



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

Área Académica de Nutrición

**Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud
Humana**

TESIS DOCTORAL

**Evaluación del contenido de aflatoxina M1 en leche,
detoxificación por termoultrasonificación y daño en
modelos *in vitro***

Nombre del alumno:

M. en C. Araceli Monter Arciniega

DIRECCIÓN

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

COMITÉ

Dra. Araceli Castañeda Ovando

Dra. Angélica Saraí Jiménez Osorio

Abril 2026



AAN/180/2026

Asunto: Autorización impresión de tesis

MTRA. OJUKI DEL ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH
PRESENTE

Por medio de la presente se informa que el comité tutorial del trabajo de tesis titulado "Evaluación del contenido de aflatoxina M1 en leche, detoxificación por termoultrasonificación y daño en modelos in vitro", realizado por la sustentante **Araceli Monter Arciniega** con número de cuenta **270469**, perteneciente al programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana (DCASH), una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado tiene a bien extender la presente **autorización de impresión**. Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y continuar con lo establecido en el proceso de grado vigente.

ATENTAMENTE

Profesor		Firma
Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino	Directora	
Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano	Codirectora	
Dra. Angelica Saraí Jiménez Osorio	Asesora	
Dra. Araceli Castañeda Ovando	Asesora	

San Agustín Tlaxiaca, Hgo., a 20 de abril de 2026

M. C. José Antonio Hernández Vera
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud
 Dean

Dra. Lydia López Pontigo
 Coordinadora del Posgrado ICSA

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino
 Jefa del Área Académica de Nutrición
 Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Eva María Santos López
 Coordinadora del Programa
 DCASH



"Amor, Orden y Progreso"



Circuito ex-Hacienda la Concepción s/n Carretera Pachuca
 Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P.42172
 Teléfono: 52(771)7172000 Ext. 41524 y 41528
 nutricion@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

*"La vida no es fácil para ninguno de nosotros.
Pero ¿qué importa?
Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros
mismos.
Debemos creer que estamos dotados para algo y que ese algo hay que
alcanzarlo cueste lo que cueste".*

Marie Curie

Dedicatoria

*A mi madre, hermana, Ignacio y mis sobrinos hermosos
A mi compañero de vida que estuvo a mi lado en este arduo camino
A la Doctora Gabriela Mariana Rodríguez Serrano por ser luz y guía*

*Con cariño
Araceli Monter Arciniega*

Agradecimientos

Concluir esta tesis significa mucho más que finalizar una etapa académica; representa un camino de aprendizaje, esfuerzo, paciencia y desarrollo personal. Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas e instituciones que me apoyaron durante este proceso y que, de diferentes maneras, facilitaron la conclusión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Secihti) le brindo mi agradecimiento por la beca recibida (777688 - CVU: 1077200) durante este proceso de superación académica. Gracias por darme la oportunidad de concluir satisfactoriamente el Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, fue para mí un gran orgullo y sé que sin su respaldo esto no hubiese sido posible.

Al Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Hidalgo (CITNOVA), por la beca otorgada para estancias cortas de investigación, cuyo apoyo fue crucial para el desarrollo de este proyecto. Gracias a este respaldo, pude fortalecer mi formación académica, ampliar mi experiencia en investigación y contar con mejores condiciones para avanzar este proyecto.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en el posgrado de Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana del Área Académica de Nutrición, en conjunto con los Instituto de Ciencias Agropecuarias, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería y al Instituto de Ciencias de la Salud, por la oportunidad de seguir perteneciendo a esta gran institución, extendiendo este agradecimiento al Laboratorio de Tecnofuncionalidad de Alimentos y al Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos del Área Académica de Nutrición, por el acceso, capacitación y asesoría continua en el manejo de las muestras y de los diferentes equipos.

Agradezco inmensamente al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por abrirme sus puertas, por la confianza y el respaldo que día a día me brindaron, por hacer posible la realización de esta tesis doctoral.

Al Comité de evaluación, Doctora Nelly del Socorro Cruz Cansino, Doctora Gabriela Mariana Rodríguez Serrano, Doctora Angelica Saraí Jiménez Osorio, Doctora Araceli Castañeda Ovando por su rigor científico, su orientación crítica y su confianza durante este proceso. Sus observaciones, experiencia y exigencia intelectual fortalecieron de manera decisiva mi crecimiento académico y el desarrollo de esta investigación.

Doctora Gaby, con profundo cariño, admiración y gratitud, agradezco el apoyo, la paciencia y la dedicación que me brindó durante el desarrollo de este proyecto. Su calidad humana, su profesionalismo y la generosidad con la que compartió su experiencia y sus conocimientos hicieron de su acompañamiento una parte profundamente significativa de esta etapa. Su ejemplo no solo enriqueció esta investigación, sino que también dejó en mí una valiosa enseñanza de vida, inspiración y crecimiento personal, que atesoro sinceramente.

Al Doctor Salvador Ramón Tello Solís, expreso mi más sincero agradecimiento por su valioso apoyo durante este proyecto. Su paciencia, dedicación, profesionalismo y amplia experiencia fueron fundamentales en esta investigación. Valoro profundamente el tiempo, la disposición y el rigor con los que contribuyó al fortalecimiento de este trabajo y a mi formación académica, esas largas pláticas en el laboratorio hicieron amenas las jornadas de trabajo.

Al Doctor Carlos Jiménez Pérez, por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Agradezco su disposición y profesionalismo, así como las observaciones y contribuciones realizadas, que enriquecieron de manera significativa esta investigación.

A mi familia, con especial cariño, gracias por estar siempre presente, su apoyo incondicional, su paciencia, su amor y su confianza en mí fueron fundamentales para llegar hasta aquí. A mi compañero de vida, gracias por caminar a mi lado durante este proceso. Tu amor, tu paciencia y tu apoyo fueron un refugio en los momentos de mayor cansancio y una fuerza silenciosa que me ayudó a continuar. Celebro profundamente haber compartido contigo esta etapa, porque tu presencia dio sentido, calma y esperanza a muchos de mis días. A mis primos Fer y Sergio, por su apoyo constante y por apoyarme en los momentos más técnicos. Su ayuda, paciencia y disposición hicieron este proceso mucho más fácil.

A mis amistades, gracias por compartir conmigo este trayecto. Gracias por las conversaciones, el apoyo, los consejos, los momentos de incertidumbre y también los de alegría. La compañía de personas valiosas hizo este proceso mucho más llevadero y significativo. Gracias amiguita *Vania Bautista* siempre tuviste sabias palabras para mí, por recordarme siempre que el esfuerzo tiene sentido cuando se sostiene con convicción y esperanza. Tu presencia fue una fuente de consuelo, fortaleza y alegría, y por ello siempre ocuparás un lugar muy especial en este camino. Gracias *Lisette* por los consejos y la ayuda en los momentos complicados. Gracias *Naza* por escuchar, por entender y ser fuente de alegría. Gracias *Liz Nava* tu compañía y amistad fueron y son una fortaleza para continuar, incluso en los momentos de cansancio, duda y dificultad, tu apoyo emocional dejó una huella profunda en esta etapa de mi vida. *Glo* agradezco profundamente la cercanía, el afecto y la generosidad con la que me acompañaste durante este proceso. *Lili* gracias por acompañarme en esta etapa con tu apoyo y afecto sincero. Gracias *Mari* y *Cata* por esas largas pláticas, por incluirme siempre y enseñarme muchas cosas nuevas, por las risas y la amistad brindada, gracias por su cercanía, por sus palabras de aliento y por su presencia en momentos importantes de este camino. Gracias *Erick* por considerarme, orientarme y ser un auténtico amigo. Gracias *Caty* siempre tuviste una sonrisa linda para mí, fuiste compañía y amistad. *Fer Patlan*, gracias por siempre escucharme por compartir y dar sabios consejos. *Marissa* gracias por mantenerme a flote, por escucharme y guiarme. Mi amiga *Karla*, por tu amistad entrañable, gracias por escucharme, animarme y acompañarme.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	14
ABREVIATURAS	15
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	18
1.1 La leche de vaca como alimento de relevancia nutricional y sanitaria	18
1.2 Aflatoxina M1: formación, transferencia a la leche y relevancia toxicológica	18
1.3 Regulación, ocurrencia y exposición a AFM1 en leche	19
1.4 Limitaciones de los tratamientos convencionales y necesidad de alternativas tecnológicas	20
1.5 Fundamento de la termoultrasonificación y su posible efecto sobre aflatoxinas....	20
1.6 Justificación	22
1.7 Objetivos.....	24
1.7.1 Objetivo general	24
1.7.2 Objetivos específicos	24
1.8 Diagrama metodológico	25
Referencias	27
CAPÍTULO 2: LA TERMOULTRASONIFICACIÓN COMO TECNOLOGÍA EMERGENTE PARA LA LECHE DE VACA: UNA REVISIÓN DE SU IMPACTO SOBRE LA INOCUIDAD Y LA CALIDAD FÍSICOQUÍMICA	31
2.1 Resumen	31
CAPÍTULO 3: NIVELES DE AFLATOXINA M1 EN LECHE DE VACA COMERCIALIZADA EN MÉXICO: EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN Y EL ÍNDICE DE RIESGO CARCINOGENÉTICO	47
3.1. Resumen	47

CAPÍTULO 4: LIBERACIÓN *IN VITRO* DE AFLATOXINA M1 DURANTE LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS: EVALUACIÓN Y ANÁLISIS 64

4.1. Resumen 64

CAPÍTULO 5: EFECTO DE LA TERMOULTRASONICACIÓN EN LA RESPUESTA DE AFLATOXINA M1 MEDIDA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN SISTEMAS MODELO 72

5.1 Introducción..... 72
5.2 Materiales y métodos..... 74
5.2.1 Reactivos y preparación de soluciones 74
5.2.2 Diseño experimental 74
5.2.3 Tratamientos de TUS..... 75
5.2.4 Cuantificación de AFM1 por HPLC–FLD 76
5.2.5 Confiabilidad y eficacia analítica del método 76
5.2.6 Análisis estadístico de los datos 77
5.3 Resultados y discusión 77
5.4 Conclusiones..... 82
Referencias 82

CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN AFLATOXINA M1 TRATADA POR TERMOULTRASONICACIÓN 86

6.1 Introducción..... 86
Referencias 88
Evaluación de los cambios estructurales en aflatoxina M1 tratada por termoultrasonicación 90
Evaluación por espectrometría de masas (ESI+) de la transformación estructural de la aflatoxina M1 posterior a la aplicación de la termoultrasonicación 119

CAPÍTULO 7: MODULACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA AFLATOXINA M1 TRATADA CON TERMOULTRASONICACIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES C2BBE1.....	138
7.1 Introducción.....	138
7.2 Materiales y métodos.....	139
7.2.1 Reactivos y preparación de soluciones.....	139
7.2.2 Diseño experimental.....	139
7.2.3 Termoultrasonicación.....	140
7.2.4 Línea celular y condiciones de cultivo.....	140
7.2.5 Tratamiento.....	140
7.2.6 Ensayo de reducción con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio.....	141
7.2.7 Análisis estadístico.....	141
7.3 Resultados y discusión.....	141
7.4 Conclusiones.....	146
Referencias.....	147
CONCLUSIONES GENERALES.....	151
PERSPECTIVAS.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño del diagrama metodológico	26
Figura 2. Concentración de AFM1 ($\mu\text{g/mL}$), obtenida por HPLC-FLD del DECC, incluido el control sin aplicación de TUS. Los resultados se reportan como media \pm DE de experimentos independientes realizados en triplicado. ^{a-g} superíndices distintos indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	79
Figura 3. Superficie de respuesta del modelo cuadrático del DECC.	79
Figura 4. Estructura química de AFB1 y AFM1.	92
Figura 5. Espectros de absorción UV del DECC en el intervalo de la longitud de onda de 200–400 nm. AFM1 (control); (B) condiciones del DECC; (C) condiciones axiales; (D) réplicas en el punto central.	100
Figura 6. Espectros de fluorescencia del DECC en el intervalo de la longitud de onda de 390 - 470 nm. AFM1 (control); (B) condiciones del DECC; (C) condiciones axiales; (D) réplicas en el punto central.	102
Figura 7. Superficie de respuesta del DECC donde se muestra la absorbancia de AFM1 a 365 nm en función del tiempo y la amplitud del tratamiento por TUS.	103
Figura 8. Superficie de respuesta del DECC donde se muestra la intensidad de fluorescencia de la AFM1 en función del tiempo y la amplitud del tratamiento por TUS. La superficie muestra los valores de intensidad de emisión a 428 nm.	105
Figura 9. Energía ultrasónica específica aplicada en cada tratamiento del DECC.	108
Figura 10. Espectros de FTIR del DECC en una ventana espectral de 400–4000 cm^{-1} . AFM1 (control); (B) condiciones del DECC; (C) condiciones axiales; (D) réplicas en el punto central.	110

Figura 11. Espectros de masas de AFM1 obtenidos mediante ESI+MS en modo de exploración total (rango 100–400 m/z). Se presenta el aducto de sodio $[M+Na]^+$ en 351.05 m/z (A) y la comparación de AFM1 tras TUS a los 10 min – 80% (B).....	126
Figura 12. Esquema preliminar de las rutas de fragmentación de la AFM1 inducidas por TUS, basado en los iones detectados mediante ESI+. Los fragmentos de menor masa (m/z 209.17, 96.08 y 79.05) se muestran como productos generales de degradación, excluir la posibilidad de isómeros diferentes.	131
Figura 13. Viabilidad celular de la línea C2BBel tras 24 horas de exposición a los tratamientos del DECC de AFM1 sometida a TUS. Los resultados se reportan como porcentaje respecto al control negativo y se presentan como media \pm DE de experimentos independientes realizados por triplicado.	143
Figura 14. Superficie de respuesta del DECC que muestra la viabilidad celular de C2BBel en función de los diferentes tratamientos aplicados.	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental central compuesto.....	75
Tabla 2. Parámetros estimados del DECC.....	80
Tabla 3. Diseño experimental central compuesto.....	94
Tabla 4. Valores del cálculo de energía total de cada tratamiento de TUS.....	96
Tabla 5. Energía fotónica de las transiciones electrónicas utilizadas en los análisis espectroscópicos ultravioleta (absorción) y fluorescencia (emisión) de la AFM1.....	108
Tabla 6. Diseño experimental central compuesto.....	123
Tabla 7. Intensidad relativa (%) de AFM1 fragmentada posterior al tratamiento de TUS	126
Tabla 8. Intensidad (%) relativa de los productos de degradación de AFM1 tras tratamiento de TUS.....	129
Tabla 9. Parámetros estimados para la superficie de respuesta del DECC respecto a la viabilidad celular	146

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Parámetros estimados del MSR para la absorbancia UV de AFM1 por aplicación de TUS.....	112
Tabla S2. Parámetros estimados del MSR para la intensidad de fluorescencia de AFM1 por aplicación de TUS	113
Tabla S3. Energías de enlace típicas para enlaces covalentes comunes en compuestos orgánicos*.....	113

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

AFB1: Aflatoxina B1

AFM1: Aflatoxina M1

ANOVA: Análisis de varianza

ATR: Reflectancia Total Atenuada

cm⁻¹: centímetro a la menos uno

COST: Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología

DE: Desviación estándar

DECC: Diseño experimental central compuesto

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

INFOGEST: Simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de alimentos

FTIR: Espectroscopía en el infrarrojo por transformada de Fourier

J/mL: Joules por mililitro

HPLC-FLD: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia

HTST: Pasteurización de Alta Temperatura y Corto Tiempo

MeOH: Metanol

min.: Minutos

µg/mL: Microgramos por mililitro

mL: Mililitro

µM: Micro mol

MSR: Modelo de superficie de respuesta

PBS: Regulador de fosfato

u.a.: Unidades arbitrarias

ROS: Especies reactivas de oxígeno

UHT: Ultra alta temperatura

UV: Ultravioleta

TEER: Resistencia transepitelial eléctrica.

TUS: Termoultrasonificación

RESUMEN

La aflatoxina M1 (AFM1) es una micotoxina de relevancia en salud pública debido a su presencia en la leche y los productos lácteos, a su relativa estabilidad frente a tratamientos convencionales y a su potencial impacto adverso en la salud humana. En este marco, el presente proyecto tuvo como propósito evaluar la presencia de AFM1 en leche comercial de vaca, estimar el riesgo asociado a su consumo y analizar el efecto de la termoultrasonificación (TUS) sobre esta toxina, considerando tanto sus modificaciones estructurales como su respuesta biológica posterior. En una primera fase, se determinó el contenido de AFM1 en muestras de leche comercial mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD). A partir de estos datos, se calcularon la exposición dietética y el índice de riesgo carcinogénico en diferentes grupos poblacionales mediante la simulación de Monte Carlo, con el fin de evaluar la relevancia toxicológica del consumo de leche contaminada. Posteriormente, se aplicó TUS a sistemas modelo con AFM1 en distintas combinaciones de tiempo y amplitud, utilizando un diseño experimental central compuesto (DECC). Los cambios provocados por el tratamiento se analizaron mediante espectroscopía ultravioleta (UV), fluorescencia, espectroscopía en el infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y espectrometría de masas, con la finalidad de identificar modificaciones estructurales asociadas al tratamiento. Finalmente, se estudió el efecto biológico de la AFM1 tratada con TUS sobre la viabilidad de las células C2BBel, empleadas como modelo de epitelio intestinal. Los resultados confirmaron la presencia de AFM1 en leche comercial y evidenciaron un riesgo potencial cuya magnitud varió entre los grupos poblacionales. En los sistemas modelo, la TUS indujo cambios en la respuesta espectroscópica y en el perfil de masas de la AFM1, lo que sugiere transformaciones estructurales dependientes de las condiciones del tratamiento. De manera complementaria, la respuesta biológica observada en células C2BBel mostró un comportamiento no lineal, determinado por la combinación específica de tiempo y amplitud aplicados. Además, la respuesta biológica en células C2BBel mostró un comportamiento no lineal, influido por la combinación específica de tiempo y amplitud. En conjunto, los hallazgos aportan evidencia analítica, toxicológica y mecánica que fortalece la comprensión del comportamiento de la AFM1 y sustenta futuras estrategias para su evaluación, transformación y gestión del riesgo en sistemas alimentarios.

ABSTRACT

Aflatoxin M1 (AFM1) is a mycotoxin of public health concern because of its presence in milk and dairy products, its relative resistance to conventional treatments, and its potential adverse effects on human health. In this context, the present project aimed to assess the presence of AFM1 in commercial cow's milk, estimate the risk associated with its consumption, and analyze the effect of termoultrasonication (TUS) on this toxin, considering both structural modifications and the subsequent biological response. In the first phase, the content of AFM1 in commercial milk samples was determined by high-resolution liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Based on these data, dietary exposure and carcinogenic risk indices were calculated for different population groups using Monte Carlo simulation to assess the toxicological significance of contaminated milk consumption. Subsequently, TUS was applied to model systems containing AFM1 at different combinations of time and amplitude, using a compound central experimental design (DECC). Treatment-induced changes were analyzed using ultraviolet (UV) spectroscopy, fluorescence, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and mass spectrometry to identify structural modifications associated with the treatment. Finally, the biological effect of AFM1 treated with TUS on the viability of C2BBel cells, used as an intestinal epithelium model, was studied. The results confirmed the presence of AFM1 in commercial milk and showed a potential risk whose magnitude varied among population groups. In modelling systems, TUS induced changes in the spectroscopic response and mass profile of AFM1, suggesting structural transformations that depend on treatment conditions. Conversely, the biological response observed in C2BBel cells exhibited nonlinear behavior, determined by the specific combination of time and amplitude applied. Taken together, the findings provide analytical, toxicological, and mechanical evidence that strengthens the understanding of AFM1 behavior and supports future strategies for its assessment, transformation, and risk management in food systems.

Capítulo 1: Antecedentes del problema de investigación

1.1 La leche de vaca como alimento de relevancia nutricional y sanitaria

La leche de vaca constituye uno de los alimentos de mayor consumo a nivel mundial; aporta proteínas de alta calidad, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales esenciales, por lo que contribuye de manera importante a cubrir los principales requerimientos nutricionales de calcio, proteínas y micronutrientes en distintos grupos de edad (Alais, 2022; FAO, 2023). Los seres humanos son la única especie que consume leche de otros mamíferos, y en diversos contextos culturales y alimentarios, este hábito puede mantenerse hasta la edad adulta (Weaver et al., 2013).

No obstante, la relevancia nutricional de la leche contrasta con su susceptibilidad a la contaminación por microorganismos patógenos y compuestos tóxicos, entre ellos las micotoxinas. En este contexto, la presencia de aflatoxina M1 (AFM1) puede convertirla en un vehículo potencial de exposición crónica para la población especialmente en escenarios de contaminación persistente o de control insuficiente (Dubey et al., 2022; Hsu et al., 2024)

1.2 Aflatoxina M1: formación, transferencia a la leche y relevancia toxicológica

La AFM1 es un metabolito hidroxilado de la aflatoxina B1 (AFB1); y se forma en el hígado de los animales por medio de la acción del sistema enzimático del citocromo P450 para posteriormente ser excretado en la leche, la orina y otros fluidos biológicos de rumiantes (IARC, 2022; Klingelhöfer et al., 2018). Debido a este proceso de biotransformación y excreción, la contaminación del alimento destinado al ganado constituye una de las principales rutas de entrada al sistema de producción láctea.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica las aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1, M2) como carcinógenos del Grupo 1 en humanos, con una evidencia sólida que respalda su asociación con el carcinoma hepatocelular y otros efectos adversos para la salud (IARC, 2022). Diversos estudios han documentado que la exposición a AFM1 se asocia con daño en tejidos y sistemas específicos; por ejemplo, se ha relacionado con alteraciones en la integridad de la barrera intestinal y en la arquitectura epitelial del intestino, la desregulación transcriptómica asociada a la inmunosupresión intestinal y los

efectos genotóxicos compatibles con daño hepático en modelos experimentales (Gao et al., 2021, 2023; Güç et al., 2022). Esta evidencia sustenta la relevancia de la AFM1 como problema de salud pública, especialmente en poblaciones con alta ingesta de leche y derivados.

1.3 Regulación, ocurrencia y exposición a AFM1 en leche

Los organismos internacionales han establecido límites máximos permisibles para la AFM1 en la leche líquida debido a su relevancia para la inocuidad alimentaria y la salud pública. La Comisión Europea establece un límite de 0.05 µg/L para la leche cruda, la tratada térmicamente y la destinada a la elaboración de productos lácteos. En cambio, el *Codex Alimentarius* y la norma mexicana, a través de la NOM-243-SSA1-2010, establecen un máximo de 0.5 µg/L (EC, 2001; FAO, 1995; Secretaría de Salud, 2010). Estas diferencias regulatorias reflejan enfoques distintos en la gestión del riesgo y refuerzan la necesidad de una vigilancia continua de los productos lácteos de amplio consumo.

A pesar de la existencia de estos límites, diversos estudios realizados en distintos países han documentado frecuencias elevadas de detección y concentraciones de AFM1 que superan los valores permitidos (Armorini et al., 2016; Gutiérrez et al., 2013; Mozafari et al., 2017; Nishimwe et al., 2022; Poapolathep et al., 2024; Tosun et al., 2013; Yang et al., 2025). En México, la evidencia disponible también ha mostrado concentraciones variables de AFM1 en leche cruda, pasteurizada y tratada por ultra alta temperatura (UHT) con reportes que, en algunos casos, exceden tanto la normativa nacional como los valores de referencia internacionales (Álvarez-Días et al., 2022; Carvajal et al., 2003; Hernández-Falcón et al., 2018; Monter-Arciniega et al., 2025; Patricia et al., 2012; Pérez et al., 2008; Quevedo-Garza et al., 2020). En conjunto, estos hallazgos sustentan la preocupación por una exposición dietética crónica en la población consumidora, especialmente en grupos con alta ingesta de leche y derivados.

1.4 Limitaciones de los tratamientos convencionales y necesidad de alternativas tecnológicas

Ante este panorama, resulta esencial reforzar las estrategias de prevención y control a lo largo de la cadena productiva, en particular durante el manejo y almacenamiento del alimento destinado al ganado lechero, ya que esta etapa constituye una de las principales rutas de entrada de aflatoxinas al sistema de producción láctea. Sin embargo, una vez que la AFM1 alcanza el producto final, las alternativas de mitigación son limitadas. Aunque la pasteurización y el tratamiento UHT aseguran la inocuidad microbiológica de la leche, su capacidad para reducir esta micotoxina está limitada por su elevada estabilidad térmica (Prado Rodríguez, 2018).

Esta limitación ha impulsado el interés de tecnologías, algunas alternativas para mejorar la inocuidad de la leche, sin comprometer su calidad nutricional y sensorial. Entre ellas, la termoultrasonificación, el termoultrasonido o la termosonicación (TUS), que combina ultrasonido de alta potencia con temperatura moderada (<50 °C) ha demostrado resultados prometedores en la inactivación de microorganismos y enzimas asociadas al deterioro del producto. Además, en comparación con los tratamientos térmicos convencionales, esta tecnología puede preservar en mayor medida los atributos fisicoquímicos y nutrimentales de la leche, aunque su efecto sobre compuestos sensibles depende de las condiciones de procesamiento, en particular de la intensidad y la duración del tratamiento (Bermúdez-Aguirre et al., 2008, 2011; Liu et al., 2022).

1.5 Fundamento de la termoultrasonificación y su posible efecto sobre aflatoxinas

El mecanismo principal de la TUS se basa en la cavitación acústica, donde la formación, el crecimiento y el colapso violento de microburbujas generan microambientes con gradientes extremos de temperatura y presión, microchorros y especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente radicales hidroxilo, con potencial de dañar estructuras celulares e impulsar transformaciones químicas de moléculas susceptibles (Asaithambi et al., 2022; Bariya et al., 2023; Crudo et al., 2014; Shen et al., 2017).

En el caso de las aflatoxinas, estudios recientes sugieren que el ultrasonido de alta potencia y la TUS podrían inducir la apertura de anillos, la ruptura de dobles enlaces conjugados y otras transformaciones estructurales (Basso et al., 2023; Jang et al., 2025; Liu et al., 2019). Sin embargo, la evidencia disponible sobre los efectos de la TUS específicamente sobre AFM1, sus posibles productos de transformación y su impacto toxicológico residual continúa siendo limitada. Esta brecha de conocimiento justifica el desarrollo de investigaciones integrales que aborden tanto la cuantificación de la micotoxina como los cambios estructurales y biológicos asociados a su potencial tóxico

1.6 Justificación

La leche de vaca forma parte habitual de la alimentación en prácticamente todas las etapas de la vida y en distintos estratos socioeconómicos, por lo que una calidad higiénico-sanitaria deficiente puede traducirse en cambios relevantes en la exposición de la población a contaminantes microbiológicos y químicos. En México, el nivel de contaminación por AFM1 constituye un problema de interés sanitario y regulatorio. Diversos estudios han documentado su presencia en leche cruda, pasteurizada, UHT y orgánica, con proporciones que, en algunos casos, exceden los límites permisibles establecidos por la normativa nacional e internacional. Este escenario resulta especialmente preocupante en regiones con alta producción lechera y en sistemas de explotación intensivos, donde las condiciones de alimentación y almacenamiento pueden favorecer la contaminación.

La relevancia de esta problemática trasciende la mera detección del contaminante. La exposición crónica a AFM1 se ha asociado con efectos adversos como hepatotoxicidad, potencial hepatocarcinogénico, alteraciones de la integridad de la barrera intestinal y posibles efectos inmunotóxicos. Además, su importancia sanitaria aumenta en poblaciones con consumo frecuente de leche y en grupos con mayor vulnerabilidad nutricional, como lactantes, niños y adolescentes. En consecuencia, el estudio de AFM1 en leche no solo responde a un interés analítico, sino también a la necesidad de comprender su posible impacto en la salud pública.

Aunque se han promovido estrategias preventivas basadas en buenas prácticas de producción, almacenamiento y manufactura, una vez que la AFM1 alcanza la leche, las opciones de mitigación son limitadas. En este contexto, la TUS ha surgido como una alternativa tecnológica de interés para modificar el comportamiento de esta micotoxina. Sin embargo, la mayoría de los estudios disponibles se han concentrado en cuantificar su reducción aparente y en evaluar parámetros generales de calidad de la leche después del tratamiento, sin profundizar en la caracterización estructural de los productos de transformación ni en su posible impacto toxicológico residual.

La evaluación de la eficacia y la seguridad de la TUS como alternativa tecnológica requiere ir más allá de la mera cuantificación de la AFM1. Es imprescindible comprender el

comportamiento de la micotoxina durante la digestión gastrointestinal, ya que se ha reportado su interacción y enlaces a proteínas lácteas lo que podría afectar la cantidad de AFM1 biodisponible. Los modelos estáticos de digestión *in vitro* ofrecen un marco estandarizado para simular las fases gástrica e intestinal para analizar la liberación de compuestos bioactivos o tóxicos a partir de la matriz alimentaria. Asimismo, el uso de líneas celulares que modelan la barrera epitelial permite evaluar la citotoxicidad y las alteraciones en la integridad de la barrera intestinal inducidas por AFM1 y los productos formados durante el tratamiento de la TUS.

La presente investigación se justifica por integrar, en un único proyecto, la cuantificación de AFM1 en leche comercial mexicana, la estimación del riesgo carcinogénico asociado a su consumo, la evaluación del comportamiento de la micotoxina durante la digestión *in vitro*, la aplicación de la TUS como estrategia de modificación del potencial tóxico y el análisis de los cambios moleculares, así como los efectos residuales en líneas celulares intestinales. Esta aproximación multietapa permite no solo dimensionar la problemática nacional de la contaminación por AFM1 en la leche, sino también generar evidencia sobre la factibilidad tecnológica y la seguridad toxicológica de la TUS, como alternativa a los procesos térmicos convencionales para modificar el riesgo asociado a esta micotoxina en la población.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar, mediante técnicas analíticas, espectroscópicas y modelos *in vitro*, los cambios estructurales y el potencial toxicológico de la AFM1 sometida a tratamiento de la TUS, con el fin de contribuir a disminuir el riesgo asociado a su consumo en la población humana.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Analizar la presencia y la concentración de AFM1 en leche de vaca de marcas comerciales distribuidas a nivel nacional mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD).
2. Estimar la exposición dietética crónica a la AFM1 en la población consumidora mediante simulación de Monte Carlo y calcular el índice de riesgo carcinogénico en distintos grupos etarios.
3. Evaluar el efecto de las condiciones de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la AFM1 presente en leche de vaca comercial.
4. Caracterizar el perfil cromatográfico por HPLC-FLD de la AFM1 antes y después de la aplicación de la TUS mediante un diseño experimental central compuesto (DECC).
5. Evaluar con diferentes técnicas espectroscópicas (fluorescencia, ultravioleta e infrarrojo) y espectrometría de masas el efecto de la TUS sobre el AFM1 a diferentes condiciones de amplitud y tiempo.
6. Evaluar el efecto de la TUS en la AFM1 por medio de un DECC sobre la viabilidad de líneas celulares C2BBel.

1.8 Diagrama metodológico

El diseño metodológico del proyecto se estructuró en tres etapas articuladas entre sí, que se resumen en la Figura 1. En la Etapa 1 se trabajó con leche de vaca de marcas comerciales distribuidas a nivel nacional, a las cuales se les cuantificó el contenido de AFM1 mediante HPLC-FLD. Con esta información fue posible estimar la exposición dietética y el índice de riesgo carcinogénico para la población consumidora. Por otra parte, se realizó una evaluación en un modelo de digestión *in vitro*, para el análisis de los cambios de AFM1 durante la digestión.

En la Etapa 2, se desarrolló un DECC con AFM1 pura, con el propósito de aplicar tratamientos de TUS bajo condiciones controladas y evaluar la capacidad de esta tecnología para modificar la micotoxina. En esta fase, se utilizaron soluciones de AFM1 y se caracterizaron los cambios inducidos mediante técnicas espectroscópicas. El uso de AFM1 pura permitió aislar el efecto de la TUS sobre la molécula y describir con mayor precisión las posibles modificaciones estructurales sin la interferencia del resto de los componentes de la leche.

En la Etapa 3, también se utilizó AFM1 pura para analizar el efecto de la micotoxina y de sus productos de transformación en la viabilidad de las células epiteliales intestinales humanas C2BBel, empleadas como modelo de barrera intestinal. Esta etapa corresponde al objetivo específico 6 y pone en evidencia el efecto de las transformaciones inducidas por la TUS sobre la AFM1 en la viabilidad de las células.

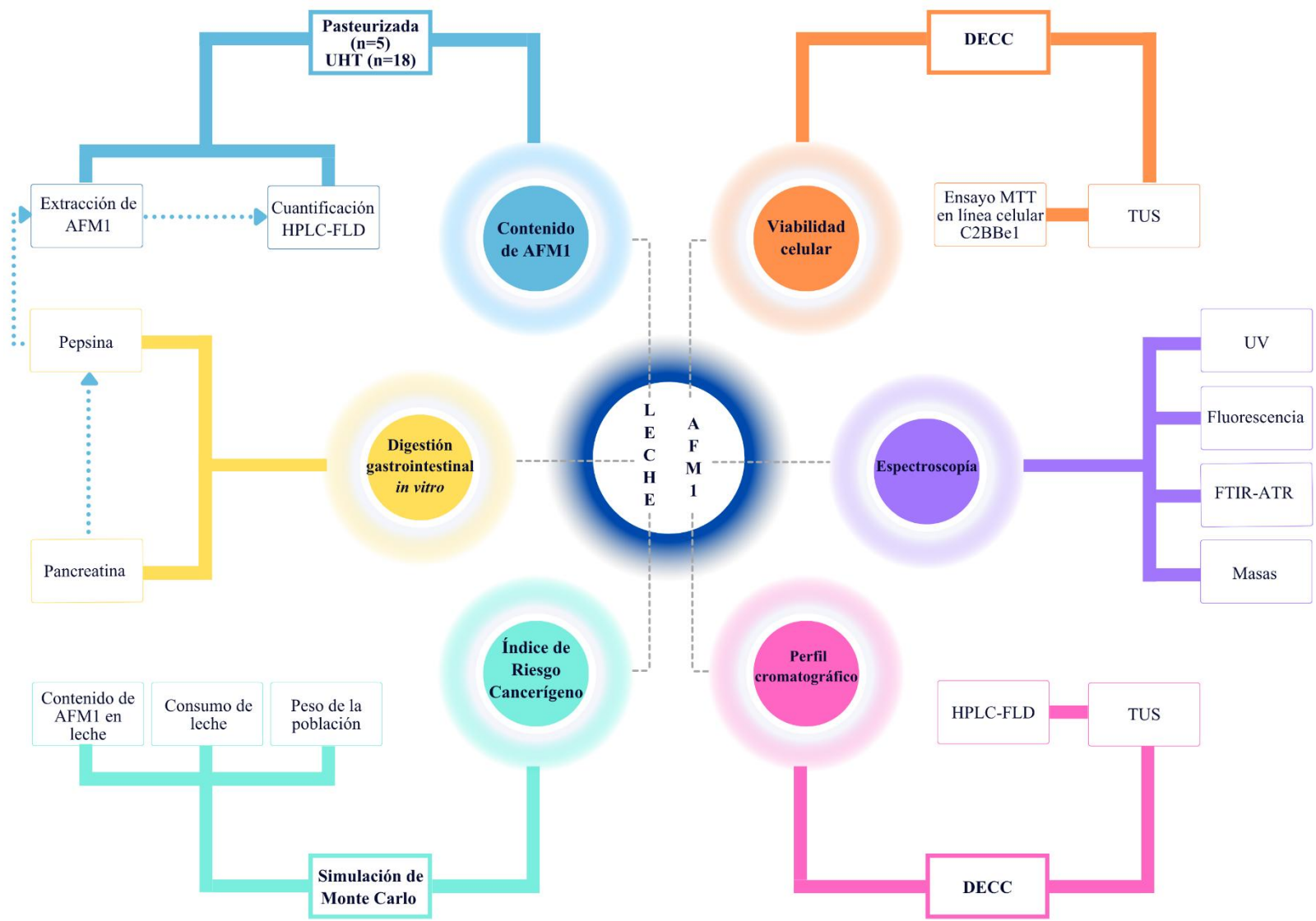


Figura 1. Diseño del diagrama metodológico

La investigación progresa desde la caracterización de un problema real en leche comercial, continua hacia un sistema de modelo de digestión, y culmina con la evaluación de los cambios estructurales por la TUS, así como el análisis toxicológico de las moléculas modificadas en un modelo *in vitro* de líneas celulares C2BBel. Esta secuencia permite establecer una relación directa entre la magnitud de la exposición poblacional de las leches analizadas, la factibilidad tecnológica de la intervención propuesta y su impacto biológico residual, fortaleciendo así la relevancia científica y aplicada del proyecto.

Referencias

- Alais, C. (2022). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera* (4.^a ed.). Reverté, S. A. España. Pp 3– 28. <https://books.google.com.ec>
- Álvarez-Díaz, F., Torres-Parga, B., Valdivia-Flores, A. G., Quezada-Tristán, T., Alejos-De La Fuente, J. I., Sosa-Ramírez, J., & Rangel-Muñoz, E. J. (2022). Aspergillus flavus and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin M1 in bovine milk in Aguascalientes, México. *Toxins*, 14(5), 292; <https://doi.org/10.3390/toxins14050292>
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A., & Roncada, P. (2016). Occurrence of aflatoxin M1 in conventional and organic milk offered for sale in Italy. *Mycotoxin Research*, 32, 237–246. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0256-8>
- Asaithambi, N., Singha, P., & Singh, S. K. (2022). Comparison of the effect of hydrodynamic and acoustic cavitations on functional, rheological and structural properties of egg white proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 82, 103166. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103166>
- Bariya, A. R., Rathod, N. B., Patel, A. S., Nayak, J. K. B., Ranveer, R. C., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Ozogul, F., Jambrak, A. R., & Rocha, J. M. (2023). Recent developments in ultrasound approach for preservation of animal origin foods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106676. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106676>
- Basso, A. B. G., Ali, S., Corassin, C. H., Rosim, R. E., & de Oliveira, C. A. F. (2023). Individual and combined decontamination effect of fermentation and ultrasound on aflatoxin B1 in wheat-based doughs: A preliminary study. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 15(3), 96–103. <https://doi.org/10.15586/qas.v15i3.1244>
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *Journal of Food Science*, 73(7), E325–E332. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00875.x>
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Study of possible mechanisms of inactivation of *Listeria innocua* in thermo-sonicated milk using scanning

- electron microscopy and transmission electron microscopy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(6), 767–777. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00527.x>
- Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo, F., & Méndez, I. (2003). Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *Journal of Food Protection*, 66, 1885–1892. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1885>
- Crudo, D., Bosco, V., Cavaglià, G., Mantegna, S., Battaglia, L., & Cravotto, G. (2014). Process intensification in food industry: Hydrodynamic and acoustic cavitation for fresh milk treatment. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 25, 55–59. <http://hdl.handle.net/2318/157137>
- Dubey, K. K., Raj, T., & Kumar, P. (2022). Pathogenic microorganisms in milk: Their source, hazardous role and identification. En *Advances in dairy microbial products* (pp. 145–161). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85793-2.00005-9>
- European Commission. (2001). *Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. *Official Journal of the European Communities*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2001/466/oj/eng>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1995). *Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed*. <https://www.fao.org>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). *Milk and dairy products in human nutrition*. <https://www.fao.org/publications>
- Gao, Y. N., Li, S. L., Yang, X., Wang, J. Q., & Zheng, N. (2021). The protective effects of lactoferrin on aflatoxin M1-induced compromised intestinal integrity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 289. <https://doi.org/10.3390/ijms23010289>
- Gao, Y. N., Wang, Z. W., Yang, X., Wang, J. Q., & Zheng, N. (2023). Aflatoxin M1 and ochratoxin A induce a competitive endogenous RNA regulatory network of intestinal immunosuppression by whole-transcriptome analysis. *Science of the Total Environment*, 854, 158777. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158777>
- Güç, İ., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., & Acar, A. (2022). Toxicity mechanisms of aflatoxin M1 assisted with molecular docking and the toxicity-limiting role of trans-resveratrol. *Scientific Reports*, 12(1), 14471. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18728-w>
- Gutiérrez, R., Vega, S., Pérez, J. J., Ruiz, J. L., Yamazaki, A., Rivera, J. G., & Escobar, A. (2013). Evaluación de aflatoxina M1 en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México. *Revista de Salud Animal*, 35(1), 33–37.
- Hernández-Falcón, T. A., Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. S., Alanís-García, E., Rodríguez-Serrano, G. M., & Castañeda-Ovando, A. (2018). Effect of thermoultrasound on aflatoxin M1 levels, physicochemical and microbiological properties of milk during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.018>

- Hsu, P., Pokharel, A., Scott, C. K., & Wu, F. (2024). Aflatoxin M1 in milk and dairy products: The state of the evidence for child growth impairment. *Food and Chemical Toxicology*, *193*, 115008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.115008>
- International Agency for Research on Cancer. (2022). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Aflatoxins*. <https://monographs.iarc.who.int/>
- International Agency for Research on Cancer. (2022). *Mycotoxins as human carcinogens—the IARC monographs classification*. <https://monographs.iarc.who.int/>
- Jang, G. Y., & Min, S. C. (2025). Ultrasound treatment using plasma-activated water for aflatoxin B1 degradation in corn kernels. *Food Control*, *181*, 111791. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111791>
- Klingelhöfer, D., Braun, M., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2018). Aflatoxin: A global burden. *Food Control*, *94*, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.007>
- Liu, Y., Li, M., Liu, Y., & Bian, K. (2019). Structures of reaction products and degradation pathways of aflatoxin B1 by ultrasound treatment. *Toxins*, *11*(9), 526. <https://doi.org/10.3390/toxins11090526>
- Liu, Y., Li, M., Bai, F., & Bian, K. (2022). Reduction of aflatoxin B1 and zearalenone contents in corn using power ultrasound and its effects on corn quality. *Toxins*, *14*(12), 834. <https://doi.org/10.3390/toxins14120834>
- Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. S., Castañeda-Ovando, A., Jiménez-Osorio, A. S., Tello-Solís, S. R., Jiménez-Pérez, C., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2025). Aflatoxin M1 levels in commercial cows' milk in Mexico: Contamination and carcinogenic risk assessment. *Applied Sciences*, *15*(11), 6106. <https://doi.org/10.3390/app15116106>
- Mozafari, S., Mohsenzadeh, M., & Mehrzad, J. (2017). Seasonally feed-related aflatoxins B1 and M1 spread in semiarid industrial dairy herd and its deteriorating impacts on food and immunity. *Journal of Food Quality*, *2017*, 4067989. <https://doi.org/10.1155/2017/4067989>
- Nishimwe, K., Bowers, E. L., Dieu-Ayabagabo, J., Habimana, R., Mutiga, S., & Maier, D. E. (2022). Preliminary sampling of aflatoxin M1 contamination in raw milk from dairy farms using feed ingredients from Rwanda. *Mycotoxin Research*, *38*, 107–115. <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00454-2>
- Patricia, L., Noa, M., López, Y., González, D. G., Noa, E., Real, M., & Medina, M. S. (2012). Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Revista de Salud Animal*, *34*, 40–45.
- Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M., & Escobar, A. (2008). Occurrence of aflatoxin M1 in raw, ultra pasteurized and organic milks produced and marketed in Mexico. *Revista de Salud Animal*, *30*, 103–109.

- Poapolathep, S., Klangkaew, N., Phaochoosak, N., Jawjaroensri, W., Sroynum, A., Saipinta, D., & Poapolathep, A. (2024). Occurrence and potential health risk of aflatoxin M1 in raw, pasteurized, and UHT milk in Thailand. *World Mycotoxin Journal*, *17*, 85–94. <https://doi.org/10.1163/18750796-20232834>
- Prado Rodríguez, D. E. (2018). *Revisión sobre las aflatoxinas en avicultura*. Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales
- Quevedo-Garza, P. A., Amador-Espejo, G. G., Salas-García, R., Ramos-Peña, E. G., & Trujillo, A. J. (2020). Aflatoxin M1 determination in infant formulae distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins*, *12*, 100. <https://doi.org/10.3390/toxins12020100>
- Secretaría de Salud. (2010). *NOM-243-SSA1-2010, leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*. México. <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>
- Shen, X., Shao, S., & Guo, M. (2017). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*, 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13292>
- Tosun, H., & Ayyıldız, T. (2013). Occurrence of aflatoxin M1 in organic dairy products. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, *5*, 215–219. <https://doi.org/10.3920/QAS2012.0147>
- Weaver, C., Wijesinha-Bettoni, R., McMahon, D., & Spence, L. (2013). *Milk and dairy products as part of the diet*. Digital Library, CABI. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133411377>
- Yang, X., Liu, B., Zhang, L., Wang, X., Xie, J., & Liang, J. (2025). Spatial distribution and dietary risk assessment of aflatoxins in raw milk and dairy feedstuff samples from different climate zones in China. *Toxins*, *17*, 41. <https://doi.org/10.3390/toxins17010041>

Capítulo 2: La termoultrasonificación como tecnología emergente para la leche de vaca: Una revisión de su impacto sobre la inocuidad y la calidad fisicoquímica

2.1 Resumen

Este capítulo presenta un artículo de revisión enfocado en la TUS como tecnología de procesamiento aplicada a la leche de vaca. El objetivo de este artículo fue analizar críticamente la evidencia disponible sobre el efecto de la TUS en la inocuidad microbiológica y la calidad fisicoquímica de la leche, con énfasis en su capacidad para reducir la carga microbiana y la actividad enzimática, así como en su impacto en parámetros como el pH, el color, la estabilidad, el tamaño del glóbulo graso y el contenido de proteínas. La revisión muestra que la TUS ha despertado un interés como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, debido a su potencial para mejorar la seguridad microbiológica de la leche con una menor afectación de sus características nutricionales y sensoriales. Sin embargo, los resultados reportados siguen siendo heterogéneos, debido a la variabilidad en las condiciones de procesamiento empleadas, como amplitud, tiempo y temperatura, así como a los criterios analíticos utilizados para evaluar su eficacia. En conjunto, la evidencia revisada sugiere que la TUS constituye una estrategia tecnológica con potencial para el procesamiento de la leche de vaca. Asimismo, este capítulo aporta el fundamento científico que sustenta los apartados experimentales posteriores de la tesis, particularmente aquellos orientados a caracterizar los efectos de la TUS sobre la AFM1 desde una perspectiva analítica, estructural y biológica.

Nota declaratoria:

Referencia: Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. S., Castañeda-Ovando, A., Jiménez-Osorio, A. S., Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S. R., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2025). Thermoultrasonication as an emerging technology for raw cow's milk processing: A review of its impacts on food safety and physicochemical quality. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 24(3), Bio25569. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio25569>; **Estado de publicación:** Publicado; **Nombre de la revista:** Revista Mexicana de Ingeniería Química; **Indexación:** JCR; **Factor de impacto:** 2.093



Thermoultrasonication as an emerging technology for raw cow's milk processing: A review of its impacts on food safety and physicochemical quality

La termoultrasonificación como tecnología emergente para la leche de vaca: Una revisión de su impacto sobre la inocuidad alimentaria y la calidad fisicoquímica

A. Monter-Arciniega¹, N. S. Cruz-Cansino¹, A. Castañeda-Ovando², A. S. Jiménez-Osorio³, C. Jiménez-Pérez⁴, S. R. Tello-Solís⁵, G. M. Rodríguez-Serrano^{4*}

¹Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo 42160, México.

²Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo 42184, México.

³Área Académica de Enfermería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo 42160, México.

⁴Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, México.

⁵Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, México.

Sent date: April 12, 2025; Accepted: August 30, 2025

Abstract

Ultrasonication combined with mild heating (TUS) has emerged as a promising alternative to conventional heat treatment (CHT) for the processing of raw cow's milk (RCM). Recent studies report significant microbial inactivation—typically around 2.5 log reductions—while preserving key nutritional and physicochemical properties. The majority of findings indicate minimal degradation of proteins and lipids, improved viscosity, enhanced stability of bioactive compounds, and a marked decrease in aflatoxin M1 (AFM1) levels. Although processing parameters such as amplitude, frequency, and duration vary across studies, there is a consistent emphasis on the synergistic effect of acoustic cavitation and moderate thermal input. This synergy not only contributes to microbial safety but also offers potential reductions in energy consumption compared to traditional thermal processing. Nevertheless, further efforts are required to scale up the technology and standardize operating protocols to facilitate regulatory acceptance. These findings collectively underscore the potential of TUS as an innovative and efficient approach for enhancing the safety and quality of dairy products.

Keywords: milk, thermoultrasonication, microbial inactivation, physicochemical properties, dairy processing.

Resumen

La ultrasonificación combinada con temperatura suave (TUS) ha surgido como una alternativa prometedora al tratamiento térmico convencional (CHT) para el procesamiento de leche cruda de vaca (RCM). Estudios recientes reportan una inactivación microbiana significativa —típicamente alrededor de 2.5 reducciones log—, mientras se preservan las propiedades nutritivas y fisicoquímicas clave. La mayoría de los hallazgos indican una degradación mínima de las proteínas y los lípidos, una mejor viscosidad, una mayor estabilidad de los compuestos bioactivos y una marcada disminución de los niveles de aflatoxina M1 (AFM1). Aunque los parámetros de procesamiento como la amplitud, la frecuencia y la duración varían entre los estudios, hay un énfasis constante en el efecto sinérgico de la cavitación acústica y la entrada térmica moderada. Esta sinergia no sólo contribuye a la seguridad microbiana, sino que también ofrece reducciones potenciales en el consumo de energía en comparación con el tratamiento térmico tradicional. Sin embargo, se requieren más esfuerzos para ampliar la tecnología y estandarizar los protocolos de funcionamiento a fin de facilitar la aceptación reglamentaria. Estos resultados subrayan colectivamente el potencial del TUS como un enfoque innovador y eficiente para mejorar la seguridad y calidad de los productos lácteos.

Palabras clave: leche, termoultrasonificación, inactivación microbiana, propiedades fisicoquímicas, procesamiento de leche.

*Corresponding author. E-mail: gmrs@xanum.uam.mx;

<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio25569>

ISSN:1665-2738, issn-e: 2395-8472

1 Introduction

Conventional heat treatments (CHT), such as pasteurization and ultra-high-temperature processing, are widely employed in the food industry to eliminate pathogenic microorganisms and extend shelf life. However, these methods often degrade heat-sensitive nutrients and alter the physical and sensory characteristics of food products (Albenzio *et al.* 2012; Cadwallader & Singh, 2009). In response to these drawbacks, alternative technologies have been proposed to ensure microbial safety while minimizing physical, chemical, and nutritional losses. Emerging food processing technologies such as pulsed electric fields, high hydrostatic pressure, microfiltration, ultrasonication (US), and thermoultrasonication (TUS) offer promising alternatives to reduce thermal damage in liquid matrices and potentially complement conventional methods in the dairy industry (Cregenzán *et al.* 2014; Hernandez-Falcón *et al.* 2018; Sharma *et al.* 2014; Stratakos *et al.* 2019).

Among these technologies, US has been reported to be used at low (<1 W/cm²) or high (>1 W/cm²) intensities, with frequencies ranging from 20 to 500 kHz (Karlović *et al.* 2014). The US has demonstrated considerable utility in food processing, improving meat texture and aging, modifying physicochemical properties, and regulating enzymatic activity in bovine muscle (Castillo-Andrade *et al.*, 2025). Building on this, Loan *et al.* (2024) showed that US-assisted enzyme extraction of purple rice bran uses acoustic cavitation to accelerate mass transfer and alter plant cell structures, resulting in higher polyphenol recovery and faster reaction rates. Similarly, Obando-Galicia *et al.* (2024) reported that US or high-shear extraction with a food-grade soybean oil/lecithin system improves polyphenol recovery from the red pear shell of the cactus; the extracts were also tailored to match the rheology and microstructure of the oleo-gel. Additionally, Ramos-Villacob *et al.* demonstrated that complexing lauric acid with amylose in cassava starch promotes V-type inclusion complexes by enhancing diffusion and inducing transient disorder, enabling quicker kinetics and more precise control of functionality. Under specific conditions, however, this technology may degrade nutrients and produce undesirable flavor compounds due to the formation of peroxides and lipid oxidation products (Chandrapala *et al.* 2012; Marchesini *et al.* 2015). To minimize these effects, US has been combined with other treatments, such as pressure (manosonication), heat and pressure (manothermosonication), or heat alone (TUS). Although the temperature in TUS can be controlled, potential effects on thermolabile components such as proteins and vitamins cannot be ruled out (Mahmoud *et al.*, 2022).

Compared to CHT, TUS has been shown to cause minimal changes in the nutritional properties, physical characteristics, antioxidant capacity, and enzymatic activity of fruits and vegetables and/or fermented beverages derived from blackberry, apple, strawberry, mango, carrot, beet, almond, cactus fruit, aguamiel, and milk (Cervantes-Elizarrarás *et al.*, 2017; Cruz-Cansino *et al.*, 2015; Hernández-Falcón *et al.*, 2018; Parreiras *et al.*, 2020; Zafra-Rojas *et al.*, 2023). The consumption of liquid cow's milk remains an integral part of the human diet due to its content of high-biological-value proteins, calcium, essential fatty acids, amino acids, fats, water-soluble vitamins, and various bioactive compounds that play crucial roles in multiple biochemical and physiological processes (Albenzio *et al.*, 2016).

In recent years, several studies have investigated TUS as a promising technique to improve the microbiological quality, rheological properties, and bioavailability of nutritional compounds in raw cow's milk (RCM), positioning it as a potential alternative for the dairy industry. This study aimed to evaluate the changes induced by TUS in raw milk intended for human consumption. Although some studies have reported temperatures exceeding the thermal threshold (>50 °C) during the US processing of RCM, none have surpassed the temperatures typically associated with CHT.

This review synthesizes current evidence from studies examining the application of TUS to RCM intended for direct human consumption. Only investigations that applied TUS directly to RCM were included, thereby ensuring that the analysis remains focused on the specific challenges and outcomes associated with unheated dairy matrices (Annandarajah *et al.*, 2018; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008, 2009a, 2009b, 2011; Deshpande & Walsh, 2021; Dhiny *et al.*, 2023; Herceg *et al.*, 2012; Hernández-Falcón *et al.*, 2018; Vijayakumar *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2020). Focusing on RCM enhances comparability and industrial relevance for three main reasons: (1) cow's milk is the most widely consumed and processed worldwide, supported by standardized supply chains; (2) native microbial and enzymatic profiles differ among species, potentially affecting the comparability of microbial log reductions and product stability; and (3) from both regulatory and technological perspectives, parameters validated in bovine milk are directly applicable to the dominant dairy sector (Cimmino *et al.*, 2023; Marangoni *et al.*, 2019). Overall, this approach enables a more rigorous assessment of how TUS influences microbial safety and physicochemical quality in the most commercially significant dairy matrix. The objective of this review is to consolidate existing knowledge on the sensorial, functional, and microbiological implications of TUS, to evaluate its advantages relative to CHT, and to identify current research gaps and future directions in dairy

processing.

2 Conventional heat treatment of raw cow's milk

CHT, such as pasteurization and ultra-high-temperature (UHT) processing, are commonly used to eliminate pathogenic microorganisms and preserve food, although they often lead to nutrient losses (Cadwallader & Singh, 2009). Pasteurization, typically referred to as high-temperature short-time (HTST), raises the temperature of RCM to 72 °C for 15 seconds, effectively inactivating pathogens such as *Coxiella burnetii*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*, and *Mycobacterium tuberculosis* (Bastam *et al.* 2021). In contrast, UHT treatments raise the temperature to 135 °C for 2–4 seconds, producing commercially sterile milk and extending shelf life for several months at ambient temperature (Bai *et al.* 2023). Although these thermal processes are effective for microbial inactivation, they often cause thermal damage to heat-sensitive components, thereby altering nutritional quality and affecting the sensory attributes of the final product (Lucey *et al.* 2022).

3 Principles and mechanisms of thermoultrasonication

TUS, also referred to as thermosonication, thermoultrasound, or thermosound, typically involves a control panel, an ultrasonic probe, and a temperature-controlled recirculating bath (Figure 1). This technology stands out as a sustainable alternative due to its energy efficiency, operational simplicity, and low environmental impact. Additionally, it reduces processing time while enhancing food quality and shelf life. Automated systems can further optimize labor and production costs (Akdeniz & Akalin, 2022; Arvanitoyannis *et al.* 2017).

TUS occurs when US is applied in combination with moderate temperatures (often <55 °C) (Bariya *et al.* 2023). The underlying principle of this technique is acoustic cavitation, in which sound waves oscillating at frequencies typically between 20 and 40 kHz generate microscopic vapor bubbles in the liquid medium (Asaithambi *et al.* 2022). These bubbles expand and grow during wave oscillations until they reach a resonant size, at which point they collapse due to alternating pressure cycles, releasing localized energy and generating shock waves (Crudo *et al.* 2014). This intense mechanism can disrupt cell membranes, facilitate the release of nutritionally



Figure 1. Equipment for thermoultrasonication.

relevant compounds, and promote the formation of stable emulsions (Shen *et al.* 2017).

The US mechanism relies on piezoelectric transducers that convert electrical energy into high-frequency sound waves. When applied to a liquid such as milk, these waves generate alternating compression and rarefaction cycles, leading to acoustic cavitation. With increasing sound intensity, microbubbles are formed and undergo oscillation, expansion, and subsequent collapse. The implosion of these bubbles produces highly localized extreme conditions, including transient temperatures approaching 4,700 °C, pressures exceeding 100 MPa, and intense shear forces (Zhang *et al.*, 2018).

When US is combined with heat, as in TUS, the efficiency of acoustic cavitation is markedly enhanced. Elevated temperatures reduce the viscosity and surface tension of the liquid, thereby facilitating microbubble formation, expansion, and collapse. This thermal contribution amplifies cavitation intensity, resulting in greater molecular disruption, improved emulsification, and accelerated microbial inactivation. The synergistic interaction between thermal energy and US thus enables more effective modifications of food structure and functional properties, ultimately leading to optimized processing outcomes.

Other effects of TUS include enzyme inactivation, microbial reduction, and nutrient preservation due to lower processing temperatures (Villamiel & De Jong, 2000). These outcomes contribute to enhanced nutritional properties, minimized loss of heat-sensitive components, reduced development of cooked flavors, and minimal adverse effects on texture or appearance (Binti-Maklin *et al.* 2025). Additional studies on goat milk have shown increased solubility of calcium and phosphorus, while in camel milk cream, a reduction in fat globule size has been observed, positively affecting

product stability, viscosity, adhesiveness, and hardness (Kashaninejad & Razai, 2020; Ragab *et al.* 2019).

Despite these advantages, TUS may present some limitations, such as the potential generation of free radicals and modifications in the structure and texture of foods, which are matrix-dependent (Pérez-Andrés *et al.* 2018).

4 Thermoultrasonication of raw cow's milk

The studies published between 2008 and 2024 included in this review were conducted in various geographical regions: Canada (Wang *et al.*, 2022), China (Zhou *et al.*, 2021), Croatia (Herceg *et al.*, 2012), Indonesia (Dhiny *et al.*, 2023), Mexico (Hernández-Falcón *et al.*, 2018), and the USA (Annandarajah *et al.*, 2018; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008, 2009a, 2009b, 2011; Deshpande & Walsh, 2021; Vijayakumar *et al.*, 2015). All studies applied high-intensity US simultaneously with heat, either in batch or continuous systems, using amplitudes

between 30% and 100%, temperatures ranging from 15 °C to 72 °C, and treatment durations between 0.25 and 30 minutes. Most protocols adhered to the moderate temperature regime typically associated with TUS; increases beyond this range were only reported in two studies, which documented temperatures between 29–55 °C and 20–71 °C, respectively (Hernández-Falcón *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). The operating parameters are summarized in Table 1, which provides a comparative overview of US intensity, frequency, treatment duration, and thermal strategies, thereby illustrating the variability in TUS implementations and their potential effects on processing outcomes. While most studies included comparisons with CHT, Wang *et al.* (2022) and Herceg *et al.* (2012) did not report any direct comparative analyses. Table 2 summarizes the principal variables assessed across microbiological, physicochemical, and proximate composition domains, together with the changes associated with TUS application. Under certain conditions, TUS consistently reduced microbial counts, altered physicochemical properties, and modified techno-functional attributes (Table 3).

Table 1. TUS¹ conditions in the included studies.

Water bath	Temperature (°C)		Time (min)	Amplitude (%)	kHz ²	Watts	Reference
	Initial	Final					
72	15 – 75	15 – 75	1	100	20	140	Annandarajah <i>et al.</i> (2018)
65	63	63	10 – 30	100	24	400	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2008)
65	63	63	30	100	24	400	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
65	63	63	30	30 – 100	24	400	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009b)
57	63	63	10 – 30	100	24	400	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2011)
72	20 – 25	67 – 72	0.11 – 0.19	90	–	168 – 180	Deshpande & Walsh, (2021)
55	–	60	5 – 20	–	20 – 22	365	Dhiny <i>et al.</i> (2023)
–	40 – 60	40 – 60	6 – 12	50 – 100	20	600	Herceg <i>et al.</i> (2012)
45	29 – 31	48 – 55	10 – 15	95	20	1500	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
72	65	–	1 – 3	100	20	115	Vijayakumar <i>et al.</i> (2015)
90	63	–	1 – 9	–	25	400	Wang <i>et al.</i> (2022)
–	55 – 63	–	315 – 30	–	20	200 – 400	Zhou <i>et al.</i> (2021)

¹TUS: termoultrasonication, ²kHz: kilohertz.

Table 2. CHT¹ conditions in the included studies.

Temperature (°C)	Time (min)	Reference
72	0.25	Annandarajah <i>et al.</i> (2018)
65	30	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2008)
65	30	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
63	30	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009b)
65	30	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2011)
72	0.11 – 0.19	Deshpande & Walsh (2021)
65	30	Dhiny <i>et al.</i> (2023)
NI ²	NI ²	Herceg <i>et al.</i> (2012)
85	0.25	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
72	1 – 3	Vijayakumar <i>et al.</i> (2015)
NI ²	NI ²	Wang <i>et al.</i> (2022)
63/121	30/0.25	Zhou <i>et al.</i> (2021)

¹CHT: conventional heat treatment, ²NI: not indicated.

Table 3. Summary of variables examined in the included studies and their observed changes.

Variables				
Microbiology	Physicochemical	Proximate analysis	Other	Reference
–	–	–	Plasmin (↓)	Annandarajah <i>et al.</i> (2018)
–	Color (↑), fat globule size (↓)	Fat (↑)	–	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2008)
Mesophilic aerobic (↓)	pH (↓), color (↑), density (↓), acidity (↑)	Fat (↑), protein (↓), NFS ¹ (↓)	–	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
<i>L. innocua</i> (↓), mesophilic bacteria (↓)	Color (↑), pH (↓), acidity (↑)	Fat (↑), protein (↓)	–	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009b)
<i>L. innocua</i> (↓)	–	–	–	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2011)
<i>G. stearotherophilus</i> (↓)	pH (↑)	–	FFAs ⁴ (↓)	Deshpande & Walsh, (2021)
<i>E. coli</i> (↓)	pH (↓), viscosity (↓)	Fat (↑), Protein (↓)	–	Dhiny <i>et al.</i> (2023)
<i>E. coli</i> (↓), <i>S. aureus</i> (↓)	–	–	–	Herceg <i>et al.</i> (2012)
Mesophilic aerobic (↓), enterobacteria (↓)	pH (↓), color (↑), density (↓), stability (↑), acidity (↑)	NFS (↑), TS (↑)	AFM1 ³ (↓), antioxidants (↑)	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
Total aerobic (↓), coliform count (↓)	Color (↑), fat globule size (↓), viscosity (↑)	–	Sensory evaluation, plasmin (↑)	Vijayakumar <i>et al.</i> (2015)
–	–	Protein (↑)	Enzymatic digestion (↑)	Wang <i>et al.</i> (2022)
<i>S. aureus</i> (↓)	pH (↓), color (↑), particle size (↓)	Protein (↓)	–	Zhou <i>et al.</i> (2021)

¹NFS: nonfat solid. ²TS: total solid. ³AFM1: aflatoxin M1. ⁴FFAs: free fatty acids. ↑: increase of the variable. ↓: decrease of the variable.

5 Impact of thermoultrasonication on milk microstructure and component functionality

TUS alters casein micelles and their spatial organization, two critical factors in firm gel formation and structural integrity of dairy matrices. It also enhances micellar interactions and promotes cross-linking, resulting in more stable and consistent gels that improve the texture of products such as yogurt and cheese (Ragab *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2021). Silva, Zisu & Chandrapala (2018) refined this view by showing that the effect of US on micelles depends on the casein-to-whey protein ratio: in casein-dominant systems, sonication reduces particle size by promoting aggregate reorganization through exposure of hydrophobic regions, whereas in formulations with a higher serum fraction, primary aggregates are formed via disulfide bonds involving κ -casein and whey proteins, thereby altering micellar architecture and functional interactions.

TUS enhances interactions between casein micelles primarily by inducing conformational changes and rearrangements within the protein matrix, which promote greater connectivity and cohesion of the gelling network. Acoustic cavitation exposes hydrophobic regions and free sulfhydryl groups, favoring hydrophobic interactions and the formation of

disulfide bonds between caseins and between caseins and whey proteins. These molecular events densify the network and increase gel firmness (Shanmugam *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2021; Pérez-Andrés *et al.*, 2018). Such effects translate into functional improvements, including increased resistance to syneresis, shorter acid gelation times, and improved elasticity of fermented milk gels, attributable to a more interconnected and stable micellar network (Reiter *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2014). Hemar *et al.* (2020) further demonstrated that high-power US could moderately reduce the apparent size of reconstituted micelles without disrupting their internal structure, suggesting surface compaction that enhances structural density. In mixed protein systems, US facilitates complementary protein–protein interactions that further strengthen the network, as observed in combinations of casein with other proteins (Nascimento *et al.*, 2023; Yuno-Ohta *et al.*, 2020).

6 Microbiological effects of thermoultrasonication on raw cow's milk

In RCM, it is important to recognize that pathogenic microorganisms such as *Brucella abortus* and *Mycobacterium* sp may be present within the dairy chain and pose significant public health concerns

(Ninković et al., 2024; Ullah et al., 2024). Tavsanlı et al. (2022) evaluated the effect of low-frequency US on the microbiota of raw goat milk inoculated with *Brucella melitensis*, reporting reductions exceeding 2 log CFU after 10 min of treatment at 20 kHz and 400 W. Similarly, Al Bsoul et al. (2010) investigated the effectiveness of US against *Mycobacterium* sp 6PY1, achieving >3 log reductions in cell density in aqueous suspension after 15 min of sonication at 20 kHz and 0.5 W/mL.

Under controlled conditions, TUS can achieve microbial reductions approaching sterilization. At US powers of 200–250 W, damage to the cell wall and membrane is intensified, leading to intracellular leakage. At 300 W, severe rupture occurs, with large cavities and fragmentation of the cell wall (Jiang et al., 2024). The extent of membrane disruption correlates positively with ultrasonic power density. Cavitation increases membrane permeability, allowing the entry of macromolecules and resulting in leakage of intracellular contents and damage to organelles, enzymes, and nucleic acids (Ahmad et al., 2023). In dairy matrices, multiple studies have demonstrated multilogarithmic microbial reductions consistent with these mechanisms. Under optimized conditions, no detectable growth has been observed following treatment and during refrigerated storage (Bermúdez-Aguirre et al., 2011; Hernández-Falcón et al., 2018; Dhiny et al., 2023). Nevertheless, sterilization efficacy is influenced by initial microbial load, reactor geometry, energy density, and matrix composition. Thus, pilot- and industrial-scale validations, along with regulatory frameworks defining process criteria and microbiological verification, are necessary.

Research summarized in Table 4 presents the application of TUS for microbial reduction, comparing pre- and post-treatment levels in RCM. For context, conventional HTST achieves >5 log reductions in indicator pathogens such as *Escherichia coli* and *Listeria* spp., while UHT treatment achieves commercial sterility levels (>6 log reductions) across a wide range of microorganisms (Cadwallader & Singh, 2009; Bai et al., 2023).

TUS treatments demonstrated effectiveness equal to or greater than that of traditional HTST in inactivating fecal contamination indicators and other pathogenic bacteria, including *E. coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and Enterobacteriaceae (Bermúdez-Aguirre et al., 2008, 2009a, 2009b; Deshpande & Walsh et al., 2021, Dhiny et al., 2023; Herceg et al., 2012; Hernández-Falcón et al., 2018; Vijayakumar et al., 2015; Zhou et al., 2021).

Escherichia coli exhibited marked sensitivity to TUS, with reductions of up to 3.07 log CFU/mL, accompanied by pronounced structural damage to the cell envelope, including multiple cracks, fractures, and outward bulging, as well as alterations in milk viscosity and fat composition (Dhiny et al., 2023; Herceg et

al., 2012). Mechanistic studies further demonstrate that cavitation induces severe membrane disruption, characterized by extensive cracking, fracturing, and outward deformation of the cell membrane, thereby confirming the destructive effects of acoustic cavitation on *E. coli* integrity (Lin et al., 2019). *Listeria innocua* was reduced by more than 5 log CFU/mL after 10 minutes of TUS at 63 °C, while CHT achieved only a 3 log CFU/mL reduction under similar conditions (Bermúdez-Aguirre et al. 2009b, 2001). *Staphylococcus aureus* was completely inactivated in milk subjected to TUS for 7.5 minutes at 63 °C highlighting the microbicidal potential of the combined treatment (Bastam et al. 2021; Arvanitoyannis et al., 2017). Additionally, mesophilic bacteria and the native microbiota experienced significant reductions, and in some cases, no microbial growth was detected after 15 days of refrigerated storage post-treatment (Hernández-Falcón et al., 2018, Bermúdez-Aguirre et al., 2009a, 2009b).

In a continuous-flow system, such as the one studied by Deshpande & Walsh (2020), the antimicrobial effect of TUS was consistent, showing reductions in both native microbiota and thermophilic bacteria. Although this study did not report detailed measurements of the initial pathogen loads, the findings suggest that, under optimized conditions, TUS can be as effective as CHT in microbial inactivation.

The effectiveness of TUS is strongly influenced by the structural characteristics of bacterial cell envelopes. In Gram-negative bacteria, the lipopolysaccharide-rich outer membrane combined with a thin peptidoglycan layer in the periplasmic space renders them particularly susceptible to shear forces, pressure pulses generated by cavitation, and oxidative stress caused by reactive oxygen species such as hydrogen peroxide produced during bubble collapse (Herceg et al., 2012; Li et al., 2019). By contrast, Gram-positive bacteria possess a thick (20–80 nm) peptidoglycan cell wall reinforced with peptide cross-bridges, which increases structural rigidity and provides greater resistance even against reactive species (Vadillo-Rodríguez & Dutcher, 2011; Zupanc et al., 2019). Under typical thermal conditions of TUS, increasing vapor pressure together with decreasing surface tension and viscosity of the medium enhances cavity formation and collapse, thereby intensifying microbial inactivation at temperatures approaching those of CHT, with Gram-negative bacteria displaying notably higher susceptibility (Ugarte-Romero et al., 2007).

For mesophilic aerobic microorganisms, higher ultrasonic amplitudes result in greater CFU reductions. Cavitation imposes a combination of mechanical, thermal, and chemical stresses. The implosion of microbubbles generates shear forces that disrupt cell membranes, alter permeability, and may lead to partial or complete lysis.

Table 4. Reducing microbial count (CFU/mL¹) in RCM² after TUS³ application.

Microorganism	CHT ⁴	TUS ²	Reference
<i>Aerobics totals</i>	1.86	1.86	Vijayakumar et al. (2015)
<i>Aerobic mesophilic</i>	~3.00	~0.30 - 2.20	Hernández-Falcón et al. (2018)
<i>Coliforms</i>	>3.60	>3.60	Vijayakumar et al. (2015)
<i>Enterobacteriaceae</i>	~4.3	~ 1.2 - 3.32	Hernández-Falcón et al. (2018)
<i>Mesophilic bacteria</i>	3.00 1.89- 3.75	3.00 0.53 – 4.25	Bermúdez-Aguirre et al. (2008) Bermúdez-Aguirre et al. (2009b)
<i>E. coli</i>	1.54 – 2.44 2.90	1.92 – 3.07 ~4.68	Herceg et al. (2012) Dhiny et al. (2023)
<i>L. innocua</i>	0.50 – 5.0 5.30	5.00 – 6.00 ~5.50	Bermúdez-Aguirre et al. (2011) Bermúdez-Aguirre et al. (2009b)
<i>S. aureus</i>	0.09 – 0.94 3.25	0.39 – 1.49 4.19	Herceg et al. (2012) Zhou et al. (2021)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0.05 – 0.37	0.26 – 0.54	Deshpande & Walsh (2021)

¹CFU/mL: log₁₀ colony-forming unit per milliliter. ²RCM: raw cow's milk. ³TUS: thermoultrasonication ⁴CHT: conventional heat treatment.

Simultaneously, the dissociation of water molecules produces hydrogen and hydroxyl radicals, while additional reactive oxygen and nitrogen species—including hydrogen peroxide, nitric oxide, and nitrous acid—are formed. These species induce oxidative stress, contributing to protein denaturation and the degradation of intracellular components (Furuta et al., 2004; Tsukamoto et al., 2004; Zhang et al., 2018). Moreover, TUS modifies surface electrostatic properties and destabilizes extracellular polymeric substances, thereby reducing adhesion and biofilm formation and diminishing microbial protection (Kentish & Feng, 2014; Ojha et al., 2017). These effects are further amplified by elevated temperatures, which accelerate bubble formation and pore development in membranes, ultimately causing rupture and leakage or accumulation of cytoplasmic material (Bermúdez-Aguirre et al., 2011).

7 Effects on physicochemical characteristics

Most authors reported a moderate pH decrease after treatments at 60–65 °C, without compromising colloidal stability or sensory properties; final pH values stayed within acceptable ranges for fluid milk products (Bermúdez-Aguirre et al. 2008, 2009b; Deshpande & Walsh, 2021; Hernández-Falcón et al. 2018; Zhou et al. 2021). Cavitation during TUS often raises the local temperature, likely contributing observed acidification. Additional pH changes during storage may come from acid metabolites produced surviving microorganisms, potentially linked to lipolysis (Bermúdez-Aguirre et al. 2009b) or from formation of carboxyl groups after TUS-induced molecular changes (Li et al. 2019). These processes can cause variations in the proximate

composition reported in some studies (Bermúdez-Aguirre et al. 2008, 2009a).

Regarding color, multiple studies reported an increase in whiteness (L^*) and a reduction in particle size (Bermúdez-Aguirre et al. 2008, 2009a, Hernández-Falcón et al. 2018; Zhou et al. 2021). The color increase specifically refers to higher luminosity (L^*), not a change in hue (a^*) or yellowish/bluish (b^*). Color is a key factor in consumer acceptance of milk and is related to the dispersion of fat globules and casein micelles (Owen et al. 2001). Light reflection is enhanced by reduced fat globule size and protein denaturation caused by TUS-induced homogenization, making milk appear whiter (Gaucher et al. 2008; Li et al. 2019).

Protein denaturation under TUS predominantly affects membrane-associated proteins, particularly xanthine oxidase and butyrophilin, thereby weakening the integrity of the milk fat globule membrane (MFGM) (Zhao et al., 2024). Gregersen et al. (2019) reported that high-intensity US combined with moderate temperatures (50–70 °C) and intermediate power levels (30–50 W) can denature up to 40% of the major whey proteins β -lactoglobulin and α -lactalbumin, demonstrating that both acoustic energy and heat contribute significantly to protein destabilization. Cavitation also disrupts the fat globule membrane, promoting the adhesion of casein micelles and the formation of a granular interfacial network, which enhances emulsion stability and improves product texture (Gaucher et al., 2008; Li et al., 2019; Villamiel & De Jong, 2000).

TUS reorganizes protein–lipid interactions, thereby strengthening emulsion stability. Cavitation reduces the size of fat globules, increasing surface area and facilitating efficient adsorption of casein micelles and whey proteins. These proteins anchor to exposed lipid surfaces through hydrophobic and electrostatic interactions; polar residues such as lysine and glutamic acid interact with phospholipid head groups,

reinforcing the interfacial layer. The resulting network enhances colloidal stability, reduces creaming, and improves viscosity and uniformity—parameters critical for producing high-quality dairy products (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008; Ragab *et al.*, 2019).

Conversely, studies assessing lipid fractions have not detected significant changes in free fatty acid concentration or total fat content following TUS treatment, confirming lipid stability under the evaluated conditions (Deshpande & Walsh, 2021; Hernández-Falcón *et al.*, 2018). Nevertheless, disruption of the MFGM during TUS exposes the triglyceride core, enabling casein micelle adhesion and the development of a granular interfacial structure that contributes to improved emulsion stability (Villamiel & De Jong, 2000).

An increase in viscosity was observed in studies using higher amplitudes (100%) or extended treatment times (>10 min), attributed to interactions between protein and lipid fractions induced by localized shear forces (Dhiny *et al.* 2023). No signs of phase separation, gel formation, or sedimentation were reported, even after 15 days of storage (Annandarajah *et al.* 2018; Deshpande & Walsh, 2021; Hernández-Falcón *et al.* 2018; Vijayakumar *et al.* 2015). TUS also improved emulsion stability by reducing particle size through cavitation (Bermúdez-Aguirre *et al.* 2008; Hernández-

Falcón *et al.* 2018). These results indicate that TUS enhances milk functionality without compromising its essential properties.

8 Proximate analysis after thermoultrasonication

Several studies assessed the proximate composition of RCM following TUS by measuring fat, total protein, non-fat solids (NFS), and total solids (TS) (Table 5) (Bermúdez-Aguirre *et al.* 2008, 2009a; Dhiny *et al.* 2023; Hernández-Falcón *et al.* 2018; Wang *et al.* 2022; Zhou *et al.* 2021). In most studies, protein content was not significantly affected, indicating that protein denaturation was not detectable under the evaluated conditions (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009a, 2009b; Zhou *et al.*, 2021). For instance, total protein quantification by nitrogen determination (Kjeldahl or Dumas methods) is insensitive to conformational changes, and thus partial denaturation induced by cavitation may occur without affecting total protein values. The variations observed in some measurements likely reflect changes in solubility, recovery efficiency, or artefacts associated with colorimetric assays, rather than a true loss of protein mass.

Table 5. Effect of TUS¹ on the physicochemical and proximate analysis of RCM².

Parameter	Physicochemical properties		
	CHT ³	TUS ¹	Reference
pH	6.74 ± 0.06	6.67 ± 0.06 – 6.71 ± 0.06	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
	6.74 ± 0.06	6.61 ± 0.01 – 6.66 ± 0.05	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
	6.74 ± 0.06	6.61 ± 0.01 – 6.66 ± 0.05	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009b)
	6.82 ± 0.02	6.80 – 6.85	Deshpande & Walsh (2021)
Acidity (%)	6.71 ± 0.04	6.66 ± 0.02	Zhou <i>et al.</i> (2021)
	0.20 ± 0.05	0.19 ± 0.04 – 0.20 ± 0.05	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
	0.126 ± 0.008	0.136 ± 0.012 – 0.14 ± 0.00	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
Density (g/mL)	0.126 ± 0.008	0.136 ± 0.012 – 0.146 ± 0.00	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009b)
	1.032 ± 0.00	1.032 ± 0.00	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
Viscosity (mPa/s)	1.0317 ± 0.0010	1.026 ± 0.001 – 1.026 ± 0.00	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
	1.41 ± 0.14 – 1.42 ± 0.14	1.39 ± 0.00 – 1.60 ± 0.05	Vijayakumar <i>et al.</i> (2015)
Stability (%)	~ 96.2	~ 96.25–97.19	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
Proximate analysis properties			
Fat (%)	4.22 ± 0.02	4.24 ± 0.02	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2008)
	4.22 ± 0.02	4.21 ± 0.04 – 4.29 ± 0.05	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
	4.22 ± 0.02	4.21 ± 0.04 – 4.29 ± 0.05	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009b)
Protein (%)	3.55 ± 0.01	3.00 ± 0.01 – 3.04 ± 0.03	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2008, 2009a)
	2.53 ± 0.38 – 3.02 ± 0.16	3.22 ± 0.16	Zhou <i>et al.</i> (2021)
NFS ³ (%)	8.60 ± 0.40	8.63 ± 0.41 – 8.67 ± 0.54	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)
	9.50 ± 0.03	8.03 ± 0.04 – 8.36 ± 0.43	Bermúdez-Aguirre <i>et al.</i> (2009a)
TS ⁴ (%)	11.59 ± 0.40	11.62 ± 0.40 – 11.67 ± 0.54	Hernández-Falcón <i>et al.</i> (2018)

¹TUS: thermoultrasonication. ²RCM: raw cow's milk. ³CHT: conventional heat treatment. ³NFS: nonfat solids. ⁴TS: total solid.

Fat content, by contrast, was reported to increase by approximately 5%. In one study, TUS applied at 400 W, 24 kHz, and 100% amplitude for 30 min reduced the mean fat globule diameter to approximately 1 μm . Mechanistically, cavitation disrupts fat globule aggregates into triacylglycerol microdroplets, yielding a finer and more homogeneous lipid dispersion and thereby increasing the fraction of dispersed and analytically recoverable lipids (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008). Consequently, the altered size distribution of fat droplets results in a modestly higher measured fat content (~5%), even though the total lipid mass in the system remains unchanged (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008, 2009a, 2009b; Dhiny *et al.*, 2023). TS and NFS values remained stable, showing no significant differences compared to CHT, indicating that TUS does not compromise the chemical integrity of RCM (Hernández-Falcón *et al.* 2018).

9 Functional and technological properties

TUS has also been shown to enhance the hydrolysis of soluble proteins when treated with pepsin and pancreatin (Wang *et al.*, 2022). This effect is driven by significant conformational changes in milk proteins, including partial unfolding of tertiary structures, increased exposure of hydrophobic residues and peptide bonds, and disruption of intramolecular hydrogen and disulfide bonds. These structural modifications improve the accessibility of digestive enzymes to cleavage sites, thereby accelerating enzymatic hydrolysis. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy revealed a decrease in α -helix content accompanied by an increase in β -sheet and random coil structures, consistent with enhanced enzymatic binding and fragmentation efficiency (Wang *et al.*, 2022).

US -assisted enzymatic hydrolysis benefits from several mechanistic improvements, as reviewed by Qian *et al.* (2023). Cavitation enhances mass transfer by disrupting boundary layers, reducing particle size, and increasing surface area. US may also induce subtle conformational changes in enzyme molecules, improving flexibility and catalytic efficiency without compromising the integrity of active sites. Optimal US parameters (20–40 kHz, 100–500 W) have been reported to reduce hydrolysis times by up to 30%, increase the degree of hydrolysis by 10–20%, and generate bioactive peptides with enhanced functional properties (Yang *et al.*, 2018; Balthazar *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2018; Magalhães *et al.*, 2022). These findings suggest that integrating US into enzymatic protocols can significantly improve protein degradation and produce peptides with targeted bioactivities relevant

to dairy applications.

The microstructural changes induced by TUS also result in techno-functional improvements, including increased protein solubility, higher emulsifying capacity, and improved gel stability in fermented products, with minimal differences in flavor, aroma, or mouthfeel compared with CHT (Abesinghe *et al.*, 2019; Zlatev *et al.*, 2018; Vijayakumar *et al.*, 2015). In a sensory evaluation involving a trained panel ($n = 8$), participants used a triangle test to characterize odor attributes and quantify intensities on a 15-cm scale. Panelists generally rated TUS-treated milk as acceptable, with no significant sensory drawbacks (Vijayakumar *et al.*, 2015). In addition, Vijayakumar *et al.* (2015) and Annadarajah *et al.* (2018) reported that TUS inactivated over 90% of plasmin, maintaining low activity through 49 days of storage. This inactivation is relevant for commercial shelf life, particularly in UHT milk, where plasmin degradation of caseins produces hydrophobic peptides associated with bitterness, viscosity changes, and protein destabilization. Controlling plasmin activity thus contributes to flavor and texture preservation during storage (7–14 days for HTST milk) (Bui *et al.*, 2021). However, in cheese manufacture, plasmin plays a key role in proteolysis during ripening; therefore, its inactivation should be adjusted according to cheese type and ripening objectives (Vélez *et al.*, 2016; France *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024).

Beyond microbiological and physicochemical changes, TUS also affects sensory attributes and product stability through interconnected structural and molecular processes. Treated milk generally exhibits increased whiteness (L^*), smoother texture, and higher viscosity, primarily due to reduced fat globule size and enhanced protein–lipid interfacial stability (Zhou *et al.*, 2021; Gou *et al.*, 2023). Under moderate conditions, flavor remains comparable to HTST; however, high-intensity treatments (e.g., 200 W for 2 min) may produce subtle off-flavors described as gummy, burnt, or foreign, likely associated with whey protein unfolding and mild lipid oxidation (Pérez-Andrés *et al.*, 2018). Overall, sensory panels have consistently rated TUS-treated milk as acceptable when processing parameters are properly optimized (Vijayakumar *et al.*, 2015).

9.1 Shelf-life and stability under refrigeration

TUS extends the refrigerated shelf life of RCM by inhibiting microbial regrowth and maintaining physicochemical stability. Hernández-Falcón *et al.* (2018) observed stable microbial counts for up to 15 days at 4 °C without phase separation or sedimentation. Other studies reported that TUS-treated milk preserved its pH and fat quality over similar periods (Deshpande

& Walsh, 2021; Hernández-Falcón *et al.*, 2018). At the molecular level, cavitation exposes hydrophobic amino acid residues and free sulfhydryl groups in proteins such as β -lactoglobulin and generates low levels of reactive species, including lipid hydroperoxides. These modifications enhance interfacial behavior and structural functionality; however, if TUS parameters are not properly controlled, mild oxidative reactions may occur, leading to subtle sensory changes (Astráin-Redín *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2018). Nevertheless, oxidative stability is generally maintained under optimized conditions, with no significant increases in FFAs or off-flavor development (Shokri *et al.*, 2022).

FTIR (post-treatment TUS) analysis of the Amide I band confirmed TUS-induced alterations in secondary protein structure, characterized by increased α -helix and random coil content at the expense of β -sheets and β -turns. While these spectra reflect the overall protein matrix rather than specific proteins, whey proteins such as β -lactoglobulin are particularly susceptible to denaturation. Such modifications may reduce immunoglobulin E binding and allergenicity, while also enhancing the digestibility of casein fractions (Ehn *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2022).

TUS has also been reported to reduce aflatoxin M1 (AFM1) content, potentially through structural modifications in the lactone or furan rings (Mortazavi *et al.* 2015). This reduction was associated with an increase in phenolic content and antioxidant activity (Hernández-Falcón *et al.* 2018). One study noted that the increase in antioxidant activity may result from weakened Van der Waals forces, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions, leading to the release of phenolic compounds into the medium (Hassam *et al.* 2013).

10 Methodological limitations and experimental constraints

Although the overall evidence highlights the potential of TUS, the comparability and generalizability of findings are constrained by methodological heterogeneity among the reviewed studies. Key challenges for rigorous synthesis include variations in amplitude (30–100%), frequency (20–40 kHz), temperature (15–72 °C), sample volume, probe design, and treatment duration (0.25–30 min), as well as differences between batch and continuous applications, thermal control strategies, measurement of initial microbial loads, and inadequate characterization of the milk matrix. Several studies also lack sufficient replication or appropriate thermal controls, making it difficult to distinguish the specific contributions of TUS from temperature-related effects. Furthermore, few investigations report complete energy profiles,

acoustic transfer efficiency, or scaling parameters, which hampers the assessment of industrial relevance. In addition, the absence of systematic analyses of oxidative by-products and markers of protein damage limits the capacity to balance potential risks against technological benefits. Most studies were conducted on a laboratory or pilot scale, with limited reproduction in industrial environments (Table 2). The survey by Deshpande & Walsh (2021) is a notable exception, as it assessed a continuous flow system on a small scale.

Further validation is necessary to translate these promising findings into industrial practice. Regulatory approval will also require reproducible data on microbial inactivation, enzyme activity reduction, and possible formation of toxic by-products. Additionally, new research into energy consumption and cost-effectiveness will help determine whether TUS offers economic advantages over traditional CHT.

11 Toward practical adoption in the dairy sector

The application of TUS to RCM aligns with current trends in the dairy industry, which seek to ensure microbial safety while preserving nutritional and sensory quality. The synergy between ultrasonic cavitation and moderate temperatures presents a promising option for processing raw milk and developing specialized dairy products that benefit from partial homogenization, extended shelf life, or reduced contaminants such as AFM1. However, practical adoption requires thorough pilot-scale experimentation, robust engineering for high-throughput systems, and full regulatory compliance. Integration into existing production lines, potentially before or after cream separation, must be carefully designed to avoid unwanted homogenization that could lead to rancidity if lipase activity remains high. Despite these challenges, the potential of TUS as an energy-efficient, environmentally friendly technology capable of improving final product quality highlights its promise in future dairy operations.

Although this review focuses on studies applying TUS directly to RCM, related research provides complementary insights. For example, Gautam *et al.* (2025) examined the effects of TUS on the plasmin system in buffalo milk, observing structural changes in proteolytic pathways that may also apply to cow's milk, albeit with species-specific matrix differences. Furthermore, recent work on US energy density and modulation modes (continuous versus pulsed) in fresh cow's milk without combined heating demonstrated significant effects on microbial, physicochemical, and techno-functional properties. While these findings fall outside the strict definition of TUS, they underscore

the importance of standardizing energy input and wave characteristics to improve reproducibility. Overall, structural and functional modifications induced by TUS enhance microbial safety and improve techno-functional properties of milk (emulsification, gelation, texture), positioning it as a promising tool for next-generation dairy products.

Building on the mechanisms described above, the advantages and limitations of TUS relative to CHT can be outlined. Comparative studies show that TUS achieves microbial reductions equal to or greater than those of HTST or UHT, while better preserving thermolabile compounds such as vitamins, bioactive peptides, and native enzymes, and maintaining the colloidal integrity of milk—attributes that support clean-label formulations (Wang et al., 2022; Shen et al., 2017). These features give TUS a clear advantage in final product quality without compromising safety. Nevertheless, several operational challenges persist: precise control of parameters is required to avoid variability in cavitation distribution; prolonged treatments may increase energy consumption; and high intensities can generate undesirable flavors. To strengthen competitiveness against CHT, systematic comparisons under diverse raw milk conditions, harmonized regulatory criteria, and assessments of potential sub-lethal injury and microbial recovery are essential.

None of the included studies evaluated the effectiveness of TUS against *Brucella* sp. or *Mycobacterium* sp. in milk, highlighting a critical gap and an opportunity for future research to validate its capacity to inactivate these pathogens.

11.1 Scale-up and engineering considerations

Scaling TUS from laboratory to industrial systems presents several engineering challenges. Uniform cavitation distribution in larger volumes is hindered by acoustic attenuation, reflections, and dead zones; thus, reactor design must optimize transducer geometry, operating frequency, and sonication pattern (batch versus continuous flow) to ensure consistent energy densities. Thermal management must be integrated with US delivery to prevent hot spots and maintain synergy between acoustic and thermal effects. Real-time monitoring of acoustic energy density, effective temperature, and local intensity requires calibrated sensors or indirect methods (e.g., calorimetry, dissolution profiles), as the absence of robust metrics limits reproducibility and validation.

Continuous-flow systems offer advantages in scalability and uniformity compared to batch processes, but require balancing residence time, amplitude, and flow rate to ensure effective microbial inactivation while preserving product quality. Assessments of acoustic transfer efficiency and energy dissipation are essential at larger scales to optimize power usage

and minimize energy losses from reflections or poor coupling. Integration into existing production lines also demands compatibility with upstream and downstream processes (e.g., cream separation, homogenization), while practical considerations such as maintenance, clean-in-place procedures, and noise-resistant materials must be addressed.

11.2 Regulatory and safety validation

For widespread adoption, TUS must undergo rigorous regulatory review to confirm its safety and consistency. Establishing critical control parameters and acceptance criteria for microbial inactivation, potential toxic by-products (e.g., aflatoxins), and preservation of functional compounds is essential. Validation should include inter-laboratory studies and benchmarking against HTST, with assessments of pathogen reduction, sub-lethal injury, and microbial recovery. Comprehensive analyses of acoustic energy transfer, thermal profiles, and oxidation products are also needed to identify hidden risks and balance potential drawbacks against benefits. Documentation should adhere to international standards (e.g., Codex Alimentarius, FDA, EFSA) to facilitate global market acceptance.

11.3 Economics and adoption roadmap

Adoption of TUS in dairy plants depends on both its technological benefits and economic feasibility. Initial cost-benefit analyses should compare energy use per liter with HTST/UHT, accounting for potential savings in refrigeration from extended shelf life and reduced product loss. Investments in specialized equipment, online monitoring, and operator training must be weighed against gains in waste reduction, quality retention, and product differentiation (e.g., clean-label marketing, longer shelf life). A phased implementation is recommended: beginning with pilot studies integrated into existing lines, followed by development of performance indicators that combine technical and economic metrics, and eventually scale-up to optimized continuous systems. Validation groups comprising academia, industry, and regulators should be established to share data, mitigate risks, and accelerate standardization.

*An adoption roadmap may include:

1. **Standardization and multi-centre validation** – development of consensus protocols for TUS parameters (acoustic energy density, temperature profiles, residence time) and inter-laboratory studies to ensure reproducibility.
2. **Industrial-scale pilot studies** – combining engineering optimization (reactor geometry, continuous-flow designs, real-time monitoring)

with techno-economic assessments of energy use, product quality retention, and process robustness.

3. **Safety and quality frameworks** – validation schemes covering microbial inactivation kinetics (including sub-lethal effects), oxidative and structural changes, and sensory stability under real storage conditions, aligned with international guidelines.
4. **Application-specific optimization** – tailoring TUS regimes for products such as yogurt or cheese, with endpoints including gel strength, emulsion stability, and flavor retention.
5. **Stakeholder integration** – creation of consortia involving academia, industry, and regulators to share data, develop certification standards, and establish labelling strategies*.

Conclusions

The evidence indicates that TUS is a viable technology for treating RCM, achieving microbial reductions comparable to CHT. In contrast to heat-based methods, TUS preserves heat-sensitive nutrients, bioactive compounds, and colloidal integrity, thereby supporting desirable techno-functional properties. By coupling temperature control with acoustic cavitation, TUS provides safety benefits with reduced thermal damage, positioning it as an innovation for “quality preservation” rather than a mere alternative to HTST. However, significant hurdles remain in methodological standardization, regulatory validation, and market integration. Addressing these challenges is essential to transition TUS from promising laboratory findings to widespread industrial adoption.

Although the antimicrobial potential of TUS has been consistently demonstrated under laboratory conditions, several critical limitations restrict its broader application. The variability in experimental setups, including reactor geometry, transducer configuration, and amplitude calibration, introduces substantial heterogeneity in reported microbial inactivation levels, complicating cross-study comparisons. Furthermore, most investigations have been performed at bench scale using model systems or artificially inoculated milk, which may not accurately replicate the microbial diversity and load present in commercial dairy chains. The lack of standardized reporting of acoustic parameters, energy densities, and thermal profiles further hampers reproducibility and limits the development of predictive models. Consequently, while TUS shows promise as a non-thermal or minimally thermal alternative to CHT, systematic pilot-scale evaluations, harmonized

methodologies, and regulatory validation are essential before reliable industrial adoption can be achieved.

Acknowledgements

The author Monter-Arciniega acknowledges the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) from Mexico for its support through Fellowship No. 1077200.

References

- Abesinghe, A., Islam, N., Vidanarachchi, J.K., Prakash, S., Silva, K. and Karim, M.A. (2019). Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 90, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.10.006>
- Ahmad, F., Mohammad, Z.H., Zaidi, S. and Ibrahim, S. A. (2023). A comprehensive review on the application of ultrasound for the preservation of fruits and vegetables. *Journal of Food Process Engineering* 46(6), e14291. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14291>
- Akdeniz, V. and Akalın, A.S. (2022). Recent advances in dual effect of power ultrasound to microorganisms in dairy industry: activation or inactivation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62, 889–904. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1830027>
- Albenzio, M., Campanozzi, A., D’Apolito, M., Santillo, A., Mantovani, M.P. and Sevi, A. (2012). Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein allergy. *Small Ruminant Research* 105, 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.018>
- Albenzio, M., Santillo, A., Ciliberti, M.G., Figliola, L., Caroprese, M., Marino, R. and Polito, A. N. (2016). Milk from different species: Relationship between protein fractions and inflammatory response in infants affected by generalized epilepsy. *Journal of Dairy Science* 99(7), 5032–5038. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10704>
- Al Bsoul, A., Magnin, J.P., Commenges-Bernole, N., Gondrexon, N., Willison, J. and Petrier, C. (2010). Effectiveness of ultrasound for the destruction of *Mycobacterium* sp. strain (6PY1). *Ultrasonics sonochemistry* 17(1), 106–110.

- <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.04.005>
- Annandarajah, C., Grewell, D., Talbert, J. N., Raman, D. R. and Clark, S. (2018). Batch thermosonication for the reduction of plasmin activity in skim milk. *Journal of Food Processing and Preservation* 42, e13616. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13616>
- Arvanitoyannis, I.S., Kotsanopoulos, K. V. and Sava A.G. (2017). Use of ultrasounds in the food industry – Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57, 109–128. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.860514>
- Asaithambi, N., Singha, P. and Singh, S.K. (2022). Comparison of the effect of hydrodynamic and acoustic cavitations on functional, rheological and structural properties of egg white proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 82, 103166. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103166>
- Astráin-Redín, L., Skipnes, D., Cebrián, G., Álvarez-Lanzarote, I. and Rode, T.M. (2023). Effect of the application of ultrasound to homogenize milk and the subsequent pasteurization by pulsed electric field, high hydrostatic pressure, and microwaves. *Foods* 12(7), 1457. <https://doi.org/10.3390/foods12071457>
- Bai, G., Cheng, L., Peng, L., Wu, B., Zhen, Y., Qin, G. and Wang, T. (2023). Effects of ultra-high-temperature processes on metabolite changes in milk. *Food Science and Nutrition* 11, 3601–3615. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3350>
- Balthazar, C.F., Santillo, A., Guimarães, J. T., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Caroprese, M. and Albenzio, M. (2019). Ultrasound processing of fresh and frozen semi-skimmed sheep milk and its effects on microbiological and physicochemical quality. *Ultrasonics Sonochemistry* 51, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.017>
- Bariya, A.R., Rathod, N.B., Patel, A.S., Nayak, J.K.B., Ranveer, R. C., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Ozogul, F., Jambrak, A. R. and Rocha, J. M. (2023). Recent developments in ultrasound approach for preservation of animal origin foods. *Ultrasonics Sonochemistry* 101, 106676. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106676>
- Bastam, M.M., Jalili, M., Pakzad, I., Maleki, A. and Ghafourian, S. (2021). Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurized milk. *Veterinary Medicine and Science* 7, 2445–2449. <https://doi.org/10.1002/vms3.604>
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R. and Barbosa-Cánovas, G.V. (2008). Microstructure of fat globules in whole milk after thermo-sonication treatment. *Journal of Food Science* 73, E325–E332. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00875.x>
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K. and Barbosa-Cánovas, G.V. (2009a). Composition properties, physicochemical characteristics and shelf life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. *Journal of Food Quality* 32, 283–302. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00250.x>
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson, R. and Barbosa-Cánovas, G.V. (2009b). Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.005>
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R. and Barbosa-Cánovas, G.V. (2011). Study of possible mechanisms of inactivation of *Listeria innocua* in thermosonicated milk using scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Journal of Food Processing and Preservation* 35(6), 767–777. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00527.x>
- Binti-Maklin, S. N., Binti-Julmohammad, N., Binti-Saallah, S., Mohd-Yaakub, N. B., Bin-Sintang, M. D., Binti-Abd-Rahman, S. N. and Binti-Julmohamad, N. (2025). Effect of sonication time on physical and foaming properties of pasteurized milk. *International Dairy Journal* 161, 106137. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106137>
- Bui, A.T.H., Cozzolino, D., Zisu, B., and Chandrapala, J. (2021). Infrared analysis of ultrasound treated milk systems with different levels of caseins, whey proteins and fat. *International Dairy Journal* 117, 104983. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.104983>
- Castillo-Andrade, A.I., Ruiz-Cabrera, M. A., Rivera-Bautista, C., Gonzalez-Garcia, R., Abud-Archila, M. and Grajales-Lagunes, A. (2025). Effect of ultrasound on the aging process, physicochemical properties, and lysosomal enzyme activity of semitendinosus and semimembranosus bovine muscles. *Revista Mexicana de*

- milk fat globule-protein complexes. *Journal of Food Engineering* 254, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.004>
- Guo, Z. and Jayan, H. (2023). Fast nondestructive detection technology and equipment for food quality and safety. *Foods* 12(20), 3744. <https://doi.org/10.3390/foods12203744>
- Hassan, Z.M.R., Fakhr, H.M., Din, E., Ali, A.A., Mehanna, N.S. and El-Messery, T. M. (2013). Interaction of some low molecular weight phenolics with milk proteins. *World Applied Sciences Journal* 23, 182–187. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.23.02.13057>
- Herceg, Z., Režek-Jambrak, A., Lelas, V. and Mededovic-Thagard, S. (2012). The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk. *Food Technology and Biotechnology* 50, 46–52. <https://hrcak.srce.hr/78997>
- Hemar, Y., Xu, C., Wu, S. and Ashokkumar, M. (2020). Size reduction of “reformed casein micelles” by high-power ultrasound and high hydrostatic pressure. *Ultrasonics sonochemistry* 63, 104929. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104929>
- Hernández-Falcón, T.A., Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N.S., Alanís-García, E., Rodríguez-Serrano, G.M., Castañeda-Ovando, A., García-Garibay, M., Ramírez-Moreno, E. and Jaimez-Ordaz, J. (2018). Effect of thermoultrasound on aflatoxin M1 levels, physicochemical and microbiological properties of milk during storage. *Ultrasonics Sonochemistry* 48, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.018>
- Jiang, Z., Wang, Y., Bai, S., Bai, C., Tu, Z., Li, H. and Qiu, L. (2024). The viable but non-culturable (VBNC) status of *Shewanella putrefaciens* (*S. putrefaciens*) with thermosonication (TS) treatment. *Ultrasonics Sonochemistry* 109, 107008. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107008>
- Karlović, S., Bosiljkov, T., Brnčić, M., Semenski, D., Dujmić, F., Tripalo, B. and Ježek, D. (2014). Reducing fat globules particle-size in goat milk: Ultrasound and high hydrostatic pressures approach. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 28(4), 499–507. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.19400>
- Kashaninejad, M. and Razai, S. M. A. (2020). Influence of thermosonication treatment on the average size of fat globules, emulsion stability, rheological properties and color of camel milk cream. *LWT – Food Science and Technology* 132, 109852. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109852>
- Kentish, S. and Feng, H. (2014). Applications of power ultrasound in food processing. *Annual review of food science and technology* 5(1), 263–284. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182537>
- Li, J., Wang, J., Zhao, X., Wang, W., Liu, D., Chen, S., Xingqian, Y. and Ding, T. (2019). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk by different processing sequences of ultrasound and heat. *Journal of Food Safety* 39, e12614. <https://doi.org/10.1111/jfs.12614>
- Lin, L., Wang, X., Li, C. and Cui, H. (2019). Inactivation mechanism of *E. coli* O157:H7 under ultrasonic sterilization. *Ultrasonics Sonochemistry* 59, 104751. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104751>
- Liu, X.T., Zhang, H., Wang, F., Luo, J., Guo, H. Y. and Ren, F.Z. (2014). Rheological and structural properties of differently acidified and renneted milk gels. *Journal of dairy science* 97(6), 3292–3299. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7568>
- Loan, L.T.K., Vinh, B. T. and Tai, N.V. (2024). Impact of ultrasound-assisted process on enzymatic extraction of polyphenols from purple rice bran in Vietnam: Experimental kinetics and innovative artificial approach. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 23(3), 1. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim24310>
- Lucey, J. A., Wilbanks, D.J. and Horne, D.S. (2022). Impact of heat treatment of milk on acid gelation. *International Dairy Journal* 125, 105222. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105222>
- Magalhães, I.S., Guimarães, A.D.B., Tribst, A.A.L., de Oliveira, E.B. and Júnior, B. R. D. C. L. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. *Food Research International* 157, 111310. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111310>
- Mahmoud, M.Z., Fagiry, M.A., Davidson, R. and Abdelbasset, W.K. (2022). The benefits, drawbacks, and potential future challenges of the

- most commonly used ultrasound-based hurdle combinations technologies in food preservation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 15, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.03.006>
- Mahmoud, M.Z., Davidson, R., Abdelbasset, W.K. and Fagiry, M.A. (2022). The new achievements in ultrasonic processing of milk and dairy products. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 15(1), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.03.005>
- Marangoni, F., Pellegrino, L., Verduci, E., Ghiselli, A., Bernabei, R., Calvani, R. and Poli, A. (2019). Cow's milk consumption and health: a health professional's guide. *Journal of the American College of Nutrition* 38(3), 197–208. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1491016>
- Marchesini, G., Fasolato, L., Novelli, E., Balzan, S., Contiero, B., Montemurro, F., Andrighetto, I. and Segato, S. (2015). Ultrasonic inactivation of microorganisms: A compromise between lethal capacity and sensory quality of milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 29, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.015>
- Meng, Y., Liang, Z., Zhang, C., Hao, S., Han, H., Du, P. and Liu, L. (2021). Ultrasonic modification of whey protein isolate: Implications for the structural and functional properties. *LWT- Food Science and Technology* 152, 112272. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112272>
- Mortazavi, S.M., Sani, A.M. and Mohseni, S. (2015). Destruction of AFT by ultrasound treatment. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 4, 198–202.
- Nascimento, J.C.N., Salgado, M.J.G., Gutierrez Alzate, K., de Alencar, J.C.G., Rosario, I.L. D.S., da Silva, J.G. and da Costa, M.P. (2023). Effect of Sonication Associated with Pasteurization on the Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk Cream. *Applied Sciences* 13(22), 12093.
- Ninković, M., Miličević, V., Radojičić, S., Bugarski, D. and Stević, N. (2024). Presence of *Mycoplasma bovis* in bulk tank milk and associated risk factor analysis in Serbian dairy farms. *Pathogens* 13(4), 302. <https://doi.org/10.3390/pathogens13040302>
- Obando-Galicia, Y. T., Martínez-de Jesús, G. and Totosaus, A. (2024) Assisted (ultrasound or high shear impeller) soybean oil/lecithin extraction of polyphenolic compounds from red cactus pear peel. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 23(2), Alim24237. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim24237>
- Ojha, K.S., Mason, T.J., O'Donnell, C.P., Kerry, J.P. and Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics sonochemistry* 34, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.001>
- Owens, S.L., Brewer, J.L. and Rankin, S.A. (2001). Influence of bacterial cell population and pH on the color of nonfat milk. *LWT- Food Science and Technology* 34, 329–333. <https://doi.org/10.1006/foodst.2001.0781>
- Parreiras, P.M., Vieira-Nogueira, J.A., Rodrigues, L., Passos, M. C., Gomes, N.R., Breguez, G.S., Falco, T.S., Bearzoti, E. and Menezes, C.C. (2020). Effect of thermosonication on microorganisms, the antioxidant activity and the retinol level of human milk. *Food Control* 113, 107172. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107172>
- Pérez-Andrés, J.M., Charoux, C.M.G., Cullen, P.J. and Tiwari, B.K. (2018). Chemical modifications of lipids and proteins by non-thermal food processing technologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 5041–5054. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06055>
- Qin, X., Yang, R., Zhong, J., Shabani, K.I. and Liu, X. (2018). Ultrasound-assisted preparation of a human milk fat analog emulsion: Understanding factors affecting formation and stability. *Journal of Food Engineering* 238, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.011>
- Qian, J., Chen, D., Zhang, Y., Gao, X., Xu, L., Guan, G. and Wang, F. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic protein hydrolysis in food processing: Mechanism and parameters. *Foods* 12(21), 4027. <https://doi.org/10.3390/foods12214027>
- Ragab, E.S., Lu, J., Pang, X.Y., Nassar, K.S., Yang, B.Y., Zhang, S.W. and Lv, J.P. (2019). Effect of thermosonication process on physicochemical properties and microbial load of goat's milk. *Journal of Food Science and Technology* 56, 5309–5316. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03994-0>
- Ramos-Villacob, V., Figueroa-Flórez, J. A., Salcedo-Mendoza, J.G., Hernandez-Ruydiaz, J. E. and Romero-Verbel, L.A. (2024). Development of modified cassava starches by ultrasound-assisted

Capítulo 3: Niveles de aflatoxina M1 en leche de vaca comercializada en México: Evaluación de la contaminación y el índice de riesgo carcinogénico

3.1. Resumen

Este capítulo presenta un artículo enfocado en la cuantificación de AFM1 en leche de vaca comercializada en México y en la evaluación del riesgo carcinogénico asociado a su consumo. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia y la concentración de AFM1 en leche de vaca de marcas comerciales distribuidas a nivel nacional mediante HPLC-FLD, así como estimar la exposición dietética crónica mediante simulación de Monte Carlo y calcular el índice de riesgo carcinogénico en distintos grupos etarios. Los resultados mostraron la presencia de AFM1 en muestras de leche comercial, con variabilidad en las concentraciones detectadas según el producto analizado. A partir de estos datos, se realizaron estimaciones de exposición y riesgo mediante enfoques determinísticos y probabilísticos, lo que permitió identificar diferencias relevantes entre grupos de edad y patrones de consumo. De manera complementaria, el análisis incluyó asociaciones con variables comerciales y tecnológicas, así como una exploración multivariada del comportamiento de las muestras. En conjunto, este capítulo aporta evidencia sobre la presencia de AFM1 en la leche comercial mexicana y sobre la necesidad de fortalecer las estrategias de vigilancia y control, en particular desde una perspectiva de salud pública orientada a poblaciones potencialmente más vulnerables.

Nota declaratoria:

Referencia: Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. d. S., Castañeda-Ovando, A., Jiménez-Osorio, A. S., Tello-Solís, S. R., Jiménez-Pérez, C., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2025). Aflatoxin M1 levels in commercial cows' milk in Mexico: Contamination and carcinogenic risk assessment. *Applied Sciences*, *15*(11), 6106. <https://doi.org/10.3390/app15116106>; **Estado de publicación:** Publicado; **Nombre de la revista:** Applied Sciences; **Indexación:** JCR; **Factor de impacto:** 2.7

Article

Aflatoxin M1 Levels in Commercial Cows' Milk in Mexico: Contamination and Carcinogenic Risk Assessment

Araceli Monter-Arciniega¹, Nelly del Socorro Cruz-Cansino^{1,*}, Araceli Castañeda-Ovando²,
Angélica Saraj Jiménez-Osorio³, Salvador Ramón Tello-Solís⁴, Carlos Jiménez-Pérez⁵
and Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano^{5,*}

¹ Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, San Agustín Tlaxiaca 42160, Mexico; mo270469@uaeh.edu.mx

² Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma 42184, Mexico

³ Área Académica de Enfermería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, San Agustín Tlaxiaca 42160, Mexico

⁴ Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, Mexico

⁵ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, Mexico

* Correspondence: ncruz@uaeh.edu.mx (N.d.S.C.-C.); gmrs@xanum.uam.mx (G.M.R.-S.);
Tel.: +52-7717172000 (ext. 41552) (N.d.S.C.-C.); +52-5558044600 (ext. 4070) (G.M.R.-S.)

Abstract: Aflatoxin M1 (AFM1), a toxic metabolite of aflatoxin B1 (AFB1), is commonly found in cow's milk (CM) when dairy cattle consume contaminated feed. Chronic exposure to AFM1 poses serious health risks, particularly for children. This study aimed to quantify AFM1 levels in commercial CM available in Mexico and assess the associated carcinogenic risk across six age groups. A total of 23 milk samples were collected between March and July 2023 from supermarkets and convenience stores. AFM1 was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). Estimated daily intake (EDI), carcinogenic risk index (CRI), and Monte Carlo simulations (MCS) to model exposure were employed. AFM1 was detected in all samples, with 80% exceeding the legal limits set by Mexican and European regulations. The highest CRI values were observed in children aged 1–4 years ($CRI > 5 \times 10^3$), indicating an elevated risk. There were no statistically significant differences in AFM1 concentration among different milk or thermal treatments. A cluster analysis revealed patterns related to AFM1 content, price, and processing methods. The widespread detection of AFM1 raises a public health concern, especially for vulnerable populations. This underscores the need for targeted regulatory strategies and improved control of aflatoxins in the dairy production chain.

Keywords: aflatoxin M1; cow's milk; carcinogenic risk index



Academic Editor: Chiara Cavaliere

Received: 22 April 2025

Revised: 24 May 2025

Accepted: 27 May 2025

Published: 29 May 2025

Citation: Monter-Arciniega, A.; Cruz-Cansino, N.d.S.; Castañeda-Ovando, A.; Jiménez-Osorio, A.S.; Tello-Solís, S.R.; Jiménez-Pérez, C.; Rodríguez-Serrano, G.M. Aflatoxin M1 Levels in Commercial Cows' Milk in Mexico: Contamination and Carcinogenic Risk Assessment. *Appl. Sci.* **2025**, *15*, 6106. <https://doi.org/10.3390/app15116106>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cow's milk (CM) ranks among the most extensively consumed food products globally, attributable to its nutritional benefits and availability to all demographic groups. It serves as a principal source of high-quality protein, essential vitamins, and readily absorbable calcium [1,2]. Nevertheless, despite its nutritional importance, milk presents potential health risks as a medium for foodborne contaminants, notably aflatoxin M1 (AFM1). AFM1 is a hydroxylated metabolite of aflatoxin B1 (AFB1) produced in the liver of dairy cattle subjected to feed contaminated with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* [3,4]. In addition, climatic conditions, insufficient feed storage, and inadequate quality control

measures significantly contribute to the contamination of animal feed with AFB1, particularly in tropical and subtropical regions [5,6]. The AFM1 is excreted into milk and dairy products, where it can persist despite pasteurization and ultra-high temperature (UHT) treatments [7,8]. AFM1 has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a Group 1 human carcinogen, attributed to its genotoxic, immunosuppressive, and mutagenic properties [3]. Chronic exposure to AFM1 is associated with an elevated risk of hepatocellular carcinoma, particularly among populations with high consumption of milk and limited dietary diversity [9,10]. A significant inverse correlation has been established between the risk of carcinogenicity and body weight, particularly among children from birth to 26 months of age in Nepal who were chronically exposed to aflatoxins. This reinforces that lower body mass predisposes individuals to a higher relative exposure [11].

Evidence suggests that the toxic effects of AFM1 are more pronounced in pediatric populations than adults, attributable to their lower body weight, greater milk consumption, and the development of physiological systems with limited capacity to metabolize and excrete toxins [10,12,13]. Prolonged exposure to AFM1 during the early years of life has been associated with hepatocellular damage, immunosuppression, altered nutrient absorption, and growth retardation [14,15]. Furthermore, even low-dose exposure may impede protein synthesis and liver enzyme functionality, potentially leading to long-term developmental disorders [16,17].

The presence of AFM1 in milk and dairy products has been widely reported in several countries using various analytical approaches. In Greece, Maggira et al. (2021) compared commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits with a high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) method developed to analyze AFM1 in raw milk, underlining the importance of selecting context-specific analytical procedures [18]. Similarly, Kolaric and Simko (2023), in Slovakia, validated an HPLC-FLD method with pretreatment in an immunoaffinity column that met the analytical performance criteria established by European standards [19]. In Hungary, routine monitoring of AFM1 in both raw and processed milk was conducted using commercial test kits, highlighting the need for continuous monitoring along the entire dairy production chain [20].

In the Latin American context, Quevedo-Garza et al. (2018) investigated AFM1 levels in liquid milk sold in Monterrey, Mexico, reporting concentrations that exceeded European regulatory limits [21]. Additionally, other studies have documented the presence of AFM1 in raw, pasteurized, and UHT milk samples throughout Mexico [22–27]. In particular, Álvarez-Díaz et al. (2022) reported concentrations of AFM1 exceeding the national regulatory threshold of 0.5 µg/L in commercially available dairy products [22,28]. These results underscore the significance of region-specific risk assessments and the necessity of continuous monitoring in various dairy markets.

While this study emphasizes the issue of AFM1 contamination in commercial milk in Mexico, it is essential to note that AFM1 contamination in dairy products has been extensively documented globally, underscoring its international significance. Researchers have reported elevated detection rates of AFM1, frequently surpassing established regulatory limits. This evidence affirms that AFM1 contamination is not restricted to particular regions but represents a pervasive issue associated with feed contamination, unsatisfactory storage conditions, and climatic influences [29–33]. Consequently, local evaluations like the one presented in this study are crucial for delineating exposure risks within specific national contexts. These studies provide essential data regarding prevalence; a paucity of research assesses the carcinogenic risk of AFM1 based on age-specific consumption patterns, which is vital for informing regulatory and public health strategies [34,35]. Therefore, accurate quantification necessitates using highly sensitive and reliable analytical

techniques, such as HPLC-FLD, which is esteemed for its precision and reproducibility in detecting AFM1 [36,37]. In addition to quantification, the carcinogenic risk index (CRI) estimation provides a more comprehensive perspective by incorporating AFM1 concentrations alongside actual consumption patterns and body weight across diverse population groups [10,38]. This methodology aids in prioritizing regulatory actions and meaningfully assessing public health risks. Consequently, this study aimed to quantify the levels of AFM1 present in various brands of CM sold in Mexico and evaluate the cancer risks associated with its consumption among different age groups.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

The analytical standard of AFM1 at a 100 µg/mL concentration in acetonitrile (ACN) was procured from Sigma-Aldrich, located in St. Louis, MI, USA. HPLC-grade ACN and methanol were acquired from J.T. Baker, Center Valley, PA, USA. Ultrapure water was generated utilizing a Milli-Q system from Millipore, Burlington, MA, USA. All chemicals employed in this study were of analytical or chromatographic grade.

2.2. Sample Collection

Between March and July 2023, 23 samples of commercial CM (A–W) were collected in supermarkets and convenience stores in Pachuca, Hidalgo, Mexico. Selected brands of pasteurized milk (A–E), UHT (F–W), where the E, U, V samples are organic milk, which are nationally distributed and commercially available in several regions. Table S1 provides detailed characteristics of the milk, including sample ID, classification, production site, origin, certification, and price. All CM samples were transported, refrigerated, and stored at 4 °C until analysis.

2.3. Preparation of Standard Solution

A stock solution (1 µg/mL) was prepared from a standard concentration of AFM1 (100 µg/mL). The stock solution was diluted in ACN to obtain working stock solutions of a standard calibration curve of 0.01–0.5 µg/mL.

2.4. Aflatoxin M1 Extraction

The liquid–liquid AFM1 extraction (LLE) employed was adapted from previously reported procedures [39,40], with the following modifications. Five milliliters of each CM were utilized; 1 g of NaCl was incorporated to facilitate the samples' dissolution, followed by adding 3.8 mL of ACN. The resultant mixture was subsequently vortexed utilizing a Vortex[®] stirrer (S1-0256, Scientific Industries, Alcobendas, Madrid, Spain) at maximum speed for 1 min and permitted to rest for 15 min. Thereafter, it underwent centrifugation (Avanti J-E, Beckman Coulter Life Sciences, Nyon, Vaud, Switzerland) at 6000 rpm for 7 min at a temperature of 4 °C. The supernatant was subsequently collected, and 5 mL of deionized water and 2 mL of chloroform were incorporated, followed by homogenization. The mixture was again subjected to centrifugation under identical conditions as previously described. The organic phase was dried under reduced pressure employing a rotary evaporator (R-300, BÜCHI[®] Labor Technik, Essen, North Rhine-Westphalia, Germany). Finally, the CM was reconstituted with 400 µL of the mobile phase and filtered through a 0.45 µm polytetrafluoroethylene membrane (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MI, USA).

2.5. Chromatographic Analysis of Aflatoxin M1

For the separation, identification, and detection of AFM1, an HPLC-FLD (LC-20AD) was utilized. This system comprised a solvent supply unit, an automatic sampler (model:

SIL-20AC XR, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), a fluorescence detector (RF-20A XS), a column heater (CTO-20A), a degassing unit (DGU-20A 5R), and a communication module (model: CBM-20A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The separation was conducted utilizing a reverse phase C18 column (dimensions: internal diameter 4.6 mm, length 250 mm, particle size 5 μm , pore size 120 \AA ; ODS HypersilTM[®], Thermo Fisher Scientific, Powai, Mumbai, India, maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$, and a mobile phase consisting of water and ACN (60:40, v/v), operated under isocratic conditions at a flow rate of 0.4 mL/min and an injection volume of 5 μL . The total run time was 15 min injection. AFM1 was detected at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 435 nm. The chromatographic data were processed using LabSolutions[®] software, version 5.87.1 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.6. Reliability and Analytical Effectiveness of the Method

The analytical procedure for quantifying AFM1 in milk was validated in accordance with the guidelines established by the International Council for Harmonization. This validation considered the following parameters: linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), selectivity, precision, and recovery [41]. Linearity was evaluated by constructing a calibration curve from standard solutions of AFM1 in acetonitrile, which spanned a concentration range of 0.01 to 0.5 $\mu\text{g/L}$. Duplicate calibration points were prepared, and the determination coefficient (R^2) to assess the linear response was used. The LOD and LOQ were computed based on the standard deviation of the intercept point (S_y) and the slope (b) of the calibration curve, utilizing the following equations:

$$\text{LOQ} = 3.3 \times S_y/b \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times S_y/b \quad (2)$$

Selectivity was evaluated by analyzing blank CM samples subjected to the identical liquid–liquid extraction (LLE) procedure outlined in Section 2.4 to ensure the absence of retention time interference peaks associated with AFM1. Accuracy was ascertained through the calculation of the relative standard deviation from three repeated injections of CM. Recovery was assessed by supplementing a previously analyzed CM sample with a quantifiable baseline concentration of AFM1 and a predetermined amount of standard solution (1.0 $\mu\text{g/L}$). The spiked CM underwent triplicate processing employing uniform extraction and quantification methods. To compute the recovery of the introduced standard, the native concentration was deducted from the total measured value. Subsequently, the recovery rate was established utilizing the following equations:

$$\text{Theoretical total concentration} = C_{\text{native}} + C_{\text{added}} \quad (3)$$

$$\text{Recovered standard} = C_{\text{measured}} - C_{\text{native}} \quad (4)$$

$$\text{Recovery (\%)} = (C_{\text{measured}} - C_{\text{native}}/C_{\text{added}}) \times 100 \quad (5)$$

where C_{native} = initial concentration of AFM1 in the unfortified CM; C_{added} = known concentration of the standard spiked; and C_{measured} = final concentration determined after spiking.

2.7. Risk Assessment for Exposure to Aflatoxin M1

2.7.1. Estimated Daily Intake

The estimated daily intake (EDI) of AFM1 was calculated to determine the amount of AFM1 ingested per unit of body weight each day, using the following equation:

$$EDI = C \times IR/BW \quad (6)$$

where C = mean concentration of AFM1 in milk ($\mu\text{g/L}$); IR = daily milk intake (L/day); and BW = average body weight of the exposed individual (kg).

Age groups were defined according to national food risk assessment guidelines and WHO population classifications: 1–2 years, 3–4 years, 5–9 years, 10–19 years, 20–59 years, and >60 years. Body weight (BW) and intake rate (IR) for each group were derived from the Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2022), Norma Oficial Mexicana-031-SSA2-1999, and World Health Organization growth standards [42–44]. Population-weighted averages were calculated from national anthropometric data, considering sex-specific differences (Table 1). Milk intake rates were based on national averages reported for liquid milk consumption by age group, with a value of 0.5 L/day for young children, adjusted proportionally for older groups as reported in ENSANUT, 2022 [42]. These values were utilized to stratify exposure levels by age and sex, allowing for a more accurate assessment of the dietary risk associated with the intake of AFM1 through CM. The concentration of AFM1 was determined through chromatographic analysis of commercial CM samples.

Table 1. Characteristics of age groups and estimated daily intake of aflatoxin M1.

Age Group (Year)	AFM1 ($\mu\text{g/L}$)	IR (L/day)	BW (kg)	EDI
1–2	1.26	0.5	11.1	0.056
3–4	1.26	0.45	14.5	0.039
5–9	1.26	0.4	22.5	0.022
10–19	1.26	0.35	44	0.01
20–59	1.26	0.25	68	0.005
>60	1.26	0.2	65	0.004

AFM1: mean concentration of AFM1 in milk ($\mu\text{g/L}$); IR: daily milk intake (L/day); BW: body weight; EDI: estimated daily intake.

2.7.2. Monte Carlo Simulation for Estimating Carcinogenic Risk Index

To account for the variability and uncertainty associated with exposure to AFM1 through milk consumption, a Monte Carlo simulation (MCS) was performed to estimate the CRI across different age groups of the Mexican population. The simulation was based on the following equation, derived from the European Food Safety Authority (EFSA) (2020) and Kuiper-Goodman (1990) [10,38]:

$$CRI = EDI \times EF \times ED \times CSF/AT \quad (7)$$

where EDI = estimated daily intake of AFM1 ($\mu\text{g/kg bw/day}$); EF = exposure frequency (days/year, assumed to be 365); ED represents exposure duration in years, defined by age group; CSF, or cancer slope factor for AFM1, is $0.04 (\mu\text{g/kg bw/day})^{-1}$, as proposed by Kuiper-Goodman (1990) [38] and endorsed by the EFSA (2020) [10]; and AT = averaging time for carcinogens (25,550 days = 70 years \times 365 days).

The AFM1 concentration was modeled using a triangular distribution based on experimental data: minimum: 0.02 $\mu\text{g/L}$; maximum: 7.62 $\mu\text{g/L}$; and mean: 1.26 $\mu\text{g/L}$. The

triangular distribution of AFM1 was used for 10,000 iterations in each age group for simulation details. For each iteration, a random value of the AFM1 concentration was generated and used to calculate the EDI and CRI. The simulation produced descriptive statistics for CRI: mean CRI, 95 percentile (P95) CRI, and maximum CRI.

2.8. Cluster Analysis

A hierarchical clustering analysis was performed to investigate patterns among commercial CM samples based on four variables: AFM1 concentration ($\mu\text{g/L}$), retail price (MXN/L—Mexican peso per liter), type (regular or organic), and heat treatment (pasteurized or UHT). Before the clustering process, the dataset underwent standardization utilizing Z-scores to mitigate the effects of scale differences among the variables. The clustering procedure employed the minimum variance method of Ward, with Euclidean distance serving as the similarity metric. This multivariate technique facilitated the identification of natural groupings predicated upon similarities in pollution levels, pricing, and production characteristics. All analyses were conducted utilizing Minitab® 17 Statistical Software State College, PA, USA.

2.9. Statistical Analysis

All experimental procedures for the extraction, identification, and quantification of AFM1 were performed in triplicate. The data were expressed as means \pm standard deviations. Variations in AFM1 concentrations among the CM were evaluated using one-way analysis of variance, followed by Tukey's test to discern statistically significant differences between individual samples. A significance threshold of $p < 0.05$ was established as statistically significant. All statistical analyses were executed using SPSS software, version 25.0 (IBM® Corp, Chicago, IL, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Sample Origin and Overview of AFM1 Contamination

The geographical sources of the 23 CM samples underscore the extensive distribution and integration of the dairy market across Mexico. The CM available in Hidalgo is sourced from nine distinct states: Aguascalientes (one sample), Durango (six), Guanajuato (one), Hidalgo (two), Jalisco (one), Mexico City (five), Nuevo León (two), Puebla (one), and the State of Mexico (four) (Table S1), situated in the central and northern regions, thereby indicating substantial interregional supply chain interconnectivity. The average concentration of AFM1 detected for each CM sample of different state allowed a more precise visualization and identification of regional differences in contamination levels of this mycotoxin (Figure 1). This scenario carries significant implications for food safety management, as contamination issues, particularly concerning AFM1, cannot be solely attributed to the state where the product is sold; instead, they may also reflect production and storage practices in other regions of origin. Regulatory monitoring programs should therefore concentrate on local retail establishments and encompass the entirety of the dairy supply chain, from primary production on the farm to post-harvest handling and industrial processing, particularly in producing regions including Durango and the State of Mexico. In Section 3.3 details the identification and quantification of AFM1 in the collected CM samples.

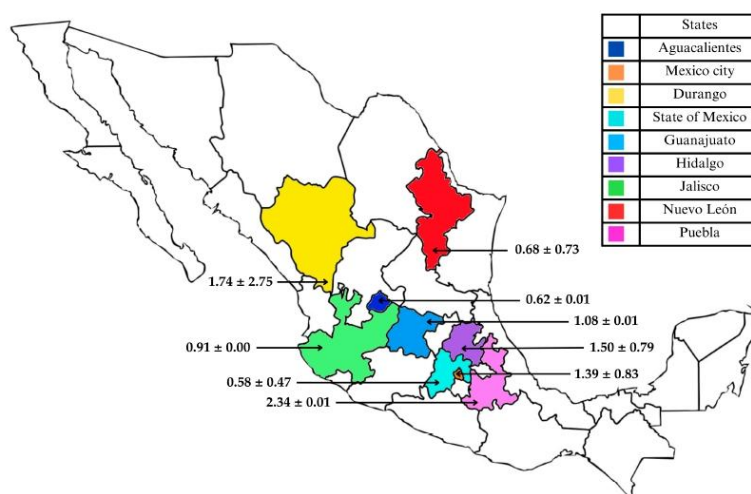


Figure 1. Geographical distribution of AFM1 concentrations ($\mu\text{g/L}$) in commercial CM samples collected in Mexico. Data is presented as mean \pm standard deviation.

3.2. Reliability of the Method

The LLE analytical method, which has been adapted from previously published procedures, offers a dependable alternative for extracting AFM1 from milk, achieving a recovery rate exceeding 80% [39,40]. This method is particularly advantageous when access to immunoaffinity columns is restricted or when high CM sample yields are required. The analytical method underwent evaluation to ascertain its reliability and suitability for detecting trace levels in dairy matrices. The calibration curve illustrated linearity within the concentration range of 0.01 to 0.5 $\mu\text{g/L}$, with an R^2 value of 0.9982, and a retention time of 9.16 ± 0.06 min (Figures S1 and S2). Triple analyses of various CM samples, which were processed under uniform extraction conditions, substantiated the method's selectivity. No interference peaks were detected during the retention time of AFM1. The calculated LOD value of 0.002 $\mu\text{g/L}$ and the LOQ value of 0.008 $\mu\text{g/L}$ were adequate for identifying levels beneath the regulatory maximum limits established by European Union and Mexican standards [28,45]. Furthermore, the method's selectivity was confirmed through chromatographic analysis of blank and fortified CM samples that were processed using the identical LLE protocol.

Figure S3 shows representative chromatograms: a CM at a known concentration of AFM1 labeled as blank (a), a CM sample enriched with 1.0 $\mu\text{g/L}$ of AFM1 (b), and a commercial CM with the highest concentration of AFM1 identified in this study (c). All chromatograms were obtained under identical HPLC-FLD conditions and exhibited consistent retention times with no interfering peaks observed, thereby affirming the method's specificity and matrix applicability. The recovery of the enriched CM was 81.6%, which falls within the acceptable range for mycotoxin analysis in complex food matrices, typically between 70% and 120%, as stipulated by international criteria [46]. The performance parameters obtained in this study are comparable to those cited in previous work utilizing solvent-based extraction methods and immunoaffinity column cleaning procedures, thereby confirming the validity of the analytical approach despite employing a more accessible LLE protocol [19,39]. Although the immunoaffinity column is commonly regarded as the reference standard due to its high specificity, it frequently incurs higher costs and single-use

limitations [47]. Similarly, solid phase extraction provides good reproducibility and the potential for automation but necessitates meticulous method development to minimize matrix effects [48,49]. QuEChERS-based protocols have also been employed to detect multiple mycotoxins; however, they may lack the selectivity necessary to detect AFM1 at trace levels [50,51]. In this context, the results indicate that the combination of liquid–liquid extraction represents a valid and practical alternative for determining a single analyte, particularly in resource-limited environments. Moreover, the absence of interference peaks corroborated the method’s selectivity, and the intraday reproducibility (relative standard deviation < 5%) underpinned the accuracy in quantifying AFM1.

3.3. Identification and Quantification of Aflatoxin M1

All 23 commercial CM samples analyzed contained detectable AFM1 levels, with an average concentration of 1.64 µg/L. Notably, 73.91% of the CM exceeded the maximum permissible limits established by Mexican regulations (0.5 µg/L) and European regulations (0.05 µg/L) [28,45]. Sample B exhibited the highest concentration at 7.62 µg/L, significantly surpassing the concentrations found in the other CM samples. This particular CM originated from a nationally distributed milk brand processed in Durango, Mexico, a region characterized by a semi-arid climate, with low rainfall (less than 500 mm) and extreme temperatures [52]. In conjunction with suboptimal agricultural and storage practices, these climatic conditions may facilitate the proliferation of aflatoxin-producing fungi such as *Aspergillus* spp. in crops utilized as dairy cattle feed, including maize and sorghum [53,54]. Furthermore, the application of silage in dairy operations presents additional risks if storage conditions are not meticulously controlled, thereby heightening the likelihood of aflatoxin formation [55]. Inadequate storage infrastructure in regions supplying feed ingredients may also contribute to heightened AFM1 levels [56], as evidenced by the findings in sample B.

Mycotoxin contamination may occur at various stages of animal feed production, encompassing pre-harvest, drying, and storage processes [57]. Insufficient agricultural practices, inadequate management, and adverse environmental conditions contribute to the formation of mycotoxins, which can disseminate throughout fungal colonies, contaminating spores, hyphae, and the surrounding substrate [58,59]. Consuming these contaminated foods remains the primary route of exposure to mycotoxins in dairy cattle, particularly in semi-arid regions [59–61].

The remaining 26.8% of CM, which included A, I, J, L, M, and O, remained compliant with legal limits, demonstrating an average AFM1 concentration of 0.18 µg/L (Figure 2). The present study’s findings align with prior research conducted across various regions. Maggira et al. (2021) identified fluctuations in AFM1 levels in raw milk obtained from distinct locations within Greece, indicating that geographical factors and management practices may significantly affect contamination levels [18]. Similarly, Kolarič and Šimko (2023) substantiated the efficacy of analytical methods for detecting AFM1 in dairy products in Slovakia, emphasizing the necessity of reliable techniques for monitoring this mycotoxin [19]. Furthermore, the research conducted by Buzás et al. (2023) in Hungary highlighted the urgent need for continuous monitoring to assess exposure to AFM1 among the general population [20]. In Mexico, there are limited studies evaluating the incidence of AFM1 in milk intended for human consumption. The most recent report documented a concentration of 0.03 µg/L in CM, which remains well within national legal thresholds [22,28]. The presence of AFM1 in milk primarily reflects the contamination of dairy cattle feed with AFB1, which is commonly found in cereals, oilseeds, flours, and by-products utilized in feed formulation. Seasonal factors may also impact the concentration of AFM1 in milk [62,63]. Elevated levels have been reported during the autumn–winter period compared to the spring–summer period [64]. This trend correlates with a decreased availability of fresh forage and an

increased reliance on dry stored feed, which is more susceptible to fungal contamination under moisture conditions and inadequate storage [64]. Given that the CM samples in this study were collected during the winter, the heightened AFM1 concentrations observed in 80% of the CM may be partially attributed to this seasonal vulnerability.

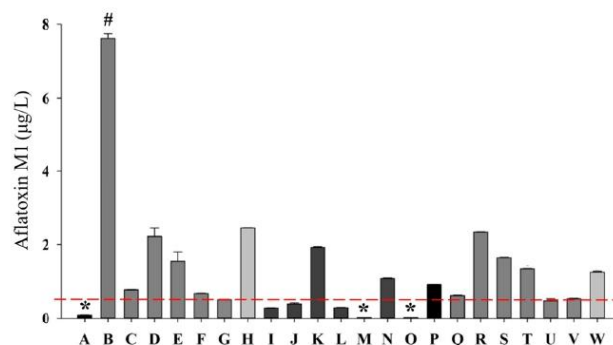


Figure 2. Quantification and identification of AFM1 by liquid chromatography in commercial milk. AFM1 µg/L: micrograms per liter of aflatoxin M1; A–W: cow’s milk; # indicates a statistically higher value compared to samples analyzed; * indicates a statistically lowest value compared to the samples. The red horizontal line indicates the maximum limit set by the Mexican standard NOM-243-SSA1-2010 (0.5 µg/L).

3.4. Carcinogenic Risk Assessment of Aflatoxin M1 Exposure

To enhance the assessment of carcinogenic risk associated with chronic exposure to AFM1 through CM, an MCS involving 10,000 iterations was conducted. The simulation utilized a triangular distribution characterized by the minimum (0.02 µg/L), mean (1.26 µg/L), and maximum (7.62 µg/L) concentrations of AFM1 observed in the CM. The findings indicated that all age demographics exhibited significant values for the CRI, with the highest mean CRI noted in children aged 1–2 years (7.92×10^3) and 3–4 years (5.07×10^3). The P95 values surpassed the internationally recognized threshold of 1×10^4 across all age groups, suggesting that a considerable segment of the population may encounter an elevated cancer risk throughout their lifetime due to chronic exposure to AFM1 via CM consumption. The comprehensive results, encompassing mean, P95, and maximum CRI values for each demographic group, are illustrated in Table 2.

Table 2. Carcinogenic risk index.

Age Group (year)	Mean	P95	Max
1–2	7.92×10^3	1.57×10^2	3.17×10^2
3–4	5.07×10^3	1.02×10^2	2.06×10^2
5–9	3.56×10^3	7.16×10^3	1.45×10^2
10–19	2.12×10^3	4.29×10^3	8.68×10^3
20–59	1.47×10^3	2.97×10^3	6.01×10^3
>60	1.72×10^3	3.46×10^3	6.93×10^3

CRI: carcinogenic risk index; P95: percentile 95; Max: maximum value.

Incorporating probabilistic modeling via MCS enhanced the authenticity of the risk analysis by considering inherent variability and uncertainty in both contaminant exposure

and population attributes. This methodology is consistent with contemporary guidelines from the EFSA (2020) and other global organizations endorsing distribution-based risk assessment models for evaluating carcinogenic mycotoxins [10]. The finding that children under five presented CRI values far exceeding the reference threshold (1×10^4) is particularly concerning. Additionally, even adult and elderly groups showed elevated CRI levels, though to a lesser extent, indicating that this issue affects the population more broadly.

This analysis employed a CSF of $0.04 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$, as proposed by Kuiper-Goodman (1990) and subsequently reaffirmed by the EFSA (2020) [10,38]. Given the structural and toxicological similarity of AFM1 to AFB1, this parameter was essential for estimating lifetime cancer risk [3]. The CRI values derived from this study are congruent with earlier research that has evaluated the cancer risks associated with AFM1 [65–68]. A probabilistic analysis in Hungary estimated chronic exposure to AFM1 in toddlers using a two-dimensional MCS [69]. The results indicated exposure levels of up to $3.79 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ at the 97.5 percentile, accompanied by a hazard index >1 , which signifies a non-negligible health risk for this age demographic. Similarly, a study conducted in Monterrey, Mexico, identified AFM1 in 100% of breast CM, with average concentrations measuring $1.70 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{L}$. The estimated daily intake for infants varied from 1.09×10^3 to $2.02 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$, which exceeded tolerable intake levels and underscored a considerable carcinogenic risk, especially for children aged 0 to 24 months [70]. The aforementioned external findings substantiate the data acquired in this study, particularly concerning CRI values among pediatric populations. Moreover, these findings underscore the pervasive nature of exposure to AFM1 and its significant implications for public health. The continual exceedance of established risk thresholds across diverse populations and nations further accentuates the necessity for enhanced surveillance, effective risk communication, and robust preventive measures to safeguard vulnerable consumers, especially infants and young children [10,71,72].

3.5. Classification of Milk Samples Through Dendrogram Analysis of Contaminants and Product Attributes

The hierarchical clustering analysis elucidated distinct groups among CM samples based on similarities in AFM1 concentration, retail price, thermal processing, and organic labeling. As illustrated in Figure 3, the CM samples are systematically organized along the X-axis. At the same time, the vertical Y-axis denotes the Euclidean distance to the square, thereby reflecting the degree of similarity among them. The groups formed at shorter distances signify CM with more comparable profiles. The B sample exhibited the highest level of AFM1, and appeared to be isolated or to establish a separate branch, indicating a distinct contamination or production profile. This pattern may represent specific regional practices, supply chain conditions, or feed quality associated with that CM. To investigate contamination patterns in commercial CM, a hierarchical cluster analysis was performed using four variables: AFM1 concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$), price per liter (MXN), milk classification (regular or organic), and thermal treatment (pasteurized or UHT).

The generated dendrogram (Figure 3) identified three primary clusters illustrating variations in AFM1 levels and product characteristics. The first cluster included milks with low AFM1 levels ($<0.5 \mu\text{g}/\text{L}$), featuring several UHT-treated and/or organic CM samples, such as U and V. The second cluster consisted of CM with moderate AFM1 values ($0.5\text{--}2.0 \mu\text{g}/\text{L}$). In contrast, the third group contained the most contaminated CM, including sample B ($7.62 \mu\text{g}/\text{L}$), an outlier due to its concentration significantly exceeding international safety limits. The groupings above indicate that heat treatment and classification significantly influence pollution profiles. Prior research has suggested that UHT treatment may yield lower levels of AFM1 [73,74].

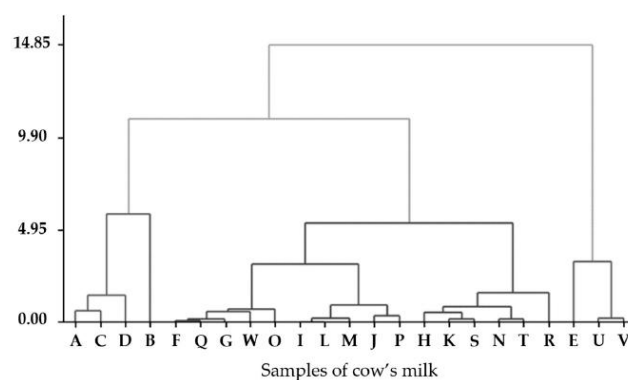


Figure 3. Dendrogram of commercial milk samples based on hierarchical cluster analysis. The X-axis represents individual milk samples, while the Y-axis indicates group distance, reflecting the similarity between samples based on AFM1 concentration, price per liter, milk classification (regular or organic), and heat treatment method (pasteurized or UHT).

Nevertheless, AFM1 is widely acknowledged for its heat resistance [72,75], implying that such variations are more likely to be related to CM sample processing rather than to the degradation of the toxin. This highlights the necessity for standardized analytical procedures when comparing CM subjected to diverse heat treatments. Furthermore, the analysis has demonstrated that elevated prices do not inherently correlate with superior microbiological quality concerning AFM1 contamination. This observation aligns with prior reports indicating that brand reputation and perceived value frequently influence pricing instead of objective quality assessment [76,77]. Interestingly, organic CM tended to group within the low-risk category; nevertheless, regular CM in the same group indicate that organic labeling alone fails to serve as a sufficient predictor of reduced contamination [78–80]. The levels of AFM1 are predominantly influenced by factors such as feed quality, storage conditions, and climate [81,82]. However, the observed trend aligns with the notion that organic dairy systems may implement more stringent feed sourcing practices. A more extensive sampling process is required to validate this association.

4. Conclusions

This study investigated the levels of AFM1 in various brands of CM available in Mexico and assessed the carcinogenic risk index across different age groups. AFM1 was detected in all CM samples analyzed, with 80% exceeding the maximum limits established by Mexican and European regulations, which raises significant public health concerns. Notably, the products under analysis are distributed nationwide and accessible to consumers across all socio-economic strata, thereby emphasizing a widespread risk of exposure throughout the country.

Cancer risk estimates derived from EDI and IRC have identified a significantly elevated susceptibility among children aged 1 to 4 during this crucial developmental phase. Monte Carlo simulations have corroborated these findings by encompassing various exposure scenarios and confirming that peak risk levels disproportionately impact younger demographics.

The findings underscore the urgent necessity to augment national surveillance, particularly regarding dairy products consumed by children. Regulatory authorities should prioritize the implementation of AFM1 limits, enhance on-farm feed management and storage protocols, and establish thorough risk-based surveillance strategies that extend beyond

average exposure assessments. Future research should expand the geographic and seasonal scope of sampling and examine biomarker-based exposure evaluations, particularly within vulnerable populations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app15116106/s1>, Table S1. Characteristics of the collected samples; Figure S1. The calibration curve for AFM1 was obtained through HPLC-FLD within the range of 0.01 to 0.5 µg/L; Figure S2. HPLC-FLD chromatograms of the AFM1 standard solutions calibration curve at ascending concentrations. µg/L: micrograms per liter; min: minutes; mV: millivolt; Figure S3. Chromatograms demonstrating AFM1 in milk samples processed through liquid–liquid extraction for method selectivity, analyzed by HPLC-FLD: (a) initial concentration of AFM1 in the unfortified sample; (b) standard concentration enriched with 1.0 µg/L of AFM1; (c) sample B.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.-A., G.M.R.-S. and S.R.T.-S.; methodology, A.S.J.-O. and C.J.-P.; software, A.M.-A. and C.J.-P.; validation, G.M.R.-S. and C.J.-P.; formal analysis, G.M.R.-S.; investigation, A.M.-A.; resources, A.C.-O.; data curation, A.C.-O.; writing—original draft preparation, A.M.-A.; writing—review and editing, S.R.T.-S.; visualization, A.S.J.-O., C.J.-P. and S.R.T.-S.; supervision, G.M.R.-S. and N.d.S.C.-C.; project administration, G.M.R.-S. and N.d.S.C.-C.; funding acquisition, G.M.R.-S. and N.d.S.C.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors express their sincere gratitude to the Departamento de Biotecnología of the Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa for granting permission to utilize its facilities and equipment for the measurements conducted in this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AFM1	Aflatoxin M1
AFB1	Aflatoxin B1
CM	Cow's milk
HPLC-FLD	High-performance liquid chromatography with fluorescence detection
EDI	Estimated daily intake
CRI	Carcinogenic risk index
MCS	Monte Carlo simulations
UHT	Ultra-high temperature
IARC	International Agency for Research on Cancer
ACN	Acetonitrile
LLE	Liquid–liquid extraction
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
IR	Daily milk intake
BW	The average body weight of the exposed individual
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EFSA	European Food Safety Authority

References

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Milk and Dairy Products in Human Nutrition. 2023. Available online: <https://www.fao.org/publications> (accessed on 10 February 2025).
2. Alais, C. *Ciencia de la Leche: Principios de Técnica Lechera*, 4th ed.; Reverté: Barcelona, Spain, 2022.
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). Mycotoxins as Human Carcinogens—the IARC Monographs Classification. 2022. Available online: <https://monographs.iarc.who.int/> (accessed on 20 November 2024).
4. Klingelhöfer, D.; Braun, M.; Brüggemann, D.; Groneberg, D.A. Aflatoxin: A global burden. *Food Control* **2018**, *221*, 823–831. [CrossRef]
5. Pitt, J.I. Toxigenic fungi: Which are important? *Med. Mycol.* **2000**, *38*, 17–22. [CrossRef]
6. Benkerroum, N. Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1215. [CrossRef]
7. Gonçalves, L.; Dalla, R.A.; Gonzales, S.L.; Feltes, M.C.; Badiale-Furlong, E.; Dors, G.C. Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. *Food Sci. Technol.* **2017**, *37*, 11–15. [CrossRef]
8. Pichardo-Matamoros, D.J.; Elizondo-Salazar, J.A. Persistence of aflatoxins during milk processing. *Food Addit. Contam.* **2020**, *37*, 1498–1505. [CrossRef]
9. Marchese, S.; Polo, A.; Ariano, A.; Velotto, S.; Costantini, S.; Severino, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins* **2018**, *10*, 214. [CrossRef]
10. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J.K.; del Mazo, J. Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J.* **2020**, *18*, e06040. [CrossRef]
11. Andrews-Trevino, J.Y.; Webb, P.; Shively, G.; Kablan, A.; Baral, K.; Davis, D.; Ghosh, S. Aflatoxin exposure and child nutrition: Measuring anthropometric and long-bone growth over time in Nepal. *Am. J. Clin. Nutr.* **2021**, *113*, 874–883. [CrossRef]
12. Andrade, P.D.; Gomes da Silva, J.L.; Caldas, E.D. Risk assessment of aflatoxin M1 in milk consumed in Brazil. *Food Control* **2013**, *29*, 55–59. [CrossRef]
13. Turner, P.C.; Moore, S.E.; Hall, A.J.; Prentice, A.M.; Wild, C.P. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111*, 217–220. [CrossRef]
14. Leroy, J.L.; Sununtasuk, C.; García-Guerra, A.; Wang, J.S. Low level aflatoxin exposure associated with greater linear growth in southern Mexico: A longitudinal study. *Matern. Child Nutr.* **2018**, *14*, e12619. [CrossRef] [PubMed]
15. Matchado, A.; Smith, J.W.; Schulze, K.J.; Groopman, J.D.; Kortekangas, E.; Chaima, D.; Stewart, C.P. Child aflatoxin exposure is associated with poor child growth outcomes: A prospective cohort study in rural Malawi. *Curr. Dev. Nutr.* **2023**, *7*, 101962. [CrossRef]
16. Ashraf, W.; Rehman, A.; Rabbani, M.; Aamir, K.; Wang, J.S. Assessing the risk and consequences of naturally occurring aflatoxins on liver and kidney health in children: A cross-sectional analysis in Lahore, Pakistan. *Public Health Toxicol.* **2024**, *4*, 1–12. [CrossRef]
17. Mahfuz, M.; Hossain, M.S.; Alam, M.A.; Gazi, M.A.; Fahim, S.M.; Nahar, B.; Ahmed, T. Chronic aflatoxin exposure and cognitive and language development in young children of Bangladesh: A longitudinal study. *Toxins* **2022**, *14*, 855. [CrossRef] [PubMed]
18. Maggira, M.; Ioannidou, M.; Sakaridis, I.; Samouris, G. Determination of aflatoxin m1 in raw milk using an HPLC-FL method in comparison with commercial elisa kits—Application in raw milk samples from various regions of Greece. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 46. [CrossRef]
19. Kolarič, L.; Šimko, P. Development and validation of HPLC-FLD method for aflatoxin M1 determination in milk and dairy products. *Acta Chim. Slovaca* **2023**, *16*, 99–108. [CrossRef]
20. Buzás, H.; Szabó-Sárvári, L.C.; Szabó, K.; Nagy-Kovács, K.; Bukovics, S.; Süle, J.; Kovács, A.J. Aflatoxin M1 detection in raw milk and drinking milk in Hungary by ELISA— A one-year survey. *J. Food Compos. Anal.* **2023**, *121*, 105368. [CrossRef]
21. Quevedo-Garza, P.A.; Amador-Espejo, G.G.; Cantú-Martínez, P.C.; Trujillo-Mesa, J.A. Aflatoxin M1 occurrence in fluid milk commercialized in Monterrey, Mexico. *J. Food Saf.* **2018**, *38*, e12507. [CrossRef]
22. Álvarez-Días, F.; Torres-Parga, B.; Valdivia-Flores, A.G.; Quezada-Tristán, T.; Alejos-De La Fuente, J.I.; Sosa-Ramírez, J.; Rangel-Muñoz, E.J. *Aspergillus flavus* and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin M1 in bovine milk in Aguascalientes, México. *Toxins* **2022**, *14*, 292. [CrossRef]
23. Hernández-Falcón, T.A.; Monter-Arciniega, A.; Cruz-Cansino, N.S. Alanís-García, E.; Rodríguez-Serrano, G.M.; Castañeda-Ovando, A. Effect of thermoultrasound on aflatoxin M1 levels, physicochemical and microbiological properties of milk during storage. *Ultrason. Sonochem.* **2018**, *48*, 396–403. [CrossRef]
24. Quevedo-Garza, P.A.; Amador-Espejo, G.G.; Salas-García, R.; Ramos-Peña, E.G.; Trujillo, A.J. Aflatoxin M1 Determination in infant formulae distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins* **2020**, *12*, 100. [CrossRef] [PubMed]
25. Patricia, L.; Noa, M.; López, Y.; González, D.G.; Noa, E.; Real, M. Aflatoxin M1 levels in raw and pasteurized milk produced in Guadalajara, Mexico. *Rev. Salud Anim.* **2012**, *34*, 40–45.

26. Pérez, J.; Gutiérrez, R.; Vega, S.; Díaz, G.; Urbán, G.; Coronado, M.; Escobar, A. Occurrence of aflatoxin M1 in raw, ultra pasteurized and organic milks produced and marketed in Mexico. *Rev. Salud Anim.* **2008**, *30*, 103–109.
27. Carvajal, M.; Bolaños, A.; Rojo, F.; Méndez, I. Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J. Food Prot.* **2003**, *66*, 1885–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Norma Oficial Mexicana. *NOM-243-SSA1-2010*; Leche, Fórmula Láctea, Producto Lácteo y Derivados Lácteos. Disposiciones y Aplicaciones Sanitarias; Métodos de Prueba. Secretaría de Salud: Mexico City, México, 2010. Available online: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm> (accessed on 2 March 2025).
29. Rahimzadeh-Barzoki, H.; Faraji, H.; Beirami, S.; Keramati, F.Z.; Nayik, G.A.; Izadi-Yazdanaabadi, Z.; Mozaffari-Nejad, A.S. Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in cow milk on the retail dairy market in Gorgan, Iran. *Dairy* **2023**, *4*, 571–580. [[CrossRef](#)]
30. Kortei, N.K.; Annan, T.; Kyei-Baffour, V.; Essuman, E.K.; Boakye, A.A.; Tettey, C.O.; Boadi, N.O. Exposure assessment and cancer risk characterization of aflatoxin M1 (AFM1) through ingestion of raw cow milk in southern Ghana. *Toxicol. Rep.* **2022**, *9*, 1189–1197. [[CrossRef](#)]
31. Kafle, S.; Paudel, M.; Shrestha, C.; Kathayat, K.B.; Sapkota, R.C.; Tiwari, A.; Subedi, D. Aflatoxin M1 Contamination in dairy milk in Kathmandu, Nepal. *Toxins* **2024**, *16*, 468. [[CrossRef](#)]
32. Min, L.; Tong, X.; Sun, H.; Ding, D.; Xu, B.; Chen, W.; Li, D. Aflatoxin M1 contamination in raw milk and its association with herd types in the ten provinces of Southern China. *Ital. J. Anim. Sci.* **2021**, *20*, 1562–1567. [[CrossRef](#)]
33. Foerster, C.; Monsalve, L.; Ríos-Gajardo, G. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and exposure estimation for its consumption in the Chilean population. *Food Control* **2023**, *148*, 109677. [[CrossRef](#)]
34. Iqbal, S.Z.; Asi, M.R.; Jinap, S. Assessment of aflatoxins in milk and feed samples and impact of UHT processing on aflatoxins. *Food Control* **2017**, *2*, 81–86. [[CrossRef](#)]
35. Vagef, R.; Mahmoudi, R. Occurrence of Aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk produced in west region of Iran (during summer and winter). *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 1421.
36. Wang, J.; Liu, J.; Li, Y. Aflatoxin M1 in milk and dairy products in China. *Food Control* **2012**, *23*, 198–204. [[CrossRef](#)]
37. De Girolamo, A.; Cervato, G.; Pascale, M. Recent advances in aflatoxin M1 detection by chromatographic and biosensing methods. *Toxins* **2022**, *14*, 179. [[CrossRef](#)]
38. Kuiper-Goodman, T. Approaches to the risk assessment of mycotoxins in food. *J. Physiol. Pharmacol.* **1990**, *7*, 497–513. [[CrossRef](#)]
39. Biancardi, A.; Piro, R.; Dall’asta, C.; Galaverna, G. A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Addit. Contam. Part A* **2013**, *30*, 381–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Campone, L.; Piccinelli, A.L.; Celano, R.; Pagano, I.; Russo, M.; Rastrelli, L. Rapid and automated analysis of aflatoxin M1 in milk and dairy products by online solid phase extraction coupled to ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1428*, 212–219. [[CrossRef](#)]
41. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Available online: <https://database.ich.org> (accessed on 15 May 2025).
42. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Salud Publica Mexico. 2022. Available online: <https://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/15087> (accessed on 28 February 2025).
43. Norma Oficial Mexicana. *NOM-031-SSA2-1999*; Para la Atención a la Salud del Niño. Secretaría de Salud: Acapulco, México, 1999. Available online: <https://www.cndh.org.mx/DocTR/2016/JUR/A70/01/JUR-20170331-NOR12.pdf> (accessed on 10 December 2024).
44. World Health Organization (WHO). Child Growth Standards. 2023. Available online: <https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards> (accessed on 20 November 2024).
45. European Commission (EC). *466/2001*; Setting Maximum Levels for Certain in Foodstuffs. Official Journal of the European Union. 2006. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2001/466/oj/eng> (accessed on 4 November 2024).
46. European Commission (EC). *2002/657/EC*; Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. Official Journal of the European Union. 2001. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj/eng> (accessed on 19 May 2024).
47. Stella, R.; Bovo, D.; Noviglio, S.; Contiero, L.; Barberio, A.; Angeletti, R.; Biancotto, G. 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* **2024**, *157*, 110149. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Y.; Liu, X.; Xiao, C.; Wang, Z.; Wang, J.; Xiao, H.; Yue, T. HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control* **2012**, *28*, 131–134. [[CrossRef](#)]
49. Van Camp, C.; Van Hassel, W.H.R.; Abdallah, M.F.; Masquelier, J. Simultaneous detection and quantification of aflatoxin M1, eight microcystin congeners and nodularin in dairy milk by LC-MS/MS. *Chemosensors* **2023**, *11*, 511. [[CrossRef](#)]
50. Miró-Abella, E.; Herrero, P.; Canela, N.; Arola, L.; Borrull, F.; Ras, R.; Fontanals, N. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2017**, *229*, 366–372. [[CrossRef](#)]

51. Sartori, A.V.; de Moraes, M.H.P.; dos Santos, R.P.; Souza, Y.P.; Candido, F.S.; da Nóbrega, A.W. Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in infant formulas from Brazil using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *Food Anal. Methods* **2023**, *16*, 841–849. [CrossRef]
52. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). Sistema de Información Climatológica para México. 2023. Available online: <https://smn.conagua.gob.mx> (accessed on 14 May 2025).
53. Daou, R.; Joubrane, K.; Maroun, R.G.; Khabbaz, L.R.; Ismail, A.; El Khoury, A. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agric. Food* **2021**, *6*, 416–447. [CrossRef]
54. Wu, L.X.; Ding, X.X.; Li, P.W.; Du, X.H.; Zhou, H.Y.; Bai, Y.Z.; Zhang, L.X. Aflatoxin contamination of peanuts at harvest in China from 2010 to 2013 and its relationship with climatic conditions. *Food Control* **2016**, *60*, 117–123. [CrossRef]
55. Gruber-Dorminger, C.; Jenkins, T.; Schatzmayr, G. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins* **2019**, *11*, 375. [CrossRef] [PubMed]
56. Tousignant, N. Residual unprotection: Aflatoxin research and regulation in Senegal's postcolonial peanut infrastructures. *Globalizations* **2023**, *20*, 932–949. [CrossRef]
57. Mahuku, G.; Nzioki, H.S.; Mutegi, C.; Kanampiu, F.; Narrod, C.; Makumbi, D. Pre-harvest management is a critical practice for minimizing aflatoxin contamination of maize. *Food Control* **2019**, *96*, 219–226. [CrossRef]
58. Zhang, W.; Lv, Y.; Yang, H.; Wei, S.; Zhang, S.; Li, N.; Hu, Y. Sub3 inhibits mycelia growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Food Biophys.* **2022**, *17*, 248–259. [CrossRef]
59. Raghu, D.; Senthilkumar, R.P.; Srinivasan, M.R.; Jaikanth, C.M.; Sarathchandra, G. Assessment of the occurrence of mycotoxins in livestock feeds and feed ingredients. *Indian J. Vet. Anim. Sci. Res.* **2021**, *50*, 32–44.
60. Zhu, Z.; Cheng, H.; Wang, J.; Ma, J.; Wang, J.; Wang, J.; Yang, J. Occurrence of co-contamination and interaction of multi-mycotoxins in dairy cow feed in China. *Toxins* **2025**, *17*, 137. [CrossRef]
61. Minooianhaghghi, M.H.; Marvi-Moghadam, A.; Taghavi, M. Investigation of feedstuff contaminated with aflatoxigenic fungi species in the semi-arid region in northeast of Iran. *Environ. Monit. Assess.* **2021**, *193*, 214. [CrossRef]
62. Tsakiris, I.N.; Tzatzarakis, M.N.; Alegakis, A.K.; Vlachou, M.; Renieri, E.A.; Tsatsakis, A.M. Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types in Greece. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *56*, 261–265. [CrossRef]
63. Alahlah, Y.; Al-Dmoor, H.; Al-Dmoor, R.; Al-Dmoor, M. Aflatoxin M1 levels in raw and pasteurized cow's milk in Jordan. *J. Food Saf.* **2020**, *40*, e12819. [CrossRef]
64. Ismail, A.; Akhtar, S.; Levin, R.E.; Ismail, T.; Riaz, M.; Amir, M. Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *42*, 418–437. [CrossRef] [PubMed]
65. Serraino, A.; Bonilauri, P.; Kerekes, K.; Farkas, Z.; Giacometti, F.; Canever, A.; Ambrus, Á. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk marketed in Italy: Exposure assessment and risk characterization. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2516. [CrossRef]
66. Hooshfar, S.; Khosrokhavar, R.; Yazdanpanah, H.; Eslamizad, S.; Kobarfard, F.; Nazari, F.; Tsatsakis, A. Health risk assessment of aflatoxin M1 in infant formula milk in IR Iran. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *142*, 111455. [CrossRef]
67. Kaur, S.; Bedi, J.S.; Dhaka, P.; Vijay, D.; Aulakh, R.S. Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin M1 through consumption of market milk and milk products in Ludhiana, Punjab. *Food Control* **2021**, *126*, 107991. [CrossRef]
68. Ghaffarian-Bahraman, A.; Mohammadi, S.; Dini, A. Occurrence and risk characterization of aflatoxin M1 in milk samples from southeastern Iran using the margin of exposure approach. *Food Sci. Nutr.* **2023**, *11*, 7100–7108. [CrossRef]
69. Farkas, Z.; Kerekes, K.; Ambrus, Á.; Süth, M.; Peles, F.; Pusztahelyi, T.; Jóźwiak, Á.B. Probabilistic modeling and risk characterization of the chronic aflatoxin M1 exposure of Hungarian consumers. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1000688. [CrossRef]
70. Salas, R.; Acosta, N.; Garza, A.D.J.; Tijerina, A.; Dávila, R.; Jiménez-Salas, Z.; Trujillo, A.J. Levels of aflatoxin M1 in breast Milk of lactating mothers in Monterrey, Mexico: Exposure and health risk assessment of newborns. *Toxins* **2022**, *14*, 194. [CrossRef]
71. Prietto, L.; Moraes, P.S.; Kraus, R.B.; Meneghetti, V.; Fagundes, C.A.A.; Furlong, E.B. Post-harvest operations and aflatoxin levels in rice (*Oryza sativa*). *Crop Prot.* **2015**, *78*, 172–177. [CrossRef]
72. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Aflatoxins. 2022. Available online: <https://monographs.iarc.who.int/> (accessed on 17 December 2024).
73. Nishimwe, K.; Bowers, E.L.; Dieu-Ayabagabo, J.; Habimana, R.; Mutiga, S.; Maier, D.E. Preliminary sampling of aflatoxin M1 contamination in raw milk from dairy farms using feed ingredients from Rwanda. *Mycotoxin Res.* **2022**, *38*, 107–115. [CrossRef] [PubMed]
74. Poapolathep, S.; Klangkaew, N.; Phaochoosak, N.; Jawaroensri, W.; Sroynum, A.; Saipinta, D.; Poapolathep, A. Occurrence and potential health risk of aflatoxin M1 in raw, pasteurized, and UHT milk in Thailand. *World Mycotoxin J.* **2024**, *17*, 85–94. [CrossRef]
75. Prandini, A.; Tansini, G.; Sigolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M.; Piva, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 984–991. [CrossRef] [PubMed]
76. Simões, A.R.P.; Bánkuti, F.L.; Borges, J.A.R.; Roschel, M.S.; Nicholson, C.F. Dairy farmers' satisfaction with the price paid by processors in competitive markets. *J. Dairy. Sci.* **2025**, *108*, 2315–2323. [CrossRef]

77. Sudirjo, F.; Kespandiar, T.; Nurofik, A.; Utami, M.P. The influence of price, product quality and promotion on customers purchase intention of pasteurized milk products. *J. Ekon. Manaj. Akunt.* **2023**, *9*, 650–654. [[CrossRef](#)]
78. Gutiérrez, R.; Vega, S.; Pérez, J.J.; Ruiz, J.L.; Yamazaki, A.; Rivera, J.G.; Escobar, A. Evaluación de aflatoxina M1 en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México. *Rev. Salud Anim.* **2013**, *35*, 33–37.
79. Armorini, S.; Altafini, A.; Zaghini, A.; Roncada, P. Occurrence of aflatoxin M1 in conventional and organic milk offered for sale in Italy. *Mycotoxin Res.* **2016**, *32*, 237–246. [[CrossRef](#)]
80. Tosun, H.; Ayyıldız, T. Occurrence of aflatoxin M1 in organic dairy products. *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* **2013**, *5*, 215–219. [[CrossRef](#)]
81. Yang, X.; Liu, B.; Zhang, L.; Wang, X.; Xie, J.; Liang, J. Spatial distribution and dietary risk assessment of aflatoxins in raw milk and dairy feedstuff samples from different climate zones in China. *Toxins* **2025**, *17*, 41. [[CrossRef](#)]
82. Mozafari, S.; Mohsenzadeh, M.; Mehrzad, J. Seasonally feed-related aflatoxins B1 and M1 spread in semiarid industrial dairy herd and its deteriorating impacts on food and immunity. *J. Food Qual.* **2017**, *1*, 4067989. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Capítulo 4: Liberación *in vitro* de aflatoxina M1 durante la digestión enzimática de las proteínas lácteas: evaluación y análisis

4.1. Resumen

Este capítulo presenta un artículo orientado a evaluar la liberación de AFM1 durante la digestión enzimática de proteínas lácteas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del tratamiento enzimático con pepsina y pancreatina sobre la AFM1 presente en leche de vaca comercial, así como comparar distintos métodos de extracción para su cuantificación antes y después de la hidrólisis proteica. Para ello, se analizaron siete marcas comerciales de leche de vaca mediante HPLC y se compararon tres metodologías de extracción de AFM1. Entre ellas, el método E3, basado en acetonitrilo (ACN) y extracción asistida por ultrasonido, mostró la mayor eficacia analítica. Los resultados evidenciaron la presencia de AFM1 en todas las muestras evaluadas, con concentraciones que superaron los límites regulatorios nacionales e internacionales. Después del tratamiento enzimático, varias muestras presentaron un incremento en la concentración detectada de AFM1, lo que sugiere la liberación de fracciones previamente asociadas a proteínas de la leche durante la hidrólisis. En conjunto, este capítulo aporta evidencia que sugiere que la digestión enzimática de la matriz láctea puede modificar la fracción detectable de AFM1, lo que refuerza la importancia de considerar la interacción entre la micotoxina y las proteínas de la leche en la evaluación de su comportamiento y riesgo potencial. Asimismo, los hallazgos resaltan la utilidad de incorporar enfoques de liberación enzimática al análisis de AFM1 en productos lácteos.

Nota declaratoria:

Referencia: Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. S., Castañeda-Ovando, A., Jiménez-Osorio, A. S., Tello-Solís, S. R., Jiménez-Pérez, C., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2026). *In vitro* release of aflatoxin M1 during enzymatic digestion of milk proteins: Evaluation and analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 106(2), 1407–1413. <https://doi.org/10.1002/jsfa.70201>; **Estado de publicación:** Publicado; **Nombre de la revista:** Journal of the Science of Food and Agriculture; **Indexación:** JCR; **Factor de impacto:** 3.5

In vitro release of aflatoxin M1 during enzymatic digestion of milk proteins: evaluation and analysis

Araceli Monter-Arciniega,^a Nelly Del Socorro Cruz-Cansino,^{a*} Araceli Castañeda-Ovando,^b Angélica Saraí Jiménez-Osorio,^c Salvador Ramón Tello-Solís,^d Carlos Jiménez-Pérez^e and Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano^{e*}

Abstract

BACKGROUND: Cow's milk is one of the most widely consumed foods worldwide due to its high nutritional value and rich content of biologically beneficial proteins. However, aflatoxin M1 (AFM1), a mycotoxin recognized for its carcinogenic potential, has been detected in milk, where it can bind to proteins. This study compared three methods for extracting AFM1 from commercial milk samples before and after enzymatic digestion with pepsin and pancreatin.

RESULTS: Initial AFM1 concentrations and those following *in vitro* enzymatic digestion were measured using high-performance liquid chromatography. Extraction method 3 proved the most effective, combining acetonitrile with ultrasound-assisted extraction. AFM1 was detected in all milk samples at concentrations ranging from 0.25 to 12 $\mu\text{g L}^{-1}$, exceeding national (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) and international (0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$) regulatory limits.

CONCLUSION: Enzymatic digestion increased AFM1 levels 3.66-fold in four liquid milk samples, suggesting that raw milk measurements might underestimate consumer exposure. Thus, evaluating AFM1 bioaccessibility is essential for accurate toxicological risk assessment of milk and dairy products.

© 2025 Society of Chemical Industry.

Keywords: aflatoxin M1; cow's milk; *in vitro* enzymatic digestion; hydrolysis

INTRODUCTION

Cow's milk is a nutritionally rich food, widely consumed across the globe for its proteins, lipids, and carbohydrates, which are linked to benefits for bone, immune, and metabolic health.¹ Milk proteins are composed mainly of caseins (80%) and whey proteins (20%).² Caseins are organized into micellar structures, with κ -casein creating a protective outer layer. These proteins are amphipathic, hydrophobic, and prone to proteolysis during digestion. In contrast, major whey proteins such as β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and serum albumin remain soluble and significantly contribute to milk's nutritional and functional properties.³

The high global consumption of liquid milk (LM) and dairy products reflects their versatility in the food industry.⁴ In Mexico, milk consumption reached 131 L per person per year.⁵ Dairy production plays a crucial role in the national agricultural sector, supporting a wide range of products, including pasteurized, ultra-high-temperature and flavored milk, powdered milk, fermented products, and cheeses.^{6,7} In recent years, several global studies have reported the presence of aflatoxin M1 (AFM1) in cow's milk from countries such as Bangladesh, Croatia, Ecuador, Ethiopia, India, Iran, Mexico, Paraguay, and Tunisia.^{8–16} AFM1 is the hydroxylated hepatic metabolite of aflatoxin B1 (AFB1). It is

excreted in milk when dairy animals consume feed contaminated with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, both fungi known to

* Correspondence to: NDS Cruz-Cansino, Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Ex. Hacienda La Concepción Circuito S/N, Pachuca-Actopan, San Juan Tilcuautla, 42160, Hidalgo, México. E-mail: ncruz@uaeh.edu.mx; or GM Rodríguez-Serrano, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra sección, 09340, Ciudad de México, México. E-mail: gmrs@xanum.uam.mx

^a Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Ex. Hacienda La Concepción Circuito S/N, San Juan Tilcuautla, México

^b Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca-Tulancingo, México

^c Área Académica de Enfermería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, San Juan Tilcuautla, México

^d Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

^e Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

produce AFB1.¹⁷ The International Agency for Research on Cancer has classified AFM1 as a Group 1 human carcinogen.¹⁸ Although less toxic than AFB1, several studies have reported associations of AFM1 with gastrointestinal, immunological, genotoxic, inflammatory, and mutagenic effects.^{18,19} A key factor affecting AFM1 bioavailability is its strong binding affinity to milk proteins, particularly caseins and α -lactalbumin, through non-covalent interactions involving polar and hydrophobic amino acid residues.²⁰⁻²⁴ Pepsin and pancreatin are essential digestive enzymes. Pepsin, secreted in the stomach, initiates the hydrolysis of proteins.²⁵ Meanwhile, pancreatin – a mixture of amylases, lipases, and proteases – acts in the small intestine to digest carbohydrates, fats, and proteins. These enzymes can break milk proteins into smaller peptides, potentially altering AFM1–protein interactions and facilitating their release into the aqueous phase.²⁶

Strategies to reduce AFM1 bioavailability, such as applying lactic acid bacteria in *in vitro* enzymatic digestion (IED) models, have been investigated.^{27,28} However, little is known about the release of AFM1 from protein matrices during gastrointestinal hydrolysis. The behavior of AFM1 during milk protein hydrolysis remains uncharacterized. This study quantifies AFM1 concentrations before and after enzymatic digestion of commercial milk, providing new insights into its bioaccessibility and potential underestimation of dietary exposure.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Seven commercial cow's milk brands were analyzed, comprising pasteurized (A–D) and ultra-pasteurized (E–G) LM, all packaged in Tetra Pak and purchased from retail stores in Pachuca, Hidalgo, Mexico. AFM1 quantification employed a certified standard from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Milk samples were purified using Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balance (O-HLB) solid-phase extraction (SPE) cartridges (3 cc Vac Cartridge, 30 μ m particle size, 60 mg sorbent; Waters Corporation, Milford, MA, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade solvents, including acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), dichloromethane (DCM), acetone (ACT), *n*-hexane (HEX), and acetic acid, were obtained from JT Baker (Centre Valley, PA, USA). All procedures used HPLC-grade deionized water (DW). The IED process was carried out with pepsin from porcine gastric mucosa (≥ 3200 U mg^{-1} protein, 30 kDa), pancreatin from porcine pancreas (4 \times USP specifications), sodium cholate hydrate (C₂₄H₃₉NaO₅·xH₂O), sodium deoxycholate (C₂₄H₃₉NaO₄), and cellulose dialysis membranes, all purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

AFM1 extraction

Three different methodologies were employed for the extraction of AFM1:

Extraction 1 (E1). Each 40 mL LM sample passed through a pre-conditioned SPE cartridge (O-HLB), which was previously hydrated with 5 mL ACN and 10 mL DW. A DCM:ACT (95:5, v/v) solution (6 mL), followed by 10 mL hexane, eluting the cartridge. The eluate was evaporated to dryness in a rotary evaporator (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) at 50 °C.²⁹ The dried extract was reconstituted with 250 μ L ACN and filtered through a 0.45 μ m polytetrafluoroethylene membrane filter (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany).

Extraction 2 (E2). This method was adapted from Wang *et al.*³⁰ with modifications. The SPE cartridge was preconditioned using 5 mL MeOH and 5 mL DW. 40 mL LM passed through a new

cartridge for each sample. The cartridge was eluted with 5 mL MeOH, and the eluate was evaporated to dryness using a rotary evaporator. The residue was then reconstituted in 250 μ L ACN and filtered through a 0.45 μ m membrane filter.

Extraction 3 (E3). Each 40 mL milk sample was mixed with 160 mL ACN in a 250 mL centrifuge tube. After resting for 10 min, the mixture underwent sonication in an ultrasonic bath (Elma, Hohentwiel, Singen, Germany) for 30 min. Centrifugation was performed at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was then concentrated to 2 mL using a rotary evaporator at 50 °C. Subsequently, 4 mL DW was added, and the pH was adjusted to 5.0 \pm 0.2 using a monobasic potassium buffer (pre-adjusted to pH 2.0 with 1 mol L⁻¹ HCl). The SPE cartridge underwent thorough preconditioning with 2 mL ACN, followed by 2 mL DW. Each sample passed through the cartridge, and elution was carried out with 4 mL ACN.³¹ The eluate was evaporated to dryness, and the final residue was reconstituted in 250 μ L ACN and filtered through a 0.45 μ m membrane. Each sample underwent triplicate analysis, ensuring a comprehensive evaluation of the results.

In vitro enzymatic digestion

20 mL of each LM sample was placed in 50 mL Falcon tubes. The pH was adjusted to 2.0 using 6 mol L⁻¹ hydrochloric acid, and 120 μ L of a pepsin solution from porcine gastric mucosa (≥ 3200 U mg^{-1} protein, 30 kDa), prepared at 40 mg mL⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ hydrochloric acid, was added. Samples were incubated for 2 h at 37 °C with constant agitation at 60 rpm in an orbital shaker incubator (Labtech Co., Mukakuning, Batan, Indonesia). After incubation, 1.5 mL of a bile–pancreatin solution was added, containing 12.5 mg sodium cholate hydrate, 12.5 mg sodium deoxycholate, and 5 mg pancreatin from porcine pancreas (4 \times USP specifications), all dissolved in 1 mL of 0.1 mol L⁻¹ sodium bicarbonate. The mixture was homogenized using a vortex mixer (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA). A 12 kDa cellulose dialysis membrane (15 cm long \times 3.3 cm wide) was pre-treated by boiling in deionized water for 1 h. The digested sample was transferred into the prepared dialysis bag, which was then sealed with 50 mm dialysis tubing closures. Dialysis was conducted in a 0.1 mol L⁻¹ sodium bicarbonate solution at pH 7.5 for 16 h at 37 °C under constant shaking at 60 rpm.³² The dialyzed fraction of each LM sample was subsequently used for AFM1 extraction and quantification via the E3 method.

Identification and quantification of AFM1

A standard calibration curve for AFM1 was prepared using serial dilutions ranging from 0.25 to 12 μ g L⁻¹, based on a stock solution of AFM1 at 100 μ g mL⁻¹ that was reconstituted in ACN. Quantification was conducted using HPLC with ultraviolet (UV) detection (Waters Corporation). The system comprised a solvent delivery module, an autosampler, and a photodiode array UV detector (Model 2996-A) fitted with a reversed-phase C18 column (4.6 \times 150 mm, 5 μ m; Waters Corporation). The mobile phases used were ACN (phase A) and 0.1% acetic acid in water (phase B). The injection volume was 20 μ L, with a 1 mL min⁻¹ flow rate over a 35 min run. The gradient elution conditions were as follows: 0–11 min (25% A–75% B), 11–15 min (70% A–30% B), 15–25 min (70% A–30% B), 25–26 min (25% A–75% B); 26–35 min (25% A–75% B). AFM1 was detected at a wavelength of 365 nm. Chromatographic data were processed using Empower Personal software, version 6.01.2154.026 (Waters Corporation).³⁰

Method validation for AFM1 quantification

The analytical method was validated according to the International Council for Harmonisation guidelines,³³ and the main parameters are summarized in Table 1.

Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate using three independent batches. Results are presented as mean \pm standard deviation. A one-way analysis of variance was carried out to assess statistically significant differences among the extraction methods (E1–E3) before and after enzymatic hydrolysis. Tukey's test was applied for multiple comparisons, with a significance level set at $P < 0.05$. Statistical analyses were conducted using SPSS software, version 25.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of AFM1

Figure 1 illustrates the chromatographic profiles of AFM1 obtained through HPLC. The AFM1 standard (Fig. 1(a)) had a retention time of 19.04 ± 0.22 min, with a detection wavelength (λ) of 365 nm. The chromatograms of the initial (F) sample (Fig. 1(b)) and post-IED (Fig. 1(c)) are also presented. The detection and quantification limits were 0.09 and $0.28 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Among all the samples analyzed, the lowest concentration of AFM1 was detected at mark E ($0.66 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$), while mark B exhibited the highest level ($7.09 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$). These findings align with those of Herzallah *et al.*,³⁴ who reported AFM1 concentrations ranging from 0.51 to $2.79 \mu\text{g L}^{-1}$ in milk samples analyzed by HPLC–UV detection using SPE for toxin purification. Various studies have confirmed the widespread presence of AFM1 in LM intended for human consumption in Mexico. Reports consistently indicate AFM1 detection in 100% of tested samples. Concentration levels ranging from 0.1 to $23.1 \mu\text{g L}^{-1}$ have been documented using HPLC and enzyme-linked immunosorbent assay techniques.^{16,35–39}

Table 1. Method validation parameters for aflatoxin M1 (AFM1) quantification using HPLC

Parameter	Value	Description
Limit of detection	$0.094 \mu\text{g L}^{-1}$	Based on the standard deviation of the intersection and the slope of the calibration curve
Limit of quantification	$0.285 \mu\text{g L}^{-1}$	
Recovery	81.8%	Evaluation was performed by adding a known concentration of AFM1 ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) to a previously analyzed LM sample
Repeatability	2.51%	Evaluated by calculating the relative standard deviation of three repeated injections of liquid milk
Linearity	0.9974	Coefficient of determination of the calibration curve of AFM1 (0.25 – $12.00 \mu\text{g L}^{-1}$)

Aflatoxin M1 extraction analysis

The extraction method used for AFM1 from LM is crucial for obtaining reliable analytical results.³⁹ SPE has been extensively employed to purify and concentrate analytes, such as aflatoxins, in food matrices. This method uses cartridges containing solid sorbents that selectively retain and elute analytes based on their hydrophobic interactions. O-HLB necessitate preconditioning with organic solvents followed by water, or a combination of the two, to activate the stationary phase and improve analyte interaction.⁴⁰ The choice of solvent is determined by the analyte's polarity and the chemical nature of the sorbent. O-HLB sorbents are designed to be compatible with both polar and non-polar solvents. Recommended activation includes ACN, MeOH, and water. Previous reports indicate that the polymeric reverse-phase matrix of O-HLB enables efficient cleanup and AFM1 purification from cow's milk, with reported recovery rates ranging from 75% to 92.6%.^{29–31,42,41} This study applied three extraction protocols (E1–E3) using O-HLB cartridges, each with different elution solvents: DCM–ACT–HEX in E1, MeOH in E2, and ACN in E3. Among these, E3 yielded the highest AFM1 recovery, demonstrating 3.06- and 4.60-fold increases compared to E1 and E2, respectively (Fig. 2). The enhanced performance of E3 may be attributed to ultrasonic treatment, which has been demonstrated to promote the release of analytes from food matrices.⁴³ In this context, ultrasound-assisted sonication may have disrupted protein–toxin interactions, especially between AFM1 and caseins, facilitating its migration into the aqueous phase.^{44,45} Furthermore, ACN is a polar aprotic solvent with a low affinity for proteins, making it highly effective in extracting AFM1 from complex matrices.⁴⁶ Combining sonication and acetonitrile elution proved the most efficient approach for recovering AFM1 from LM.

MeOH, used in extraction method E2, is a solvent commonly employed in aflatoxin extraction because of its polarity, ability to solubilize a wide range of compounds, acceptable recovery rates, and low cost.^{31,47} However, the AFM1 concentrations recovered in this study (0.37 ± 0.03 to $1.07 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$) indicate that MeOH was less efficient than ACN, likely due to its higher polarity, which may restrict interaction with the hydrophobic regions of AFM1. In contrast, the solvent mixture used in E1 (DCM–ACT–HEX) did not effectively extract AFM1, possibly due to differential distribution between solvent phases. Variations in solvent polarity, solubility, and chemical affinity with the toxin may have influenced this.⁴⁸ Based on these findings, E3 has been chosen as the preferred extraction method for the subsequent analysis of AFM1 concentrations before and after enzymatic hydrolysis.

Quantification of AFM1

The AFM1 concentrations detected in the analyzed LM samples (A–G) exceeded both the national maximum permissible limit ($0.50 \mu\text{g L}^{-1}$) and the international regulatory threshold ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$).^{49,50} The findings, summarized in Fig. 3, align with results reported earlier in various countries, including Mexico.^{8–16} These data highlight a persistent global problem linked to poor storage practices of animal feed and fodder for livestock. Such practices promote fungal contamination, particularly by *Aspergillus* species, leading to the subsequent production of AFB1. After ingesting contaminated feed, AFB1 is metabolized in the liver of lactating animals into AFM1, which is then excreted in milk.⁵¹ Although AFM1 is about ten times less toxic than AFB1, it remains a concern due to its established carcinogenic, genotoxic, and immunosuppressive properties.^{18,19} These findings highlight concerns regarding exposure to AFM1 from milk

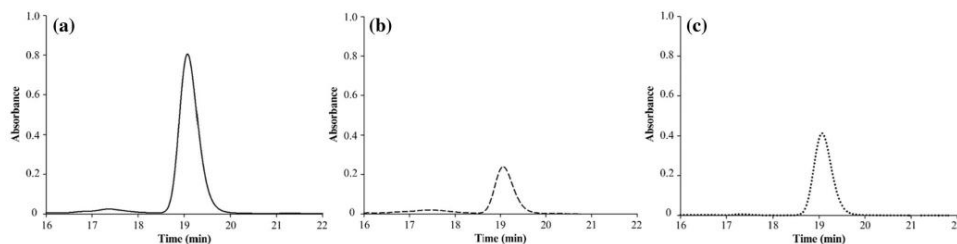


Figure 1. High-performance liquid chromatograms of aflatoxin M1 (AFM1): (a) AFM1 standard with a retention time of 19.04 ± 0.22 min at $\lambda = 365$ nm; (b) chromatogram of milk sample F prior to *in vitro* enzymatic digestion; (c) chromatogram of AFM1 following *in vitro* enzymatic digestion of sample F.

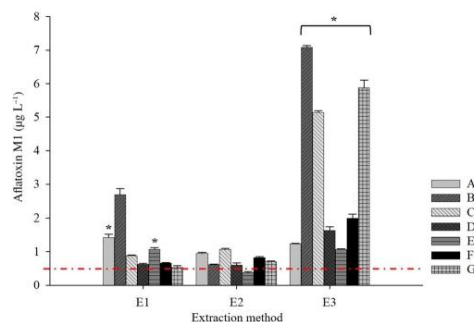


Figure 2. Aflatoxin M1 concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in cow's milk samples were extracted using three methods; (A–G) commercial cow's milk brands; (E1) dichloromethane–acetone–*n*-hexane; (E2) methanol; (E3) acetonitrile.

consumption, especially among vulnerable groups such as children and adolescents with high dairy intake.

***In vitro* enzymatic digestion of AFM1**

Pepsin and pancreatin are digestive enzymes that hydrolyze proteins into smaller peptides, facilitating absorption in the small intestine.^{25,26} Table 2 presents AFM1 concentrations measured

before and after enzymatic hydrolysis. Four samples showed a significant release of AFM1 following digestion, with increases ranging from 2.95 ± 0.20 to $4.58 \pm 0.03 \mu\text{g L}^{-1}$, exceeding the initial AFM1 levels. Among them, milk E exhibited the highest AFM1 release during digestion. Milk proteins, including caseins and whey proteins such as α -lactalbumin and β -lactoglobulin, possess amphipathic structures that enable them to bind and transport various bioactive and toxic compounds, including mycotoxins.²⁰ Reports indicate that over 80% of AFM1 strongly binds to the hydrophobic domains of casein micelles and specific regions of whey proteins through non-covalent interactions involving aromatic and polar amino acid residues.^{20–23} Jiménez-Pérez *et al.*²⁴ also noted the high-affinity binding of AFM1 to α -lactalbumin via hydrophobic interactions, forming stable complexes. Milk proteins undergo progressive hydrolysis during digestion under acid and neutral pH conditions. This process leads to the cleavage of peptide bonds ($-\text{CO}-\text{NH}-$) and the disruption of protein–ligand complexes. In simulated gastrointestinal environments, pepsin initiates proteolysis in the stomach and pancreatin-mediated hydrolysis in the small intestine. The reported degrees of hydrolysis for milk proteins range from 30% to 60%, depending on enzymatic activity, exposure time, and matrix complexity. This enzymatic breakdown facilitates the release of previously bound compounds, including AFM1, into the aqueous phase.^{20,21,52,53}

Following enzymatic hydrolysis, the observed increase in AFM1 concentrations suggests that protein matrix degradation altered the AFM1–protein interaction, releasing previously bound toxins.

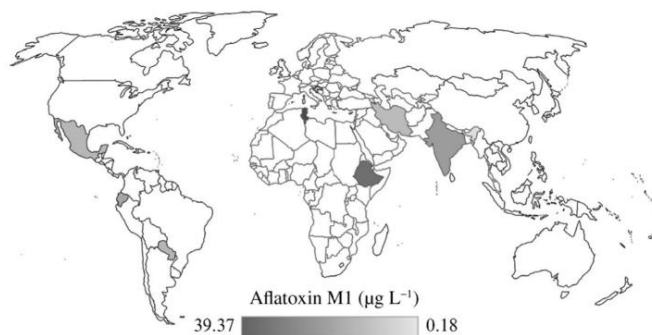


Figure 3. Geographic distribution of aflatoxin M1 ($\mu\text{g L}^{-1}$) concentrations reported in different places worldwide. Values were sourced from published literature. Countries without shaded areas indicate regions for which no original data were available in the reviewed sources.

Table 2. Aflatoxin M1 (AFM1) levels ($\mu\text{g L}^{-1}$) in commercial liquid milk (LM) before and after *in vitro* enzymatic digestion, including fold-release values

LM sample	Initial	Final	Fold-release ^a
A	1.23 ± 0.02ef	4.42 ± 0.03f	3.59 ± 0.08b
B	7.09 ± 0.05a	5.81 ± 0.06b	—
C	5.14 ± 0.06c	4.71 ± 0.06e	—
D	1.64 ± 0.10de	4.81 ± 0.05de	2.95 ± 0.20c
E	1.07 ± 0.02f	4.89 ± 0.07d	4.58 ± 0.03a
F	1.99 ± 0.11d	7.00 ± 0.04a	3.52 ± 0.19b
G	5.87 ± 0.24b	5.04 ± 0.06c	—

Values are expressed as mean ± standard deviation from three independent replicates. Different lower-case letters within the same row indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

^a Fold-release is described as the relationship between AFM1 concentration before and after *in vitro* digestion.

Similar findings were reported by Romero-Sánchez *et al.*,^{54,55} who demonstrated enhanced availability of AFM1 after simulated gastrointestinal digestion, supporting the notion that enzymatic hydrolysis increases the intestinal bioaccessibility of this toxin mycotoxin. This outcome provides clear evidence of increased AFM1 bioaccessibility during gastrointestinal digestion, directly enhancing its potential for intestinal absorption and toxicological impact. Such findings highlight a critical gap in current regulatory risk assessments, as reliance solely on AFM1 concentrations in undigested milk likely leads to a substantial underestimation of consumer exposure. Therefore, integrating bioaccessibility data into food safety evaluations is imperative to ensure more reliable and protective toxicological risk assessments.

Conversely, samples B, C, and G displayed lower AFM1 concentrations after hydrolysis, which may be due to the saturation of the SPE column. This phenomenon arises when the cartridge's active sites become fully occupied, restricting further analyte retention. When AFM1 concentrations are high (5.14 ± 0.06 to $7.09 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$) and the milk matrix is abundant in proteins, lipids, and carbohydrates, the sorbent capacity of the O-HLB cartridge (6 mg) might be exceeded, potentially hindering AFM1 recovery.^{41,56} Consequently, some analytes may pass through unrestrained, resulting in an underestimation of AFM1 content. A similar shift in the distribution has been observed in goat's milk, where elevated initial AFM1 levels modified its binding behavior and matrix interactions.²¹

CONCLUSIONS

The extraction methods utilized in this study enabled the quantification of AFM1 in commercially available milk samples. Method 3, incorporating ACN and ultrasound-assisted extraction, proved the most effective for recovering AFM1. Additionally, the enzymatic hydrolysis of milk proteins using pepsin and pancreatin promoted the release of AFM1 bound to the protein matrix, which led to higher aqueous-phase concentrations in four out of seven samples.

Regarding food safety, AFM1 concentrations in all analyzed samples exceeded the maximum limits established by Mexican regulations (NOM-243-SSA1-2010) and European Union standards, indicating a potential risk to public health. Overall, these findings provide new evidence that *in vitro* enzymatic digestion

increases the release of AFM1 from the milk protein matrix, thereby enhancing its bioaccessibility and potentially elevating toxicological risks to consumers. The observation of higher AFM1 concentrations after digestion in more than half of the samples indicates that assessments based solely on raw milk may substantially underestimate actual exposure. These results underscore the importance of reinforcing good agricultural and storage practices for livestock feed to reduce contamination by aflatoxin-producing fungi and, consequently, minimize AFM1 levels in milk and dairy products. Furthermore, regulatory agencies should consider integrating bioaccessibility data from *in vitro* digestion models into routine food safety monitoring. Such an approach would strengthen risk assessment and support the development of more protective public health policies, particularly for vulnerable populations with high milk consumption.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author Monter-Arciniega (1077200) acknowledges the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), Mexico.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that no conflict of interest could have influenced the research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Araceli Monter-Arciniega: investigation; writing – original draft; review and editing. Nelly Del Socorro Cruz-Cansino: project administration; review and editing; conceptualization; supervision. Araceli Castañeda-Ovando: review and editing; visualization. Angélica Sarai Jiménez-Osorio: review and editing; visualization; methodology. Carlos Jiménez-Pérez: review and editing; conceptualization and visualization. Salvador Ramón Tello-Solis: methodology; formal analysis; review and editing; visualization. Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano: project administration; review and editing; conceptualization and supervision.

REFERENCES

- 1 FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Gateway to dairy production and products*. Rome, Italy. (2024) Available: <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/milk-composition/>. [23 February 2024].
- 2 Li X, Spencer GW, Ong L and Gras SL, Beta casein proteins—a comparison between caprine and bovine milk. *Trends Food Sci Technol* **121**: 30–43 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.023>.
- 3 Sheng B, Nielsen SD, Poulsen NA and Larsen LB, Differential *in vitro* digestion rates in gastric phase of bovine milk with different κ -casein phenotypes. *J Dairy Sci* **104**:10462–10472 (2021). <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20073>.
- 4 FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Milk production* (2024). Available: <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/milk-production/en>. [13 May 2024].
- 5 SAGARPA, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, *Consumo de leche en México* (2024). <https://www.gob.mx/liconsa/articulos/consumo-de-leche-en-mexico>. [9 June 2024].
- 6 SAGARPA, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, *Crece la producción de leche en México* (2023). [Online]. Available: <https://www.gob.mx>.

- mx/agricultura/articulos/crece-la-produccion-de-leche-en-mexico-sagarpa. [20 June 2024].
- 7 CANILEC, Cámara Nacional de Industriales de la Leche. *Compendio de estadísticas del sector lácteo en México* (2024). [Online]. Available: <https://www.canilec.org.mx/>. [28 June 2024].
 - 8 Sumon AH, Islam F, Mohanto NC, Kathak RR, Molla NH, Rana S et al., The presence of aflatoxin M1 in milk and milk products in Bangladesh. *Toxins (Basel)* **25**:440 (2021). <https://doi.org/10.3390/toxins13070440>.
 - 9 Bilandžić N, Varga I, Varenina I, Solomun-Kolanović B, Božić-Luburić D, Dokić M et al., Seasonal occurrence of aflatoxin M1 in raw milk during a five-year period in Croatia: dietary exposure and risk assessment. *Foods* **11**:1959 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11131959>.
 - 10 Puga-Torres B, Salazar D, Cachuango M, Cisneros G and Gómez-Bravo C, Determination of aflatoxin M1 in raw milk from different provinces of Ecuador. *Toxins (Basel)* **12**:498 (2020). <https://doi.org/10.3390/toxins12080498>.
 - 11 Admasu FT, Melak A, Demissie B, Yenew C, Habtie ML, Bekele TT et al., Occurrence and associated factors of aflatoxin M1 in raw cow milk in South Gondar zone, north West Ethiopia. *Food Sci Nutr* **22**: 6286–6293 (2020). <https://doi.org/10.1002/fsn3.2589>.
 - 12 Sharma H, Jadhav VJ and Garg SR, Aflatoxin M1 in milk in Hisar city, Haryana, India and risk assessment. *Food Additives & Contaminants: Part B* **13**:59–63 (2020). <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1693434>.
 - 13 Mokhtari SA, Nemati A, Fazlzadeh M, Moradi-Asl E, Ardebili VT and Seddigh A, Aflatoxin M1 in distributed milks in northwestern Iran: occurrence, seasonal variation, and risk assessment. *Environ Sci Pollut Res Int* **29**:41429–41438 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18212-9>.
 - 14 Arrua AA, Arrúa PD, Moura-Mendes J, Cazaal C, Ferreira FP, Grabowski CJ et al., Presence of aflatoxin M1 in commercial milk in Paraguay. *J Food Prot* **84**:2128–2132 (2021). <https://doi.org/10.4315/JFP-21-196>.
 - 15 Hassouna KB, Salah-Abbès JB, Chaieb K, Abbès S, Ferrer E, Martí-Quijal FJ et al., The occurrence and health risk assessment of aflatoxin M1 in raw cow milk collected from Tunisia during a hot lactating season. *Toxins (Basel)* **15**:518 (2023). <https://doi.org/10.3390/toxins15090518>.
 - 16 Álvarez-Días F, Torres-Parga B, Valdivia-Flores AG, Quezada-Tristán T, Alejos-De La Fuente JI et al., *Aspergillus flavus* and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin M1 in bovine milk in Aguascalientes, México. *Toxins* **14**:292 (2022). <https://doi.org/10.3390/toxins14050292>.
 - 17 Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V and Kuca K, Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab Rev* **41**:1–7 (2009). <https://doi.org/10.1080/03602530802563850>.
 - 18 IARC, International Agency for Research on Cancer. *Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification* [Online] (2022). Available: <https://monographs.iarc.who.int/>. [4 May 2024].
 - 19 Gao YN, Wang JQ, Li SL, Zhang YD and Aflatoxin M1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins. *Food Chem Toxicol.* **96**:79–89 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.019>.
 - 20 Lopez C, Ramos L, Ramadan S, Bulacio L and Perez J, Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J Food Microbiol* **64**:211–215 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X).
 - 21 Barbiroli A, Bonomi F, Benedetti S, Mannino S, Monti L and Cattaneo T, Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *J Dairy Sci* **90**:532–540 (2007). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71536-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9).
 - 22 Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M and Piva G, On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* **7**:984–991 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>.
 - 23 Bianco G, Russo R, Marzocco S, Velotto S, Autore G and Severino L, Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon* **59**:644–650 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.010>.
 - 24 Jiménez-Pérez C, Tello-Solis SR, Gómez-Castro CZ, Alatorre-Santamaría S, Gómez-Ruiz R-SG et al., Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *J Photochem Photobiol B: Biol* **209**:111957 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>.
 - 25 Chamorro RDV, Rodríguez P, Paredes M and Coyago E, Caracterización de concentrados proteicos de *Begonia x semperlorens-cultorum* (*Begonia doublet*), actividad antioxidante, antiinflamatoria, digestibilidad gastrointestinal. *Rev Cubana Plantas Med* **28**:1–14 (2023).
 - 26 Ye Y, Engholm-Keller K, Fang Y, Nielsen CF, Jordà A, Lund MN et al., UHT treatment and storage of liquid infant formula affects protein digestion and release of bioactive peptides. *Food and Function* **13**: 344–355 (2022).
 - 27 Sevim S, Macit A, Sancak B and Kizil M, Aflatoxin M1 mitigation by novel biological agents and evaluation of bioaccessibility with enzymatic digestion in milk. *Food Biosci* **59**:103998 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103998>.
 - 28 Serrano-Niño JC, Cavazos-Garduño A, Hernández-Mendoza A, Applegate B, Ferruzzi MG, San Martín-González MF et al., Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an *in vitro* digestive model. *Food Control* **31**:202–207 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.023>.
 - 29 Manetta AC, Di Giuseppe L, Giammarco M, Fusaro I, Simonella A, Gramenzi A et al., High-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *J Chromatogr A* **1083**:219–222 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.039>.
 - 30 Wang Y, Liu X, Xiao C, Wang Z, Wang J, Xiao H et al., HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control* **28**:131–134 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.037>.
 - 31 Huang LC, Zheng N, Zheng BQ, Wen F, Cheng JB, Han RW et al., Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* **146**:242–249 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.047>.
 - 32 Ramírez-Moreno E, Marques CD, Sánchez-Mata MC and Goñi I, *In vitro* calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT* **44**:1611–1615 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.001>.
 - 33 WHO, World Health Organization, *Child Growth Standards* (2023). <https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards>. [20 January 2024].
 - 34 Herzallah SM, Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescence and UV detectors. *Food Chem* **114**:1141–1146 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.077>.
 - 35 Hernández-Falcón TA, Monter-Arciniega A, Cruz-Cansino NS, Alanís-García E, Rodríguez-Serrano GM, Castañeda-Ovando A et al., Effect of thermoultrasound on aflatoxin M1 levels, physicochemical and microbiological properties of milk during storage. *Ultrason Sonochem* **48**:396–403 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.018>.
 - 36 Quevedo-Garza PA, Amador-Espejo GG, Cantú-Martínez PC and Trujillo-Mesa JA, Aflatoxin M1 occurrence in fluid milk commercialized in Monterrey, Mexico. *J Food Saf* **38**:e12507 (2018). <https://doi.org/10.1111/jfs.12507>.
 - 37 Malla Bravo AC and Saula-López SV, Determinación del metabolito tóxico aflatoxina M1 en leches cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Universidad de Cuenca (2016).
 - 38 Patricia L, Noa M, López Y, González D, Noa E, Real M et al., Aflatoxin M1 levels in raw and pasteurized milk produced in Guadalajara, Mexico. *Rev Salud Anim* **34**:40–45 (2012).
 - 39 Carvajal M, Bolaños A, Rojo F and Méndez I, Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Prot* **66**:1885–1892 (2003). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1885>.
 - 40 Allaña-González J, Domínguez-Pérez I, Romero-González R, Van Camp C, Van Hassel H, Wannes R et al., Simultaneous detection and quantification of aflatoxin M1, eight microcystin congeners and nodularin in dairy milk by LC-MS/MS. *Chem* **11**:511 (2023). <https://doi.org/10.3390/chemosensors11100511>.
 - 41 Waters Oasis HLB 6 (2024). [Online]. Available <https://www.waters.com>. [15 April 2024].
 - 42 Hamidi S, Recent advances in solid-phase extraction as a platform for sample preparation in biomarker assay. *Crit Rev Anal Chem* **53**: 199–210 (2023). <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1947771>.

- 43 de Oliveira CF, Giordani D, Lutckemier R, Gurak PD, Cladera-Olivera F and Marczak LDF, Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. *LWT* **71**:110–115 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.027>.
- 44 Cohen SR, Plazanet M, Rols S, Voneshen DJ, Fourkas JT and Coasne B, Structure and dynamics of acetonitrile: molecular simulation and neutron scattering. *J Mol Liq* **348**:118423 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118423>.
- 45 Pecorelli I, Branciari R, Roila R, Ranucci D, Bibi R, Van-Asselt M *et al.*, Evaluation of aflatoxin M1 enrichment factor in different cow milk cheese hardness category. *Ital J Food Saf* **9**:8419 (2020). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8419>.
- 46 De Girolamo A, Lippolis V and Pascale M, Overview of recent liquid chromatography mass spectrometry-based methods for natural toxins detection in food products. *Toxins* **14**:328 (2022). <https://doi.org/10.3390/toxins14050328>.
- 47 Shen MH and Singh RK, Determining aflatoxins in raw peanuts using immunoaffinity column as sample clean-up method followed by normal-phase HPLC-FLD analysis. *Food Control* **139**:109065 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109065>.
- 48 Van Hassel WHR, Huybrechts B, Masquelier J, Wilmotte A and Andjelkovic M, Development, validation and application of a targeted LC-MS method for quantification of microcystins and nodularin: towards a better characterization of drinking water. *Water* **14**:1195 (2022). <https://doi.org/10.3390/w14081195>.
- 49 NOM-243-SSA1-2010, Norma Oficial Mexicana 2010 Leche, fórmula láctea, producto lácteo y derivados lácteos Disposiciones y aplicaciones sanitarias Métodos de prueba. México [Online]. Available: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/>. [3 September 2024].
- 50 EC, European Commission, 466/2001. Setting maximum levels for certain in foodstuffs (2006). Official Journal of the European Union [Online]. Available: https://commission.europa.eu/index_es. [3 September 2024].
- 51 Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S and Severino L, Aflatoxin B1 and M1: biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins* **10**:214 (2018). <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>.
- 52 Wang J, Saxena R, Vanga SK and Raghavan V, Effects of microwaves, ultrasonication, and thermosonication on the secondary structure and digestibility of bovine milk protein. *Foods* **11**:138 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11020138>.
- 53 Loveday SM, Protein digestion and absorption: the influence of food processing. *Nutr Res Rev* **36**:544–559 (2023). <https://doi.org/10.1017/S0954422422000245>.
- 54 Romero-Sánchez I, Gracia-Lor E and Madrid-Albarrán Y, Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of *in vitro* bioaccessibility from white and brown rice. *Food Chem* **436**:137738 (2024a). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137738>.
- 55 Romero-Sánchez I, Alonso-Núñez I, Gracia-Lor E and Madrid-Albarrán Y, Analysis and evaluation of *in vitro* bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in plant-based milks. *Food Chem* **460**:140538 (2024b). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140538>.
- 56 Tahir NI, Hussain S, Javed M, Rehman H, Shahzady TG, Parveen B *et al.*, Nature of aflatoxins: their extraction, analysis, and control. *J Food Saf* **38**:e12561 (2018). <https://doi.org/10.1111/jfs.12561>.

Capítulo 5: Efecto de la termoultrasonificación en la respuesta de aflatoxina M1 medida por cromatografía líquida de alta resolución en sistemas modelo

5.1 Introducción

La problemática principal referente a la AFM1 ya no se circunscribe a la detección de esta micotoxina en leche comercial, sino a la estrategia de tratamiento capaz de modificar su estructura y potencialmente, su toxicidad.

Las estrategias a nivel de intervención dentro de la cadena de producción y transformación láctea de control de AFM1 se han abordado en dos niveles principales. En la primera fase, se ha recurrido al uso de adsorbentes en el alimento del ganado (arcillas, zeolitas, levaduras) y a buenas prácticas de manejo del alimento para reducir la presencia de la AFB1; estas prácticas incluyen el secado adecuado de granos y forrajes antes del almacenamiento, el control de la humedad y la temperatura, la ventilación de silos y bodegas, la rotación del inventario, la exclusión de lotes visiblemente deteriorados y el monitoreo periódico de AFB1 en materias primas y raciones. Aunque efectivas, estas medidas dependen de la gestión agrícola y muestran una eficacia variable entre sistemas de producción (Ceniti et al., 2021; Panwar et al., 2019; Sanaldi et al., 2023).

En la propia leche, se han estudiado tratamientos físicos, químicos y biológicos dirigidos a disminuir la concentración o la biodisponibilidad de AFM1, incluidos procesos térmicos intensificados, radiación UV, ozonización, fermentación con bacterias ácido-lácticas o la acción de enzimas específicas. Sin embargo, muchas de estas aproximaciones enfrentan limitaciones relacionadas con la necesidad de aditivos, la posible formación de productos de degradación indeseables o la alteración de las propiedades fisicoquímicas y sensoriales (Fakhrabadipour et al., 2023; Gu et al., 2019; Nguyen et al., 2022, 2025).

En este contexto, la TUS se ha presentado como una tecnología con potencial para inducir transformaciones químicas en moléculas termoestables mediante la combinación de ultrasonido de alta potencia y temperatura moderada. La cavitación acústica generada durante la TUS produce condiciones locales de temperatura y presión, microchorros y radicales

libres, que podrían inducir modificaciones estructurales en las AF (Asaithambi et al., 2022; Bariya et al., 2023; Crudo et al., 2014; Shen et al., 2027).

Estudios previos han demostrado que el ultrasonido y sistemas similares son capaces de alterar la estructura de la AFB1 y otros compuestos, mediante mecanismos asociados a la cavitación, la oxidación sonoquímica y la generación de especies reactivas, permitiendo identificar productos de degradación y proponer rutas estructurales de modificación de la toxina (Basso et al., 2023; Jang & Min, 2025; Liu et al., 2019; Su et al., 2024). En conjunto, estos trabajos han aportado evidencia de las posibles alteraciones de los grupos estructurales relevantes para su toxicidad, incluso en sistemas combinados con fermentación o agua activada por plasma; sin embargo, la información disponible sigue concentrándose principalmente en AFB1, en matrices distintas de la leche y en indicadores de degradación química. En particular, aún se conoce poco sobre cómo la TUS modifica la respuesta analítica de AFM1 en métodos como HPLC-FLD, es decir, su señal de detección y cuantificación, incluyendo cambios en el área del pico, la intensidad de fluorescencia, el tiempo de retención o la posible formación de compuestos de transformación que interfieran con su determinación.

Por lo que, el presente capítulo se centra en evaluar el efecto de la TUS sobre el comportamiento analítico de la AFM1 en un sistema controlado. Para ello, se empleó una solución estándar de AFM1 a una concentración de 0.8 µg/mL en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 mM a pH 6.8), sometiendo alícuotas (15 mL) a diferentes combinaciones de tiempo y amplitud ultrasónica, bajo condiciones de temperatura moderada. La cuantificación mediante HPLC-FLD después del tratamiento permitió determinar las variaciones en la señal analítica asociada a AFM1 y aportar evidencia sobre la diferencia entre pérdida analítica de señal y posible transformación estructural de la molécula.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Reactivos y preparación de soluciones

La AFM1 se obtuvo de Enzo Life Sciences® (Nueva York, E.U.A.) con una pureza $\geq 95\%$. Cada vial, con un contenido de 0.1 mg de AFM1, se reconstituyó con 1.0 mL de ACN de grado HPLC (pureza $\geq 99\%$) para obtener una solución madre de 100 $\mu\text{g/mL}$ de AFM1 en. La solución se almacenó en frascos ámbar a 4 °C, protegida de la luz, de acuerdo con las condiciones de conservación recomendadas para estándares de aflatoxinas en solución.

Para el sistema modelo, se preparó una solución de trabajo de AFM1 a una concentración final de 0.8 $\mu\text{g/mL}$ en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 mM, ajustada a pH 6.8. Para ello se utilizaron dos soluciones madre reconstituidas. A partir de esta solución, se transfirieron alícuotas de 15 mL a matraces de doble revestimiento. Todas las muestras sometidas a los tratamientos de TUS presentaron la misma concentración inicial de AFM1. El agua desionizada se obtuvo de un sistema de purificación Millipore Replete (Replete Bioscience®, India).

5.2.2 Diseño experimental

El efecto de la TUS sobre la respuesta analítica de AFM1 se evaluó mediante un DECC de superficie de respuesta con dos factores independientes y puntos axiales. Los factores evaluados fueron tiempo de tratamiento (min), en el rango de 5 a 15 min y amplitud ultrasónica (%), en el rango de 70 a 90%.

Cada factor se codificó en cinco niveles ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$), donde α corresponde al valor de rotabilidad del diseño ($\alpha = 1.41$). El diseño incluyó 4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 4 réplicas en el punto central, para un total de 12 combinaciones de tratamiento. Se incluyó un control sin aplicación de TUS, que consistió en una alícuota de AFM1 conservada en el mismo sistema modelo, sin exposición a ultrasonido ni a tratamiento térmico independiente. (Tabla 1).

Para cada condición experimental se procesaron tres réplicas independientes. Durante los tratamientos, la temperatura de la muestra se monitoreo con un termómetro digital de sonda, registrando la temperatura inicial y final de cada tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño experimental central compuesto

Código	Tiempo (min)	Amplitud (%)
-1, -1	5	70
-1, +1	5	90
+1, -1	15	70
+1, +1	15	90
$-\alpha$, 0	3	80
$+\alpha$, 0	17	80
0, $-\alpha$	10	66
0, $+\alpha$	10	94
0, 0	10	80
0, 0	10	80
0, 0	10	80
0, 0	10	80

En todos los ensayos del DECC, la temperatura de entrada se mantuvo en promedio a 38 ± 0.3 °C y la temperatura de salida a 45 ± 0.9 °C

5.2.3 Tratamientos de TUS

Los tratamientos de TUS se aplicaron con un equipo de ultrasonido de potencia de tipo sonda a 130 vatios (Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, EUA) de watts 130, kHz 50/60 y VAC 220 equipado con una punta de titanio, unido a un baño de recirculación a una temperatura constante de 40 °C para controlar la temperatura de salida de las alícuotas.

La sonda ultrasónica se colocó a una profundidad constante de 0.5 cm respecto a la superficie de la muestra, evitando el contacto con las paredes y la parte inferior del contenedor. Esta posición se ajustó mediante un soporte fijo, antes de cada tratamiento para mantener condiciones geométricas uniformes entre las corridas experimental. Al finalizar cada tratamiento, se enfriaron inmediatamente en baño de hielo y se almacenaron a 4 °C hasta

su análisis. La alícuota sin tratamiento se almacenó en las mismas condiciones y se utilizó como control experimental.

5.2.4 Cuantificación de AFM1 por HPLC–FLD

La detección y cuantificación de AFM1 después de los tratamientos del DECC se realizó mediante HPLC-FLD en un sistema LC-20AD (Shimadzu Corporation®, Japón) equipado con auto muestreador (SIL-20AC XR), detector de fluorescencia (RF-20A XS), horno (CTO-20A), unidad de desgasificación (DGU-20A-5R) y un módulo de comunicación (CBM-20A, Shimadzu Corporation®, Japón).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna de fase reversa C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) ODS Hypersil™ (Thermo Scientific®, USA) mantenida a 30 °C. La fase móvil estuvo compuesta por agua:ACN 60:40 (v/v), con un flujo de 0.4 mL/min durante 15 min en modo isocrático. El volumen de inyección fue de 20 µL. La detección de AFM1 se realizó a una $\lambda_{exc}=365$ nm y $\lambda_{em}=435$ nm. La identificación del analito se basó en la comparación en el tiempo de retención obtenido en las muestras y el estándar de AFM1 analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas y en la coincidencia de las propiedades espectrales del detector de fluorescencia. Los cromatogramas se procesaron con el software del sistema HPLC LabSolutions® versión 5.87.1 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). La integración del área del pico de AFM1 se llevó a cabo conforme a los parámetros establecidos durante la calibración del sistema. Para cada condición de TUS, se calculó la concentración de AFM1 a partir de la curva de calibración externa (0.2 a 1.0 µg/mL) y se expresó en µg/mL.

5.2.5 Confiabilidad y eficacia analítica del método

El procedimiento analítico para la cuantificación de la AFM1 fue validado de acuerdo con las directrices del *International Council for Harmonization* (ICH, 2005). Se tomaron en cuenta los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, precisión y recuperación (ver Capítulo 3).

5.2.6 Análisis estadístico de los datos

Los resultados de la cuantificación de AFM1 se reportaron como media \pm desviación estándar (DE) de tres réplicas independientes. Las diferencias entre las distintas condiciones experimentales y control se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba post hoc de Tukey. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Adicionalmente, se ajustó un modelo de superficie de respuesta (MSR) de segundo orden para describir el efecto combinado del tiempo (X_1) y la amplitud (X_2) de la onda sobre la respuesta relativa de AFM1 (Y). Para este propósito, se emplearon los datos del DECC (Tabla 2) y se utilizó la forma general del modelo cuadrático (Ecuación 1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Donde Y : variable respuesta de AFM1 por HPLC-FLD, β_0 : coeficiente constante, β_1 β_2 : coeficiente de regresión de los términos lineales, β_{11} y β_{22} : coeficientes de regresión cuadráticos, β_{12} : coeficientes de interacción, X_1 y X_2 son las variables codificadas de tiempo y amplitud, respectivamente.

Se evaluó la significancia estadística de los coeficientes lineales, cuadráticos y de interacción mediante un ANOVA del MSR, considerando $p < 0.05$ como criterio de significancia. Asimismo, se determinó el coeficiente de determinación R^2 . Las superficies de respuesta y las curvas de nivel se llevaron a cabo con el software NCSS®.

5.3 Resultados y discusión

La identificación de la AFM1 se confirmó mediante un tiempo de retención de 10.6 ± 0.06 min bajo las condiciones cromatográficas establecidas. La cuantificación por HPLC-FLD en los sistemas modelo mostró que el tratamiento por TUS modificó estadísticamente la señal cromatográfica de la AFM1 en comparación con el control sin tratamiento ($0.8 \mu\text{g/mL}$, Figura 2).

En los puntos factoriales del DECC, los tratamientos de 5 min – 70% y 3 min – 80% de longitud de onda generaron la mayor señal de AFM1 con $2.55 \pm 0.02 \mu\text{g/L}$ y 1.72 ± 0.02

$\mu\text{g/L}$, respectivamente, equivalente a incrementos 2–3 veces respecto al control. Estas condiciones sugieren que exposiciones breves a TUS, especialmente a baja amplitud, favorecen una mayor respuesta, posiblemente debido a la desagregación de la micotoxina o a cambios en el entorno molecular que incrementan la eficiencia de excitación/emisión del fluoróforo, en línea con los efectos descritos para la AFM1 en diversos microambientes (Aghamohammadi et al., 2007; Bagheri et al., 2018).

Se ha documentado que la fluorescencia de las aflatoxinas puede verse afectada por el entorno molecular y por interacciones supramoleculares, como las descritas para AFM1 en presencia de ciclodextrinas o en sistemas de interacción con biomoléculas (Franco et al., 1998; Huang et al., 2022). Asimismo, algunos estudios han mostrado que el ultrasonido puede promover la transformación química de AFB1 mediante cavitación acústica, oxidación sonoquímica y formación de ROS (Liu et al., 2019; Su et al., 2024; Jang & Min, 2025). En contraste, extender el tiempo a 15 min a 70 o 90% de amplitud redujo la señal a 0.58–0.60 $\mu\text{g/L}$ (aproximadamente 67–69% del control de 0.87 $\mu\text{g/L}$), lo que indica un efecto que tiende a disminuir la respuesta aparente a medida que se prolonga el tratamiento.

A un tiempo fijo de 10 min, la concentración aparente de AFM1 fue significativamente mayor en los extremos del rango de amplitud (66% y 94%, aproximadamente 1.03 – 1.14 veces más que el control). Los puntos factoriales en el eje a 80% de amplitud de onda (3 y 17 min) también estuvieron por encima del mínimo central (1.72 y 0.67 $\mu\text{g/L}$, respectivamente).

El modelo cuadrático permitió generar la superficie de respuesta (Figura 3). Los coeficientes lineales de tiempo y amplitud, así como los términos cuadráticos y de interacción, resultaron estadísticamente significativos (Tabla 2). Esto confirma la contribución conjunta de ambos factores y de su interacción al modelo obtenido a partir de los datos experimentales. El modelo predijo un mínimo local en torno a 10 min y 80% de amplitud, coincidiendo con las mediciones experimentales en el punto central ($\sim 0.25 \mu\text{g/L}$) (Figura 2). En las zonas extremas del dominio experimental, la superficie de respuesta aumentó, como se observa en la Figura 3.

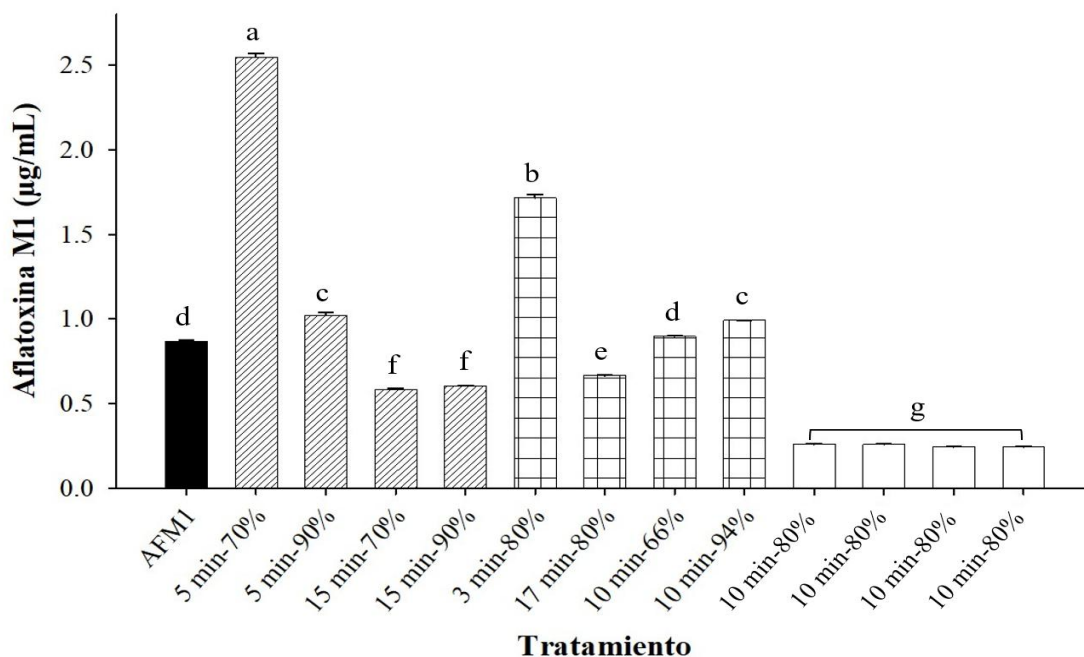


Figura 2. Concentración de AFM1 ($\mu\text{g/mL}$), obtenida por HPLC-FLD del DECC, incluido el control sin aplicación de TUS. Los resultados se reportan como media \pm DE de experimentos independientes realizados en triplicado. ^{a-g} superíndices distintos indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

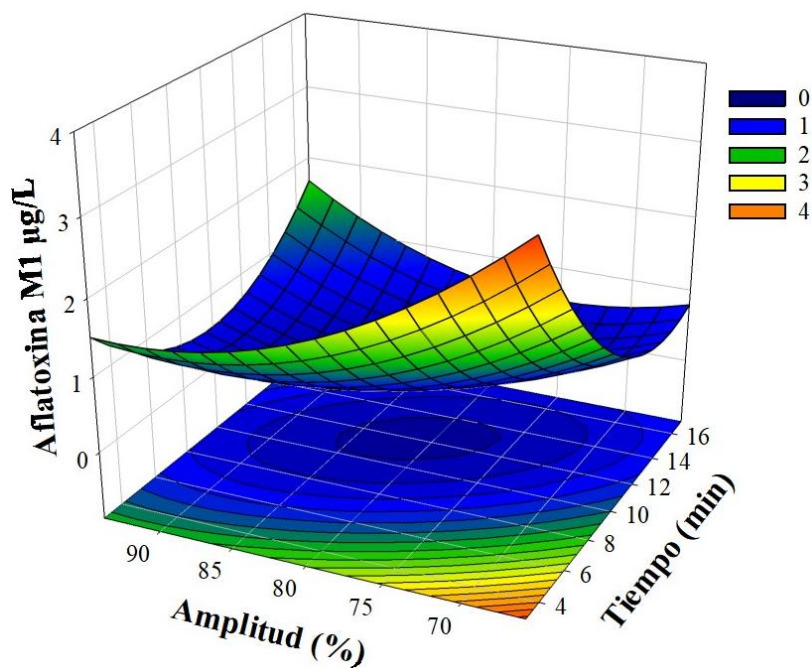


Figura 3. Superficie de respuesta del modelo cuadrático del DECC.

Tabla 2. Parámetros estimados del DECC

Parámetro	Grados de libertad	Coefficiente de regresión	Error estándar	Valor t	Nivel de probabilidad	Coefficiente de determinación parcial
Intercepto	1	31.78				
Tiempo	1	-1.141	0.204	-5.58	0.001	0.33
Amplitud	1	-0.610	0.154	-3.97	0.007	0.17
Tiempo ²	1	0.021	0.004	5.58	0.001	0.33
Amplitud ²	1	0.003	0.001	3.36	0.015	0.12
Tiempo*Amplitud	1	0.008	0.002	3.28	0.017	0.11

Los términos con $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos para explicar la variabilidad en la respuesta. El ajuste global del modelo se resume en el ANOVA de la Figura 3 (R^2 : 0.88).

La disminución de la señal integrada en el tiempo de retención característico de la micotoxina puede reflejar: 1) la transformación de AFM1 en productos con menor fluorescencia o con tiempos de retención diferentes, 2) una redistribución de la señal en varios picos de baja intensidad, difíciles de integrar de manera conjunta, o 3) cambios en el entorno microestructural de la molécula que afectan su respuesta fluorescente, como se ha descrito en estudios sobre su interacción con ciclodextrinas, ADN y proteínas, donde cambios en el entorno químico modificaron sus propiedades (Franco et al., 1998; Huang et al., 2022; Jiménez-Pérez et al., 2020).

En este contexto, la condición 10 min – 80% de amplitud de onda puede considerarse una región de tratamiento capaz de minimizar la respuesta cromatográfica debido a estos cambios. Sin embargo, la naturaleza química y el perfil toxicológico de los productos formados deben confirmarse mediante análisis estructurales y ensayos biológicos complementarios.

La evidencia disponible indica que el efecto del ultrasonido sobre las AF depende de la matriz, de las condiciones de operación y de la técnica analítica empleada. En solución acuosa, Liu et al. (2019) demostraron que el ultrasonido de potencia puede degradar AFB1 e identificar productos de transformación mediante UHPLC acoplado a espectrometría de masas, lo que permitió proponer rutas de reacción asociadas a modificaciones en el doble

enlace C8=C9, en el anillo lactona y en el grupo metoxi. En una matriz más compleja, Basso et al., (2023) evaluaron masas de trigo contaminadas con 50 ng/g de AFB1 y aplicaron ultrasonido en baño a 40 kHz y a 35 °C durante 10, 30 y 60 min; en ese caso, el análisis se limitó a la reducción cuantitativa mediante HPLC, sin caracterización estructural de los productos.

De manera complementaria, Su et al. (2024) mostraron que el ultrasonido de doble frecuencia aceleró la degradación de AFB1 y aumentó la generación de radicales hidroxilos, lo que sugiere un papel importante de la configuración acústica y de la intensidad del proceso sonoquímico. Por su parte, Jang y Min (2025) observaron la degradación de AFB₁ en maíz mediante un sistema híbrido de ultrasonido y agua activada por plasma, aunque en una matriz sólida y bajo un esquema tecnológico distinto.

Estas evidencias respaldan la hipótesis de la modificación del perfil cromatográfico de la AFM1 en el presente estudio, relacionado con transformaciones estructurales promovidas por cavitación acústica y oxidación sonoquímica, en lugar de una simple pérdida analítica de la micotoxina. No obstante, es necesario corroborar esta hipótesis con análisis más detallados como espectrometría de masas, para elucidar los cambios estructurales a nivel molecular.

Por otra parte, la aplicación de diseños de superficies de respuesta en tecnologías ultrasónicas se ha consolidado como una herramienta eficaz para identificar regiones óptimas de operación y comprender la interacción entre los parámetros del proceso (Civil et al., 2024; Subramanian et al., 2017; Yang et al., 2017). Diversos trabajos en procesamiento de alimentos han empleado diseños centrales compuestos para optimizar la extracción, la modificación funcional o los tratamientos de conservación mediados por ultrasonido, demostrando que esta aproximación estadística permite reducir el número de corridas experimentales (Baltrusch et al., 2025; Pham et al., 2024; Priyadharsini et al., 2023; Rheem et al., 2023). La estrategia aplicada en este estudio se alinea con este enfoque: el modelo obtenido localiza la región de mínima respuesta cromatográfica de AFM1 y señala las condiciones de TUS que se utilizarán posteriormente en la caracterización espectroscópica y en la evaluación de la viabilidad celular.

5.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en sistemas modelo de AFM1, confirmaron que la TUS modifica el perfil cromatográfico de la AFM1 cuantificado por HPLC-FLD. El análisis mediante la metodología de superficie de respuesta evidenció que ambos factores evaluados, el tiempo y la amplitud, influyeron en la concentración de AFM1. El empleo de TUS, aplicado en condiciones centrales de operación, redujo la concentración de AFM1 determinada por HPLC-FLD.

Los resultados obtenidos del DECC y la superficie de respuesta permitieron la selección de condiciones para realizar la caracterización química de los productos generados y su relevancia toxicológica.

Referencias

- Asaithambi, N., Singha, P., & Singh, S. K. (2022). Comparison of the effect of hydrodynamic and acoustic cavitations on functional, rheological and structural properties of egg white proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 82, 103166. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103166>
- Aghamohammadi, M., & Alizadeh, N. (2007). Fluorescence enhancement of the aflatoxin B1 by forming inclusion complexes with some cyclodextrins and molecular modeling study. *Journal of Luminescence*, 127(2), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2007.03.012>
- Bagheri, M., & Fatemi, M. H. (2018). Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-aflatoxin B1 and G1 interactions. *Journal of Luminescence*, 202, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.05.066>
- Baltrusch, K. L., Torres, M. D., & Domínguez, H. (2025). Optimizing ultrasound-assisted extraction with custom design and response surface methodology: A case study using *Ulva* spp. *Ultrasonics Sonochemistry*, 120, 107443. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2025.107443>
- Basso, A. B. G., Ali, S., Corassin, C. H., Rosim, R. E., & de Oliveira, C. A. F. (2023). Individual and combined decontamination effect of fermentation and ultrasound on aflatoxin B1 in wheat-based doughs: A preliminary study. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 15(3), 96–103. <https://doi.org/10.15586/qas.v15i3.1244>
- Bariya, A. R., Rathod, N. B., Patel, A. S., Nayak, J. K. B., Ranveer, R. C., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Ozogul, F., Jambrak, A. R., & Rocha, J. M. (2023). Recent developments

- in ultrasound approach for preservation of animal origin foods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106676. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106676>
- Ceniti, C., Costanzo, N., Spina, A. A., Rodolfi, M., Tilocca, B., Piras, C., ... & Morittu, V. M. (2021). Fungal contamination and aflatoxin B1 detected in hay for dairy cows in south Italy. *Frontiers in Nutrition*, 8, 704976. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.704976>
- Civil, O., Şen, L., & Demirdöven, A. (2024). Investigating the effect of glucoamylase enzyme treatment and continuous ultrasound application on quality characteristics and aflatoxins degradation of hazelnut paste by Box-Behnken response surface design. *Food Biophysics*, 19(2), 471–489. <https://doi.org/10.1007/s11483-024-09837-7>
- Crudo, D., Bosco, V., Cavaglià, G., Mantegna, S., Battaglia, L., & Cravotto, G. (2014). Process intensification in food industry: Hydrodynamic and acoustic cavitation for fresh milk treatment. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 25, 55–59.
- Fakhrabadipour, M., Khajehrahimi, A. E., Haghdoost, N. S., Anvar, S. A., & Tala, M. (2023). Efficiency of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* for detoxification of aflatoxin M1 in skim milk. *International Journal of Dairy Technology*, 76(3), 564–571. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12942>
- Franco, C. M., Fente, C. A., Vázquez, B. I., Cepeda, A., Mahuzier, G., & Prognon, P. (1998). Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1: Fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00509-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00509-3)
- Gu, X., Sun, J., Cui, Y., Wang, X., & Sang, Y. (2019). Biological degradation of aflatoxin M1 by *Bacillus pumilus* E-1-1-1. *MicrobiologyOpen*, 8(3), e00663. <https://doi.org/10.1002/mbo3.663>
- Huang, G., Ma, J., Li, J., & Yan, L. (2022). Study on the interaction between aflatoxin M1 and DNA and its application in the removal of aflatoxin M1. *Journal of Molecular Liquids*, 355, 118938. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118938>
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. <https://database.ich.org>
- Jang, G. Y., & Min, S. C. (2025). Ultrasound treatment using plasma-activated water for aflatoxin B1 degradation in corn kernels. *Food Control*, 111791. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111791>
- Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S. R., Gómez-Castro, C. Z., Alatorre-Santamaría, S., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2020). Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111957. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>

- Liu, Y., Li, M., Liu, Y., & Bian, K. (2019). Structures of reaction products and degradation pathways of aflatoxin B1 by ultrasound treatment. *Toxins*, *11*(9), 526. <https://doi.org/10.3390/toxins11090526>
- Nguyen, T., Palmer, J., Loo, T., Shilton, A., Petcu, M., Newson, H. L., & Flint, S. (2022). Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim milk and degradation products after treatment. *Food Chemistry*, *390*, 133165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133165>
- Nguyen, T., Palmer, J., Pedley, J., Petcu, M., Newson, H. L., Keener, K., & Flint, S. (2025). The effect of variations in cold plasma conditions on the detoxification of aflatoxin M1 and degradation products. *International Dairy Journal*, *160*, 106103. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106103>
- Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Ram, C., & Kapila, R. (2019). Aflatoxin M1 detoxification ability of probiotic lactobacilli of Indian origin in in vitro digestion model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(2), 460–469. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9414-y>
- Pham, E. C., & Van Nguyen, D. (2024). Optimization of ultrasound-assisted biodiesel production from python fat oil using response surface methodology. *Energy Nexus*, *16*, 100331. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2024.100331>
- Priyadharsini, P., & Dawn, S. S. (2023). Optimization of fermentation conditions using response surface methodology (RSM) with kinetic studies for the production of bioethanol from rejects of *Kappaphycus alvarezii* and solid food waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(11), 9977–9995. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02195-w>
- Rheem, S. (2023). Optimizing food processing through a new approach to response surface methodology. *Food Science of Animal Resources*, *43*(2), 374–381. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2023.e7>
- Sanaldi, K., & Coban, A. Y. (2023). Detoxification of aflatoxin M1 in different milk types using probiotics. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *95*(suppl. 1), e20220794. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220794>
- Shen, X., Shao, S., & Guo, M. (2017). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*, 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13292>
- Su, H., Xie, Y., Cheng, X., Yang, Z., Mao, J., Yang, H., ... & Hu, H. (2024). The effect of dual-frequency ultrasound on synergistic sonochemical oxidation to degrade aflatoxin B1. *Food Chemistry*, *457*, 139708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139708>
- Subramanian, V., Shanmugam, N., Ranganathan, K., Kumar, S., & Reddy, R. (2017). Effect of combination processing on aflatoxin reduction: Process optimization by response

surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), e13230. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13230>

Yang, J., Zhao, R., Song, L., Yin, J., You, Y., Sun, C., & Li, Y. (2017). Optimized ultrasonic-assisted extraction of aflatoxin B1 in peanuts with response surface methodology. *Analytical Letters*, 50(4), 629–640. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1195067>

Capítulo 6: Evaluación espectroscópica de los cambios estructurales en aflatoxina M1 tratada por termoultrasonificación

6.1 Introducción

El desarrollo de estrategias eficaces para gestionar el potencial tóxico de AFM1 requiere ir más allá de la simple cuantificación mediante métodos cromatográficos y avanzar hacia la caracterización estructural de la molécula y de sus posibles productos de transformación. Tecnologías como la TUS generan entornos extremos de cavitación y micro calentamiento local capaces de inducir cambios conformacionales, alteraciones en sistemas π conjugados y modificaciones en el entorno de grupos funcionales clave del AFM1 (Bariya et al., 2023). Por ello, resulta imprescindible disponer de herramientas que permitan detectar, de manera directa, cambios conformacionales o de estructura fina que no siempre se reflejan de forma evidente en un análisis por HPLC.

En este contexto, las técnicas espectroscópicas aportan información complementaria a la del HPLC-FLD, proporcionando "huellas dactilares" asociadas a los grupos cromóforos y a las vibraciones de los enlaces moleculares. La AFM1, al igual que otras AF, presenta una fluorescencia intrínseca debida a su sistema conjugado cumarínico y al anillo lactónico; bajo excitación en el rango de 360–365 nm y emisión alrededor de 425–435 nm, lo que permite su detección y cuantificación (Ghaffarian-Bahraman et al., 2023; Rabie et al., 2024). Las variaciones en el entorno electrónico de la molécula, como las inducidas por la apertura del anillo de lactona, la alteración del doble enlace del anillo furánico o la formación de productos de reacción menos fluorescentes permiten evaluar el efecto de los tratamientos aplicados (Barbiroli et al., 2007; Bianco et al., 2012; Jiménez-Pérez et al., 2020; Peng et al., 2023; Prandini et al., 2009).

Por otro lado, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), especialmente con reflectancia total atenuada (ATR), proporciona una visión complementaria basada en las vibraciones de grupos funcionales específicos, como los carbonilos de lactona, funciones de éter y sistemas aromáticos conjugados, presentes en AF (Dutta et al., 2017; Wu et al., 2020).

Estudios recientes han utilizado FTIR-ATR para analizar la interacción de la AFM1 con las proteínas de la leche, mostrando cambios en las bandas amidas y en la región 1700-1600 cm^{-1} , indicando alteraciones en la estructura secundaria de las proteínas y una fuerte afinidad con la micotoxina por estos sistemas (Harshitha et al., 2023; Yao et al., 2020). Harshitha et al. (2023) evaluaron proteínas lácteas mediante ATR-FTIR acoplado a la quimiometría y encontraron que la región amida I resultó especialmente informativa para detectar cambios conformacionales inducidos por AFM1.

De manera complementaria, Jiménez-Pérez et al. (2020) estudiaron la interacción entre AFM1 y α -lactoalbúmina bovina mediante espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía UV y modelado molecular, lo que evidenció la formación de complejos y cambios en el microentorno proteico. Esta sensibilidad a pequeños cambios en el entorno químico hace que la FTIR sea una herramienta funcional para detectar modificaciones o desplazamientos de grupos funcionales.

Las pruebas disponibles sobre otras micotoxinas refuerzan la pertinencia de este enfoque. En el caso de la AFB1, se ha demostrado que la ultrasonicación de potencia y otras tecnologías físicas, pueden degradar la molécula rompiendo el doble enlace C8 = C9 del anillo furano, la modificación de la lactona y la alteración de los grupos metoxi, con la consiguiente reducción de la bioactividad y toxicidad (Anjum et al., 2020; Jaiswal et al., 2018; Taheur et al., 2020). Asimismo, estudios previos han descrito productos de degradación de AFM1, generados por tecnologías de plasma frío que comparten el patrón de pérdida de doble enlace en el anillo del furano, asociado con una disminución del potencial bioactivo de la micotoxina (Liu et al., 2019; Nguyen et al., 2022, 2025). Este trasfondo indica que la TUS puede inducir transformaciones estructurales detectables por espectroscopía y, potencialmente, relacionadas con cambios en el perfil toxicológico.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la TUS sobre AFM1 bajo distintas combinaciones de tiempo y amplitud, definidas mediante un DECC. Para cumplir el objetivo de caracterizar los cambios inducidos por TUS mediante distintas herramientas analíticas, el capítulo integra dos manuscritos complementarios. El primero aborda la evaluación espectroscópica mediante UV, fluorescencia y FTIR, mientras que el segundo se centra en la caracterización mediante espectrometría de masas. En

conjunto, estos análisis permitieron identificar modificaciones en la absorción, la emisión, las regiones vibratorias y los productos de transformación de la molécula, y posteriormente contrastarlas con la viabilidad celular descrita en el Capítulo 7.

Referencias

- Anjum, T., Iram, W., Iqbal, M., Ghaffar, A., & Abbas, M. (2020). Identification of degradation products of aflatoxin B1 and B2 resulting after their biodetoxification by aqueous extracts of *Acacia nilotica*. *World Mycotoxin Journal*, 13(4), 499–514. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2411>
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., & Cattaneo, T. (2007). Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 532–540. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71536-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9)
- Bariya, A. R., Rathod, N. B., Patel, A. S., Nayak, J. K. B., Ranveer, R. C., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Ozogul, F., Jambrak, A. R., & Rocha, J. M. (2023). Recent developments in ultrasound approach for preservation of animal origin foods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106676. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106676>
- Bianco, G., Russo, R., Marzocco, S., Velotto, S., Autore, G., & Severino, L. (2012). Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon*, 59, 644–650. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.010>
- Dutta, A. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy. En S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, & R. K. Mishra (Eds.), *Spectroscopic methods for nanomaterials characterization* (pp. 73–93). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>
- Ghaffarian-Bahraman, A., Mohammadi, S., & Dini, A. (2023). Occurrence and risk characterization of aflatoxin M1 in milk samples from southeastern Iran using the margin of exposure approach. *Food Science & Nutrition*, 11(11), 7100–7108. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3634>
- Harshitha, C. G., Sharma, N., Singh, R., Sharma, R., Gandhi, K., & Mann, B. (2023). Interaction study of aflatoxin M1 with milk proteins using ATR-FTIR. *Journal of Food Science and Technology*, 60(1), 64–72. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05587-x>
- Jaiswal, P., Jha, S. N., Kaur, J., Borah, A., & Ramya, H. G. (2018). Detection of aflatoxin M1 in milk using spectroscopy and multivariate analyses. *Food Chemistry*, 238, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.150>
- Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S. R., Gómez-Castro, C. Z., Alatorre-Santamaría, S., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2020). Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry and*

- Liu, Y., Li, M., Liu, Y., & Bian, K. (2019). Structures of reaction products and degradation pathways of aflatoxin B1 by ultrasound treatment. *Toxins*, 11(9), 526. <https://doi.org/10.3390/toxins11090526>
- Nguyen, T., Palmer, J., Loo, T., Shilton, A., Petcu, M., Newson, H. L., & Flint, S. (2022). Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim milk and degradation products after treatment. *Food Chemistry*, 390, 133165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133165>
- Nguyen, T., Palmer, J., Pedley, J., Petcu, M., Newson, H. L., Keener, K., & Flint, S. (2025). The effect of variations in cold plasma conditions on the detoxification of aflatoxin M1 and degradation products. *International Dairy Journal*, 160, 106103. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106103>
- Peng, Z., Zhang, Y., Ai, Z., Pandiselvam, R., Guo, J., Kothakota, A., & Liu, Y. (2023). Current physical techniques for the degradation of aflatoxins in food and feed: Safety evaluation methods, degradation mechanisms and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(5), 4030–4052. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13197>
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., & Laporta, M. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984–991. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>
- Rabie, M., Movassaghghazani, M., & Mogaddam, M. R. A. (2024). HPLC-FLD determination of aflatoxins M1 and M2 in raw cow milk samples using in-syringe gas-controlled density tunable solidification of a floating organic droplet-based dispersive liquid-liquid microextraction method. *RSC Advances*, 14(8), 5077–5084. <https://doi.org/10.1039/D3RA04149B>
- Taheur, F. B., Mansour, C., Jeddou, K. B., Machreki, Y., Kouidhi, B., Abdulhakim, J. A., & Chaieb, K. (2020). Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture. *Toxicon*, 179, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.004>
- Yao, W., Liu, R., Zhang, F., Li, S., Huang, X., Guo, H., ... & Zhong, G. (2022). Detecting aflatoxin B1 in peanuts by fourier transform near-infrared transmission and diffuse reflection spectroscopy. *Molecules*, 27(19), 6294. <https://doi.org/10.3390/molecules27196294>
- Wu, Q., & Xu, H. (2020). Design and development of an on-line fluorescence spectroscopy system for detection of aflatoxin in pistachio nuts. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111016. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111016>

Evaluación de los cambios estructurales en aflatoxina M1 tratada por termoultrasonificación

Araceli Monter-Arciniega¹, Salvador R Tello-Solís², Nelly Del Socorro Cruz-Cansino¹, Carlos Jiménez-Pérez³, Angélica Saraí Jiménez-Osorio⁴, Araceli Castañeda-Ovando⁵, Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano^{6*}

¹Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42160 Hidalgo, México

²Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, 09310 Ciudad de México, México.

³Departamento Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana, 52005 Lerma de Villada, Estado de México

⁴Area Académica de Enfermería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42160 Hidalgo, México

⁵Química de los Alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42183 Hidalgo, México

⁶Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, 09310 Ciudad de México, México

*Autor de correspondencia: gmrs@xanum.uam.mx

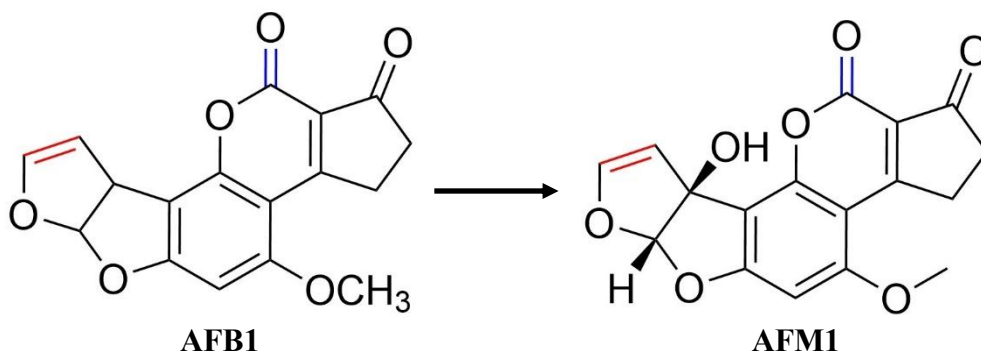
Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, responsables de contaminar una amplia gama de materias primas y alimentos procesados, con repercusiones relevantes para la inocuidad alimentaria y la salud pública a nivel mundial (Kępińska-Pacelik & Biel, 2021; de Melo Nazareth et al., 2024). Las AF constituyen uno de los grupos de mayor interés por su alta toxicidad, estabilidad y frecuencia de detección en la cadena alimentaria (Benkerroum, 2020; Nazhand *et al.*, 2020).

La AFM1 se produce a partir de la biotransformación hepática de la AFB1 en el sistema enzimático del citocromo P450. Este proceso incorpora un grupo hidroxilo en la posición 4 de la molécula y genera un metabolito más polar que se excreta principalmente a través de la leche de animales lactantes que consumen piensos contaminados (Bbosa *et al.*, 2013; Zhang

31 *et al.*, 2016). Aunque la AFM1 muestra menor potencial carcinogénico en comparación con
32 su precursor, ha sido clasificada, junto con otras AF, como carcinógeno del Grupo 1 para
33 humanos por la IARC, debido a su asociación con hepatocarcinoma y otros efectos adversos
34 crónicos (IARC, 2022). Su presencia habitual en leche y derivados plantea un riesgo
35 particular para lactantes, niños y otros grupos vulnerables con alto consumo relativo de
36 productos lácteos (Escobar *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2021).

37 Desde el punto de vista estructural, las AF son compuestos policíclicos de tipo difurano-
38 cumarínico, con un sistema de anillos fusionados que incluye una lactona cíclica y un anillo
39 furano, elementos clave en su reactividad y toxicidad (Nji *et al.*, 2023). La AFM1 conserva
40 el esqueleto básico de la AFB1, pero el grupo hidroxilo adicional modifica su polaridad,
41 solubilidad y afinidad por proteínas, así como sus propiedades espectrales (Li *et al.*, 2020;
42 Ramadan *et al.*, 2022) (Figura 4). Una de las principales dificultades en el control de la AFM1
43 radica en su notable termoestabilidad (Pichardo-Matamoros *et al.*, 2020). Diversos estudios
44 han mostrado que esta micotoxina puede resistir los tratamientos térmicos convencionales,
45 como la pasteurización y la UHT, manteniéndose en la leche comercial en niveles detectables
46 e incluso, en algunos casos, por encima de los límites regulatorios en determinados contextos
47 geográficos (Foerster *et al.*, 2023; Monter-Arciniega *et al.*, 2025; Rahimzadeh *et al.*, 2023;
48 Sumon *et al.*, 2021; Xiong *et al.*, 2022). En consecuencia, la sola cuantificación analítica,
49 aunque imprescindible, no basta para asegurar una reducción efectiva del riesgo, se requieren
50 estrategias que actúen que demuestren que los productos de transformación presentan menor
51 toxicidad, menor biodisponibilidad o capacidad de inducir efectos biológicos adversos.



53 **Figura 4.** Estructura química de AFB1 y AFM1.

54

55 En este marco, la TUS se ha propuesto como una tecnología emergente con potencial para
 56 promover modificaciones químicas mediante la combinación de temperatura moderada y
 57 cavitación acústica (Asaithambi *et al.*, 2022). El colapso violento de microburbujas durante
 58 la cavitación genera zonas localizadas de alta temperatura, presión y formación de radicales
 59 reactivos, capaces de alterar enlaces críticos en moléculas orgánicas que requieren
 60 caracterización estructural y validación biológica complementaria. (Crudo *et al.*, 2014; Shen
 61 *et al.*, 2017). En el caso de las AF, se ha demostrado que el ultrasonido de alta intensidad
 62 puede inducir la ruptura del doble enlace 8-9 y modificaciones en el anillo de lactona, con
 63 una reducción concomitante de la bioactividad de AF en sistemas modelo (Jang, *et al.*, 2025;
 64 Mortazavia *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que al aplicar la TUS en condiciones
 65 adecuadas, podrían promover transformaciones estructurales en AFM1 y modificar su
 66 potencial tóxico.

67 La caracterización detallada de estos cambios requiere el empleo de herramientas analíticas
 68 que sean sensibles a las variaciones en la estructura o distribución electrónica y en las
 69 vibraciones de los enlaces y va más allá de la observación directa de la disminución de la
 70 señal cromatográfica obtenida por HPLC-FLD. La espectroscopía de fluorescencia y la

71 espectroscopía FTIR resultan particularmente idóneas para este fin, puesto que facilitan la
72 detección de alteraciones en los cromóforos responsables de la emisión intrínseca de AFM1,
73 así como en las bandas relacionadas con grupos funcionales esenciales como la lactona, el
74 carbonilo y los enlaces C–O–C (Ahuja *et al.*, 2023; Gachara *et al.*, 2025; Jaiswal *et al.*, 2018).
75 Este estudio tuvo como objetivo evaluar los cambios estructurales o electrónicos, mediante
76 técnicas espectroscópicas, inducidos por el tratamiento de la AFM1 mediante TUS como
77 propuesta para modificar su potencial toxicológico.

78 **MATERIALES Y MÉTODOS**

79 **Reactivos y estándares**

80 El estándar de AFM1 (Enzo Life Sciences®, Nueva York, EE. UU.) se utilizó como
81 referencia analítica. Se emplearon ACN grado cromatográfico, fosfato mono-potásico y
82 fosfato dipotásico (J.T. Baker®, EE. UU.). El agua desionizada se obtuvo de un sistema de
83 purificación Millipore Replete (Replete Bioscience®, India). Todas las disoluciones acuosas
84 fueron preparadas con agua desionizada.

85 **Preparación de la solución estándar**

86 La solución madre de AFM1 se preparó en ACN a una concentración de 100 µg/mL.
87 Posteriormente, en solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.1 mM, pH 6.8), se preparó
88 una concentración de 0.8 µg/mL de AFM1, para llevar a cabo cada experimento del DECC.
89 Las disoluciones se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a 4 °C y protegidas de la luz
90 para preservar su estabilidad durante el período de análisis.

91 **Diseño Experimental Central Compuesto**

92 Las condiciones de tratamiento por TUS se definieron mediante un DECC con dos factores:
93 Tiempo (5 – 15 min) y amplitud de onda ultrasónica (70 – 90%). Se incluyeron puntos
94 factoriales (4), axiales (4) y réplicas en el punto central (4). La Tabla 3 presenta la

95 combinación de niveles codificados y reales de tiempo y amplitud seleccionados, la
96 temperatura inicial y final de cada tratamiento.

97 **Tabla 3. Diseño experimental central compuesto**

Código	Tiempo (min)	Amplitud (%)
-1, -1	5	70
-1, +1	5	90
+1, -1	15	70
+1, +1	15	90
$-\alpha$, 0	3	80
$+\alpha$, 0	17	80
0, $-\alpha$	10	66
0, $+\alpha$	10	94
0, 0	10	80
0, 0	10	80
0, 0	10	80
0, 0	10	80

En todos los ensayos del DECC, la temperatura de entrada se mantuvo en promedio a 38 ± 0.3 °C y la temperatura de salida a 45 ± 0.9 °C

98 **Termoultrasonicación**

99 Las alícuotas de 15 mL de la solución de AFM1 (0.2 µg/mL en PBS, pH 6.8) se sometieron
100 de forma independiente a TUS en cada condición del diseño experimental. Se utilizó un
101 procesador ultrasónico de sonda (Cole-Parmer Instrument Company®, Illinois, EE. UU.;
102 potencia nominal 130 W; 50/60 kHz; 220 VAC), acoplado a un baño de recirculación que
103 mantuvo la temperatura de la celda a 40 °C para evitar sobrecalentamiento de la solución
104 durante la sonicación. Al finalizar cada tratamiento, las muestras se enfriaron inmediatamente
105 en un baño de hielo y se almacenaron a 4 °C, protegidas de la luz, hasta su análisis. Una

106 alícuota no sometida a TUS, conservada en las mismas condiciones de almacenamiento, se
107 utilizó como control.

108 **Energía ultrasónica total entregada**

109 Para determinar el efecto del tratamiento por TUS sobre la AFM1, se calcularon los valores
110 de energía ultrasónica total y específica aplicados en cada tratamiento experimental (Tabla
111 4). Los cálculos se realizaron considerando la potencia máxima del equipo ultrasónico (130
112 W), el porcentaje de amplitud utilizado en cada tratamiento y la duración del tratamiento
113 expresada en segundos. Se ajustó la potencia efectiva según el porcentaje de amplitud
114 empleada utilizando la ecuación 2:

$$115 \quad P_{efectiva} = P_{m\acute{a}x} \times \left(\frac{A}{100}\right)^2 \quad (2)$$

116 Donde $P_{efectiva}$: Potencia efectiva (W); P_{max} : Potencia máxima del equipo; A: Porcentaje de
117 amplitud de onda ultrasónica. La potencia efectiva para cada condición se estimó a partir de
118 la potencia máxima del equipo ultrasónico (130 W; modelo Cole-Parmer Instrument
119 Company, 130 vatios), ajustada en función de la amplitud (%). Posteriormente, la energía
120 ultrasónica total para cada tratamiento se calculó con la Ecuación (3).

$$121 \quad E_{total} = P_{efectiva} \times t \quad (3)$$

122 Donde E_{total} : Energía total (J); $P_{efectiva}$: Potencia efectiva (W); t: Tiempo de tratamiento (s).
123 Finalmente, se obtuvo la energía específica por mL de muestra tratada, utilizando la ecuación
124 4.

$$125 \quad E_{espec\acute{i}fica} = \frac{E_{total}}{V} \quad (4)$$

126
127 Donde $E_{espec\acute{i}fica}$: Energía por mililitro (J/mL); E_{total} : Energía total (J); V: Volumen de la
128 muestra (mL). Cada tratamiento se aplicó a un volumen constante de muestra de 15 mL, lo

129 que permitió calcular la energía específica en J/mL. Estos valores fueron considerados como
 130 una variable cuantitativa auxiliar en el análisis de los cambios estructurales inducidos por
 131 TUS, particularmente en los espectros UV y de fluorescencia, donde se evaluó la posible
 132 relación entre la energía aplicada y la intensidad de los picos característicos.

133 **Tabla 4. Valores del cálculo de energía total de cada tratamiento de TUS**

Tratamiento	Potencia (W)	Energía (J)
5 min – 70%	63.70	19,110.00
5 min – 90%	105.30	31,590.00
15 min – 70%	63.70	57,330.00
15 min – 90%	105.30	94,770.00
3 min – 80%	83.20	14,976.00
17 min – 80%	83.20	84,864.00
10 min – 66%	56.63	33,976.80
10 min – 94%	114.87	68,920.80
10 min – 80%	83.20	49,920.00
10 min – 80%	83.20	49,920.00
10 min – 80%	83.20	49,920.00
10 min – 80%	83.20	49,920.00

134 **Análisis UV y fluorescencia**

135 Para estimar la energía asociada a las transiciones electrónicas inducidas por radiación
 136 electromagnética, se empleó la ecuación 5.

137
$$E = \frac{h \times c}{\lambda} \quad (5)$$

138 Donde E : Energía en J; h : Constante de Planck (6.626×10^{-34} Js); c : Velocidad de la luz en
 139 el vacío (3.00×10^8 m/s); λ : Longitud de onda (m). Este cálculo se aplicó a las longitudes de
 140 onda utilizadas en espectroscopía UV y de fluorescencia para AFM1(365 nm en UV y 428

141 nm para emisión de fluorescencia). Estos valores de energía se consideraron como referencia
142 teórica para discutir la relación entre la energía del fotón incidente y la estabilidad de los
143 enlaces moleculares más relevantes del AFM1.

144 **Espectroscopía ultravioleta**

145 Los espectros de absorción UV de AFM1 se obtuvieron en un espectrofotómetro (UV-1800,
146 Shimadzu®, Tokio, Japón). Para cada medición, se colocó 1.0 mL de la solución de AFM1,
147 tanto el control como los tratamientos del DECC, en una celda de cuarzo con una trayectoria
148 óptica de 1 cm. Los espectros se registraron en el intervalo de 200–400 nm, utilizando PBS
149 (0.1 mM, pH 6.8) como blanco para la corrección de la línea base

150 **Espectroscopía de fluorescencia**

151 Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS®,
152 Champaign, IL, EE. UU.) equipado con soporte de celda con control de temperatura mediante
153 chaqueta de circulación de agua y agitación magnética. Se colocaron 3.0 mL de la solución
154 de AFM1 en una celda de cuarzo y se mantuvo la temperatura en 25 ± 1 °C. La longitud de
155 onda de excitación se fijó en 365 nm y los espectros de emisión se registraron entre 390–470
156 nm. El PBS se utilizó como blanco para la corrección de la línea base de cada espectro.

157 **Espectroscopía en el infrarrojo por transformada de Fourier**

158 Para el análisis FTIR, 3 mL de la solución de AFM1 se llevaron a sequedad en un baño seco
159 a 40 °C. El residuo seco se resuspendió en 50 μ L de ACN y se homogeneizó mediante un
160 vortex (Gen-2, G560, Scientific Industries®, Bohemia, EE. UU). Posteriormente, se depositó
161 una alícuota de 10 μ L sobre un accesorio de ATR acoplado a un espectrómetro FTIR (GX,
162 PerkinElmer®, EE. UU.), equipado con cristal de diamante (Pike Technologies®, EE. UU.).
163 Los espectros se registraron en el intervalo de 4000–400 cm^{-1} , con resolución de 4 cm^{-1} y
164 acumulación de 32 escaneos por muestra. Antes de cada medición, se registró un espectro de

165 fondo y entre muestras, el cristal se limpió con etanol absoluto. El ACN se empleó para la
166 corrección de los espectros y como referencia para discriminar las bandas atribuibles
167 exclusivamente a AFM1.

168 **Análisis estadístico**

169 El análisis estadístico se realizó mediante modelos de regresión cuadrática múltiple. Los
170 datos se analizaron con el *software* NCSS® (LLC, Kaysville, Utah, EE. UU.). Se ajustaron
171 modelos polinomiales de segundo orden que incluyeron términos lineales, cuadráticos e
172 interacción para cada variable de respuesta de acuerdo con la ecuación 6.

$$173 \quad Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (6)$$

174 Donde Y: Variable respuesta de AFM1 por espectroscopía, β_0 : Coeficiente constante, β_1 β_2 :
175 Coeficiente de regresión de los términos lineales, β_{11} y β_{22} : Coeficientes de regresión
176 cuadráticos, β_{12} : Coeficientes de interacción, X_1 y X_2 : Variables codificadas de tiempo y
177 amplitud, respectivamente.

178 La significancia estadística de los coeficientes del modelo se evaluó mediante ANOVA,
179 considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se calcularon los coeficientes de
180 determinación (R^2) y se emplearon para generar el MSR sobre las variables espectroscópicas
181 seleccionadas.

182 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

183 **Análisis de la absorción UV del DECC**

184 Los espectros UV de la AFM1 de las combinaciones del DECC (Figura 5A–D) mostraron un
185 máximo alrededor de 360 nm y otros ubicados en la región de 210–260 nm, asociados al
186 sistema difurano–cumarínico de la molécula (Jiménez-Pérez *et al.*, 2020). La ausencia de
187 desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos del máximo principal indica que, bajo las

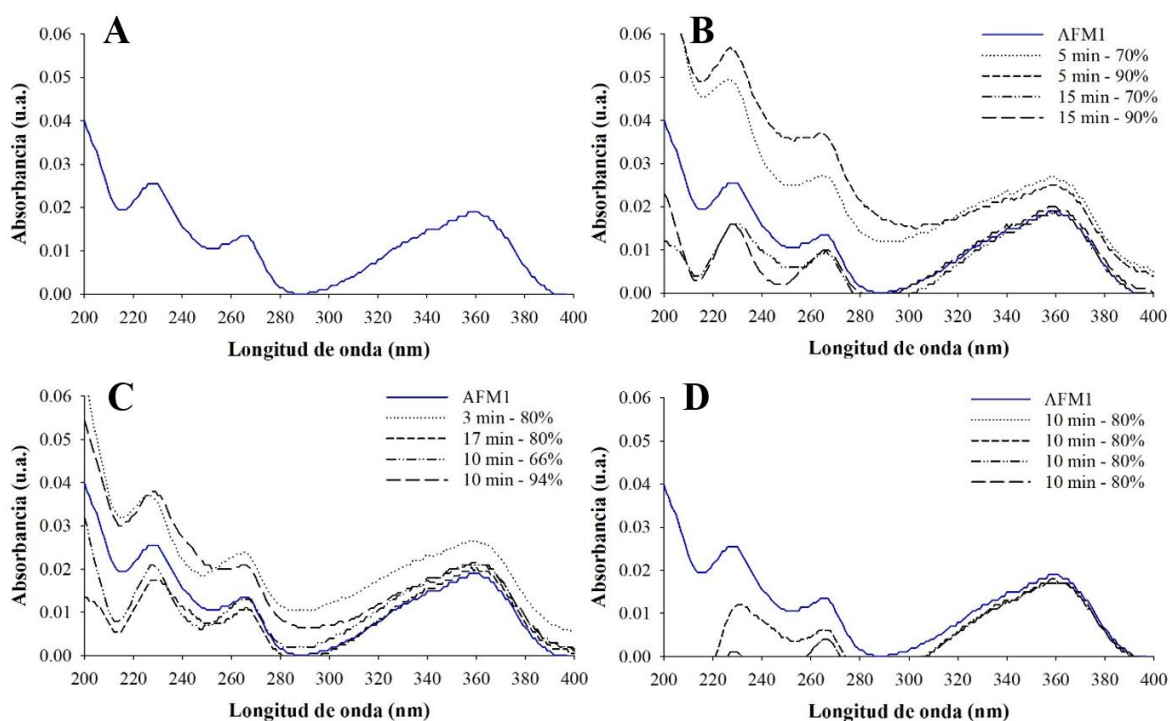
188 condiciones experimentales, el cromóforo responsable de la absorción en la región UV se
189 mantiene sin cambios (Liu *et al.*, 2020).

190 Los espectros correspondientes a las condiciones 5 – 15 min; y 70 – 90% (Figura 5B)
191 presentaron modificaciones en la intensidad de absorbancia en las regiones de 220 a 260 nm
192 y en el entorno de 360 nm, sin cambios notables en la posición del pico máximo. En
193 particular, los tratamientos de menor duración y amplitud intermedia mostraron una ligera
194 disminución en la absorbancia global, mientras que las combinaciones de mayor duración y
195 amplitud tendieron a incrementar la señal en 360 nm. Este comportamiento podría sugerir
196 que las alteraciones en el microentorno de la AFM1 pueden dar lugar a la formación de otras
197 especies moleculares, pero conservando parte de la estructura de la AFM1 (Kurup *et al.*,
198 2022).

199 En el tratamiento de 3 min – 80%, se observó un aumento de la absorbancia en 360 nm,
200 mientras que la condición de 17 min – 80%, mostró una tendencia opuesta con reducción de
201 intensidad en la región de 220–260 nm (Figura 5C). Las amplitudes 66 y 94% generaron
202 perfiles intermedios, en los que la forma del espectro se conserva, pero con variaciones en la
203 altura de los picos. Estas diferencias, aunque sutiles, son consistentes con efectos
204 dependientes de la energía ultrasónica específica aplicada, tal como se ha descrito para la
205 degradación parcial de AF en sistemas acuosos tratados con ultrasonido de potencia (Lui *et*
206 *al.*, 2019ab, 2022).

207 Las réplicas en el punto central (Figura 5D) mostraron una elevada reproducibilidad del perfil
208 espectral, presentando reducciones en la absorbancia de 210–260 nm en comparación con el
209 control y valores prácticamente idénticos en la región de 360 nm. Este hallazgo indica que,
210 bajo condiciones moderadas de TUS, la AFM1 conserva en gran medida su estructura
211 cromófora, sugiriendo que cualquier modificación estructural ocurre principalmente en

212 combinación con energías específicas mayores, más que en el punto central del diseño. En
213 conjunto, los espectros UV sugieren que TUS induce cambios cuantitativos en la respuesta
214 de absorción de AFM1, sin embargo, no provocan desplazamientos importantes en los picos
215 máximos, lo que resulta compatible con transformaciones parciales en el sistema conjugado
216 o con la coexistencia de AFM1 y posibles productos de reacción con estructura similar, más
217 que con una degradación completa de la molécula (He et al., 2021; Stanley et al., 2020).



218

219 **Figura 5.** Espectros de absorción UV del DECC en el intervalo de la longitud de onda de
220 200–400 nm. AFM1 (control); (B) condiciones del DECC; (C) condiciones axiales; (D)
221 réplicas en el punto central.

222 **Análisis de emisión de fluorescencia de los puntos de DECC**

223 El espectro de fluorescencia de la solución control de AFM1 (Figura 6A) presentó un pico
224 característico con un máximo entre 426–430 nm, en concordancia con lo reportado para esta
225 micotoxina tras excitación a 365 nm (Jiménez-Pérez *et al.*, 2020). La forma de la banda es

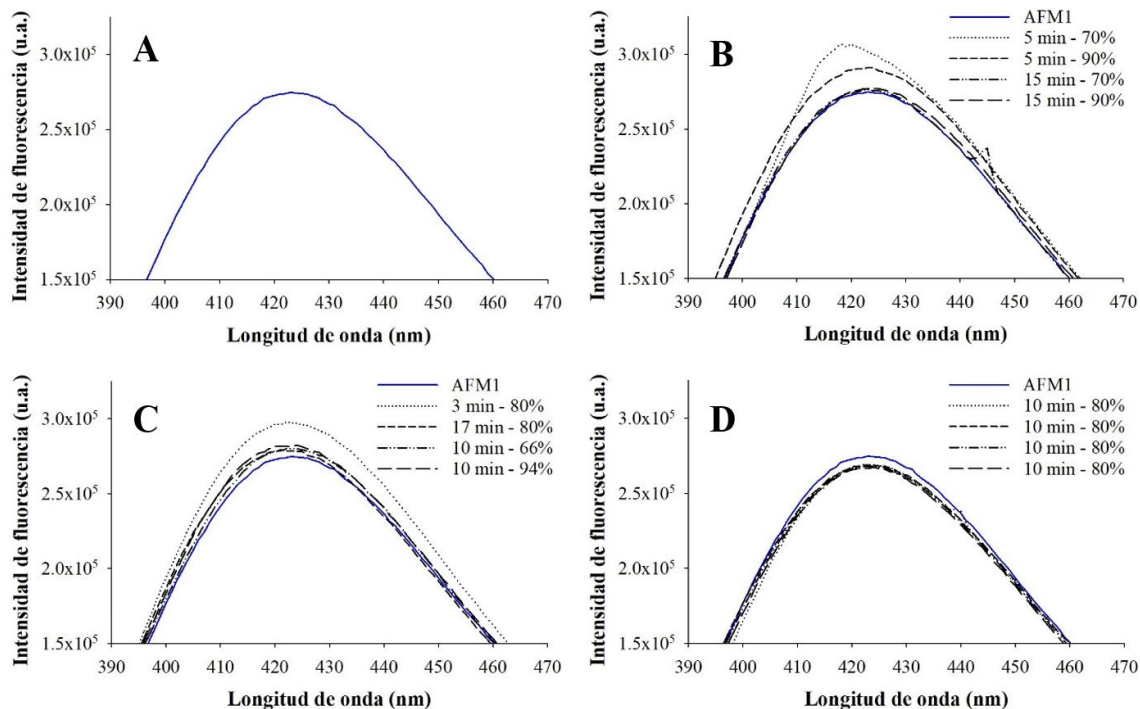
226 característica del cromóforo furanocumarínico de la AFM1 (control) (Jaiswal *et al.*, 2018;
227 Stanley *et al.*, 2020).

228 Los espectros correspondientes a cada condición del DECC (Figura 6B) conservaron el perfil
229 de la AMF1 (control). Las combinaciones de menor tiempo y amplitud intermedia (5 min –
230 70 y 90%) mostraron incrementos respecto al control de AMF1, mientras que algunas
231 condiciones de mayor tiempo y/o amplitud presentaron valores menores a la AMF1 sin
232 tratamiento por TUS. En las condiciones aplicadas, la longitud de onda de emisión de
233 fluorescencia para cada condición evaluada del DECC fue la misma (428 nm); al comparar
234 los tratamientos entre sí, la variación se observó en la intensidad máxima de fluorescencia
235 (u.a., unidades arbitrarias). La condición de 5 min – 70% mostró la mayor señal de
236 fluorescencia con respecto a la AFM1 control, sugiriendo que bajo estas condiciones las
237 modificaciones en el microentorno estructural del cromóforo principal (cumarina) de la
238 AFM1 promueven una mayor emisión de fluorescencia (Liu *et al.*, 2019b; Soltanabadi *et al.*,
239 2024).

240 La Figura 6C ilustra las condiciones axiales del DECC. El tratamiento de menor duración (3
241 min – 80%) generó el incremento mayor en la intensidad de emisión, ubicado en 426–430
242 nm. Por otro lado, las condiciones de 17 min – 80% y las amplitudes extremas demostraron
243 una disminución de la señal en comparación con el control. Estas variaciones se alinean con
244 efectos dependientes de la energía ultrasónica específica, en donde niveles intermedios de
245 energía promueven la exposición de cromóforos o leves cambios conformacionales, en tanto
246 que energías elevadas podrían facilitar procesos de formación de especies no fluorescentes o
247 agregados (Liu *et al.*, 2019b; Liu *et al.*, 2022).

248 Los puntos centrales del DECC (Figura 6D) mostraron espectros reproducibles, con curvas
249 superpuestas y una intensidad ligeramente inferior a la AMF1 (control). Por lo tanto, la

250 mayoría de los tratamientos con TUS modifican la intensidad de fluorescencia por
251 apagamiento o por mayor emisión, excepto para los tratamientos de 15 min (Figura 6B),
252 afectando el microambiente estructural de la AFM1. Los cambios de aumento de emisión de
253 fluorescencia son mayores que los de apagamiento de fluorescencia.



254

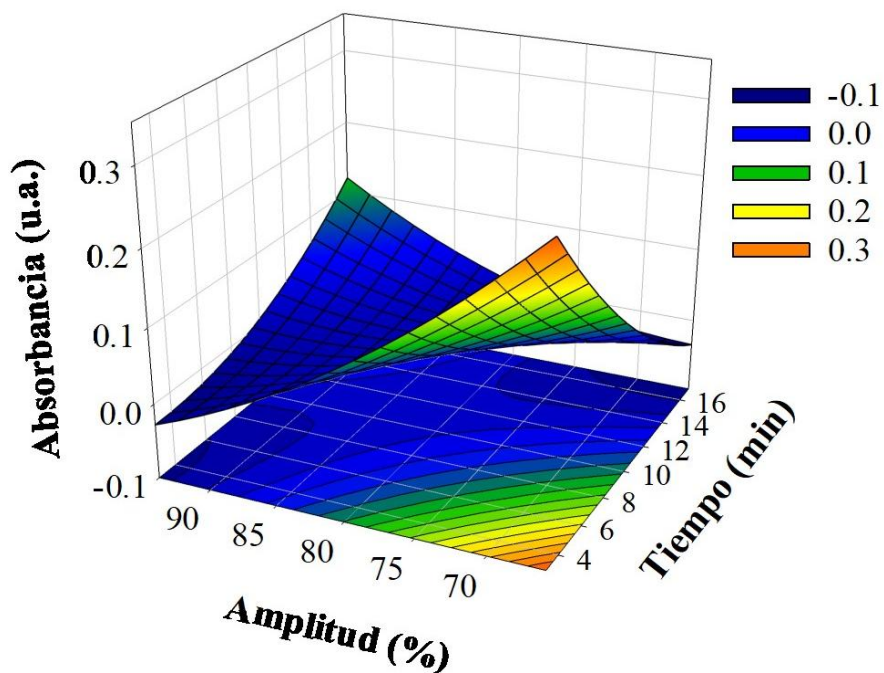
255 **Figura 6.** Espectros de fluorescencia del DECC en el intervalo de la longitud de onda de
256 390 - 470 nm. AFM1 (control); (B) condiciones del DECC; (C) condiciones axiales; (D)
257 réplicas en el punto central.

258 Superficie de respuesta de la absorbancia UV del DECC

259 Para optimizar el efecto conjunto del tiempo y la amplitud de TUS sobre la respuesta
260 espectral de absorción de AFM1 a 365 nm se realizó el análisis por medio del DECC. El
261 ajuste global mostró un coeficiente de determinación $R^2 = 0.61$. Ninguno de los coeficientes
262 individuales alcanzó significancia estadística ($p < 0.05$) (Tabla S1). Estos resultados sugieren
263 que el modelo indica parcialmente la tendencia general de la respuesta. La Figura 7 ilustra el

264 MSR para la absorbancia en función del tiempo y la amplitud del tratamiento aplicado. En la
265 región de tiempos cortos (~5 min) y amplitudes bajas (~70%), se observó una disminución
266 de la absorbancia (ver curvas de contorno). A tiempos más prolongados (10 – 15 min), el
267 modelo predice nuevamente valores menores de absorbancia, especialmente cuando la
268 amplitud se aproxima al límite superior del diseño.

269 No obstante, dado que el R^2 es moderado (0.61; Tabla S1) y los coeficientes no muestran una
270 diferencia estadísticamente significativa respecto a cero al nivel convencional de $p < 0.05$, la
271 superficie de respuesta debe interpretarse como una herramienta exploratoria. En este
272 contexto, el MSR proporciona una visualización de la tendencia general del sistema y permite
273 identificar regiones de interés, para investigaciones futuras.



274 **Figura 7.** Superficie de respuesta del DECC donde se muestra la absorbancia de AFM1 a
275 365 nm en función del tiempo y la amplitud del tratamiento por TUS.
276

277 **Superficie de respuesta de la intensidad de fluorescencia del DECC**

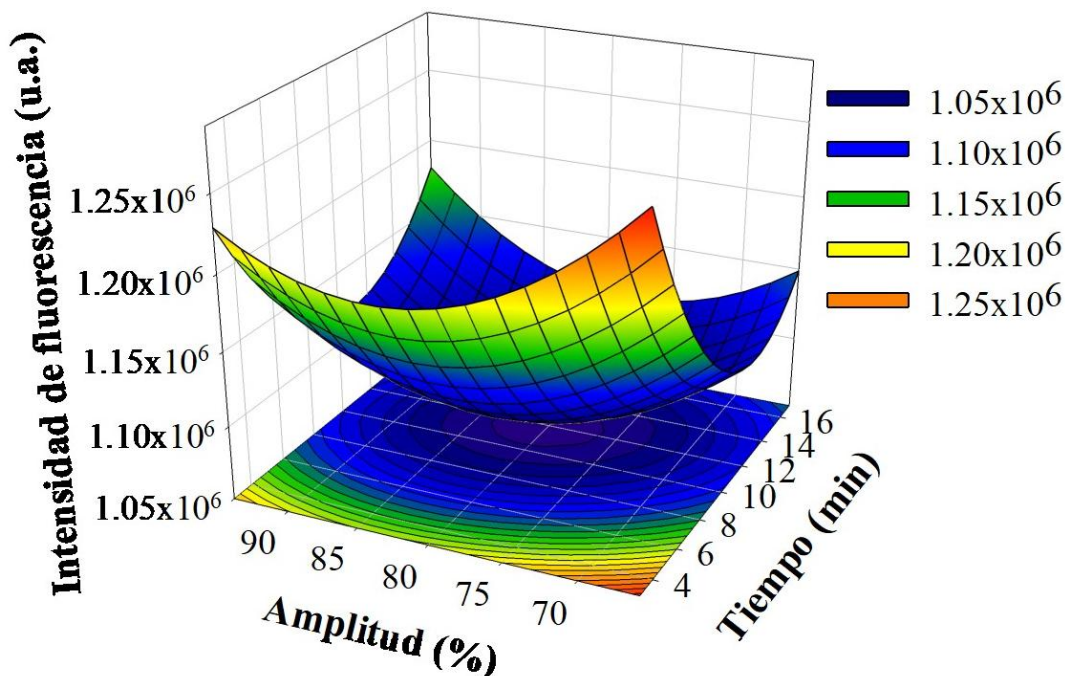
278 A partir de un modelo de segundo orden se generó el MSR utilizando la intensidad máxima
279 de emisión de fluorescencia. El ajuste del coeficiente de determinación fue de $R^2 = 0.97$,
280 indicando que el modelo se ajusta bien a los datos reales. Los coeficientes lineales de ambos
281 factores fueron negativos, mientras que los términos cuadráticos resultaron positivos y
282 estadísticamente significativos, con un mínimo definido en el centro del dominio
283 experimental.

284 En la cuantificación de la emisión de fluorescencia, AFM1 mostró coincidencias en los
285 puntos máximos obtenidos a 5 min – 70% y 15 min – 90%, con lo observado en la absorción
286 UV. Al excitarse a 365 nm, el pico de emisión alrededor de 428 nm correspondió a las
287 variaciones de tiempo y amplitud de la TUS, con intensidades que se concentraron en un
288 intervalo aproximado de 1.05×10^6 a 1.25×10^6 u.a. Esta interpretación es consistente con
289 lo reportado por Jiménez-Pérez et al. (2020), quienes demostraron que la fluorescencia de
290 AFM1 cambia de manera apreciable cuando la micotoxina interactúa con la α -lactoalbúmina
291 bovina, debido a modificaciones en su microentorno y a la formación de complejos
292 moleculares, detectables también mediante el modelado molecular.

293 Aunque en el presente estudio AFM1 se evaluó en un sistema modelo distinto, estos
294 antecedentes respaldan la idea de que su señal fluorescente constituye una herramienta
295 particularmente sensible para detectar perturbaciones estructurales finas, incluso cuando los
296 cambios en la absorbancia son más discretos. En este sentido, la respuesta observada indica
297 que la fluorescencia tiene mayor sensibilidad a las alteraciones inducidas por la TUS (Tabla
298 S2).

299 Las condiciones de los puntos centrales de DECC generaron un mínimo de fluorescencia
300 (extinción de fluorescencia) (Figura 8), flanqueada por regiones de mayor intensidad hacia
301 los extremos de tiempo y amplitud. Desde una perspectiva molecular, este patrón puede

302 interpretarse como el resultado de cambios en el microentorno estructural de AFM1 o en su
303 organización conformacional por la aplicación de la TUS, en ciertas combinaciones de
304 tiempo y amplitud podrían predominar estados de menor emisión de fluorescencia, mientras
305 que en los bordes del espacio experimental se favorecerían configuraciones más expuestas
306 del cromóforo que benefician la emisión.



307

308 **Figura 8.** Superficie de respuesta del DECC donde se muestra la intensidad de
309 fluorescencia de la AFM1 en función del tiempo y la amplitud del tratamiento por TUS. La
310 superficie muestra los valores de intensidad de emisión a 428 nm.

311 **Energía ultrasónica específica aplicada y su relación con los cambios espectrales**

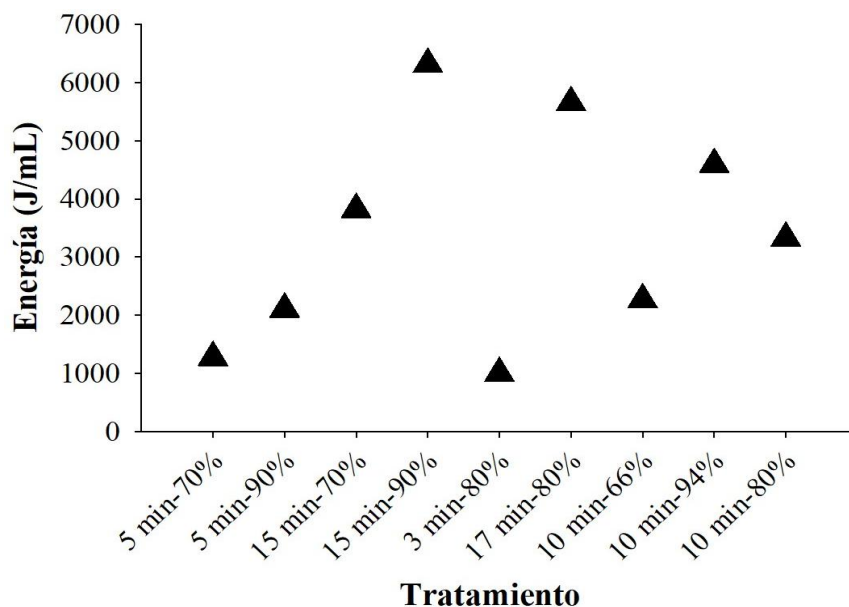
312 La Figura 9 resume la energía ultrasónica específica aplicada en cada una de las condiciones
313 de TUS, expresada en J/mL. Los tratamientos que combinan tiempos prolongados y
314 amplitudes altas generaron las energías más elevadas, con valores de alrededor de 6,300 J/mL
315 y 5,600 J/mL, mientras que las combinaciones de menor tiempo y amplitud se situaron por
316 debajo de 1,500 J/mL. Estas diferencias proporcionan un marco cuantitativo para interpretar
317 los efectos observados en la espectroscopía. Las condiciones asociadas a energías

318 intermedias coincidieron con la zona del “valle” en el MSR de fluorescencia, donde la señal
319 mostró sus menores intensidades, mientras que los extremos de los valores de la energía
320 ultrasónica específica se relacionaron con incrementos moderados de la emisión.
321 Este comportamiento sugiere que la cavitación ultrasónica no actúa de manera lineal sobre
322 el entorno microestructural de AFM1, existe un intervalo de energía en el que podrían
323 favorecerse estados de menor emisión de fluorescencia y regiones de baja o muy alta energía
324 donde la reorganización conformacional favorece una mayor emisión.
325 El ultrasonido de alta intensidad indica que el aumento de energía específica incrementa el
326 número y la intensidad de los eventos de cavitación, generando gradientes locales de
327 temperatura y presión, así como ROS capaces de alterar interacciones no covalentes y el
328 empaquetamiento de moléculas orgánicas, sin implicar necesariamente la ruptura inmediata
329 de enlaces covalentes fuertes (Kentish et al., 2014; Mason, 2002; Taha et al., 2024).
330 En el contexto de este estudio, los cambios observados en la absorbancia y, sobre todo, en la
331 fluorescencia de la AFM1, sugieren la presencia de perturbaciones fisicoquímicas en el
332 entorno molecular del analito. Sin embargo, la conservación de la posición de los picos
333 espectrales indica que, no se produjo una alteración extensa de la estructura del cromóforo,
334 sugiriendo que las modificaciones inducidas por la TUS pudieron ser parciales o localizarse
335 en regiones en la molécula que no desplazaron los máximos espectrales.
336 El uso explícito de la energía específica como variable auxiliar aporta, por tanto, un criterio
337 cuantitativo complementario al análisis del efecto del tiempo y amplitud del DECC. Este
338 parámetro facilita la comparación con otros trabajos sobre la modificación del potencial
339 tóxico de micotoxinas por ultrasonido y podría incorporarse en etapas posteriores como
340 restricción de diseño para la optimización de procesos, especialmente en aplicaciones
341 industriales donde se requiere equilibrar la intensidad del tratamiento con la preservación de

342 la matriz alimentaria. No obstante, la relación entre energía ultrasónica y la modificación del
343 potencial toxicológico efectiva deberá corroborarse antes de proponer umbrales energéticos
344 específicos como objetivo tecnológico.

345 Las energías de transición electrónica asociadas con las longitudes de onda utilizadas en
346 espectroscopía UV (365 nm) y fluorescencia (428 nm) (Tabla 5), permiten contextualizar la
347 magnitud real de los cambios inducidos en la molécula de la AFM1 por efecto del tratamiento
348 de la TUS. Los fotones utilizados corresponden a energías del orden de 3.40 y 2.93 eV,
349 respectivamente, suficientes para promover la excitación del sistema conjugado π , pero
350 claramente por debajo de los valores típicos de disociación de enlaces covalentes C=C y C=O
351 reportados para los compuestos orgánicos aromáticos (Tabla S3).

352 Dentro de este marco, las variaciones observadas en la intensidad de los picos UV y de
353 fluorescencia, junto con la ausencia de desplazamientos significativos a la longitud de onda
354 máxima, indican que el cromóforo furanocoumarino de la AFM1 conserva su integridad
355 básica. Los cambios espectrales se interpretan, por tanto, como consecuencia de
356 reordenamientos conformacionales, modificaciones en el apilamiento π - π o alteraciones del
357 microambiente polar de la molécula, más que como evidencia de una ruptura masiva de
358 enlaces covalentes. La energía ultrasónica específica calculada para cada tratamiento
359 sintetiza el efecto combinado del tiempo y la amplitud sobre la intensidad de cavitación. En
360 las condiciones evaluadas, esta energía parece suficiente para inducir reorganización
361 estructural y cambios en la estructura del cromóforo, pero no para provocar una
362 fragmentación de la AFM1. En consecuencia, energía ultrasónica específica se perfiló como
363 una variable operativa útil para analizar la magnitud de las respuestas espectroscópicas.



364

365 **Figura 9.** Energía ultrasónica específica aplicada en cada tratamiento del DECC.

366 **Tabla 5. Energía fotónica de las transiciones electrónicas utilizadas en los análisis**
 367 **espectroscópicos ultravioleta (absorción) y fluorescencia (emisión) de la AFM1**

Espectroscopia	Longitud de onda (nm)	Energía (J)	Energía (eV)
UV	365	5.45×10^{-19}	3.40
FLD	428	4.70×10^{-19}	2.93

368 **Análisis en el infrarrojo por transformada de Fourier en el DECC**

369 El espectro FTIR de la solución control de AFM1 (Figura 10) indicó las bandas
 370 características de esta micotoxina en la región del infrarrojo. Se observó una banda ancha
 371 entre $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ relacionada con vibraciones C–H alifáticas y una banda intensa cerca
 372 de 1740 cm^{-1} que indica el estiramiento C=O del grupo cumarina y ciclopentanona. En el
 373 intervalo de $1650\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$, se identifican bandas asociadas al estiramiento C=C de anillos
 374 aromáticos conjugados, mientras que las señales en $1300\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ corresponden a
 375 vibraciones C–O y C–C=O en la estructura furanocumarínica y el ciclopentanona
 376 Finalmente, en la zona de $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, se detectaron deformaciones fuera del plano de C–

377 H aromático, que son coherentes con la presencia de anillos condensados en la molécula de
378 AFM1 (Harshitha *et al.*, 2023; Jha *et al.*, 2021; Sein *et al.*, 2024).

379 Los tratamientos factoriales de TUS (Figura 10B), produjeron cambios consistentes en la
380 intensidad de algunas bandas. Específicamente, se observó una ligera reducción en la
381 transmitancia (aumento de absorbancia) en la banda de aproximadamente 3000 cm^{-1} y en la
382 región de $2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ en condiciones de mayor energía (15 min – 90% y 15 min – 70%),
383 lo cual indica una perturbación parcial en el entorno del carbonilo lactónico y el sistema
384 aromático conjugado.

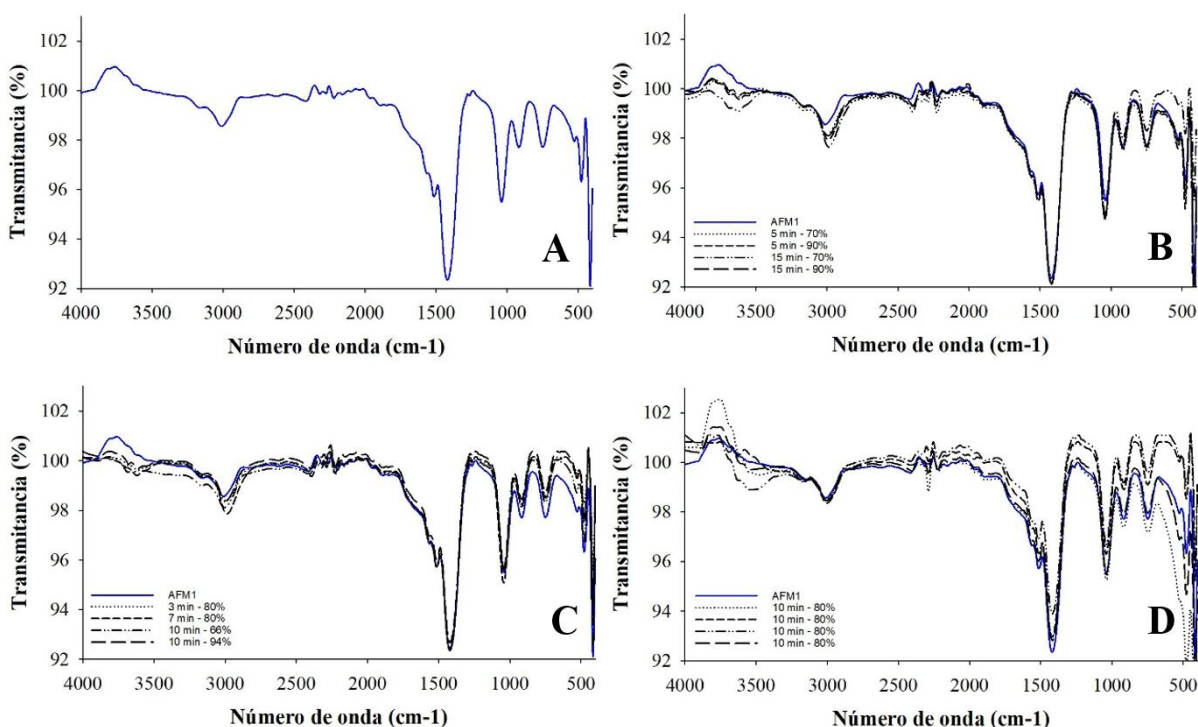
385 Los tratamientos de la Figura 10C (axiales), mostraron cambios evidentes en las regiones de
386 $4000\text{--}3000$ y $<1500\text{ cm}^{-1}$. Estos cambios pueden estar relacionados con una reorganización
387 del sistema π conjugado y la posible formación de especies más polares o nuevos entornos
388 C–O, así como una posible ruptura parcial de enlaces de hidrógeno o reorganización
389 estructural inducida por cavitación (Grewal *et al.*, 2018), sin desplazamientos significativos
390 en el número de onda, lo que indica que el esqueleto aromático principal se mantiene intacto.

391 En la región de $900\text{--}600\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a deformaciones fuera del plano en anillos
392 aromáticos, no se detectaron cambios estructurales significativos, aunque algunas
393 condiciones provocaron variaciones leves en la intensidad.

394 Por otro lado, las condiciones centrales (10 min – 80%, Figura 10D) mostraron espectros
395 muy similares a la AMF1 (control), con variaciones mínimas en la magnitud de la
396 transmitancia, sugiriendo un régimen de la TUS moderada en el que predominan cambios
397 conformacionales.

398 En conjunto, los espectros FTIR muestran que la TUS produce modificaciones en los grupos
399 funcionales de AFM1, principalmente en las bandas relacionadas con C–H, C=O lactónico y
400 C–O, manteniendo la estructura general del sistema aromático. Este comportamiento resulta

401 congruente con lo descrito en sistemas moleculares complejos sometidos a cavitación
402 ultrasónica, en particular matrices lácteas y dispersiones proteicas, donde el ultrasonido
403 provoca reorganización de enlaces de hidrógeno, cambios en la densidad electrónica y la
404 formación de microentornos más polares, sin necesidad de romper enlaces covalentes fuertes
405 (Bui *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2024). Bajo esta perspectiva, las variaciones
406 espectroscópicas observadas en AFM1 podrían reflejar perturbaciones locales del entorno
407 molecular y de la organización conformacional provocadas por la TUS.



408

409 **Figura 10.** Espectros de FTIR del DECC en una ventana espectral de 400–4000 cm⁻¹.
410 AFM1 (control); (B) condiciones del DECC; (C) condiciones axiales; (D) réplicas en el
411 punto central.

412 CONCLUSIONES

413 La evaluación espectroscópica del DECC de la AFM1 sometida a TUS indicó que esta
414 micotoxina responde a los tratamientos de tiempo y amplitud, principalmente mediante
415 cambios en la intensidad de las señales UV y de fluorescencia. Los espectros UV conservaron

416 su perfil característico con un máximo cercano a 365 nm, los cambios observados
417 evidenciaron alteraciones en el entorno electrónico del cromóforo furanocumarínicos.
418 En fluorescencia, los espectros de AFM1 mostraron emisiones con un máximo alrededor de
419 428 nm tras ser excitado a 365 nm, identificando diferentes regímenes de reorganización
420 estructural como resultado de la cavitación. Estas modificaciones indican que la TUS puede
421 modificar la exposición de grupos cromóforos y la rigidez conformacional, sin causar la
422 ruptura del esqueleto covalente.

423 El análisis de la energía ultrasónica específica en cada tratamiento permitió relacionar los
424 cambios espectrales con el aporte energético del DECC. Al comparar con las energías de
425 transición electrónica calculadas para 365 nm y 428 nm, además de las energías típicas de
426 enlaces C–C, C=C, C–O y C=O, se observó que la energías fotónicas y ultrasónicas
427 disponible están por debajo de los umbrales necesarios para la ruptura directa de enlaces
428 covalentes clave. Por ello, los resultados apoyan la interpretación de que la TUS
429 principalmente induce cambios conformacionales, redistribución de densidad electrónica y
430 modificaciones en interacciones no covalentes de la molécula de AFM1.

431 Los espectros FTIR reforzaron esta evidencia al mostrar variaciones discretas pero
432 coherentes en las bandas vinculadas a grupos C–H, C–O y C=O. Estas diferencias en
433 intensidad, sin alteraciones significativas en la posición de los picos, sugieren la participación
434 de grupos funcionales en posibles procesos de apertura parcial de anillos, formación de
435 nuevas interacciones de hidrógeno o cambios en la polaridad local. Estos fenómenos son
436 coherentes con la química de cavitación reportada en otros sistemas orgánicos y proteicos
437 sometidos a ultrasonido.

438 En conjunto, los resultados de UV, fluorescencia y FTIR muestran que la TUS no rompe el
439 sistema aromático conjugado de la AFM1. Tales perturbaciones podrían tener implicaciones

440 en la reactividad química de la molécula, al alterar la deslocalización electrónica y el entorno
 441 de grupos funcionales como la lactona, el sistema furánico y el grupo hidroxilo, con posibles
 442 efectos sobre su afinidad por biomoléculas, su susceptibilidad a la oxidación y su
 443 participación en interacciones intermoleculares. Sin embargo, la información
 444 espectroscópica por sí sola no permite determinar si estas transformaciones conducen a una
 445 reducción real en su potencial toxicológico.

446 **AGRADECIMIENTOS**

447 Autor Monter-Arciniega reconoce y agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades,
 448 Tecnología e Innovación (SECIHTI) de México por su apoyo mediante la Beca (1077200).

449 **Material suplementario: Tabla S1.** Parámetros estimados del MSR para la absorbancia
 450 ultravioleta de AFM1 por aplicación de TUS; **Tabla S2.** Parámetros estimados del MSR para
 451 la intensidad de fluorescencia de AFM1 por aplicación de TUS; **Tabla S3.** Energías de enlace
 452 típicas para enlaces covalentes comunes en compuestos orgánicos

453 **Tabla S1. Parámetros estimados del MSR para la absorbancia UV de AFM1 por**
 454 **aplicación de TUS**

Parámetro	Grados de libertad	Coefficiente de regresión	Error estándar	Valor t	Nivel de probabilidad	Coefficiente de determinación parcial
Intercepto	1	2.54				
Tiempo	1	-0.12	0.053	-2.29	0.062	0.338
Amplitud	1	-0.04	0.040	-1.12	0.307	0.081
Tiempo ²	1	0.00	0.001	0.79	0.462	0.040
Amplitud ²	1	0.00	0.000	0.74	0.488	0.035
Tiempo*Amplitud	1	0.00	0.001	2.02	0.090	0.264

Los términos con $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos para explicar la variabilidad en la respuesta. El ajuste global del modelo se resume en el ANOVA de la Figura 7 (R^2 : 0.61).

Tabla S2. Parámetros estimados del MSR para la intensidad de fluorescencia de AFM1 por aplicación de TUS

Parámetro	Grados de libertad	Coefficiente de regresión	Error estándar	Valor t	Nivel de probabilidad	Coefficiente de determinación parcial
Intercepto	1	3302115.66				
Tiempo	1	-58612.24	9435.60	-6.21	0.001	0.192
Amplitud	1	-47160.95	7093.20	-6.65	0.001	0.220
Tiempo ²	1	1712.97	174.95	9.79	0.000	0.477
Amplitud ²	1	278.17	43.74	6.36	0.001	0.201
Tiempo*Amplitud	1	221.70	109.11	2.03	0.088	0.021

Los términos con $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos para explicar la variabilidad en la respuesta. El ajuste global del modelo se resume en el ANOVA de la Figura 8 (R^2 : 0.97).

Tabla S3. Energías de enlace típicas para enlaces covalentes comunes en compuestos orgánicos*

Tipo de enlace	Energía de enlace aproximada (kJ/mol)	Energía de enlace aproximada (eV)	Comentario
C–C	~ 350	~ 3.6	Enlace σ simple en cadenas alifáticas
C=C	~ 610	~ 6.3	Sistema π – σ conjugado, típico de dobles enlaces en anillos aromáticos sustituidos
C–O	~ 360	~ 3.7	Enlaces σ en grupos éter o alcohol
C=O	~ 740	~ 7.7	Enlace carbonilo en grupos cetona, aldehído o lactona

*Zumdahl et al., 2020. Los valores corresponden a intervalos típicos reportados para enlaces covalentes en compuestos orgánicos y se emplean como referencia aproximada para comparar con las energías de transición electrónica y la energía ultrasónica aplicada en los tratamientos de TUS.

455 **Contribución de los autores:** Todos los autores participaron en la elaboración y en el diseño
 456 del estudio. La metodología y la validación fueron llevadas a cabo por [Gabriela Mariana
 457 Rodríguez-Serrano], [Salvador Ramón Tello-Solís] y [Carlos Jiménez-Pérez]. La
 458 preparación del material y la recopilación de datos fueron llevadas a cabo por [Araceli
 459 Monter-Arciniega], [Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano], [Nelly del Socorro Cruz

460 Cansino] y [Salvador Ramón Tello-Solís]. El software y la visualización fueron realizados
461 por [Angélica Saraí Jiménez-Osorio] y [Araceli Castañeda-Ovando]. La supervisión fue
462 realizada por [Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano] y [Nelly del Socorro Cruz Cansino]. El
463 análisis de datos fue realizado por [Salvador Ramón Tello-Solís] y [Carlos Jiménez-Pérez].
464 El primer borrador del manuscrito fue elaborado por [Araceli Monter-Arciniega]. Todos los
465 autores leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

466 **Declaraciones & Manifestaciones**

467 Los autores declaran que no haber recibido fondos, subvenciones ni otro tipo de apoyo
468 durante la preparación de este manuscrito.

469 **Aprobación ética:** No aplica

470 **Consentimiento para participar:** No aplica

471 **Consentimiento para publicar:** No aplica

472 **Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de interés ni ningún
473 interés financiero que reportar.

474 **Referencias**

475 Ahuja, V., Singh, A., Paul, D., Dasgupta, D., Urajová, P., Ghosh, S., Singh, R., Sahoo, G.,
476 Ewe, D., & Saurav, K. (2023). Recent advances in the detection of food toxins using
477 mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 36(12), 1834–1863.
478 <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00241>

479 Asaithambi, N., Singha, P., & Singh, S. K. (2022). Comparison of the effect of hydrodynamic
480 and acoustic cavitations on functional, rheological and structural properties of egg white
481 proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 82, 103166.
482 <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103166>

483 Bbosa, G. S., Kitya, D., Odda, J., & Ogwal-Okeng, J. (2013). Aflatoxins metabolism, effects
484 on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 5(10A), 14–34.
485 <https://doi.org/10.4236/health.2013.510A1003>

- 486 Benkerroum, N. (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action.
 487 *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 423.
 488 <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- 489 Bui, A. T. H., Cozzolino, D., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2021). Infrared analysis of
 490 ultrasound treated milk systems with different levels of caseins, whey proteins and fat.
 491 *International Dairy Journal*, 117, 104983. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.104983>
- 492 Crudo, D., Bosco, V., Cavaglià, G., Mantegna, S., Battaglia, L., & Cravotto, G. (2014).
 493 Process intensification in food industry: Hydrodynamic and acoustic cavitation for fresh
 494 milk treatment. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 25, 55–59.
- 495 Escobar, K. V., Ramón, P., Cárdenas, F. R., & Monroy, B. L. D. (2023). Detección de
 496 micotoxinas (aflatoxinas) en alimentos primarios y procesados para humanos y animales
 497 de granja en Riobamba-Ecuador. *Siembra*, 10(1), e4126.
 498 <https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4126>
- 499 Gao, Y. N., Li, S. L., Yang, X., Wang, J. Q., & Zheng, N. (2021). The protective effects of
 500 lactoferrin on aflatoxin M1-induced compromised intestinal integrity. *International*
 501 *Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 289. <https://doi.org/10.3390/ijms23010289>
- 502 Foerster, C., Monsalve, L., & Ríos-Gajardo, G. (2023). Occurrence of aflatoxin M1 in milk
 503 and exposure estimation for its consumption in the Chilean population. *Food Control*,
 504 148, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109677>
- 505 Gachara, G. W., Suleiman, R., Kilima, B., Ligan, B., Sobeh, M., & Lahlali, R. (2025). Rapid
 506 detection of *Aspergillus* spp. and quantitative simultaneous analysis of aflatoxins (B1,
 507 B2, G1 and G2) in Kenyan hybrid maize cultivars using FT-IR and LC-ESI-MS/MS
 508 spectro-analysis techniques. *Microbiology Society*, 7, 000978.v1.
 509 <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000978.v1>
- 510 Grewal, M. K., Huppertz, T., & Vasiljevic, T. (2018). FTIR fingerprinting of structural
 511 changes of milk proteins induced by heat treatment, deamidation and dephosphorylation.
 512 *Food Hydrocolloids*, 80, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.010>
- 513 Harshitha, C. G., Sharma, N., Singh, R., Sharma, R., Gandhi, K., & Mann, B. (2023).
 514 Interaction study of aflatoxin M1 with milk proteins using ATR-FTIR. *Journal of Food*
 515 *Science and Technology*, 60(1), 64–72. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05587-x>
- 516 He, J., Evans, N. M., Liu, H., Zhu, Y., Zhou, T., & Shao, S. (2021). UV treatment for
 517 degradation of chemical contaminants in food: A review. *Comprehensive Reviews in*
 518 *Food Science and Food Safety*, 20(2), 1857–1886. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12698>
- 520 International Agency for Research on Cancer. (2022). *A review of human carcinogens:*
 521 *Chemical agents and related occupations* (IARC Monographs on the Evaluation of
 522 Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 100F). IARC. [https://monographs.iarc.who.int/wp-](https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F.pdf)
 523 [content/uploads/2018/06/mono100F.pdf](https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F.pdf)

- 524 Jaiswal, P., Jha, S. N., Kaur, J., Borah, A., & Ramya, H. G. (2018). Detection of aflatoxin
525 M1 in milk using spectroscopy and multivariate analyses. *Food Chemistry*, 238, 209–
526 214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.150>
- 527 Jang, G. Y., & Min, S. C. (2025). Ultrasound treatment using plasma-activated water for
528 aflatoxin B1 degradation in corn kernels. *Food Control*, 181, 111791.
529 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111791>
- 530 Jha, S. N., Jaiswal, P., Kaur, J., & Ramya, H. G. (2021). Rapid detection and quantification
531 of aflatoxin B1 in milk using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of The*
532 *Institution of Engineers (India): Series A*, 102(1), 259–265.
533 <https://doi.org/10.1007/s40030-020-00507-8>
- 534 Jiménez-Pérez, C., Alatorre-Santamaría, S., Tello-Solís, S. R., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-
535 Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2021). Analysis of aflatoxin M1
536 contamination in milk and cheese produced in Mexico: A review. *World Mycotoxin*
537 *Journal*, 14(3), 269-286. <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2668>
- 538 Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S. R., Gómez-Castro, C. Z., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-
539 Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Cruz-Borbolla, J., García-Garibay, M., & Cruz-
540 Guerrero, A. (2020). Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-
541 bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*
542 *B: Biology*, 209, 111957. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>
- 543 Kentish, S., & Feng, H. (2014). Applications of power ultrasound in food processing. *Annual*
544 *Review of Food Science and Technology*, 5(1), 263–284.
545 <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182537>
- 546 Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). Alimentary risk of mycotoxins for humans and
547 animals. *Toxins*, 13(11), 822. <https://doi.org/10.3390/toxins13110822>
- 548 Kurup, A. H., Patras, A., Pendyala, B., Vergne, M. J., & Bansode, R. R. (2022). Evaluation
549 of ultraviolet-light (UV-A) emitting diodes technology on the reduction of spiked
550 aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in whole milk. *Food and Bioprocess Technology*, 15(1),
551 165–176. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02731-x>
- 552 Liu, Y., Li, M., Bai, F., & Bian, K. (2019a). Effects of pulsed ultrasound at 20 kHz on the
553 sonochemical degradation of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 12(4), 357–366.
554 <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2431>
- 555 Liu, Y., Li, M., Liu, Y., & Bian, K. (2019b). Structures of reaction products and degradation
556 pathways of aflatoxin B1 by ultrasound treatment. *Toxins*, 11(9), 526.
557 <https://doi.org/10.3390/toxins11090526>
- 558 Liu, Y., Liu, Y., Zhao, W., Li, M., Liu, N., & Bian, K. (2022). Reduction of aflatoxin B1 and
559 zearalenone contents in corn using power ultrasound and its effects on corn quality.
560 *Toxins*, 14(12), 834. <https://doi.org/10.3390/toxins14120834>

- 561 Liu, Z., Zhao, H., Yang, G., He, K., Sun, X., Wang, Z., & Qiu, J. (2020). Study of
 562 photodegradation kinetics of aflatoxins in cereals using trilinear component modeling of
 563 excitation-emission matrix fluorescence data. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular
 564 and Biomolecular Spectroscopy*, 235, 118266.
 565 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118266>
- 566 Li, P., Su, R., Yin, R., Lai, D., Wang, M., Liu, Y., & Zhou, L. (2020). Detoxification of
 567 mycotoxins through biotransformation. *Toxins*, 12(2), 121.
 568 <https://doi.org/10.3390/toxins12020121>
- 569 Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002). *Applied sonochemistry: The uses of power ultrasound
 570 in chemistry and processing*. Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/352760054X>
- 571 Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. d. S., Castañeda-Ovando, A., Jiménez-Osorio, A.
 572 S., Tello-Solís, S. R., Jiménez-Pérez, C., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2025). Aflatoxin
 573 M1 levels in commercial cows' milk in Mexico: Contamination and carcinogenic risk
 574 assessment. *Applied Sciences*, 15(11), 6106. <https://doi.org/10.3390/app15116106>
- 575 Mortazavi, S. M., Sani, A. M., & Mohseni, S. (2015). Destruction of AFT by ultrasound
 576 treatment. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4, 198–202.
- 577 Nji, Q. N., Babalola, O. O., & Mwanza, M. (2023). Soil *Aspergillus* species, pathogenicity
 578 and control perspectives. *Journal of Fungi*, 9(7), 766.
 579 <https://doi.org/10.3390/jof9070766>
- 580 Pichardo-Matamoros, D. J., & Elizondo-Salazar, J. A. (2020). Persistence of aflatoxins
 581 during milk processing. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37, 1498–1505.
 582 <https://doi.org/10.15517/nat.v14i2.44842>
- 583 Ramadan, N. A., & Al-Ameri, H. A. (2022). Aflatoxins. En L. B. Abdulra'uf (Ed.),
 584 *Aflatoxins—Occurrence, detoxification, determination and health risks* (pp. 1–95).
 585 IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97292>
- 586 Rahimzadeh Barzoki, H., Faraji, H., Beirami, S., Keramati, F. Z., Nayik, G. A., Izadi
 587 Yazdanaabadi, Z., & Mozaffari Nejad, A. S. (2023). Seasonal study of aflatoxin M1
 588 contamination in cow milk on the retail dairy market in Gorgan, Iran. *Dairy*, 4(4), 571–
 589 580. <https://doi.org/10.3390/dairy4040039>
- 590 Sein, T. T., Mongmonsin, U., Chatchawal, P., Wongwattanakul, M., Srichaiyapol, O.,
 591 Pattanakul, R., & Tippayawat, P. (2024). Detection of aflatoxin B1 in chili powder using
 592 attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food
 593 and Drug Analysis*, 32(2), 184–195. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3497>
- 594 Shen, X., Shao, S., & Guo, M. (2017). Ultrasound-induced changes in physical and functional
 595 properties of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*,
 596 52(2), 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13292>

- 597 Soltanabadi, O., Atri, M. S., & Bagheri, M. (2024). Fluorescence spectroscopy and molecular
598 modeling studies on the interaction of aflatoxin B1 and G1 with bovine α -lactalbumin.
599 *Veterinary Research Forum*, 15(10), 551–558.
600 <https://doi.org/10.30466/vrf.2024.2006492.3959>
- 601 Stanley, J., Patras, A., Pendyala, B., Vergne, M. J., & Bansode, R. R. (2020). Performance
602 of a UV-A LED system for degradation of aflatoxins B1 and M1 in pure water: Kinetics
603 and cytotoxicity study. *Scientific Reports*, 10(1), 13473. [https://doi.org/10.1038/s41598-
604 020-70370-x](https://doi.org/10.1038/s41598-020-70370-x)
- 605 Sumon, A. H., Islam, F., Mohanto, N. C., Kathak, R. R., Molla, N. H., Rana, S., Degen, G.
606 H., & Ali, N. (2021). The presence of aflatoxin M1 in milk and milk products in
607 Bangladesh. *Toxins*, 13(7), 440. <https://doi.org/10.3390/toxins13070440>
- 608 Taha, A., Mehany, T., Pandiselvam, R., Siddiqui, S. A., Mir, N. A., Malik, M. A., Sujayasree,
609 O. J., Alamuru, K. C., Khanashyam, A. C., Casanova, F., Xu, X., Pan, S., & Hu, H.
610 (2024). Sonoprocessing: Mechanisms and recent applications of power ultrasound in
611 food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(17), 6016–6054.
612 <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2161464>
- 613 Wang, Y., Li, B., Guo, Y., Liu, C., Liu, J., Tan, B., ... & Jiang, L. (2022). Effects of ultrasound
614 on the structural and emulsifying properties and interfacial properties of oxidized
615 soybean protein aggregates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 87, 106046.
616 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106046>
- 617 Xiong, J., Chen, F., Zhang, J., Ao, W., Zhou, X., Yang, H., Wu, Z., Wu, L., Wang, C., &
618 Qiu, Y. (2022). Occurrence of aflatoxin M1 in three types of milk from Xinjiang, China,
619 and the risk of exposure for milk consumers in different age-sex groups. *Foods*, 11(23),
620 3922. <https://doi.org/10.3390/foods11233922>
- 621 Zhang, N.-Y., Qi, M., Zhao, L., Zhu, M.-K., Guo, J., Liu, J., Gu, C.-Q., Rajput, S. A., Krumm,
622 C. S., Qi, D.-S., & Sun, L.-H. (2016). Curcumin prevents aflatoxin B1 hepatotoxicity by
623 inhibition of cytochrome P450 isozymes in chick liver. *Toxins*, 8(11), 327.
624 <https://doi.org/10.3390/toxins8110327>
- 625 Zhao, Y., Saxena, J., Cherian, V., Silva, M., Truong, T., & Chandrapala, J. (2024). Effect of
626 low frequency ultrasound on lactose-protein interactions in protein solution containing
627 different casein to whey protein ratios. *International Journal of Food Science and
628 Technology*, 59(2), 1037–1050. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16871>
- 629

1 **Evaluación por espectrometría de masas (ESI+) de la transformación estructural de la**
2 **aflatoxina M1 posterior a la aplicación de la termoultrasonificación**

3 Araceli Monter-Arciniega¹, Salvador R Tello-Solís², Nelly Del Socorro Cruz-Cansino¹,
4 Carlos Jiménez-Pérez³, Angélica Saraí Jiménez-Osorio⁴, Araceli Castañeda-Ovando⁵,
5 Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano^{6*}

6 ¹Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42160
7 Hidalgo, México

8 ²Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, 09310 Ciudad de
9 México, México.

10 ³Departamento Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana, 52005
11 Lerma de Villada, Estado de México

12 ⁴Area Académica de Enfermería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42160
13 Hidalgo, México

14 ⁵Química de los Alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42183 Hidalgo,
15 México

16 ⁶Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, 09310 Ciudad de
17 México, México

18 *Autor de correspondencia: gmrs@xanum.uam.mx

19 **Introducción**

20 Las micotoxinas constituyen unos de los principales contaminantes químicos en la cadena
21 alimentaria, debido a su alta estabilidad y a sus efectos crónicos en la salud humana (Chulli
22 et al., 2023). Entre ellas, las AF destacan por su elevada toxicidad, distribución a nivel
23 mundial y persistencia en materias primas y alimentos procesados, especialmente en regiones
24 tropicales y subtropicales, donde las condiciones climáticas favorecen el crecimiento de
25 hongos toxigénicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Hoyos et al., 2015;
26 Vallejo-López et al., 2025). La AFB1 es el compuesto más carcinogénico de este grupo y ha
27 sido clasificada como carcinógeno del Grupo 1 por la IARC, debido a su asociación con
28 carcinoma hepatocelular y otros efectos adversos (IARC, 2021; Salazar et al., 2014). Tras su
29 ingestión, AFB1 se convierte en el hígado por acción del sistema del citocromo P450,
30 produciendo metabolitos hidroxilados como la AFM1 (Min et al., 2021). Este metabolito se

31 excreta en la leche de animales expuestos y representa un riesgo directo para los
32 consumidores de productos lácteos (Battacone et al., 2003).

33 La presencia de AFM1 ha sido ampliamente reportada en leche, productos lácteos y fórmulas
34 lácteas a niveles cercanos o superiores a los límites máximos permitidos (EC, 2001;
35 Secretaría de Salud, 2010). Esto ha motivado el desarrollo de métodos analíticos cada vez
36 más precisos y selectivos para su cuantificación, entre los cuales destacan las técnicas de
37 cromatografía líquida acopladas con espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Cossu et al.,
38 2025; Van Camp et al., 2023). Estas metodologías cumplen con los criterios regulatorios más
39 rigurosos y proporcionan información estructural adicional mediante la detección de iones
40 precursores y fragmentos característicos (Van Camp et al., 2023). No obstante, la mayoría de
41 estos estudios se centran en la cuantificación de AFM1 en matrices lácteas y en la validación
42 de métodos de control, siendo limitada la evidencia respecto al uso de la espectrometría de
43 masas para analizar las modificaciones estructurales inducidas por las tecnologías aplicadas.
44 La TUS se ha establecido como una opción prometedora para el procesamiento de leche y
45 otros líquidos alimentarios, dado que combina ultrasonido de alta intensidad con
46 temperaturas moderadas (Bariya et al., 2023). Este método produce cavitación acústica,
47 microchorros y gradientes locales de presión y temperatura, que actúan para inactivar
48 microorganismos y modificar estructuras supramoleculares sin necesidad de aplicar procesos
49 térmicos extremos (Asaithambi et al., 2022; Crudo et al., 2014). Estudios han descrito que el
50 ultrasonido de potencia puede reducir significativamente el contenido de micotoxinas en
51 sistemas acuosos y matrices sólidas, además de que sus productos de degradación pueden ser
52 analizados mediante espectrometría de masas de alta resolución, permitiendo proponer rutas
53 de transformación que incluyen apertura de anillos lactónicos, hidroxilaciones y oxidaciones
54 selectivas (Basso et al., 2023; Liu et al., 2019; Liu et al., 2022; Su et al., 2024). No obstante,

55 la mayor parte de la evidencia se centra en la AFB1, mientras que las transformaciones de
56 AFM1 bajo tecnologías aplicadas han sido menos investigadas y, en particular, poco descritas
57 desde una perspectiva estructural.

58 En el caso de la AFM1, la mayoría de los estudios con TUS se han centrado en cuantificar la
59 reducción de la micotoxina en la leche y evaluar en general su impacto en la calidad
60 fisicoquímica y microbiológica (Annandarajah et al., 2018; Bermúdez-Aguirre et al., 2009;
61 Hernández-Falcón et al., 2018; Vijayakumar et al., 2015) sin explorar en profundidad la
62 naturaleza de los productos de transformación generados. La falta de esta información
63 constituye una limitación importante, ya que la simple disminución de la concentración
64 analítica no asegura por sí sola una reducción del riesgo toxicológico: Algunos productos
65 pueden seguir conservando el cromóforo furanocumarínico, mantener afinidad por
66 macromoléculas biológicas o incluso formar metabolitos con toxicidad residual. En este
67 contexto, la espectrometría de masas es una herramienta clave para complementar la
68 información obtenida mediante espectroscopía UV, fluorescencia y FTIR, ya que permite
69 detectar la pérdida relativa del ion molecular de AFM1, identificar iones emergentes y
70 proponer, al menos de forma preliminar, tipos de transformaciones estructurales relacionadas
71 con el tratamiento por TUS.

72 Esta investigación tiene como objetivo caracterizar, mediante espectrometría de masas, los
73 cambios estructurales en AFM1 sometida a tratamientos de TUS en un sistema acuoso
74 modelo. En este contexto, el estudio buscó complementar la cuantificación clásica de la
75 micotoxina con evidencia directa sobre posibles rutas de transformación molecular. La
76 información obtenida pretende proporcionar elementos para determinar si la disminución en
77 la señal analítica de AFM1 bajo TUS se debe únicamente a efectos físicos o redistribución,

78 o si en realidad existen procesos de modificación estructural que puedan reducir su potencial
79 tóxico.

80 **MATERIALES Y MÉTODOS**

81 **Reactivos y preparación de soluciones**

82 Se adquirió el estándar de AFM1 de Enzo Life Sciences®, (Nueva York, EUA)., con una
83 pureza declarada de 95%. Cada vial, con un contenido de 0.1 mg, se reconstituyó con 1.0 mL
84 de ACN grado HPLC para obtener una solución madre de 100 µg/mL. Como fases se
85 utilizaron acetonitrilo y agua, las cuales se filtraron (0.22 µm) antes de su utilización. El PBS
86 se preparó con fosfato monobásico y dibásico de potasio (J.T. Baker®, EE. UU.) para obtener
87 0.1 mM ajustado a pH 6.8. a partir de la solución madre, se preparó una solución de trabajo
88 de AFM1 en PBS a una concentración de 0.8 µg/mL, correspondiente al sistema acuoso
89 modelo empleado en los tratamientos TUS. Todas las soluciones se almacenaron en frascos
90 de vidrio ámbar a 4 °C y protegidas de la luz hasta su análisis.

91 **Tratamiento por termoultrasonificación**

92 Los tratamientos de TUS se llevaron a cabo sobre alícuotas de 15 mL de AFM1 en PBS, sin
93 matriz láctea. Se utilizó un equipo de ultrasonido de potencia, tipo sonda (Cole-Parmer®,
94 130 W, 20 kHz), conectado a un baño de recirculación de agua para mantener la temperatura
95 en 40 ± °C. Las condiciones de tratamiento fueron establecidas mediante un DECC: Tiempo
96 (5 – 15 min) y amplitud (70 – 90%) (Tabla 6). Las combinaciones de tiempo y amplitud se
97 generaron con el software JMP®, versión 7. Tras cada tratamiento, las muestras fueron
98 enfriadas rápidamente en un baño de hielo y almacenadas a 4 °C hasta su análisis mediante
99 espectrometría de masas. Se registró la temperatura de entrada y salida posterior a la
100 aplicación de TUS. Una alícuota de 15 mL sin tratamiento se utilizó como control.

Tabla 6. Diseño experimental central compuesto

Código	Tiempo (min)	Amplitud (%)
-1, -1	5	70
-1, +1	5	90
+1, -1	15	70
+1, +1	15	90
$-\alpha$, 0	3	80
$+\alpha$, 0	17	80
0, $-\alpha$	10	66
0, $+\alpha$	10	94
0, 0	10	80
0, 0	10	80
0, 0	10	80
0, 0	10	80

En todos los ensayos del DECC, la temperatura de entrada se mantuvo en promedio a 38 ± 0.3 °C y la temperatura de salida a 45 ± 0.9 °C.

102 **Espectrometría de masas**

103 La caracterización molecular de AFM1 tras el tratamiento con TUS se llevó a cabo mediante
 104 espectrometría de masas con ionización por *electrospray* en modo positivo (ESI⁺), acoplada
 105 a un analizador de trampa iónica (LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Se
 106 realizaron diluciones de cada tratamiento hasta obtener una concentración de 0.025 µg/mL
 107 empleando como diluyente una mezcla de metanol, agua Milli-Q y ácido fórmico (70:30:0.1,
 108 respectivamente). Se inyectaron 5 µL de cada muestra mediante infusión directa, utilizando
 109 una bomba de jeringa a un flujo constante de 0.3 µL/min. Las condiciones de ionización
 110 incluyeron un voltaje de entrada de 4.5 kV, temperatura del capilar de 275 °C y presión del
 111 gas vapor nebulizador de nitrógeno ajustada automáticamente. El escaneo se realizó en el
 112 intervalo de 100 a 1000 m/z, con adquisición en modo *full-scan*. Los espectros obtenidos se

113 evaluaron para detectar la presencia de iones moleculares correspondientes a AFM1 ($M+H^+$
114 = m/z 329), así como para identificar posibles fragmentos o productos de degradación
115 inducidos por TUS. Todas las muestras se analizaron por triplicado y fueron procesadas
116 aplicando corrección de línea de base y alineamiento de tiempo de retención cuando fue
117 necesario. Para cada muestra, se crearon listas de picos, y la intensidad relativa de cada uno
118 se expresó como porcentaje (%) en relación con el pico principal. Los iones nuevos o
119 aumentados en condiciones de alta energía específica se clasificaron según su Δm en
120 comparación con la AFM1.

121 **Análisis estadístico**

122 Se realizó un análisis descriptivo de la intensidad relativa del ion AFM1 y de los principales
123 iones emergentes detectados en los espectros ESI+, con el fin de comparar visual y
124 numéricamente los cambios en la abundancia relativa de los iones entre los tratamientos. Los
125 resultados se interpretaron en función de las tendencias observadas según el tiempo y la
126 amplitud de TUS.

127 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

128 **Perfil de masas de AFM1**

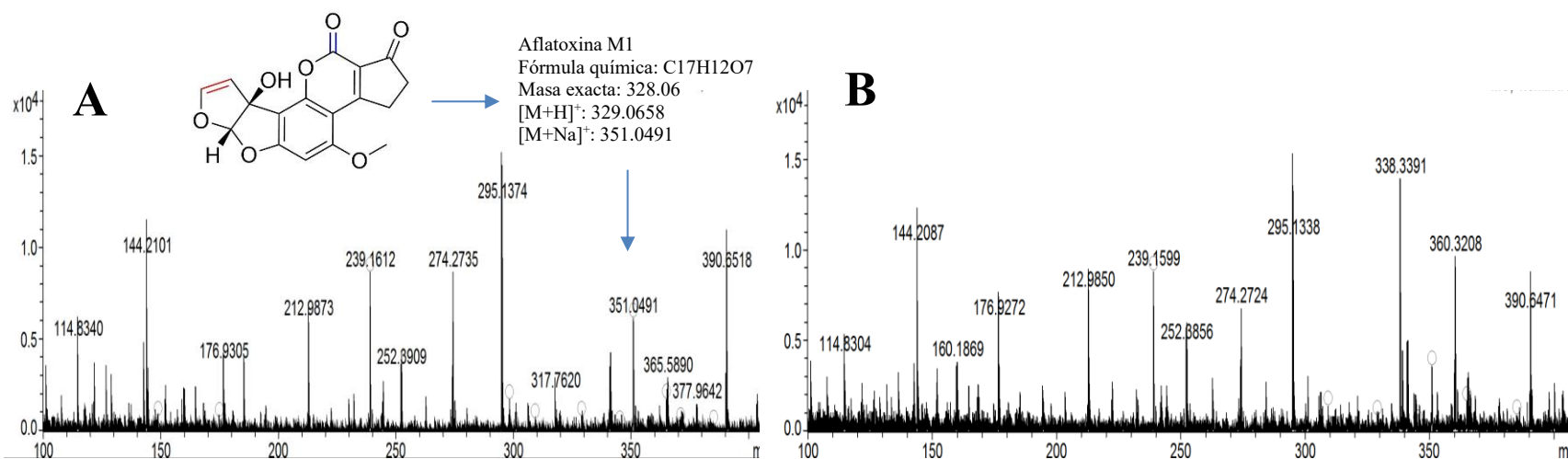
129 El espectro ESI-MS en modo positivo de la solución de control de AFM1 presentó un patrón
130 reportado para esta micotoxina (Figura 11). El ion principal fue el molecular $[M+H]^+$ en m/z
131 329.07 ($C_{17}H_{13}O_7$), acompañado por el aducto sódico $[M+Na]^+$ en m/z 351.05 ($C_{17}H_{12}NaO_7$)
132 y fragmentos menores, destacando m/z 273.08 ($C_{15}H_{13}O_5$) y 239.16 ($C_{12}H_{24}NaO_3$) (Tabla 7,
133 Figura 11). Este patrón se alinea con los perfiles de AFM1 reportados en métodos LC-
134 MS/MS para leche y productos lácteos, donde el ion en 329 m/z y sus fragmentos se usan
135 como transiciones diagnósticas para confirmación estructural (Nguyen et al., 2022; Nikmaran
136 et al., 2023; Qi et al., 2023; Shi et al., 2017).

137 **Modulación del ion molecular y de los fragmentos diagnósticos de AFM1 tras TUS**

138 La Tabla 7 muestra las intensidades relativas de los iones diagnósticos de AFM1 en el grupo
139 de control y en los 12 tratamientos de TUS. Tras la aplicación de TUS, el ion $[M+H]^+$ (m/z
140 329.07) evidenció una disminución en todos los tratamientos, presentando intensidades
141 inferiores al 15% en comparación con el espectro de control. Por otra parte, el aducto de
142 sodio $[M+Na]^+$ (351.05 m/z) mostró reducciones más moderadas y persistió como señal
143 relevante en la mayoría de las condiciones, lo que indica que la estructura básica del esqueleto
144 furanocumarínico se mantiene, aunque en un microentorno iónico distinto (Figura 11)
145 (Nguyen et al., 2022; Nikmaran et al., 2023; Qi et al., 2023; Shi et al., 2017).

146 El comportamiento más destacado se observó en el fragmento 239.16 m/z ($C_{12}H_{24}NaO_3$),
147 cuya intensidad relativa aumentó en todos los tratamientos del DECC, con excepción de las
148 condiciones de 5 min – 70%, 15 min – 70% y 10 min – 66%. Este incremento indica que el
149 tratamiento focalizado (TUS) favorece rutas de fragmentación específicas, relacionadas con
150 la apertura de anillos y pérdidas sucesivas de unidades oxigenadas, sin eliminar
151 completamente el núcleo aromático. Un patrón similar de redistribución de intensidad del ion
152 molecular a fragmentos de menor masa se ha observado en otros xenobióticos sometidos a
153 procesos oxidativos avanzados y plasma frío (Nguyen et al., 2022, 2025; Oliveira et al.,
154 2025). En general, la contracción del ion molecular y la elevación selectiva de fragmentos
155 diagnósticos respaldan la idea de una degradación parcial y específica, en lugar de una
156 destrucción completa de la molécula.

157



130

131 **Figura 11.** Espectros de masas de AFM1 obtenidos mediante ESI+MS en modo de exploración total (rango 100–400 m/z). Se presenta
 132 el aducto de sodio [M+Na]⁺ en 351.05 m/z (A) y la comparación de AFM1 tras TUS a los 10 min – 80% (B).

133

Tabla 7. Intensidad relativa (%) de AFM1 fragmentada posterior al tratamiento de TUS

m/z	Fórmula	AFM1	5 min 70%	5 min 90%	15 min 70%	15 min 90%	3 min 80%	17 min 80%	10 min 66%	10 min 94%	10 min 80%
329.07	C ₁₇ H ₁₃ O ₇		8.9	10.4	8.5		5.7	10.8	7.2	7.6	8.8
351.05	C ₁₇ H ₁₂ NaO ₇	38.2	35.4	33.9	29.7	31.7	34.5	32.2	32.3	33.7	19.1
239.16	C ₁₂ H ₂₄ NaO ₃	53.6	52	71.6	45	69.9	99.2	88.9	46.3	68.5	64.6
273.08	C ₁₅ H ₁₃ O ₅		9.5	6.7	9.4		12.3			13	41.5

134

155 **Productos de degradación de AFM1 inducidos por TUS**

156 La Tabla 8 presenta una selección de iones nuevos o notablemente aumentados tras TUS,
157 cuyos valores de m/z y las fórmulas propuestas corresponden a especies previamente
158 reportadas como posibles productos de degradación de AFM1 y AFB1. Se destacan entre
159 ellos (1) iones de baja masa como 79.05 m/z ($C_6H_7^+$) y 96.08 m/z ($C_6H_{10}N^+$), que reflejan
160 rupturas en el esqueleto policíclico; (2) fragmentos intermedios en la región m/z 209–261
161 ($C_{12}H_{21}N_2O_2$, $C_{15}H_{14}O_3$, $C_{14}H_{12}O_5$), que son compatibles con la apertura de anillos lactónicos
162 y pérdidas sucesivas de CO, CO₂ o unidades C₂H₂O; (3) iones más oxigenados en la zona
163 301–371 m/z ($C_{16}H_{12}O_6$, $C_{17}H_{23}O_9$, $C_{18}H_{34}N_3O_3$, $C_{17}H_{17}O_9$), cuya mayor relación O/C indica
164 procesos de oxidación, hidroxilación o incorporación adicional de grupos carbonílicos (Lui
165 et al., 2024; Luo et al., 2013; Mau et al., 2016; Nguyen et al., 2022; Nikmaram et al., 2023;
166 Qi et al., 2023; Shi et al., 2017; Stanley et al., 2020; Wang et al., 2015, Wang et al., 2025;
167 Zhang et al., 2021), la distribución de estos productos varió entre tratamientos. Las
168 condiciones con tiempos intermedios (~10 min) y amplitudes elevadas ($\geq 90\%$) concentraron
169 la mayor variedad de iones de degradación, mientras que los tratamientos suaves generaron
170 patrones más similares al control. Esta tendencia se alinea con la lógica fisicoquímica de la
171 cavitación acústica: A mayor número de eventos de colapso de burbujas, aumenta la
172 formación local de radicales hidroxilo y ROS, lo cual facilita oxidaciones y rupturas de
173 enlaces en compuestos orgánicos (Zhang et al., 2021; Strieder et al., 2021).

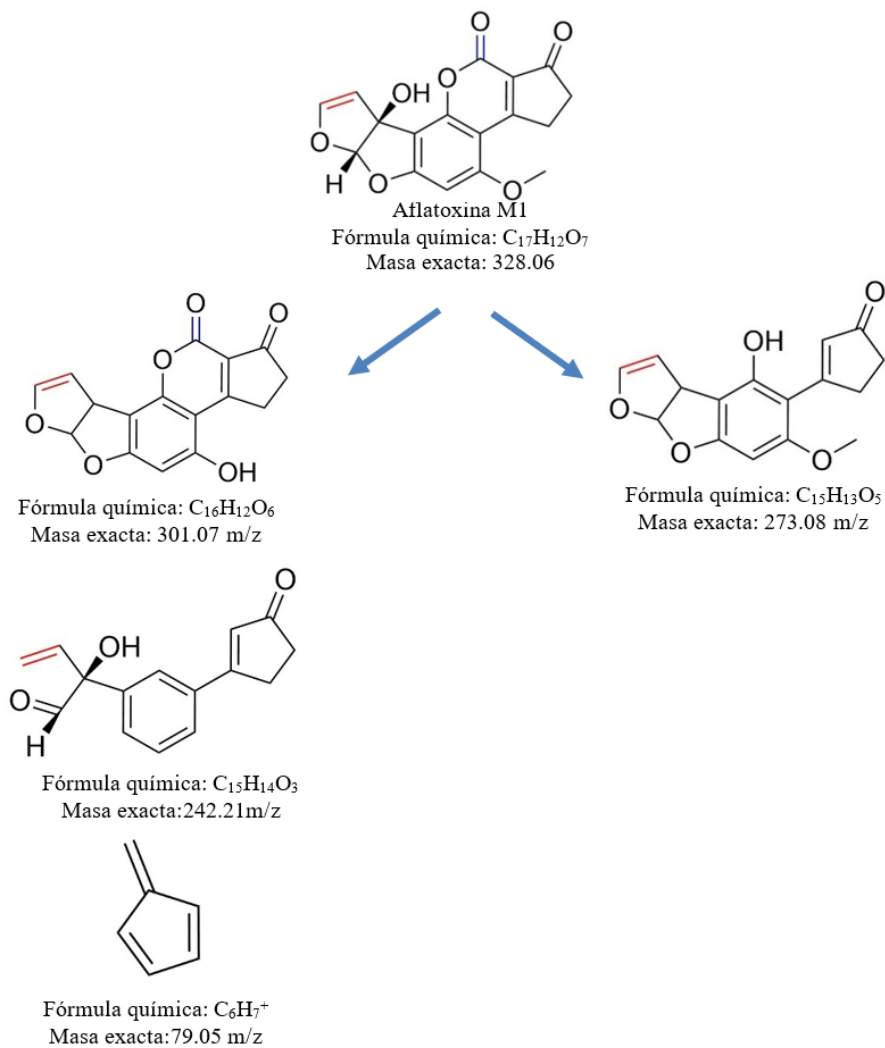
174 Desde una perspectiva estructural, la coexistencia de fragmentos pesados (301–371 m/z) con
175 especies de baja masa, indica la presencia simultánea de intermediarios parcialmente
176 oxidados y productos de ruptura más avanzados. Este patrón coincide con lo descrito para
177 tratamientos con plasma frío y oxidación avanzada, en los que AFM1 produce una familia de

178 derivados más polares, con modificaciones en la lactona y el anillo furanocumarínico (Dinç
179 et al., 2025; Nguyen et al., 2025; Nikmaram et al., 2022, 2023).

Tabla 8. Intensidad (%) relativa de los productos de degradación de AFM1 tras tratamiento de TUS

m/z	Fórmula	5 min 70%	5 min 90%	15 min 70%	15 min 90%	3 min 80%	17 min 80%	10 min 66%	10 min 94%	10 min 80%
79.05	C ₆ H ₇									6.2
96.08	C ₆ H ₁₀ N			6.9	8.3					6.3
114.83	C ₆ H ₁₂ NO	30.6		39	36.3	27.7	6.3		35.9	
209.17	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O					3.1				7.8
221.08	C ₁₂ H ₁₃ O ₄	2								
227.18	C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₂	2.5				2.7				
242.21	C ₁₅ H ₁₄ O ₃		17.8					7.4		12.1
249.08	C ₁₃ H ₁₃ O ₅					2.5				
261.08	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	3.5				3.4				
273.08	C ₁₅ H ₁₃ O ₅		9.5	6.7	9.4		12.3			13
301.07	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	13.8	26.6	9.9	7.3	19.8	11.2	9.4	13.7	21.6
303.05	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	2								
304.13	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	2.4				2.4				
313.07	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	4.5				2.4				
315.09	C ₁₇ H ₁₄ O ₆		13.6			2.3				
327.05	C ₁₇ H ₁₁ O ₇					2.4				
330.07	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	7.2								
331.08	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	3.3				2.3				
340.26	C ₁₈ H ₃₄ N ₃ O ₃	8.7			6	9.5		7.5	10.1	
346.07	C ₁₇ H ₁₄ O ₈			7.6					14.2	
363.07	C ₁₇ H ₁₅ O ₉	2.2				3.2				
365.04	C ₁₇ H ₁₇ O ₉	16.1	23.3	8	6.4	11	6.7	7.7	21	11.9
369.05	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	4.2				2.4				
371.13	C ₁₇ H ₂₃ O ₉	3.1				2.2				6.7

182 La Figura 12 presenta un esquema propuesto de la transformación estructural de AFM1 tras
183 aplicar TUS, basado en los iones detectados en ESI⁺-MS y en las fórmulas moleculares de la
184 Tabla 8. El ion precursor [M+H]⁺ de AFM1 (329.07 m/z, C₁₇H₁₃O₇) origina una serie inicial
185 de productos de degradación con pérdida secuencial de unidades CH₂O y C₂H₂O (301.07
186 m/z, C₁₆H₁₂O₆; 273.08 m/z, C₁₅H₁₃O₅; 242.21 m/z, C₁₅H₁₄O₃), lo que indica reacciones de
187 apertura parcial del anillo lactónico y una contracción progresiva del sistema policíclico.
188 Simultáneamente, la aparición de especies con mayor polaridad como C₆H₁₀N; 79.05 m/z,
189 C₆H₇) sugiere una mayor fragmentación del esqueleto furanocumarínico y la generación de
190 subestructuras aromáticas y nitrogenadas más pequeñas, compatible con rutas de oxidación
191 y escisión inducidas por radicales durante la cavitación. En conjunto, este esquema
192 estructural apoya que la TUS no solo modifica la respuesta espectral de AFM1, sino que
193 también favorece una transformación parcial de la toxina en fragmentos de menor tamaño,
194 coherente con la reducción relativa de los iones del precursor observada en tratamientos con
195 mayor energía ultrasónica (Qi et al., 2023; Liu et al., 2023, 2024; Mau et al., 2016; Zhang et
196 al., 2021).



197
198
199
200
201

Figura 12. Esquema preliminar de las rutas de fragmentación de la AFM1 inducidas por TUS, basado en los iones detectados mediante ESI+. Los fragmentos de menor masa (m/z 209.17, 96.08 y 79.05) se muestran como productos generales de degradación, excluir la posibilidad de isómeros diferentes.

202 **CONCLUSIONES**

203 La caracterización mediante ESI⁺-MS confirmó que el tratamiento con TUS altera
204 sistemáticamente el perfil iónico de la AFM1. El espectro de control mostró un patrón del
205 aducto [M+Na]⁺, además de fragmentos de menor intensidad que reflejan la molécula. Tras
206 la aplicación de TUS, se observó transformación estructural parcial de AFM1 que depende
207 del tiempo y la amplitud utilizados. La propuesta estructural sugiere que las especies de
208 fragmentación corresponden a una serie de reacciones que incluyen la pérdida de unidades
209 metoxilo, la apertura o reorganización del anillo lactónico, y la ruptura de partes del sistema
210 furanocumarínico, finalizando en estructuras más pequeñas y polares.

211 Los resultados indicaron que la TUS induce rutas de transformación molecular que podrían
212 modificar el potencial tóxico. La reducción del ion precursor, junto con la formación de
213 fragmentos que pierden tanto el anillo lactónico como el sistema π conjugado extendido,
214 sugiere una posible disminución del riesgo asociado a la molécula original. En conjunto, la
215 evaluación mediante ESI⁺-MS posiciona a la TUS como una herramienta para inducir
216 cambios estructurales en AFM1, además las posibles vías de degradación pueden orientar
217 futuros estudios de evaluación de riesgos.

218 **AGRADECIMIENTOS**

219 Autor Monter-Arciniega reconoce y agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades,
220 Tecnología e Innovación (SECIHTI) de México por su apoyo mediante la Beca (1077200).

221 **Contribución de los autores:** Todos los autores participaron en la elaboración y en el diseño
222 del estudio. La metodología y la validación fueron llevadas a cabo por [Gabriela Mariana
223 Rodríguez-Serrano], [Salvador Ramón Tello-Solís] y [Carlos Jiménez-Pérez]. La
224 preparación del material y la recopilación de datos fueron llevadas a cabo por [Araceli
225 Monter-Arciniega], [Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano], [Nelly del Socorro Cruz

226 Cansino] y [Salvador Ramón Tello-Solís]. El software y la visualización fueron realizados
227 por [Angélica Saraí Jiménez-Osorio] y [Araceli Castañeda-Ovando]. La supervisión fue
228 realizada por [Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano] y [Nelly del Socorro Cruz Cansino]. El
229 análisis de datos fue realizado por [Salvador Ramón Tello-Solís] y [Carlos Jiménez-Pérez].
230 El primer borrador del manuscrito fue elaborado por [Araceli Monter-Arciniega]. Todos los
231 autores leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

232 **Declaraciones & Manifestaciones**

233 Los autores declaran que no haber recibido fondos, subvenciones ni otro tipo de apoyo
234 durante la preparación de este manuscrito.

235 **Aprobación ética:** No aplica

236 **Consentimiento para participar:** No aplica

237 **Consentimiento para publicar:** No aplica

238 **Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de interés ni ningún
239 interés financiero que reportar.

240 **Referencias**

241 Annandarajah, C., Grewell, D., Talbert, J. N., Raman, D. R., & Clark, S. (2018). Batch
242 thermosonication for the reduction of plasmin activity in skim milk. *Journal of Food*
243 *Processing and Preservation*, 42(5), e13616. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13616>

244 Asaithambi, N., Singha, P., & Singh, S. K. (2022). Comparison of the effect of hydrodynamic
245 and acoustic cavitations on functional, rheological and structural properties of egg white
246 proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 82, 103166.
247 <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103166>

248 Bariya, A. R., Rathod, N. B., Patel, A. S., Nayak, J. K. B., Ranveer, R. C., Hashem, A.,
249 Abd_Allah, E. F., Ozogul, F., Režek Jambrak, A., & Rocha, J. M. (2023). Recent
250 developments in ultrasound approach for preservation of animal origin foods.
251 *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106676.
252 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106676>

- 253 Basso, A. B. G., Ali, S., Corassin, C. H., Rosim, R. E., & de Oliveira, C. A. F. (2023).
 254 Individual and combined decontamination effect of fermentation and ultrasound on
 255 aflatoxin B1 in wheat-based doughs: A preliminary study. *Quality Assurance and Safety*
 256 *of Crops & Foods*, 15(3), 96–103. <https://doi.org/10.15586/qas.v15i3.1244>
- 257 Battacone, G., Nudda, A., Cannas, A., Borlino, A. C., Bomboi, G., & Pulina, G. (2003).
 258 Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin
 259 B1. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2667–2675. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73862-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73862-4)
- 261 Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009).
 262 Composition properties, physicochemical characteristics and shelf life of whole milk
 263 after thermal and thermosonication treatments. *Journal of Food Quality*, 32(3), 283–302.
 264 <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00250.x>
- 265 Chulli Yupangui, E. S. (2023). *Contaminación de micotoxinas en alimentos balanceados*
 266 [Tesis de licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio
 267 Institucional ESPOCH. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/19081>
- 268 Cossu, M., Sanna, A., Mangano, G., Ledda, G., Chessa, G., Gallo, P., ... & Boselli, C. (2025).
 269 Emerging mycotoxins in cheese: Simultaneous analysis of aflatoxin M1, aflatoxicol, and
 270 sterigmatocystin by LC-MS/MS. *Molecules*, 30(8), 1774.
 271 <https://doi.org/10.3390/molecules30081774>
- 272 Crudo, D., Bosco, V., Cavaglià, G., Mantegna, S., Battaglia, L., & Cravotto, G. (2014).
 273 Process intensification in food industry: Hydrodynamic and acoustic cavitation for fresh
 274 milk treatment. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 25, 55–59.
- 275 Dinç, M., Taşan, M., Palabiyik, I., Akbulut, M. T., & Gunes, R. (2025). Effect of atmospheric
 276 pressure cold plasma on aflatoxins in mixed nuts: A comparative study using natural and
 277 spiked samples. *Food Chemistry*, 494, 146203.
 278 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146203>
- 279 European Commission. (2001). *Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001*
 280 *setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the*
 281 *European Communities*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2001/466/oj/eng>
- 282 Hernández-Falcón, T. A., Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N. S., Alanís-García, E.,
 283 Rodríguez-Serrano, G. M., & Castañeda-Ovando, A. (2018). Effect of thermoultrasound
 284 on aflatoxin M1 levels, physicochemical and microbiological properties of milk during
 285 storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 396–403.
 286 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.018>
- 287 Hoyos Ossa, D. E., Hincapié, D. A., & Peñuela, G. A. (2015). Determination of aflatoxin M1
 288 in ice cream samples using immunoaffinity columns and ultra-high performance liquid
 289 chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control*, 56, 34–40.
 290 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.011>

- 291 International Agency for Research on Cancer. (2022). *Monographs on the evaluation of*
292 *carcinogenic risks to humans: Aflatoxins*. <https://monographs.iarc.who.int/>
- 293 Liu, X., Zhao, F., Chitrakar, B., Wei, G., Wang, X., & Sang, Y. (2023). Three recombinant
294 peroxidases as a degradation agent of aflatoxin M1 applied in milk and beer. *Food*
295 *Research International*, 166, 112352. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112352>
- 296 Liu, X., Zhao, F., Wang, X., Peng, K., Kang, C., & Sang, Y. (2024). Degradation mechanism
297 of aflatoxin M1 by recombinant catalase from *Bacillus pumilus* E-1-1-1: Food
298 applications in milk and beer. *Foods*, 13(6), 888. <https://doi.org/10.3390/foods13060888>
- 299 Liu, Y., Li, M., Liu, Y., & Bian, K. (2019). Structures of reaction products and degradation
300 pathways of aflatoxin B1 by ultrasound treatment. *Toxins*, 11(9), 526.
301 <https://doi.org/10.3390/toxins11090526>
- 302 Liu, Y., Liu, Y., Zhao, W., Li, M., Liu, N., & Bian, K. (2022). Reduction of aflatoxin B1 and
303 zearalenone contents in corn using power ultrasound and its effects on corn quality.
304 *Toxins*, 14(12), 834. <https://doi.org/10.3390/toxins14120834>
- 305 Luo, X., Wang, R., Wang, L., Li, Y., Wang, Y., Chen, Z., Xing, F., & He, X. (2013). Structure
306 elucidation and toxicity analyses of the degradation products of aflatoxin B1 by aqueous
307 ozone. *Food Control*, 31(2), 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.030>
- 308 Mao, J., He, B., Zhang, L., Li, P., Zhang, Q., Ding, X., & Zhang, W. (2016). A structure
309 identification and toxicity assessment of the degradation products of aflatoxin B1 in
310 peanut oil under UV irradiation. *Toxins*, 8(11), 332.
311 <https://doi.org/10.3390/toxins8110332>
- 312 Min, L., Fink-Gremmels, J., Li, D., Tong, X., Tang, J., Nan, X., Yu, Z., Chen, W., & Wang,
313 G. (2021). An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in
314 lactating dairy cows. *Animal Nutrition*, 7(1), 42–48.
315 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.002>
- 316 Nguyen, T., Palmer, J., Loo, T., Shilton, A., Petcu, M., Newson, H. L., & Flint, S. (2022).
317 Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim
318 milk and degradation products after treatment. *Food Chemistry*, 390, 133165.
319 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133165>
- 320 Nguyen, T., Palmer, J., Pedley, J., Petcu, M., Newson, H. L., Keener, K., & Flint, S. (2025).
321 The effect of variations in cold plasma conditions on the detoxification of aflatoxin M1
322 and degradation products. *International Dairy Journal*, 160, 106103.
323 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106103>
- 324 Nikmaram, N., Brückner, L., Cramer, B., Humpf, H.-U., & Keener, K. (2022). Degradation
325 of aflatoxin M1 in skim and whole milk using high voltage atmospheric cold plasma
326 (HVACP) and quality assessment. *Food Research International*, 162(Pt. A), 112009.
327 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112009>

- 328 Nikmaram, N., Brückner, L., Cramer, B., Humpf, H.-U., & Keener, K. (2023). Degradation
329 products of aflatoxin M1 (AFM1) formed by high voltage atmospheric cold plasma
330 (HVACP) treatment. *Toxicon*, 230, 107160.
331 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107160>
- 332 Oliveira, A. C. D., Ali, S., Corassin, C. H., Ullah, S., Pereira, K. N., Walsh, J. L., Hojnik, N.,
333 & Oliveira, C. A. F. (2025). Application of cold atmospheric plasma for decontamination
334 of toxigenic fungi and mycotoxins: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 15,
335 1502915. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1502915>
- 336 Qi, L., Ma, Y., Cai, R., Li, Y., Wang, R., Yue, T., ... & Wang, Z. (2023). Degradation of
337 aflatoxins in apple juice by pulsed light and the analysis of their degradation products.
338 *Food Control*, 148, 109648. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109648>
- 339 Salazar, C. A. Z., Fallas, M. U., & Soto, G. R. (2014). Aflatoxina B1 y su relación con el
340 cáncer hepático. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 71(612), 637–641.
- 341 Shi, H., Cooper, B., Stroshine, R. L., & Keener, K. (2017). Aflatoxin decontamination in
342 food systems using high-voltage atmospheric cold plasma: Structural modification of
343 aflatoxin molecules and degradation products. *Journal of Agricultural and Food
344 Chemistry*, 65(30), 6222–6230. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01604>
- 345 Stanley, J., Patras, A., Pendyala, B., Vergne, M. J., & Bansode, R. R. (2020). Performance
346 of a UV-A LED system for degradation of aflatoxins B1 and M1 in pure water: Kinetics
347 and cytotoxicity study. *Scientific Reports*, 10(1), 13473. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70370-x>
348
- 349 Strieder, M. M., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2021). Advances and innovations
350 associated with the use of acoustic energy in food processing: An updated review.
351 *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, 102863.
352 <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102863>
- 353 Su, H., Xie, Y., Cheng, X., Yang, Z., Mao, J., Yang, H., ... & Hu, H. (2024). The effect of
354 dual-frequency ultrasound on synergistic sonochemical oxidation to degrade aflatoxin
355 B1. *Food Chemistry*, 457, 139708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139708>
- 356 Vallejo-López, A. B., Flores-Murillo, C. R., & Moran-Mosquera, D. V. (2025). Micotoxinas
357 en la cadena alimenticia y su impacto en la salud. *MQRInvestigar*, 9(1), e158.
358 <https://doi.org/10.56048/MQR20225.9.1.2025.e158>
- 359 Van Camp, C., Van Hassel, W. H. R., Abdallah, M. F., & Masquelier, J. (2023).
360 Simultaneous detection and quantification of aflatoxin M1, eight microcystin congeners
361 and nodularin in dairy milk by LC-MS/MS. *Chemosensors*, 11(10), 511.
362 <https://doi.org/10.3390/chemosensors11100511>
- 363 Vijayakumar, S., Grewell, D., Annandarajah, C., Benner, L., & Clark, S. (2015). Quality
364 characteristics and plasmin activity of thermosonicated skim milk and cream. *Journal of
365 Dairy Science*, 98(10), 6678–6691. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9429>

- 366 Wang, S. Q., Huang, G. Q., Li, Y. P., Xiao, J. X., Zhang, Y., & Jiang, W. L. (2015).
367 Degradation of aflatoxin B1 by low-temperature radio frequency plasma and degradation
368 product elucidation. *European Food Research and Technology*, 241(1), 103–113.
369 <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2439-5>
- 370 Wang, X., Li, Z., & Zhang, H. (2025). Study on the degradation of aflatoxin B1 by *Myroides*
371 *odoratimimus* 3J2MO. *Biology*, 14(6), 724. <https://doi.org/10.3390/biology14060724>
- 372 Zhang, Y., Li, M., Liu, Y., Guan, E., & Bian, K. (2021). Degradation of aflatoxin B1 by
373 water-assisted microwave irradiation: Kinetics, products, and pathways. *LWT*, 152,
374 112310. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112310>
- 375

Capítulo 7: Modulación de la citotoxicidad de la aflatoxina M1 tratada con termoultrasonificación en células epiteliales intestinales C2BBel

7.1 Introducción

La leche contaminada con AFM1 constituye una fuente de exposición vía oral en la población, especialmente en infantes, el grupo más vulnerable (Li et al., 2018). Tras su ingesta, la primera barrera biológica que enfrenta la micotoxina es el epitelio intestinal, cuyo deterioro puede facilitar la absorción sistémica de AFM1 y potenciar sus efectos tóxicos en órganos como el hígado (Gao et al., 2022). Diversos estudios han demostrado que la AFM1 reduce la viabilidad de las células epiteliales intestinales en función de la dosis y el tiempo de exposición, acompañada de un aumento en el estrés oxidativo, apoptosis y alteraciones en las proteínas de uniones estrechas, entre las que se encuentran las proteínas transmembrana y las citoplasmáticas, lo que conduce a un incremento en la permeabilidad paracelular y a una disfunción de la barrera intestinal (Adácsi et al., 2023; Gao et al., 2021; Huang et al., 2020; Wu et al., 2021; Zhang et al., 2015).

En conjunto, los hallazgos evidencian que el epitelio intestinal constituye la principal diana de toxicidad y subrayan la urgencia de evaluar no solo el contenido de AFM1 en los alimentos, sino también sus consecuencias funcionales sobre la integridad de la mucosa (Kumar et al., 2023). En este contexto, las líneas celulares derivadas del colon humano que adquieren un fenotipo enterocitario, como Caco-2 y su clon C2BBel, constituyen modelos experimentales eficaces para estudiar la viabilidad celular, el daño estructural y las alteraciones en la permeabilidad intestinal inducidas por micotoxinas. (Peterson & Mooseker, 1992).

Paralelamente, algunas tecnologías de procesamiento no térmico, como la TUS, se consideran alternativas para mejorar la inocuidad alimentaria sin afectar de manera significativa las propiedades nutricionales y sensoriales. La TUS combina ultrasonido de alta intensidad con temperaturas moderadas y utiliza fenómenos de cavitación acústica para inactivar microorganismos y modificar componentes químicos en matrices líquidas (Cregenzán et al., 2014; Sharma et al., 2014; Stratakos et al., 2019). Investigaciones previas han demostrado que la TUS puede inducir cambios estructurales en micotoxinas como

AFM1, evidenciados por modificaciones en sus perfiles cromatográficos y espectroscópicos (Nguyen et al., 2022, 2025, Nikmaram et al., 2023). No obstante, la modificación estructural por sí sola no garantiza una disminución del riesgo, especialmente si los productos generados mantienen o incluso incrementan su citotoxicidad sobre el epitelio intestinal.

En este escenario, resulta fundamental establecer una relación entre los hallazgos analíticos y la respuesta biológica observada en modelos celulares. La evaluación de la viabilidad de células intestinales expuestas a AFM1, tanto antes como después del tratamiento con TUS, es esencial para determinar si las transformaciones estructurales observadas realmente contribuyen a reducir el daño celular o, por el contrario, generan combinaciones de productos con toxicidad igual o incluso mayor.

Este capítulo aborda esta problemática exponiendo células C2BBel a AFM1 sometida a tratamiento con TUS, con el propósito de comparar sus efectos sobre la viabilidad celular y aportar evidencia funcional que complemente la caracterización fisicoquímica presentada en capítulos previos

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Reactivos y preparación de soluciones

Las muestras empleadas en este capítulo correspondieron a soluciones de AFM1 previamente sometidas a tratamientos de TUS definidos por el DECC. Dichas muestras se obtuvieron a partir de soluciones de trabajo preparadas en PBS 0.1 mM (pH 6.8), como se describe en los capítulos 5 y 6. Posteriormente, estas soluciones tratadas se utilizaron para evaluar su efecto sobre la viabilidad de las células C2BBel.

7.2.2 Diseño experimental

El DECC para evaluar el efecto de la TUS a diferentes condiciones se expone en el Capítulo 5–6, en la sección “*Diseño experimental*”, donde se describen los 12 tratamientos codificados y las condiciones específicas de tiempo y amplitud para cada uno. En este capítulo se analizaron las mismas condiciones experimentales para evaluar la viabilidad celular.

7.2.3 Termoultrasonificación

Se describen detalladamente las condiciones operativas de la TUS (tipo de equipo, potencia nominal, control de temperatura y volumen de reacción) en el Capítulo 5–6, sección “*Termoultrasonido*”. En resumen, las soluciones de AFM1 en amortiguador de fosfatos fueron sometidas a la TUS usando un procesador ultrasónico de sonda con una potencia máxima de 130 W bajo diferentes condiciones de duración del tratamiento (5 – 15 min) e intensidad del tratamiento (amplitud 70 – 90%). Se controló la temperatura mediante un baño de recirculación a 40 °C.

7.2.4 Línea celular y condiciones de cultivo

Para evaluar el efecto citotóxico de la AFM1 tratada con TUS, se empleó la línea celular epitelial intestinal humana C2BBel (ATCC® CRL-2102™), un clon derivado de Caco-2 que desarrolla un fenotipo enterocitario caracterizado por microvellosidades y uniones estrechas bien definidas bajo condiciones de cultivo apropiadas. Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa al 5%, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y un 1% de penicilina-estreptomicina. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y se subcultivaron cada 3 a 4 días, cuando alcanzaron una confluencia del 80 al 90%

7.2.5 Tratamiento

Las células C2BBel se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo y se dejaron adherir durante 24 horas antes de la exposición a la AFM1. Posteriormente, se aplicaron los siguientes tratamientos: (1) Control negativo: Células incubadas únicamente con DMEM suplementado, sin AFM1; (2) Control positivo de citotoxicidad de AFM1: Células expuestas a AFM1 sin tratamiento previo, disueltas en DMEM; (3) AFM1-TUS: Células expuestas a AFM1 previamente tratadas con TUS (12 tratamientos), evaluadas de forma independiente. La solución de AFM1 se diluyó en DMEM hasta alcanzar una concentración final de 0.1 μ M. Tras la adición de los tratamientos, las células se incubaron durante 24 horas en las condiciones estándar de cultivo.

7.2.6 Ensayo de reducción con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Al finalizar el período de exposición, el medio de cultivo fue sustituido por 100 µL de solución de MTT (0.5 mg/mL en DMEM) y las placas se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Los cristales de formazán generados en las células viables se disolvieron en 100 µL de DMSO y la absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de microplacas (BioTek Synergy™ HTX, EE. UU.). La viabilidad celular se expresó como porcentaje respecto al control negativo, utilizando la ecuación 7:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Muestra (abs)}}{\text{Control (abs)}} \times 100 \quad (7)$$

7.2.7 Análisis estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicados y los resultados se reportaron como media ± DE. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v26.0 (IBM, EE. UU.).

7.3 Resultados y discusión

La línea C2BBel presenta un fenotipo enterocítico polarizado, con microvellosidades apicales, borde en cepillo bien desarrollado y uniones estrechas funcionales, características que la convierten en un modelo útil para estudiar la toxicidad luminal y la integridad de la barrera intestinal frente a xenobióticos, incluidas las micotoxinas (Peterson & Mooseker, 1992). En este contexto, el ensayo MTT debe interpretarse como un indicador indirecto del daño celular y de la integridad funcional de la monocapa, más que como una medida con implicaciones antitumorales (Larsson & Parris, 2023).

En el presente estudio, la AFM1 sin tratamiento mantuvo una viabilidad similar a la del control (>90%) a la concentración de 0.1 µM, lo que sugiere una citotoxicidad limitada bajo las condiciones evaluadas. Este hallazgo concuerda con lo descrito por algunos autores

que indican que la AFM1 puede alterar la función de barrera intestinal a concentraciones que no necesariamente reducen de forma marcada la viabilidad celular (Caloni et al., 2012; Gao et al., 2018). En células Caco-2/TC7, Caloni et al. (2012) observaron una disminución transitoria de la resistencia transepitelial eléctrica (TEER) en el intervalo de 1,000 a 10,000 ng/kg, sin daño irreversible de la monocapa. De forma similar, Gao et al. (2018) mostraron en Caco-2 diferenciadas que 0.12 μ M no redujo significativamente la TEER, mientras que 12 μ M sí produjo una disminución clara de la resistencia transepitelial y alteraciones en las proteínas de unión estrecha tras 48 h de exposición. En la misma línea, Kumar et al. (2023) reportaron que la AFM1 apenas modificó la morfología de Caco-2 y solo redujo alrededor de un 10% la viabilidad a concentraciones superiores a 1,000 ng/L después de 12 h. En conjunto, estos antecedentes indican que la respuesta tóxica a AFM1 depende de la concentración, del tiempo de exposición y del parámetro biológico evaluado.

Después del tratamiento con TUS, la viabilidad de C2BBel mostró un amplio rango de respuestas, con valores inferiores al 30% en algunas condiciones y respuestas cercanas al control, e incluso ligeramente superiores al control, en otras (Figura 13). Los tratamientos de 5 min – 70% y 5 min – 90% redujeron significativamente la viabilidad, mientras que combinaciones intermedias, cercanas a 10 min con amplitudes entre 66 y 80%, mantuvieron la viabilidad por encima de aproximadamente el 90%. Estos resultados sugieren que el TUS no modifica de manera uniforme la respuesta biológica de la AFM1, sino que puede aumentar o atenuar su citotoxicidad aparente en función de la combinación específica de tiempo y amplitud aplicados.

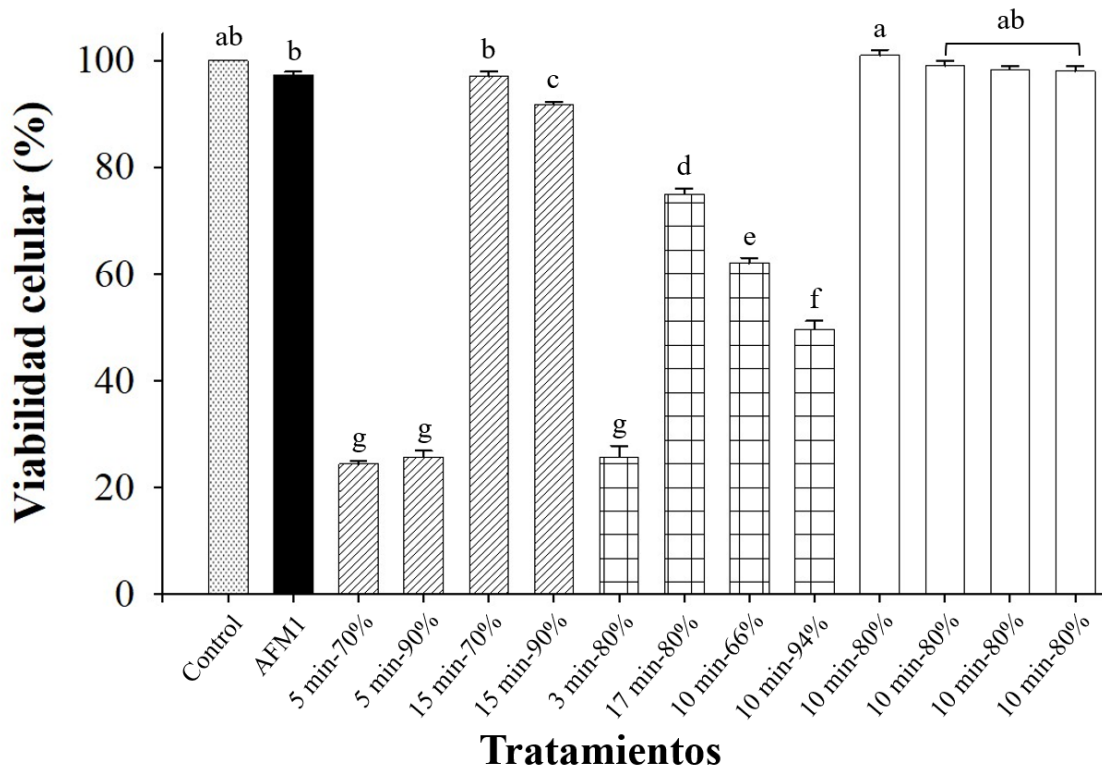


Figura 13. Viabilidad celular de la línea C2BBel tras 24 horas de exposición a los tratamientos del DECC de AFM1 sometida a TUS. Los resultados se reportan como porcentaje respecto al control negativo y se presentan como media \pm DE de experimentos independientes realizados por triplicado.

El MSR confirmó este comportamiento no lineal (Figura 14). La viabilidad celular se ajustó a un modelo cuadrático en función del tiempo y la amplitud, con una región de máxima respuesta localizada aproximadamente entre 9 – 11 minutos y entre 78 – 84% de amplitud, donde los valores se aproximaron a los del control. Por el contrario, los bordes del espacio experimental, definidos por tiempos muy cortos o prolongados y por amplitudes extremas, se asociaron con una menor viabilidad. En términos estadísticos, el modelo explicó el 75% de la variabilidad total ($R^2 = 0.75$) y el término cuadrático del tiempo aportó la mayor contribución al ajuste (R^2 parcial = 0.67; $p = 0.007$). En contraste, los efectos lineales de tiempo y de amplitud, así como el término cuadrático de amplitud y la interacción tiempo \times amplitud, no fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$, Tabla 9). En conjunto, estos resultados sugieren que la duración del tratamiento desempeñó un papel más relevante que la amplitud por sí sola y que existe una región intermedia en la que la AFM1 tratada por TUS ejerció un efecto citotóxico relativo menor sobre C2BBel.

Desde una perspectiva mecanicista, los resultados del MSR son coherentes con la física de la cavitación acústica. Durante la sonicación, el colapso inercial de microburbujas puede generar microambientes transitorios con temperaturas superiores a 5000 K y presiones del orden de 1000 bar, condiciones capaces de favorecer la pirólisis del vapor contenido en la burbuja y la formación de especies reactivas como $H\cdot$ y $\cdot OH$. Una fracción de estas especies puede difundirse a la fase líquida y contribuir a la formación de oxidantes secundarios, incluido H_2O_2 . No obstante, esta evidencia se ha documentado principalmente en sistemas acuosos simples y de reactores sonoquímicos diseñados específicamente para la dosimetría de radicales, por lo que su extrapolación a sistemas biológicos complejos debe analizarse con mayor precisión. En ese sentido, Wong et al. (2023) demostraron que la generación de $\cdot OH$ en un reactor cilíndrico convergente (“SonoCYL”) mediante un enfoque dosimétrico específico depende de parámetros acústicos como la amplitud de presión, el ciclo de trabajo y el diseño del reactor, mientras que revisiones recientes sobre sonoprosos han señalado que la magnitud del efecto sonoquímico depende críticamente de variables como la frecuencia, la intensidad acústica, el tiempo de exposición y la composición del medio, lo que ayuda a explicar por qué los resultados no son directamente extrapolables entre sistemas (Dehghani et al., 2023; Fu et al., 2020). En el presente estudio, aunque no se cuantificaron directamente los ROS, la combinación de tiempo y amplitud aplicada durante el TUS pudo haber modulado la intensidad de cavitación y, con ello, el grado de transformación de la AFM1 y la respuesta biológica observada posteriormente.

Bajo esta interpretación, la región intermedia del espacio experimental, cercana a 10 min y con amplitudes entre 66 y 80 %, podría representar una ventana operativa en la que la energía acústica total y la carga oxidante generada fueron suficientes para inducir transformaciones estructurales de la AFM1 sin favorecer de manera dominante la acumulación de especies o intermediarios más lesivos (Nguyen et al., 2022; Nikmaran et al., 2023; Shi et al., 2017). Esta hipótesis resulta coherente con los hallazgos previos de espectroscopía y de espectrometría de masas, que sugieren modificaciones en la estructura difurano-lactónica y una posible disminución del potencial tóxico. En contraste, condiciones subóptimas, como exposiciones muy breves o tratamientos prolongados a intensidades relativamente bajas, podrían haber favorecido transformaciones incompletas o una mayor persistencia de especies reactivas, capaces de intensificar el estrés oxidativo y afectar de

manera más significativa la viabilidad celular. En conjunto, este comportamiento concuerda con la naturaleza no lineal de la cavitación acústica, en la que pequeñas variaciones en las condiciones de proceso pueden modificar significativamente la intensidad del fenómeno y, por tanto, sus efectos químicos y biológicos (Ashokkumar, 2011; Onyeaka et al., 2023; Taha et al., 2024).

Asimismo, es razonable considerar que la propia solución de AFM1 en PBS, tras el tratamiento con TUS, contribuyó a las respuestas observadas. Wong et al. (2023) mostraron que la cavitación acústica puede incrementar la producción de radicales hidroxilo en sistemas acuosos bajo condiciones definidas, y revisiones recientes han señalado que estos procesos también favorecen la formación y persistencia de oxidantes secundarios en fase líquida, incluido H_2O_2 , en función del diseño del sistema y de la intensidad del tratamiento. A su vez, revisiones recientes de biología redox han establecido que un aumento sostenido de ROS puede promover peroxidación lipídica, modificaciones oxidativas en proteínas y daño al ADN (Aureliano et al., 2023; Geçotek et al., 2024; Jomova et al., 2025; Manoharan et al., 2024; Schieber et al., 2014). Por ello, las condiciones de TUS que combinaron mayor energía acústica con tiempos prolongados podrían haber incrementado no solo la transformación de AFM1, sino también la carga oxidante residual del medio, lo que ofrece una explicación mecanísticamente plausible para las caídas más pronunciadas de viabilidad observadas en ciertos tratamientos. Sin embargo, dado que en este estudio no se cuantificaron ROS ni biomarcadores de daño oxidativo, esta interpretación debe considerarse consistente con la literatura, pero todavía inferencial.

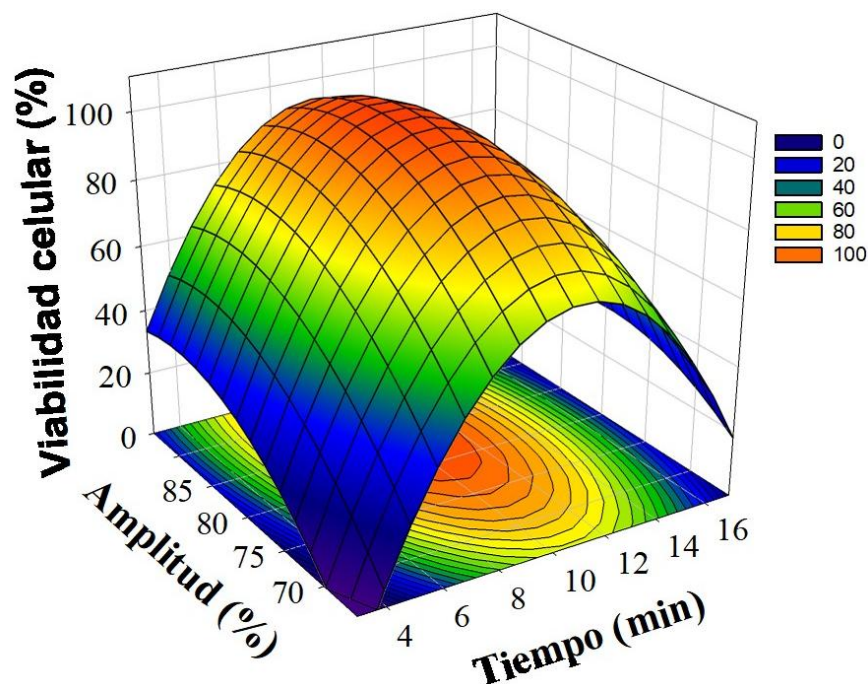


Figura 14. Superficie de respuesta del DECC que muestra la viabilidad celular de C2BBel en función de los diferentes tratamientos aplicados.

Tabla 9. Parámetros estimados para la superficie de respuesta del DECC respecto a la viabilidad celular

Parámetro	Grados de libertad	Coefficiente de regresión	Error estándar	Valor t	Nivel de probabilidad	Coefficiente de determinación parcial
Intercepto	1	-777.222				
Tiempo	1	37.922	18.724	2.03	0.089	0.17
Amplitud	1	16.249	14.076	1.15	0.292	0.06
Tiempo ²	1	-1.386	0.347	-3.99	0.007	0.67
Amplitud ²	1	-0.089	0.087	-1.02	0.346	0.04
Tiempo*Amplitud	1	-0.120	0.217	-0.55	0.599	0.01

Los términos con $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos para explicar la variabilidad en la respuesta. El ajuste global del modelo se resume en el ANOVA de la Figura 14 ($R^2: 0.75$).

7.4 Conclusiones

El efecto biológico de la AFM1 tratada con TUS depende en gran medida de la combinación de tiempo y amplitud aplicados. En particular, se identificó una región experimental asociada con una mayor viabilidad relativa de las células C2BBel,

aproximadamente correspondiente a condiciones intermedias del DECC (66–80% alrededor de los puntos centrales), lo que subraya la necesidad de optimizar cuidadosamente el tratamiento antes de considerar su posible aplicación como estrategia para modificar la toxina.

Referencias

- Adácsi, C., Kovács, S., & Pusztahelyi, T. (2023). Aflatoxin M1 binding by probiotic bacterial cells and cell fractions. *Acta Alimentaria*, 52(4), 579–588. <https://doi.org/10.1556/066.2023.00139>
- Ashokkumar, M. (2011). The characterization of acoustic cavitation bubbles—An overview. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 864–872. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.016>
- Aureliano, M., De Sousa-Coelho, A. L., Dolan, C. C., Roess, D. A., & Crans, D. C. (2023). Biological consequences of vanadium effects on formation of reactive oxygen species and lipid peroxidation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5382. <https://doi.org/10.3390/ijms24065382>
- Caloni, F., Cortinovis, C., Pizzo, F., & De Angelis, I. (2012). Transport of aflatoxin M1 in human intestinal Caco-2/TC7 cells. *Frontiers in Pharmacology*, 3, Article 111. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00111>
- Cregenzán-Alberti, O., Halpin, R. M., Whyte, P., Lyng, J., & Noci, F. (2014). Suitability of ccRSM as a tool to predict inactivation and its kinetics for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in homogenized milk treated by manothermosonication (MTS). *Food Control*, 39(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.007>
- Dehghani, M. H., Karri, R. R., Koduru, J. R., Manickam, S., Tyagi, I., Mubarak, N. M., & Shukla, S. K. (2023). Recent trends in the applications of sonochemical reactors as an advanced oxidation process for the remediation of microbial hazards associated with water and wastewater: A critical review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 93, 106302. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106302>
- Fu, X., Belwal, T., Cravotto, G., & Luo, Z. (2020). Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104726. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726>
- Gao, Y., Bao, X., Meng, L., Liu, H., Wang, J., & Zheng, N. (2018). Modulation of intestinal epithelial permeability in differentiated Caco-2 cells exposed to aflatoxin M1 and ochratoxin A individually or collectively. *Toxins*, 10(1), Article 13. <https://doi.org/10.3390/toxins10010013>

- Gao, Y., Bao, X., Meng, L., Liu, H., Wang, J., & Zheng, N. (2021). Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induce compromised intestinal integrity through clathrin-mediated endocytosis. *Toxins*, *13*(3), 184. <https://doi.org/10.3390/toxins13030184>
- Gao, Y.-N., Wu, C.-Q., Wang, J.-Q., & Zheng, N. (2022). Metabolomic analysis reveals the mechanisms of hepatotoxicity induced by aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Toxins*, *14*(2), 141. <https://doi.org/10.3390/toxins14020141>
- Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2024). Lipid peroxidation products' role in autophagy regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, *212*, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.01.001>
- Huang, B., Chen, Q., Wang, L., Gao, X., Zhu, W., Mu, P., & Deng, Y. (2020). Aflatoxin B1 induces neurotoxicity through reactive oxygen species generation, DNA damage, apoptosis, and S-phase cell cycle arrest. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6517. <https://doi.org/10.3390/ijms21186517>
- Jomova, K., Alomar, S. Y., Valko, R., Liska, J., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2025). Interplay of oxidative stress and antioxidant mechanisms in cancer development and progression. *Archives of Toxicology*, *100*(1), 27–73. <https://doi.org/10.1007/s00204-025-04146-5>
- Kumar, L. K., Verma, S. K., Chandel, R., Thumar, M., Singh, D., & Onteru, S. K. (2023). Aflatoxin M1 decreases the expression of genes encoding tight junction proteins and influences the intestinal epithelial integrity. *Mycotoxin Research*, *39*(4), 453–467. <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00505-2>
- Larsson, P., & Parris, T. Z. (2023). Optimization of cell viability assays for drug sensitivity screens. In *Cell viability assays: Methods and protocols* (pp. 287–302). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5_18
- Li, H., Xing, L., Zhang, M., Wang, J., & Zheng, N. (2018). The toxic effects of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 on kidney through regulating L-proline and downstream apoptosis. *BioMed Research International*, *2018*, 9074861. <https://doi.org/10.1155/2018/9074861>
- Manoharan, R. R., Prasad, A., Pospíšil, P., & Kzhyshkowska, J. (2024). ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications. *Frontiers in Immunology*, *15*, Article 1359600. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1359600>
- Nguyen, T., Palmer, J., Loo, T., Shilton, A., Petcu, M., Newson, H. L., & Flint, S. (2022). Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim milk and degradation products after treatment. *Food Chemistry*, *390*, 133165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133165>
- Nguyen, T., Palmer, J., Pedley, J., Petcu, M., Newson, H. L., Keener, K., & Flint, S. (2025). The effect of variations in cold plasma conditions on the detoxification of aflatoxin M1 and degradation products. *International Dairy Journal*, *160*, 106103. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106103>

- Nikmaram, N., Brückner, L., Cramer, B., Humpf, H.-U., & Keener, K. (2023). Degradation products of aflatoxin M1 (AFM1) formed by high voltage atmospheric cold plasma (HVACP) treatment. *Toxicon*, 230, 107160. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107160>
- Onyeaka, H., Miri, T., Hart, A., Anumudu, C., & Nwabor, O. F. (2023). Application of ultrasound technology in food processing with emphasis on bacterial spores. *Food Reviews International*, 39(7), 3663–3675. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2013255>
- Taha, A., Mehany, T., Pandiselvam, R., Siddiqui, S. A., Mir, N. A., Malik, M. A., Sujayasree, O. J., Alamuru, K. C., Khanashyam, A. C., Casanova, F., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2024). Sonoprocessing: Mechanisms and recent applications of power ultrasound in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(17), 6016–6054. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2161464>
- Peterson, M. D., & Mooseker, M. S. (1992). Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Cell Science*, 102(3), 581–600. <https://doi.org/10.1242/jcs.102.3.581>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sharma, P., Oey, I., Bremer, P., & Everett, D. W. (2014). Reduction of bacterial counts and inactivation of enzymes in bovine whole milk using pulsed electric fields. *International Dairy Journal*, 39(1), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.06.003>
- Shi, H., Cooper, B., Stroshine, R. L., & Keener, K. (2017). Aflatoxin decontamination in food systems using high-voltage atmospheric cold plasma: Structural modification of aflatoxin molecules and degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(30), 6222–6230. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01604>
- Stratakos, A. C., Inguglia, E. S., Linton, M., Tollerton, J., Murphy, L., Corcionivoschi, N., Koidis, A., & Tiwari, B. K. (2019). Effect of high-pressure processing on the safety, shelf life and quality of raw milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.009>
- Wong, C. C. Y., Rode, N., Melaine, F., Campbell, G. M., & Lee, J. (2023). Enhancement of sonochemical production of hydroxyl radicals from pulsed cylindrically converging ultrasound waves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 99, 106559. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106559>
- Wu, K., Jia, S., Zhang, J., Zhang, C., Wang, S., Rajput, S. A., Sun, L., & Qi, D. (2021). Transcriptomics and flow cytometry reveals the cytotoxicity of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in bovine mammary epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111823. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111823>

Zhang, J., Zheng, N., Liu, J., Li, F. D., Li, S. L., & Wang, J. Q. (2015). Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.020>

CONCLUSIONES GENERALES

La presente investigación abordó de manera integral la problemática asociada a la presencia de AFM1 en leche de vaca comercial en México, evaluando su concentración, riesgo toxicológico, comportamiento durante la digestión gastrointestinal simulada y estrategias para su reducción mediante tecnologías emergentes. A través de los tres artículos científicos publicados, se estableció un marco analítico robusto que permitió comprender la magnitud del riesgo de la toxina y la eficacia de la TUS como posible herramienta en la modificación del potencial tóxico.

En conjunto, los resultados demostraron que la TUS puede modificar la AFM1, pero también debe validarse con evidencia biológica antes de interpretarse como una disminución real de su potencial tóxico. Bajo esta perspectiva, el principal aporte científico del proyecto radica en haber establecido un marco experimental integral para el estudio de la AFM1, capaz de aplicarse en leche comercial, su riesgo potencial, su comportamiento digestivo, su transformación estructural por TUS y su respuesta celular intestinal en una misma lógica de evaluación. Finalmente, los hallazgos obtenidos sustentan la necesidad de validar las condiciones más prometedoras de TUS en leche real y en derivados lácteos, compararlas con tratamientos térmicos convencionales y profundizar en la identificación estructural y la evaluación toxicológica de los productos de transformación antes de proponer esta tecnología como una estrategia segura y eficaz para la mitigación de la AFM1.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una base sólida para el desarrollo de estrategias de modificación de AFM1 mediante TUS y abren varias líneas de investigación complementarias. En primer lugar, resulta prioritario realizar una comparación sistemática de la ventana operativa de TUS identificada en este estudio con los procesos térmicos convencionales utilizados en la industria láctea, tales como la pasteurización y UHT. Una comparación directa entre TUS y estos procesos, en términos de conservación de la calidad fisicoquímica y preservación de la bioactividad de componentes sensibles, posibilitaría posicionar la TUS como una alternativa tecnológica viable (siempre y cuando se analicen bien sus efectos citotóxicos) y cuantificar sus ventajas y limitaciones en comparación con las tecnologías de referencia.

En segundo lugar, la validación en matrices reales constituye un paso imprescindible. El presente estudio utilizó sistemas modelo basados en AFM1 en soluciones amortiguadoras y en condiciones controladas, lo que permitió aislar el efecto de la TUS y caracterizar los cambios estructurales y citotóxicos. Sin embargo, la AFM1 se encuentra, en la práctica, unida a proteínas lácteas y distribuida en una matriz compleja de grasa, lactosa y minerales. La aplicación de TUS en leche cruda y en leche procesada, así como en derivados lácteos de alto consumo, permitirá evaluar la eficacia del potencial tóxico en condiciones tecnológicamente relevantes y analizar posibles efectos sobre la funcionalidad proteica, la estabilidad de la emulsión y la retención de nutrientes.

Una tercera línea de trabajo esencial consiste en integrar la modificación del potencial tóxico mediante la TUS con la evaluación sensorial y tecnológica de los productos tratados bajo las condiciones más favorables en la viabilidad celular. La aceptación del consumidor no solo depende de la inocuidad, sino también de atributos como el sabor, el aroma, la textura y la apariencia. La incorporación de paneles sensoriales entrenados y de pruebas de aceptación con consumidores, junto con parámetros tecnológicos (estabilidad durante el almacenamiento, comportamiento en procesos posteriores tales como la fermentación o la elaboración de queso), permitirá determinar si las condiciones óptimas de la TUS para reducir el riesgo toxicológico son compatibles con la calidad sensorial y tecno funcional requerida por la industria.

Desde una perspectiva mecanicista, también se propone, como línea futura, profundizar en la relación entre los productos de degradación y la toxicidad residual. La caracterización realizada mediante espectroscopía y espectrometría de masas sugiere rutas específicas de transformación del núcleo difurano–lactónico de la AFM1 junto con técnicas de aislamiento preparativo que permitan concentrar las fracciones mayoritarias y someterlas a estudios de resonancia magnética nuclear. Esta aproximación integradora permitiría confirmar las estructuras propuestas, diferenciar productos verdaderamente detoxificados de intermediarios potencialmente reactivos y vincular cada perfil estructural con la respuesta observada en los modelos celulares.

Otra línea de investigación relevante consiste en vincular el efecto de la TUS sobre AFM1 con parámetros avanzados de integridad de la barrera intestinal. El empleo de modelos epiteliales más complejos (cocultivos, monocapas con TEER monitorizada) y la inclusión de marcadores de unión estrecha, estrés oxidativo, inflamación y daño genético permitirá traducir con mayor precisión los hallazgos *in vitro* a escenarios fisiológicamente relevantes. En paralelo, la caracterización de la solución de AFM1 en PBS, incluyendo la cuantificación de H₂O₂, el pH, la conductividad y otros indicadores de sonólisis del medio, ayudará a discriminar entre los efectos atribuibles a los productos de degradación de AFM1 y aquellos relacionados con la matriz sonoprocesada.

Finalmente, el escalamiento de esta tecnología a condiciones de planta piloto o industrial amplía las oportunidades de investigación adicional. La evaluación de diversas configuraciones de equipos, como sonotrodos de flujo continuo, reactores de mayor volumen, junto con el análisis de costo-beneficio y de huella energética, permitirá determinar la viabilidad real de la TUS como estrategia de control de AFM1 en cadenas lácteas. De este modo, las evidencias generadas en este proyecto pueden aplicarse a propuestas de intervención concretas en salud pública y en la industria alimentaria, con el objetivo de reducir el riesgo toxicológico asociado al consumo crónico de AF, sin comprometer la calidad nutricional y sensorial de los productos lácteos.