrícolas, como el control de plagas y enfermedades en los cultivos, el uso de semillas de alta calidad que permitan una mayor resistencia a infecciones y la adecuada gestión y almacenamiento de la cosecha.

El control de plagas debe realizarse implementando medidas para controlarlas, evitando que dañen los cultivos y favorezcan el crecimiento de hongos productores de aflatoxina. Se están estudiando técnicas posibles a implementar como es el uso de cepas de *A. flavus* no aflatoxigénico que compita con los productores de AF evitando su desarrollo y su posterior producción de aflatoxinas (Ojiambo et al., 2018; Jallow et al., 2021; Ouadhene et al., 2024).

Un punto importante dentro de la prevención de AF es la correcta gestión en etapas posteriores a la cosecha, basadas en el control de la humedad, almacenando los cereales y piensos en condiciones adecuadas, es decir, secos, evitando tanto la humedad excesiva como la luz solar directa, ya que los hongos productores de aflatoxina tienden a crecer en condiciones de alta humedad. Además, de la detección de AF en los cereales, piensos y alimentos, y la posterior eliminación de aquellos que contengan niveles elevados de estas toxinas.

En caso de detectar la presencia de estas toxinas, se ha estudiado la posibilidad de añadir absorbentes de micotoxinas a los piensos de alimentación animal, como aditivo dentro de la formulación del alimento (Blandon Martínez, 2011). Aunque una variante a esta medida que también está en estudio es la degradación de las AF a través de una descontaminación por bacterias y hongos que las metabolicen (Arimboor, 2023).

En un estudio elaborado por Jallow et al. (2021), destacan la importancia de, además de implementar medidas sobre los cultivos, usar modelos predictivos de aparición de AF con el fin de poder actuar de forma más eficaz. Tampoco olvida la importancia que tiene la concienciación que se debe crear en los distintos eslabones implicados en la elaboración y distribución de alimentos contaminados con la toxina, desde los agricultores, distribuidores, superficies de venta y todos los implicados.

A la hora de hablar del marco legal que recoge la regulación de los límites máximos establecidos para las AF en leche y productos lácteos, se encuentra que existe regulación para la leche y los alimentos infantiles y dietéticos para usos médicos especiales para lactantes. En el caso de leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos se ha establecido un límite máximo de 0,050 µg/kg, en el caso de preparados para lactantes,

preparados de continuación y preparados para niños de corta edad, este límite disminuye hasta un límite máximo de 0,025 µg/kg (Anexo I del Reglamento (UE) nº 2023/915).

La legislación europea no concreta ningún valor máximo para los límites máximos de AFM1 en productos lácteos, pero existen países donde se ha establecido un límite máximo para el queso. En el caso de Italia, se propuso una concentración máxima de 250 ng/kg de queso en queso fresco y 450 ng/kg de queso para quesos curados. En cambio, en Austria y Suiza se establece en 250 ng/kg de queso para todos los tipos de queso y en Países Bajos disminuye a 20 ng/kg de queso. (Vaz et al., 2020).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La presencia de aflatoxinas supone un reto para la salud pública debido a los efectos adversos que producen y a su elevada presencia en distintos alimentos. Es por eso que existe una necesidad de conocer los niveles de exposición de la población a estos contaminantes, al igual que establecer medidas de prevención y control eficaces para mitigar este problema.

Entre los alimentos que contribuyen a la exposición a aflatoxinas, están los productos lácteos en los que se puede llegar a cuantificar AFM1 como consecuencia del procesado de leche ya contaminada por la toxina. Esta contaminación puede variar además en función del producto elaborado y las etapas y procesos por lo que es un tema muy amplio ya que existen muchos productos lácteos distintos.

El presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo una evaluación de la contaminación por AFM1 en muestras comerciales de quesos de distintos tipos con el fin de aportar datos que puedan contribuir a evaluar la presencia de AFM1 en productos lácteos comerciales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó la contaminación de diferentes tipos de queso que se encontraban a disposición del consumidor en distintos supermercados de Aragón. Las muestras de queso se analizaron mediante un procedimiento de análisis que consta de 5 etapas principales: toma de muestra, de preparación de la muestra, extracción mediante disolventes orgánicos, purificación del extracto y, por último, la determinación final mediante cromatografía UPLC-FLD (ver imagen 4).

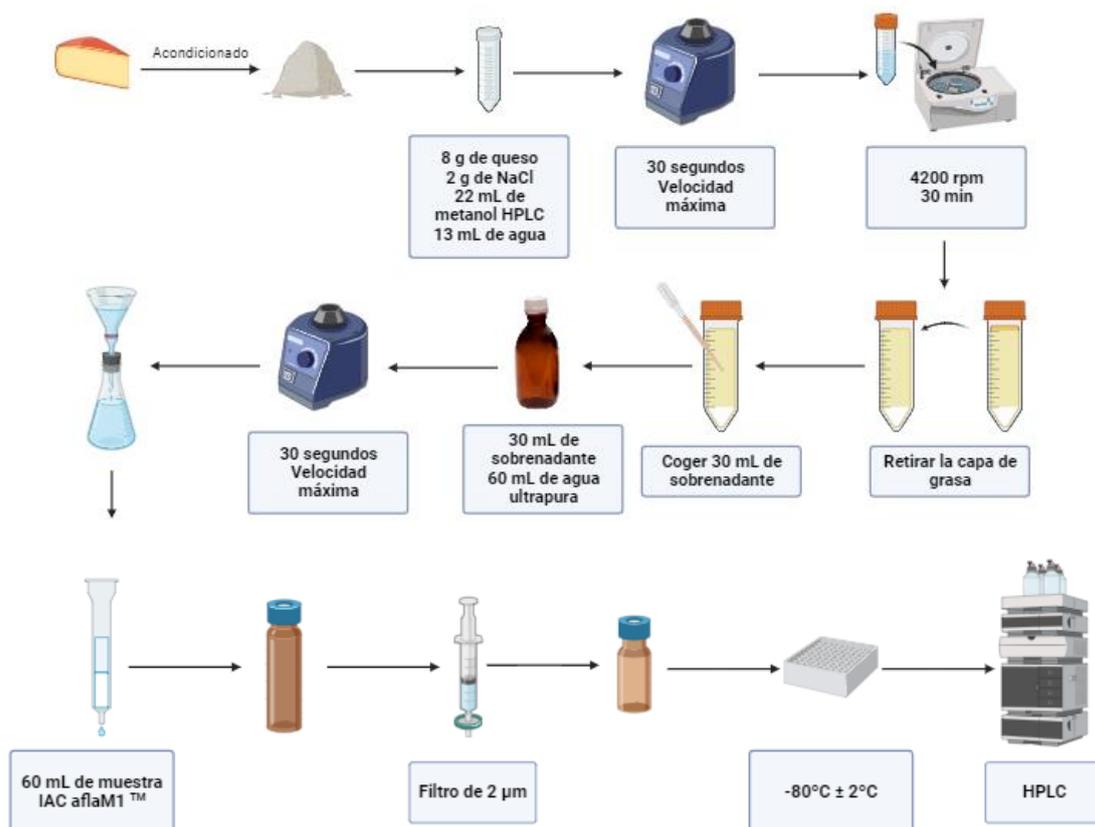


Imagen 4: Etapas para el análisis de AFM1 en muestras de queso.

Para realizar este ensayo se utilizó una metodología de análisis previamente optimizada y validada en el laboratorio (Guillén, 2021), cumpliendo con los criterios de linealidad, exactitud y sensibilidad establecidos en la legislación (Reglamento de ejecución (UE) 2023/2782).

3.1. Toma de muestras

Se adquirieron 61 muestras de queso en diferentes establecimientos comerciales de la comunidad autónoma de Aragón, de los cuales 33 procedían de queso fresco, 4 de queso semicurado y 24 de queso curado. La mayoría de los quesos analizados se comercializaban en cuñas o porciones de entre 150 a 350 gramos, en menor medida, se analizaron quesos enteros de pequeño tamaño, de entre 400 y 550 gramos de peso. Solo 4 muestras procedían de quesos denominados “para untar”.

Todas las muestras se codificaron y registraron en una tabla junto a la información detallada sobre el tipo de muestra (untable/grado de curación), tipo de leche (especie), si estaban elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada, sus ingredientes, la marca o productor, el origen geográfico, el lote, el comercio donde se adquirió y un último apartado para detallar información relevante que no se haya registrado en los apartados anteriores como pueden ser características de la corteza o condiciones de conservación. Para más información acerca de las muestras ver Anexo I.

3.2. Preparación de la muestra

Las muestras procedentes de queso semicurado y curado se rallaron con un rallador manual con el menor diámetro posible (\varnothing 2mm). En las muestras procedentes de quesos de untar se homogenizaron con una cuchara en el propio envase y posteriormente se cogió la muestra para ser usada en el análisis. Las muestras preparadas y codificadas se conservaron en botes tipo duquesa con tapa en congelación a -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta el momento del análisis.

3.3. Extracción

Para la extracción, en un recipiente tipo Falcon de 50 mL (Deltalab, Rubí, España), se combinaron 8 g de muestra, 2 g de NaCl (Chem-lab, Zedelgem, Bélgica), 22 mL de metanol HPLC (Chem-lab) y 13 mL de agua ultrapura. La mezcla se homogeneizó en un vortex (Heidolph, Reax Top, Schwabach, Alemania) durante 30 segundos y luego se trasladó a un agitador orbital (Heidolph, MultiReax), agitándose a velocidad máxima durante 30 minutos.

Posteriormente, la muestra se centrifugó (Heraeus, Megafuge 1.0 R, Hanau, Alemania) a 4200 rpm durante 30 minutos y, una vez terminado el programa, se procedió a retirar la capa grasa con una cucharilla de café desechable. Se recogieron 30 mL del sobrenadante en una probeta de vidrio de 50 mL, junto a 60 mL de agua ultrapura se mezcló en un frasco topacio con el fin de 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 matraz Erlenmeyer protegido de la luz para su posterior purificación.

3.4. Purificación

Para llevar a cabo la purificación, primero se debía montar el sistema de filtración (Vicam, Mildford, EEUU) mediante la conexión de las jeringas de 60 mL y las bombas de vacío. Posteriormente, se acondicionó la columna de inmunoafinidad (Vicam, IAC afaM1™) insuflando aire con una jeringuilla hasta que la solución tampón de la columna alcanzase la altura del relleno.



Imagen 5: Sistema de filtración de AFM1.

Luego, se acopló la columna a la jeringa de 60 mL equipada con una llave de paso/regulador de flujo (Stopcock) y se vertieron 60 ml del extracto medidos con probeta. Se tapó la jeringa con el tapón de silicona (Silicon stopper) y se abrió la llave de paso/regulador de flujo. Acto seguido, se puso en marcha la bomba a baja intensidad, se abrió la válvula de paso, y se pasó el extracto a través de la columna a un flujo de 1-2 gotas/segundo.

Posteriormente, se llenó el espacio de cabeza con 20 mL de agua MilliQ, se tapó la jeringa y se procedió a lavar la columna con los 20 mL de agua MilliQ a un flujo de 1-2 gotas/segundo.

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 jeringa (Análisis vénicos, 2 cuerpos BD 2 mL, Ciudad Real, España), se quitó la aguja (Análisis vénicos, Microlance 1,2*40 mm, 18G), se colocó un filtro de 0,2 μm (Agilent, Econofilter PTFE 13 mm, California, EEUU) y se transfirieron a un vial de 2 ml con tapa precortada (con septo) (Agilent), repitiendo este proceso para recoger el resto de la muestra y almacenándola en un vial silanizado de 2 mL con tapa.

Las muestras purificadas, debidamente etiquetadas, se conservaron a -80°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de su análisis cromatográfico.

3.5. Determinación cromatográfica de AFM1 (UPLC-FLD)

La determinación de AFM1 mediante cromatografía se realizó en un equipo Acquity UPLC Waters equipado con un inyector automático, un detector de absorbancia (Waters, PDA eλ Detector, Mildford, EEUU) y un detector de fluorescencia (Waters, 2475 Multiλ Fluorescence Detector).

Se preparó la fase móvil constituida por una mezcla de agua milli-Q, acetonitrilo y metanol (calidad HPLC, Chem-lab) en proporción de 68:24:8. Luego, se acidificó la mezcla a un pH de 2 utilizando ácido fosfórico al 85% (Analar Normapur), empleando un pHmetro (Crison micropH 2002) para ajustar el pH.

Además, para hacer las rectas de calibración, se prepararon soluciones patrón, a partir de una solución de patrón comercial de AFM1 (Sigma-Aldrich Aflatoxin M1 solution) con una concentración de 523 ng/mL. Para ello, en primer lugar, se elaboró una disolución intermedia, en fase móvil, de concentración 100 ng/mL. A partir de esta disolución intermedia se elaboraron las soluciones patrón de calibración a concentraciones de 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 y 5,0 ng/mL.

Cada día, previo a las determinaciones, se inyectaron las soluciones en el sistema cromatográfico para elaborar la recta de calibrado correspondiente. Tanto las soluciones patrón como las disoluciones intermedias se guardaron en congelación a -80°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) en viales ámbar para evitar su degradación.

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 mantenida de 35°C durante la realización del ensayo. Se hizo circular la fase móvil a un flujo contante de 0,2 mL/min en condiciones isocráticas.

Se utilizó un detector de fluorescencia durante el análisis, con $\lambda_{\text{excitación}} = 360 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 440 \text{ nm}$, en el cual se inyectaron 15 μL de cada muestra, manteniendo la temperatura del automuestreador a 5°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Las muestras en las que se detectó AFM1 en concentraciones por encima del límite de detección se analizaron por duplicado.

Asimismo, inicialmente y a largo 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 durante el análisis y muestras control para evaluar la recuperación. Las muestras control se elaboraron enriqueciendo muestras blanco patrón hasta obtener una concentración final de 50 ng/kg y 250 ng/kg.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se va a exponer los resultados obtenidos una vez realizado el análisis previamente descrito en el apartado anterior.

Las condiciones de análisis establecidas permitieron determinar la AFM1 con un límite de detección de 8,0 ng/kg.

En relación con las muestras control, se verificó que los porcentajes de recuperación se encontraban entre el 80% y el 100%, lo cual es un resultado válido según el Reglamento de ejecución (UE) 2023/2782 Asimismo, en el análisis de las muestras en blanco no se detectó la existencia de interferencias que pudieran afectar a los resultados.

En la imagen 6 se puede observar un cromatograma del blanco de fase móvil, patrón de AFM1, muestra comercial contaminada con AFM1 y muestra comercial sin contaminar con AFM1 (<LD).

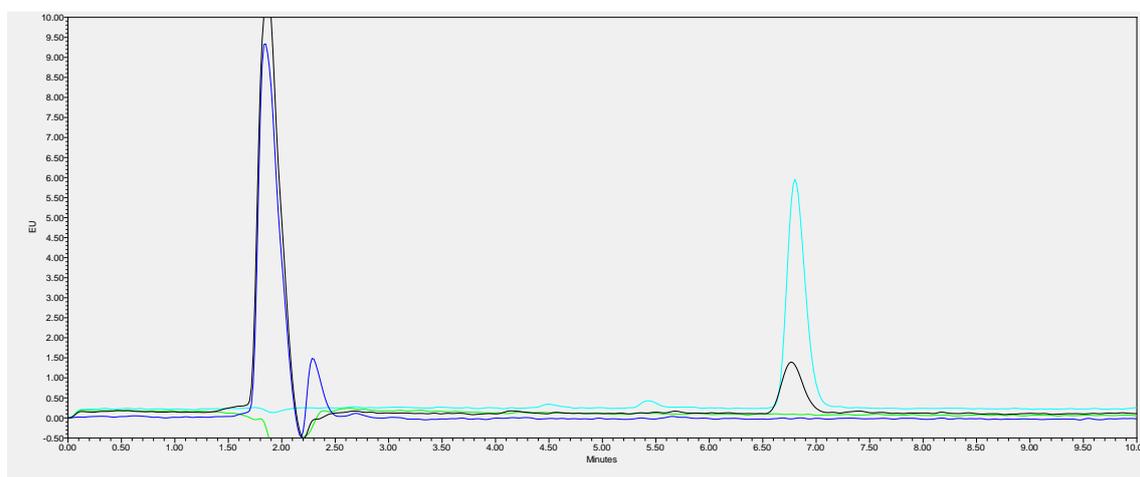


Imagen 6: Cromatograma. ● Queso comercial, ● Queso comercial blanco, ● Blanco fase móvil, ● patrón AFM1.

Mientras que la imagen 7 muestra como ejemplo la recta de calibrado de aflatoxina M1 que se obtiene a la hora de representar el valor del área del pico cromatográfico respecto a su concentración correspondiente, de esta forma se pudo realizar un ajuste mediante el método de mínimos cuadrados, mostrando valores de correlación lineal (R^2) superior a 0,99 en todos los casos.

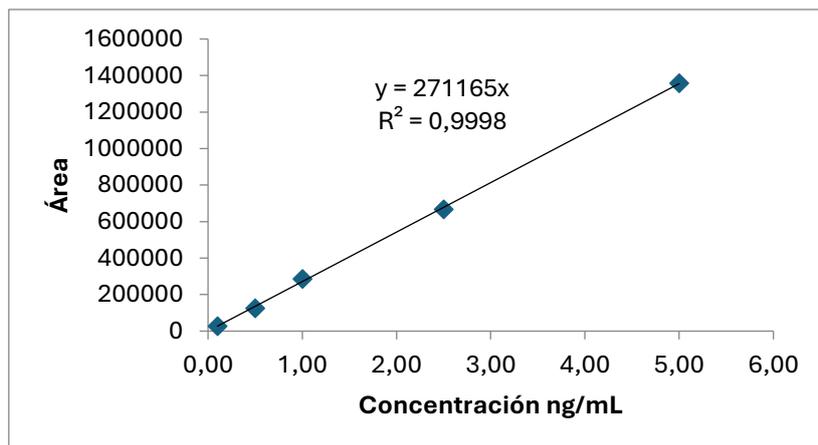


Imagen 7: Recta de calibrado para AFM1.

En la tabla 3 se muestran los resultados de AFM1 obtenidos de las muestras de queso analizadas en el ensayo:

Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)	Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)	Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)	Muestras	[Afla-M1] (ng/kg)
M 1	232,50	M 17	< LD	M 33	33,80	M 49	< LD
M 2	47,95	M 18	< LD	M 34	30,49	M 50	20,70
M 3	224,68	M 19	< LD	M 35	< LD	M 51	< LD
M 4	< LD	M 20	8,55	M 36	14,30	M 52	57,12
M 5	< LD	M 21	34,75	M 37	10,56	M 53	68,20
M 6	< LD	M 22	14,18	M 38	9,43	M 54	14,23
M 7	< LD	M 23	13,95	M 39	26,72	M 55	< LD
M 8	< LD	M 24	18,69	M 40	8,05	M 56	32,92
M 9	< LD	M 25	12,71	M 41	37,31	M 57	21,20
M 10	< LD	M 26	24,72	M 42	8,39	M 58	23,63
M 11	< LD	M 27	470,70	M 43	< LD	M 59	< LD
M 12	< LD	M 28	< LD	M 44	29,23	M 60	< LD
M 13	< LD	M 29	< LD	M 45	13,10	M 61	< LD
M 14	< LD	M 30	20,47	M 46	< LD		
M 15	< LD	M 31	102,74	M 47	23,21		
M 16	< LD	M 32	72,22	M 48	< LD		

* < LD: muestra cuyo resultado estaba por debajo del límite de detección (8,0 ng/kg).

Del total de muestras de queso que se analizaron se observó que en 28 de ellas (45,90%) la concentración de AF M1 se encontraba por debajo del límite de detección y 33 (54,10%) se encontraban por encima de este, en concentraciones de entre 8,05 y 470,70 ng/kg de queso.

Para poder analizar los resultados obtenidos se trabajó con el límite máximo establecido para la leche y sus derivados recogido en la normativa, que es de 50 ng/kg y, además, con el límite común a la normativa de distintos países europeos de 250 ng/kg de queso. Solo una muestra se encontraba en este caso, y tenía una concentración de AFM1 de 470,70 ng/kg. Se trataba de una muestra de queso fresco elaborada a partir de leche de vaca proveniente de Aragón.

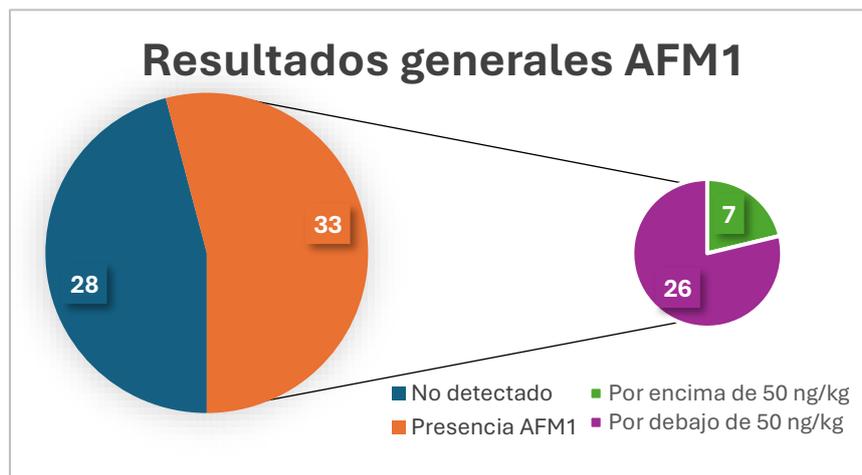


Imagen 8: Incidencia de AFM1 en muestras de queso.

Si tomamos como referencia el límite máximo establecido en la legislación para AFM1 en muestras de leche, 7 de ellas presentaron una concentración por encima de este límite, lo cual corresponde con el 11,48% del total de muestras analizadas, mientras que las 26 muestras positivas, pero que no sobrepasaban este límite, correspondían con el 42,62% de las muestras totales. Estas 7 muestras correspondían con muestras de queso fresco, 1 elaborada con leche de oveja y las 6 restantes con leche de vaca.

Para las 7 muestras que sobrepasaron el límite considerado, teniendo en cuenta el tipo de leche, queso elaborado y los factores de concentración para AFM1 descritos en la bibliografía, se estimó que el nivel de contaminación de la leche de partida era de entre 19 y 77,5 ng/kg de leche. En el caso de la muestra con mayor concentración de AFM1, 470,70 ng/kg, los cálculos realizados nos llevaron a hacer una estimación de una contaminación de la leche de partida en torno a 156,9 ng/kg de leche, lo cual excede de forma notable el límite establecido en la normativa. En el caso de las otras 6 muestras restantes, la concentración estimada de AFM1 que podría contener la leche con la que se elaboraron fue de entre 19,0 y 77,5 ng/kg de leche.

Tabla 4: Presencia de AFM1 en muestras de queso según maduración:

Tipo de queso	Número de muestras (n)			Concentración (ng/kg)	
	Analizadas	No detectado	Detectado	Nivel medio	Rango
Fresco	33	13	20 (60,60%)	37,12	8,55 – 470,70
Semicurado	4	1	3 (75%)	23,56	20,70 – 26,72
Curado	24	14	10 (41,66%)	17,50	8,05 – 37,31

Si tenemos en cuenta la contaminación por AFM1 de los quesos según su maduración (Tabla 4), se observa que los valores más altos, con un valor medio de 37,12 ng/kg de queso (rango, 8,55 a 470,70 ng/kg), corresponden con las muestras de queso fresco. A continuación, se encontraban los quesos semicurados con un valor medio de concentración de 23,56 ng/kg de queso (rango, 20,70 a 26,72 ng/kg), mientras que los quesos curados presentaban los niveles más bajos de entre los analizados, con una media de 17,50 ng/kg de queso (rango, 8,05 a 37,31 ng/kg).

En un estudio realizado por Pecorelli et al. (2019), se estudió la concentración de AFM1 que contenía el queso en función de los días de maduración, alcanzando el fin del estudio a los 45 días de maduración. Este estudio sí detectó un aumento proporcional de la concentración con respecto a los días de maduración, pero también determinó que, del tipo de queso, dependía el aumento de la concentración de la toxina.

Cabe remarcar que en otros estudios la relación entre la concentración de la toxina y el tiempo de madurado es inversamente proporcional. Este es el caso de Chavarría et al. (2017), cuyo estudio sobre la distribución y presencia de AFM1 en queso fresco y en suero descubrió que, durante la elaboración de queso fresco, hasta un 70% de la toxina se liberan a través del suero. Además, se registró una reducción significativa de la concentración durante la maduración del producto, mostrando una relación inversamente proporcional con los recuentos de bacterias ácido-lácticas y una relación directa con el proceso de desuerado que sucede durante la maduración o almacenamiento del queso fresco.

En el caso del estudio desarrollado por Barrios et al. (1996), se detectó AFM1 en 16 de 35 muestras analizadas (45,71%) mediante determinación cromatográfica (HPLC), con concentraciones entre 20 y 200 ng/kg de queso lo cual no difiere en gran medida de los resultados obtenidos en este trabajo. Por otro lado, registró concentraciones medias de AFM1 de 42,60 ng/kg para queso fresco, 73,80 ng/kg para semicurado y 105,23 para curado. En este caso, los datos son distintos a los registrados ya que se observa una tendencia a aumentar la concentración en función del grado de maduración mientras que en este trabajo es al revés, registrando valores medios de 37,12 ng/kg, 23,56 ng/kg y 17,50 ng/kg de queso en función de si se trata de queso fresco, semicurado o curado, respectivamente.

En cambio, Cano-Sancho et al. (2010), detallaron que en su estudio no se detectó presencia de AFM1 en quesos en 72 muestras que analizaron.

Al comparar los resultados con los obtenidos por distintos autores con respecto al contenido de agua de las muestras, se vio que existen numerosos estudios que sugieren que la concentración de AFM1 es proporcional a esta clasificación, como es el caso de Stella et al. (2023), los cuales

estudiaron cómo aumentaba el factor de concentración cuanto menor era el porcentaje de humedad. Lo mismo ocurrió en el informe emitido por el Ministerio Italiano de Salud (2019), el cual determinó que el factor de concentración podía ir desde 3 hasta 6 veces mayor en función del contenido de agua en queso desnatado, lo cual difiere de los resultados obtenidos en este estudio, ya que no se ha observado esta tendencia en las muestras estudiadas.

Dentro del grupo de muestras que excedían el límite máximo establecido en 50 ng/kg de queso, todas ellas procedían de quesos frescos y, aunque se podría aproximar la fecha de elaboración a los meses entre febrero y abril, el determinar si cambios en el clima podrían haber sido supuestamente un factor importante en la producción de AFM1 es difícil (Juan Esteban, Herrera Sánchez y Bodas Rodríguez, 2022). Las condiciones óptimas para la formación de AF son las encontradas en zonas con climas cálidos y húmedos. Por otro lado, Blanco et al. (1988) y El Marnissi et al. (2012) indicaron que las muestras de leche recogidas en otoño eran las que mayor concentración de AFM1 presentaban.

Teniendo en cuenta la leche con la que se elaboraron los quesos se observó que, las muestras elaboradas con leche de vaca que contenían AFM1 correspondían con un 69,23% de las muestras elaboradas con esta leche, con concentraciones entre 8,54 y 470,70 ng/kg de queso, y en el caso de la leche de oveja esta cifra disminuyó hasta el 41,67%, en un rango de concentraciones de 8,05 y 57,12 ng/kg de queso. Los elaborados con leche de cabra tuvieron un 50,00% de muestras positivas, con valores de entre 12,71 y 24,72 ng/kg de queso y, en el caso del queso elaborado con mezcla de leche, de oveja, cabra y vaca, solo un queso fue analizado, detectando AFM1 en una concentración de 34,75 ng/kg de queso.

En el estudio realizado por Montagna et al. (2008), se detectaron concentraciones ligeramente más elevadas que las registradas en este estudio, excepto en las muestras elaboradas con leche de vaca. Se registraron concentraciones de AFM1 en leche de vaca de entre 90 y 250 ng/kg de queso, en leche de oveja de entre 50 y 215 ng/kg de queso. En el caso de la leche de cabra, los datos siguieron siendo más elevados, registrando entre 90 y 250 ng/kg de queso. Por último, analizaron muestras elaboradas con mezcla de leche de oveja y de cabra en las que se detectaron concentraciones entre 55 y 140 ng/kg de queso. Como se puede observar, las concentraciones son más elevadas, excepto en las muestras provenientes de leche de vaca en las que este trabajo detectó hasta una concentración máxima de 470,70 ng/kg de queso.

El grado de contaminación depende, en parte, de la tasa de transferencia asociado a la especie y la raza del animal. En el gano vacuno esta se establece en un 1-2% a excepción del ganado de alta productividad que se eleva hasta el 6% (EFSA, 2006). En el caso del gano ovino es de un

0,17% para las ovejas de raza sarda (Battacone et al., 2012) y un 0,23% para las ovejas de raza assaf (Bodas et al., 2023). En el caso de las muestras analizadas se puede observar que las muestras con mayor res concentraciones de AFM1 son las procedentes de quesos elaborados a partir de leche de vaca, a excepción de una muestra que procedía de leche de oveja.

Ahora bien, a la hora de hablar del grano utilizado para el pienso, el estudio realizado por Moral Valderrama (2017) indicó que la mayor contaminación de AFB1 se localiza en el invierno, cuando los piensos están almacenados y se mantienen en condiciones húmedas, por tanto, se favorece el crecimiento de hongos.

Todo ello basándose en que no se conoce el tipo de cereal utilizado para los piensos, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, o incluso cómo ha afectado en la producción de leche contaminada por la toxina.

Para finalizar, se puede observar que existe presencia de AFM1 en quesos que se encuentran a disposición de la población y a concentraciones muy diferentes, esto debería motivar a seguir investigando y conociendo la realidad sobre el nivel de contaminación que tiene este tipo de producto.

5. CONCLUSIONES

Primera

La incidencia de aflatoxina M1 en las muestras de queso analizadas en este estudio fue elevada, habiéndose detectado en 33 de las 61 muestras de queso analizadas. El elevado porcentaje de muestras (54,1%) con concentraciones por encima del límite de detección, es similar a los resultados obtenidos por otros autores para este alimento, si bien la variabilidad de datos en la bibliografía a este respecto es elevada.

Segunda

La concentración media de AFM1 en las muestras positivas fue de 37,12 ng/kg de queso (rango, 8,55 a 470,70 ng/kg), lo que también se asemeja a algunos resultados recogidos en la bibliografía. Si bien la legislación no establece límites máximos de AFM1 específicos para productos lácteos, destaca que 7 de las muestras analizadas (11,48%) presentaron concentraciones por encima del límite máximo establecido por la legislación para leche (50 ng/kg) y una de ellas superó el límite máximo de 250 ng/kg establecido en algunos países para muestras de queso.

Tercera

La incidencia de muestras positivas fue mayor en muestras de queso elaboradas con leche de vaca con respecto a las fabricadas con leche de oveja o cabra. Al contrario de lo esperado, los niveles medios de contaminación en muestras de queso fresco fueron más elevados que en las muestras de quesos con mayor nivel de curación. No obstante, sería necesario incluir un mayor número de muestras en el estudio para confirmar si se trata de un hecho casual o si refleja una tendencia.

Cuarta

La presencia de AFM1 en las muestras de queso analizadas confirma la necesidad de la realización de controles para evaluar el riesgo de exposición a esta micotoxina. Asimismo, sería necesario realizar más estudios que permitieran conocer con mayor exactitud el factor de concentración de la AFM1 en los productos lácteos, lo que ayudaría al establecimiento de límites máximos específicos para estos productos.

CONCLUSIONS

First

The incidence of aflatoxin M1 in the cheese samples analyzed in this study was high, having been detected in 33 out of the 61 cheese samples analyzed. The high percentage of samples (54.1%) with concentrations above the detection limit is similar to the results obtained by other authors for this food product, although the variability of data in the literature on this subject is significant.

Second

The average concentration of AFM1 in the positive samples was 37.12 ng/kg of cheese (range, 8.55 to 470.70 ng/kg), which also resembles some results reported in the literature. Although legislation does not establish specific maximum limits for AFM1 in dairy products, it is notable that 7 of the analyzed samples (11.48%) had concentrations above the maximum limit established by legislation for milk (50 ng/kg) and one of them exceeded the maximum limit of 250 ng/kg established in some countries for cheese samples.

Third

The incidence of positive samples was higher in cheese samples made from cow's milk compared to those made from sheep's or goat's milk. Contrary to expectations, the average contamination levels in fresh cheese samples were higher than in samples of cheeses with a higher degree of maturation. However, it would be necessary to include a larger number of samples in the study to confirm whether this is a casual occurrence or if it reflects a trend.

Fourth

The presence of AFM1 in the analyzed cheese samples confirms the need for controls to assess the risk of exposure to this mycotoxin. Additionally, more studies are needed to determine more accurately the concentration factor of AFM1 in dairy products, which would help in establishing specific maximum limits for these products.

6. VALORACIÓN PERSONAL

Este Trabajo de Fin de Grado ha contribuido a que pudiese crecer como persona y, también muy importante, como estudiante. A través de las técnicas que he podido desarrollar en la parte experimental del proyecto, he conseguido afianzar mi técnica, sentirme más seguro de las aptitudes que ya tenía y aprender más sobre la vida dentro de un laboratorio.

Por otro lado, gracias al tema escogido y trabajado, he podido ser más consciente de la necesidad de avanzar y apostar por la investigación científica con el fin de un bien mayor y comunitario, con el fin de unificar esfuerzos para proteger más a la población y para comprender cómo afectan las decisiones y acciones que desarrollamos en nuestro día a día, ya sea desde la vida de un agricultor hasta la de un técnico de control de calidad, por ejemplo.

Aun existiendo diferentes normativas que regulan la presencia y el control de las aflatoxinas, se debería seguir trabajando por unificar los esfuerzos para poder reducir su presencia en los alimentos y su futuro impacto en la población, ese debería ser un punto clave en la investigación de este tipo de toxinas.

Tampoco debo olvidar que, gracias a la extensa bibliografía que existe sobre este tema, he podido aprender a diferenciar y escoger la información más relevante con la que poder trabajar. La gestión de toda esta información es un proceso que, aunque al principio me pareciera tedioso, he conseguido gestionar, e incluso disfrutar, a lo largo de la elaboración de este trabajo.

No debo olvidarme de las personas que tanto me han enseñado a lo largo de este aprendizaje, ya que cada una de ellas me ha hecho mejor científico e incluso me ha enseñado valores y aptitudes que puedo seguir implementando en mi día a día.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2024). Micotoxinas. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm [Consultado: Mar 25, 2024].
- Arimboor, R. (2024). "Metabolites and degradation pathways of microbial detoxification of aflatoxins: a review". *Mycotoxin research*, 40(1), pp. 71-83 DOI: 10.1007/s12550-023-00515-0.
- Asociación de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España, (AFHSE) (2015) Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Madrid: Centro de Publicaciones.
- Barrios, M.J., Gualda, M.J., Cabanas, J.M., Medina, L.M. y Jordano, R. (1996). "Occurrence of Aflatoxin M1 in Cheeses from the South of Spain". *Journal of food protection*, 59(8), pp. 898-900 DOI: 10.4315/0362-028X-59.8.898.
- Battacone, G., Nudda, A., Rassu, S.P.G., Decandia, M. y Pulina, G. (2012). "Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1". *Journal of dairy science*, 95(5), pp. 2656-2661 DOI: 10.3168/jds.2011-5003.
- Biomin Mycotoxin Survey. (2014). <https://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey/>
- Biomin Mycotoxin Survey. (2018). <https://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey/>
- Blandon Martínez, J.C. (2011). Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo en el pienso de animales de renta, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Blanco, J.L., Domínguez, L., Gómez-Lucía, E., Garayzabal, J.F., García, J.A. y Suárez, G. (1988). "Presence of aflatoxin M1 in commercial ultra-high-temperature-treated milk". *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), pp. 1622-1623 DOI: 10.1128/aem.54.6.1622-1623.1988.
- Bodas, R., Giráldez, F.J., Olmedo, S., Herrera, M., Lorán, S., Ariño, A., López, S., Benito, A. y Juan, T. (2023). "The Effects of Aflatoxin B1 Intake in Assaf Dairy Ewes on Aflatoxin M1 Excretion, Milk Yield, Haematology and Biochemical Profile". *Animals*, 13(3) DOI: 10.3390/ani13030436.
- Cano-Sancho, G., Marín, S., Ramos, A.J., Peris-Vicente, J. y Sanchis, V. (2010). "Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain)". *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(3), pp. 130-135 DOI: 10.1016.
- Carvajal, M. (2013). "Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN". *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), pp. 109-120.

- Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong-González, E., Cortés-Muñoz, M., Rodríguez, C. y Granados-Chinchilla, F. (2017). "Distribution, stability, and protein interactions of Aflatoxin M1 in fresh cheese". *Food Control*, 73, pp. 581-586 DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.09.005.
- Codex Alimentarius. Enmienda 2022. Norma General para el Queso CXS 283-1978. Adoptado en 1978.
- Decisión de la Comisión 97/80/CE, de 18 de diciembre de 1996, por la que se establecen las disposiciones de aplicación de la Directiva 96/16/CE del Consejo sobre las encuestas estadísticas de la leche y los productos lácteos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 024, 25.1.1997, p.26.
- Directiva 2002/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. *Diario oficial de la Unión Europea*, L 140, de 30 de mayo de 2002. p. 10-22
- El Marnissi, B., Belkhou, R., Morgavi, D.P., Bennani, L. y Boudra, H. (2012). "Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco". *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(8), pp. 2819-2821 DOI: 10.1016/j.fct.2012.05.031.
- European Food Safety Authority (2004). "Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed". *The EFSA Journal*, 39, pp. 1–27. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.39>
- 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.
- Giovati, L., Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S. y Polonelli, L. (2015). "AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination". *Toxins*, 7(10), pp. 4349 DOI: 10.3390/toxins7104330.
- International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2002). "Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene". *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 82, pp. 1-556.
- International Agency for Research on Cancer (2012). *Monografías de la IARC sobre la identificación de peligros cancerígenos para los seres humanos*. Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/>. [Consulta 06-11-2023]
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996). *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. Londres: Springer Science & Business Media.

- Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z. y Li, P. (2021). "Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control". *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(3), pp. 2332-2381 DOI: 10.1111/1541-4337.12734.
- Juan Esteban, T., Herrera Sánchez, M. y Bodas Rodríguez, R. (2022). "Transferencia de aflatoxina en ganado ovino desde el alimento a la leche". *Tierras, Ovino* (36), pp. 66-69.
- Kuilman, M.E., Maas, R.F. y Fink-Gremmels, J. (2000). "Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B (1) in bovine hepatocytes". *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 14(4), pp. 321-327 DOI: 10.1016/s0887-2333(00)00025-4.
- Martí Solé, M.d.C., Alonso Espadalé, R.M. y Constans Aubert, A. (1994) NTP 351: Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales. Madrid.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2024). El queso y su elaboración. Disponible en: <https://www.alimentosdespana.es/es/estrategia-alimentos-espana/gastronomia/bloc/quesos/detalle/etapas-elaboracion-queso.aspx>
- Ministero della Salute (2019) Conclusione dell'attività del gruppo di lavoro per la classificazione dei formaggi e definizione dei fattori di concentrazione (art.2 del regolamento CE 1881/2006 e s.m.i.) di aflatoxina M1. Disponible en: https://www.alimenti-salute.it/doc/11Nota_ministeriale.pdf
- Montagna, M.T., Napoli, C., De Giglio, O., Iatta, R. y Barbuti, G. (2008). "Occurrence of aflatoxin M(1) in dairy products in southern Italy". *International journal of molecular sciences*, 9(12), pp. 2614-2621 DOI: 10.3390/ijms9122614.
- Moral Valderrama, A. (2017). *Aflatoxinas B1 y M1: problemática y métodos de análisis para su determinación en piensos y leche*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Jaén.
- Ojiambo, P.S., Battilani, P., Cary, J.W., Blum, B.H. y Carbone, I. (2018). "Cultural and Genetic Approaches to Manage Aflatoxin Contamination: Recent Insights Provide Opportunities for Improved Control". *Phytopathology*, 108(9), pp. 1024-1037 DOI: 10.1094/PHYTO-04-18-0134-RVW.
- Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. (2007).
- OMS - Organización Mundial de la Salud (2023). Micotoxinas. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins> [Consultado: 20-10-2023].
- Ouadhene, M.A., Callicott, K.A., Ortega-Beltran, A., Mehl, H.L., Cotty, P.J. y Battilani, P. (2024). "Structure of *Aspergillus flavus* populations associated with maize in Greece, Spain, and Serbia:

Implications for aflatoxin biocontrol on a regional scale". *Environmental microbiology reports*, 16(2), pp. e13249-2229.13249 DOI: 10.1111/1758-2229.13249.

- Pecorelli, I., Branciarri, R., Roila, R., Bibi, R., Ranucci, D., Onofri, A. y Valiani, A. (2019). "Evaluation of Aflatoxin M(1) Enrichment Factor in Semihard Cow's Milk Cheese and Correlation with Cheese Yield". *Journal of food protection*, 82(7), pp. 1176-1182 DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-19-023.

- Pitt, J.I. y Miscamble, B.F. (1995). "Water Relations of *Aspergillus flavus* and Closely Related Species". *Journal of food protection*, 58(1), pp. 86-90 DOI: 10.4315/0362-028X-58.1.86.

- Piva, G., Pietri, A., Galazzi, L. y Curto, O. (1988). "Aflatoxin M1 occurrence in dairy products marketed in Italy". *Food additives and contaminants*, 5(2), pp. 133-139 DOI: 10.1080/02652038809373692.

- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. y Piva, G. (2009). "On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products". *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), pp. 984-991 DOI: 10.1016/j.fct.2007.10.005.

- Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*, n. 239, de 6 de octubre de 2006

- 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) n.º 1881/2006. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 119/103, de 5 de mayo de 2023.

- Reglamento de Ejecución (UE) 2023/2782 de la Comisión, de 14 de diciembre de 2023, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control del contenido de micotoxinas en los alimentos y se deroga el Reglamento (CE) n.o 401/2006. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 15 de diciembre, pp. 1-44.

- Santos Pereira, C., C Cunha, S. y Fernandes, J.O. (2019). "Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods". *Toxins*, 11(5), pp. 290. doi: 10.3390/toxins11050290 DOI: 10.3390/toxins11050290.

- Stella, R., Bovo, D., Noviello, S., Contiero, L., Barberio, A., Angeletti, R. y 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". *Food Control*, 157, pp. 110149 DOI: 10.1016/j.foodcont.2023.110149.

- Vaz, A., Cabral Silva, A.C., Rodrigues, P. y Venâncio, A. (2020). "Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products". *Microorganisms*, 8(2) DOI: 10.3390/microorganisms8020246.

8. ANEXOS

ANEXO I: Tabla de características de las muestras de queso analizadas.

Muestra	Tipo de queso	Ingredientes	Tipo de leche	Tratamiento de la leche	Origen
M 01	Fresco	Leche, cuajo, sal, cloruro cálcico y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 02	Fresco	Leche de vaca pasteurizada, proteínas lácteas concentradas, sal, cloruro cálcico, conservador (E202) y cuajo.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 03	Fresco	Leche, cuajo, sal, cloruro cálcico y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 04	Fresco	Leche, sal, estabilizantes (E,410, E401, E407) y E202.	Leche de vaca	Pasteurizada	Madrid
M 05	Fresco	Leche de cabra pasteurizada (origen UE), sal y fermentos.	Leche de cabra	Pasteurizada	Francia
M 06	Curado	Leche cruda de oveja, sal común y cuajo vegetal.	Leche de oveja	Cruda	Extremadura
M 07	Curado	Leche cruda de oveja, sal, conservador (E252), cuajo de origen animal (cordero lechal), cloruro cálcico, fermentos lácticos. Recubrimiento en corteza: conservador (E200, E235). Colorante (E171, E172).	Leche de oveja	Cruda	Castilla y León
M 08	Curado	Leche cruda de oveja, sal, cloruro cálcico, fermentos lácticos, E252 y agentes de recubrimiento (E202, E235).	Leche de oveja	Cruda	Madrid
M 09	Curado	Leche cruda de oveja merina, cuajo vegetal y sal común.	Leche de oveja	Cruda	Extremadura
M 10	Semicurado	Leche cruda de oveja, fermentos lácticos, conservador (lisozima de huevo), cuajo y sal.	Leche de oveja	Cruda	Castilla-La Mancha
M 11	Curado	Leche cruda de oveja, sal, cuajo animal y lisozima de yema de huevo.	Leche de oveja	Cruda	Castilla y León
M 12	Curado	Leche cruda de oveja, sal, fermento y cuajo. Recubrimiento en corteza natural: Conservador (E235 y E202).	Leche de oveja	Cruda	Castilla y León
M 13	Curado	Leche pasteurizada de oveja, sal, estabilizante (Cloruro cálcico) fermentos lácticos, cuajo y lisozima.	Leche de oveja	Pasteurizada	Castilla-La Mancha
M 14	Fresco	Leche de cabra pasteurizada, sal, cuajo microbiano y fermentos lácticos.	Leche de cabra	Pasteurizada	Murcia
M 15	Fresco	Leche de cabra pasteurizada, sal, endurecedor (Cloruro Cálcico) y cuajo microbiano.	Leche de cabra	Pasteurizada	Murcia

Muestra	Tipo de queso	Ingredientes	Tipo de leche	Tratamiento de la leche	Origen
M 16	Fresco	Leche pasterizada de vaca, nata pasterizada de vaca, sal, estabilizantes (goma garrofín, alginato sódico y carragenano), conservador (sorbato potásico) y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Castilla y León
M 17	Fresco	Nata pasteurizada (Leche pasteurizada de vaca y corrector de acidez (ácido cítrico).	Leche de vaca	Pasteurizada	Cantabria
M 18	Curado	Leche cruda de oveja, sal y cuajo.	Leche de oveja	Cruda	Castilla y León
M 19	Curado	Leche pasterizada de oveja, sal, cuajo (de origen no animal) y fermentos lácteos. Contiene conservadores (E-202 y E-235) Colorante (E-172).	Leche de oveja	Pasteurizada	Castilla y León
M 20	Fresco	Queso fresco, sal y espesante: goma guar.	Leche de vaca	Pasteurizada	Alemania
M 21	Curado	Leche pasteurizada de oveja (min. 33%), leche pasteurizada de cabra (min. 33%), leche pasteurizada de vaca (min. 19%), fermentos lácticos, sal, cuajo. En corteza: colorante: caramelo natural; conservadores: natamicina y ácido sórbico.	Leche de oveja, leche de cabra y leche de vaca	Pasteurizada	Murcia
M 22	Curado	Leche de oveja, sal, cuajo y fermentos lácticos. Conservador: Lisozima (derivado del huevo). Conservadores en corteza (E-202 y E-235).	Leche de oveja	Cruda	Navarra
M 23	Fresco	Leche pasteurizada de cabra, sal, cultivos microbianos y cuajo microbiano.	Leche de cabra	Pasteurizada	Alemania
M 24	Curado	Leche pasteurizada de oveja manchega, sal, cuajo, fermento láctico, conservador: Lisozima (huevo*). En corteza conservador: natamicina; colorantes: caramelo natural, norbixina de bija.	Leche de oveja	Pasteurizada	Castilla-La Mancha
M 25	Curado	Leche pasterizada de cabra, sal, cultivos microbianos, cuajo microbiano.	Leche de cabra	Pasteurizada	Alemania
M 26	Fresco	Leche pasteurizada de cabra, sal, cuajo, cloruro cálcico y conservador: E-202.	Leche de cabra	Pasteurizada	Aragón
M 27	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, cuajo, sal, secuestrante (Cloruro cálcico) y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón

Muestra	Tipo de queso	Ingredientes	Tipo de leche	Tratamiento de la leche	Origen
M 28	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, proteínas lácteas concentradas (leche), sal, corrector de acidez: Cloruro cálcico, conservador: E202 y cuajo.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 29	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, sal, cuajo, cloruro cálcico y conservador: E-202.	Leche de vaca	Pasteurizada	Castilla y León
M 30	Fresco	Leche entera, nata (leche (sólidos lácteos (leche), sal, estabilizante: E410, E412 y E407, conservador: E200 y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Asturias
M 31	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, cuajo, sal, secuestrante (Cloruro cálcico) y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 32	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, cuajo, sal, secuestrante (Cloruro cálcico) y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 33	Fresco	Leche de vaca pasteurizada, cuajo y sal.	Leche de vaca	Pasteurizada	Murcia
M 34	Fresco	Leche de vaca desnatada pasteurizada, sal, conservador (E-202) y cuajo.	Leche de vaca	Pasteurizada	Castilla y León
M 35	Fresco	Leche de vaca (mín. 45%), leche de cabra (mín. 30%), cuajo y sal.	Leche de vaca y cabra	Pasteurizada	Andalucía
M 36	Fresco	Nata, leche desnatada pasteurizada de vaca, sal y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Dinamarca
M 37	Fresco	Leche ecológica pasteurizada de nuestras vacas, sal ecológica, lactosa ecológica, harina de algarroba ecológica y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Galicia
M 38	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, sal, conservador (sorbato potásico) y cuajo.	Leche de vaca	Pasteurizada	Castilla-La Mancha
M 39	Semicurado	Leche pasteurizada de oveja, sal, cloruro cálcico, cuajo, fermentos lácticos, conservador E252 y agentes de recubrimiento (E202, E235).	Leche de oveja	Pasteurizada	Madrid
M 40	Curado	Leche pasteurizada de oveja, cloruro cálcico (E-509), cuajo, Lisozima de huevo (E-1105), fermentos lácticos y sal.	Leche de oveja	Pasteurizada	Andalucía
M 41	Curado	Leche pasteurizada de oveja manchega, sal, estabilizante (cloruro cálcico), cuajo y fermentos lácticos.	Leche de oveja	Pasteurizada	Castilla-La Mancha

Muestra	Tipo de queso	Ingredientes	Tipo de leche	Tratamiento de la leche	Origen
M 42	Curado	Leche pasteurizada de oveja, sal, cuajo, corrector de la acidez: Cloruro cálcico, conservador: lisozima de huevo y fermentos lácticos. Corteza: Conservadores E-202 y E-235, colorantes E-172.	Leche de oveja	Pasteurizada	Aragón
M 43	Curado	Leche pasteurizada de oveja, sal, cloruro cálcico, cuajo y fermentos lácticos. Conservante: lisozima (derivado de huevo). Conservantes E-202 y E-235 y colorante E-172.	Leche de oveja	Pasteurizada	Castilla-La Mancha
M 44	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, sal y coagulante.	Leche de vaca	Pasteurizada	Cataluña
M 45	Curado	Leche termizada de oveja, fermentos lácticos, sal y cuajo microbiano.	Leche de oveja	Pasteurizada	Cataluña
M 46	Curado	Leche cruda de oveja (min 45%), leche cruda de cabra (min 45%), aceite de oliva virgen extra (min 1%), sal, cuajo, fermentos lácticos, estabilizante (E-509) y conservador (E-1105).	Leche de oveja	Cruda	Castilla y León
M 47	Fresco	Leche de vaca pasteurizada, sal y cuajo microbiano.	Leche de vaca	Pasteurizada	Murcia
M 48	Fresco	Leche desnatada de vaca, nata, serum de mantequilla, fermentos lácticos, sal, cuajo, estabilizantes (goma garrofin, goma guar).	Leche de vaca	Pasteurizada	Cataluña
M 49	Curado	Leche pasteurizada de cabra, sal, secuestrante: cloruro cálcico, cuajo, fermentos lácticos.	Leche de cabra	Pasteurizada	Cataluña
M 50	Semicurado	Leche cruda de vaca, sal, fermentos lácticos, cuajo, cloruro cálcico y lisozima. Corteza: aceite de oliva y pimentón.	Leche de vaca	Cruda	Cataluña
M 51	Curado	Leche cruda de oveja, sal, cuajo, fermentos lácticos y conservadores: E-252 y E-1105 (derivado del huevo).	Leche de oveja	Cruda	Cataluña
M 52	Fresco	Leche pasteurizada de oveja (70% min) y cabra (30 % máx.), sal, cultivo y cuajo.	Leche de oveja	Pasteurizada	Grecia
M 53	Fresco	Leche de vaca pasteurizada, cuajo, sal, secuestrante (cloruro cálcico) y fermentos lácticos.	Leche de vaca	Pasteurizada	Aragón
M 54	Fresco	Queso blanco pasteurizado, sal y espesante: goma guar.	Leche de vaca	Pasteurizada	Alemania
M 55	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, sal y cuajo.	Leche de vaca	Pasteurizada	Castilla y León

Muestra	Tipo de queso	Ingredientes	Tipo de leche	Tratamiento de la leche	Origen
M 56	Curado	Leche cruda de oveja, fermentos lácticos, extracto de cuajo y sal.	Leche de oveja	Cruda	Aragón
M 57	Curado	Leche pasteurizada de cabra, sal, coagulante, secuestrante: cloruro cálcico, fermentos lácticos (leche) y <i>Penicillium</i> .	Leche de cabra	Pasteurizada	Castilla y León
M 58	Semicurado	Leche cruda de oveja, fermentos lácticos, cuajo, cloruro cálcico y sal.	Leche de oveja	Cruda	Aragón
M 59	Fresco	Leche de vaca pasteurizada (mín. 80%) y oveja (mín 10%), sal, cuajo, cloruro cálcico y conservador (E-202).	Leche de vaca	Pasteurizada	Castilla y León
M 60	Curado	Leche cruda de oveja, sal, fermento y cuajo. Recubrimiento en corteza natural: Conservador (E235 y E202).	Leche de oveja	Cruda	Castilla y León
M 61	Fresco	Leche pasteurizada de vaca, proteínas de la leche, leche en polvo desnatada, aroma natural (leche), sal, espesantes: goma garrofín, goma guar, corrector de acidez: ácido cítrico, fermentos lácticos, coagulante microbiano.	Leche de vaca	Pasteurizada	Cataluña