

# REPORTE DE ANÁLISIS CUANTITATIVO DE AFLATOXINAS POR EL MÉTODO ELISA EN MUESTRAS DE MATERIAS PRIMAS DE ALIMENTO BALANCEADO PARA AVES PROVENIENTES DE UNA PLANTA UBICADA EN EL MUNICIPIO MARA DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Report of Quantitative Analysis of Aflatoxins by ELISA Method in Raw Ingredients  
Samples of Balanced Feed for Poultry from a Factory located at Mara Municipality  
of Zulia State, Venezuela

Guillermo Fernández-Surumay<sup>1</sup>, Gilberto Negrón-González<sup>1</sup>, Gerardo Isea-Fernández<sup>1</sup> y Egar Sánchez-Camarillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Farmacología y Toxicología. <sup>2</sup>Unidad de Apoyo Bioestadístico a la Investigación, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela. E-mail: gefs@hotmail.com

## RESUMEN

La Aflatoxina, metabolito secundario de varias especies del hongo *Aspergillus*, (principalmente *Aspergillus flavus*) puede ocasionar una gran variedad de efectos adversos en las explotaciones avícolas, que pudieran ir desde disminución en la producción de huevos y retardo en el crecimiento de pollos, hasta incremento de mortalidad en aves adultas. La presencia de esta toxina ha sido reportada en múltiples ocasiones, en una gran variedad de granos, tejidos orgánicos y fluidos animales, utilizando métodos cromatográficos e inmunoquímicos, entre otros. En este trabajo se utilizó como método de determinación el test de ELISA con un detector espectrofotométrico (*Stat Fax EIA Reader*), a una longitud de onda de 650 nm, con el cual se analizaron cuarenta muestras, previamente extraídas con alcohol metílico. Se realizó un muestreo de cinco diferentes materias primas utilizadas en la producción de un alimento balanceado para aves, elaborado en un fábrica ubicada en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. De las cuarenta pruebas realizadas, 17 resultaron positivas a la presencia de aflatoxina, en cantidades variables, siendo la harina de maíz la de mayor concentración ( $\bar{X} = 34,1$  ppb). El contenido de la biotoxina en las restantes muestras fue notablemente menor (maíz amarillo molido:  $\bar{X} = 0,98$  ppb; harina de soya:  $\bar{X} = 2$  ppb; sorgo molido:  $\bar{X} = 0,25$  ppb y afrechillo de trigo:  $\bar{X} = 0,0$  ppb).

**Palabras clave:** Aflatoxina, alimento balanceado, aves, ELISA.

## ABSTRACT

Aflatoxin is a secondary metabolite of several species of fungus, like *Aspergillus flavus* mainly. It can produce many adverse effects. These effects range from a decrease of egg production, growth depression in broilers, and an increase of mortality in adult birds. The presence of this toxin has been detected in several grains, organic tissues and animal fluids using chromatographic and immunochemical methods. For this study was used the ELISA test with a spectrophotometer at 650 nm as the determination method. Forty samples, treated with methilic alcohol were analyzed. Five different raw ingredients used in the production of concentrate feed for poultry were sampled, elaborated in a factory located at Mara municipality of Zulia state. Seventeen of analyzed samples resulted positive for aflatoxin in variable amounts. The corn flour resulted with the highest values ( $\bar{X} = 34.1$  ppb). The aflatoxin content of the rest of the samples was significantly lower (milled yellow corn:  $\bar{X} = 0.98$  ppb, soy flour:  $\bar{X} = 2$  ppb, milled sorghum:  $\bar{X} = 0.25$  ppb and wheat bran:  $\bar{X} = 0.0$  ppb).

**Key words:** Aflatoxin, concentrate feed, poultry, ELISA.

## INTRODUCCIÓN

La aflatoxina es una biotoxina resultante del metabolismo secundario del hongo *Aspergillus flavus* [7]. En la actualidad se sabe que ella puede ser producida por otras especies del género *Aspergillus*, tales como *A. parasiticus* y *A. nomius*;

y que pueden estar constituida por una mezcla de compuestos estrechamente relacionados entre sí, como las denominadas aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>. Las letras B y G hacen referencia a fluorescencia azul (Blue) y verde (Green) en las hojas cromatográficas, mientras que la M se refiere a la leche (Milk) como fuente de los metabolitos de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, siendo la aflatoxina B<sub>1</sub> la más abundante en condiciones naturales, encontrándose principalmente en granos y cereales [2].

Los efectos adversos de las dietas que contienen aflatoxinas, en aves de corral, pueden ir desde daños indetectables hasta reducción en la producción de huevos, pasando por des-capacitación del sistema inmunológico, retardo del crecimiento y aumento de mortalidad en pollos de engorde, con una variada sintomatología que ha sido descrita como "Síndrome de Aflatoxinas" más comúnmente conocido como aflatoxicosis [6].

La humedad contenida en el sustrato, la humedad relativa del ambiente, las temperaturas cálidas y el pH alcalino del medio constituyen factores que favorecen la producción de aflatoxinas en los cereales y sus subproductos [9].

La aflatoxina puede ser detectada en granos, tejidos orgánicos y fluidos animales, utilizando cualquiera de las siguientes técnicas: cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrofotometría de masa (MS), columnas de inmutofinidad (IAC) y el método de ELISA [8].

La mayoría de estos métodos necesitan de un personal altamente entrenado, además de equipos muy sofisticados y laboratorios bien dotados, por lo que en años muy recientes se han desarrollado técnicas más sencillas que requieren de menos infraestructura y de fácil manipulación sin desmedro de la calidad de análisis [15]. Los métodos inmunoquímicos, utilizados y recomendados por el Servicio de Inspección Federal para Granos de USA, han sido comercializados amplia y recientemente por su rapidez y sensibilidad, ya que pueden detectarse valores de hasta nanogramos/gramo en 48 minutos [8, 13].

Trabajos recientes han demostrado la presencia de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* en trescientas treinta (330) muestras de alimentos balanceados para pollos en diferentes épocas de los años 1996 y 1997, en algunas zonas de Argentina, predominando las especies *Aspergillus spp.* en un 85% y *Fusarium spp.* en un 70% de las muestras [5].

Un estudio experimental desarrollado en gallinas reproductoras, alimentadas con dietas que contenían aflatoxinas en cantidades de 0; 0,2; 1 y 5 mg/kg, demostró que los huevos fértiles obtenidos de esas unidades experimentales, contenían cantidades que oscilan entre 0,15 y 0,48 mg/g de aflatoxina B<sub>1</sub> y que los niveles de anticuerpos de los grupos que consumieron 1 y 5 mg/kg fueron inferiores a los niveles del grupo control [12].

Otro trabajo experimental que comprueba la excreción de aflatoxina en productos de origen animal, fue llevado a cabo en lotes de cerdos "Large White" en lactación, alimentados diaria-

mente con dietas que contenían aflatoxina. Los resultados demostraron la presencia de aflatoxina en la leche de los grupos experimentales hasta 25 días después del parto [20].

Una investigación desarrollada en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Bogotá, donde se analizaron 129 muestras de varios ingredientes constituyentes de alimentos concentrados para pollos, provenientes de 5 industrias que comercializan el 95% de alimentos para aves en Colombia, arrojó los siguientes resultados: 11 de 45 muestras de sorgo fueron positivas a la presencia de aflatoxinas, mientras que 4 de 33 muestras de maíz, 8 de 22 muestras de arroz, 15 de 17 muestras de semillas de algodón y 1 de 12 muestras de otros componentes resultaron positivas a la presencia de la micotoxina. Nueve de las 58 muestras que resultaron positivas excedieron los niveles máximos permitidos para esta toxina en ese país [3].

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Detectar la presencia de aflatoxinas en 5 materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia.
- Comprobar la efectividad del método espectrofotométrico de ELISA para detectar la presencia de aflatoxinas en muestras de 5 materias primas de alimento balanceado para aves.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Principio de la prueba de Elisa para aflatoxinas

En esta prueba, la aflatoxina B<sub>1</sub> se encuentra conjugada a la enzima "peroxidasa horseradish" y el conjugado "enzima-aflatoxina B<sub>1</sub>" es utilizado como el antígeno conocido. Los micropozos de la prueba de Elisa están revestidos por anticuerpos específicos para aflatoxinas, que son separadas de la muestra problema mediante una extracción con solvente orgánico. El extracto obtenido es mezclado con el conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub> y el conjunto resultante se coloca en los pozos revestidos por los anticuerpos específicos para aflatoxinas. Si la muestra problema contiene aflatoxinas contaminantes, éstas, y el conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub>, compiten por los sitios de unión con los anticuerpos específicos para formar el complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se realiza un lavado del exceso de aflatoxinas contaminantes y conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub>, que no se unieron a los anticuerpos. A continuación se añade a cada micropozo el sustrato de la enzima, que se une al conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub>, para desarrollar un color en la solución. La intensidad del color formado depende de la cantidad de conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub> que se encuentre unido a los anticuerpos presentes. Un color oscuro indica la presencia de una menor cantidad de aflatoxinas contaminantes (aflatoxinas libres) en la muestra problema, mientras que, un color más claro indica la presencia de una

mayor cantidad de aflatoxinas libres en la muestra. Después de 2 a 3 minutos, el cambio de color puede ser evaluado visualmente o midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro. Posterior a añadir la solución coloreada finalizadora de la reacción, la intensidad del color puede ser utilizada para indicar el nivel de micotoxina presente en la muestra, comparándola con la intensidad del color obtenida utilizando soluciones standard de aflatoxina B<sub>1</sub> [10].

### Recolección de las muestras

Para realizar la fase experimental del ensayo, se recolectaron en una planta de alimento concentrado para animales, muestras de cinco tipos diferentes de materias primas, utilizadas en la elaboración de alimento para aves, FIG. 1. Dichas materias primas fueron: afrechillo de trigo, harina de maíz, harina de soya, maíz amarillo molido y sorgo molido. Se realizó un muestreo aleatorio en los galpones de la planta, directamente de los depósitos de materia prima, de aproximadamente 500 toneladas cada uno, para asegurar la homogeneidad de las muestras [11]. Se tomaron ocho muestras de cada una de las materias primas, de un peso aproximado de 100 g. Los galpones mantienen una temperatura entre 29 y 30°C, con una humedad relativa promedio de 30% y un tratamiento periódico con insecticidas y fungicidas. Las muestras se envasaron en bolsas de plástico y se trasladaron al Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, para ser sometidas a la determinación de aflatoxinas.

### Extracción de las aflatoxinas libres

Para realizar la determinación de las aflatoxinas contaminantes presentes en las muestras problema, se realizó ini-

cialmente una extracción alcohólica. Una porción de 50 g de cada una de las muestras se colocó, junto a 250 ml de metanol al 70%, en una licuadora y el conjunto se mezcló a alta velocidad durante 3 minutos [8]. A continuación, la mezcla se filtró a través de papel Whatman No. 1, obteniéndose aproximadamente 150 ml de filtrado para cada muestra.

### Determinación de aflatoxinas

Una vez obtenido el extracto metanólico de las muestras, se procedió a realizar la prueba de Elisa para determinar la concentración de aflatoxinas presentes en cada una de las muestras de materia prima, tal como se describe a continuación: utilizando una pipeta automática, se colocaron 100 µL del conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub> en cada uno de los micropozos de mezclado del test, tanto en los destinados a los controles de aflatoxina como en los de las muestras problema. Luego, utilizando la misma pipeta, se transfirieron 100 µL de los controles y de las muestras a los micropozos de mezclado correspondientes. A continuación, mediante una pipeta automática de 12 canales, realizando un movimiento de rotación, se mezcló el contenido de los micropozos de mezclado y se absorbió y decantó ese contenido en los micropozos tres veces, tratando de asegurar la unión del conjugado enzima-aflatoxina B<sub>1</sub> con las muestras problema. Una vez realizado esto, se transfirieron 100 µL de la mezcla hacia los micropozos revestidos por anticuerpos, deslizando hacia atrás y hacia delante el porta-micropozos sobre una superficie plana, incubándolos por dos minutos a temperatura ambiente.

Inmediatamente, se procedió a realizar una serie de cinco lavados de los micropozos con agua deionizada. El remanente de agua que pudiera quedar en los micropozos fue eli-



FIGURA 1. DEPÓSITO DE MATERIA PRIMA DE DONDE SE RECOLECTARON LAS MUESTRAS.

minado golpeando suavemente y varias veces el porta-micropozos contra un trozo de papel absorbente colocado en la mesa de trabajo, dejándolo escurrir boca abajo hasta sequedad. Luego, se agregaron 100  $\mu$ L de substrato a cada uno de los micropozos, se mezclaron e incubaron por tres minutos. Seguido a esto, se agregaron 100  $\mu$ L de solución finalizadora de la reacción a cada uno de los micropozos, mezclándolos adecuadamente. Por último, se limpió con papel absorbente el fondo de cada uno de los micropozos por su cara externa, es decir, por la cara que queda expuesta al lector de absorbancia, y se leyeron en un espectrofotómetro (*Stat Fax EIA Reader*) a una longitud de onda de 650 nm, obteniéndose inmediatamente la lectura de absorbancia y concentración de aflatoxinas, para cada una de las muestras [10].

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los valores correspondientes a la concentración de aflatoxinas para cada materia prima se realizó mediante el paquete estadístico computarizado S.A.S. (Statistical Analysis System) [21], realizando una comparación entre las medias, utilizando las pruebas de Análisis de Varianza y Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente reporte se presentan en la TABLA I.

Tal como se observa en la FIG. 2, de las cinco materias primas utilizadas para la elaboración del alimento comercial para aves, cuatro contenían cantidades variables de aflatoxinas, siendo la harina de maíz con un promedio de 34,1 ppb, la muestra que resultó con cantidades más elevadas; este valor se encuentra por encima de los niveles máximos permitidos (20 ppb) en Venezuela y otros países [14, 15]. La prueba de Tukey determinó que la única media estadísticamente diferente a las demás, fue la de la harina de

maíz, ya que el resto de las medias se comportaron igual entre sí. El contenido promedio de aflatoxinas para el resto de las muestras analizadas fue significativamente menor: 0,98 ppb para el maíz amarillo molido, 2 ppb para la harina de soya, 0,25 ppb para el sorgo molido y 0 ppb para el afrechillo de trigo. Estos resultados evidencian la alta susceptibilidad de la harina de maíz a la contaminación por aflatoxina, tal como lo reportan otros autores en sus trabajos de investigación en el maíz y sus subproductos [5, 9, 16, 19].

De las 40 muestras analizadas, 17 resultaron positivas a la presencia de aflatoxinas, lo que corresponde al 43% del total de muestras analizadas. Estos valores son similares a los reportados por otros investigadores en el área de la nutrición avícola a nivel mundial [1, 2, 4, 14, 17, 18].

Todas las muestras de harina de maíz evidenciaron la presencia de aflatoxinas, mientras que el resto de las muestras analizadas mostró el siguiente resultado: harina de soya: 5 muestras positivas, maíz amarillo molido: 3 muestras positivas y sorgo molido: 1 muestra positiva. Esto se corresponde a lo señalado por varios autores que citan al maíz como la materia prima para alimento concentrado, más susceptible de contaminación por aflatoxinas [1, 9, 12, 14, 20, 22].

## CONCLUSIONES

De las 5 materias primas analizadas, la harina de maíz presentó los mas altos niveles de aflatoxinas, siendo todos sus valores superiores a los permitidos en Venezuela (20 ppb).

La determinación de aflatoxinas por el método espectrofotométrico de ELISA resultó ser una técnica eficaz para la cuantificación de estas toxinas en materias primas para alimento balanceado, por su gran rapidez y sensibilidad, habiendo sido capaz de detectar cantidades que oscilaron entre un nivel máximo de 44,07 ppb para la harina de maíz y un mínimo de 0,26 ppb para el maíz amarillo molido.

TABLA I  
NIVELES DE AFLATOXINA EN 5 MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA FABRICACIÓN DE ALIMENTO BALANCEADO PARA AVES EN EL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Materia Prima	N° de muestras analizadas	N° de muestras positivas a la presencia de aflatoxinas	Frecuencia relativa	Lectura de absorbancia		ppb ( $\mu$ g/kg)	
				Media	Rango	Media	Rango
Afrechillo de Trigo	8	0	0	1,470	1,353 - 1,691	0	--
Harina de Maíz	8	8	100	0,561	0,492 - 0,635	34,1a	24,2 - 44,07
Harina de Soya	8	5	62,5	1,199	0,996 - 1,496	2b	0 - 4,6
Maíz Amarillo Molido	8	3	37,5	1,280	0,956 - 1,545	0,98b	0 - 5,7
Sorgo Molido	8	1	12,5	1,303	0,752 - 1,778	0,25b	0 - 2

a,b (P<0,05).

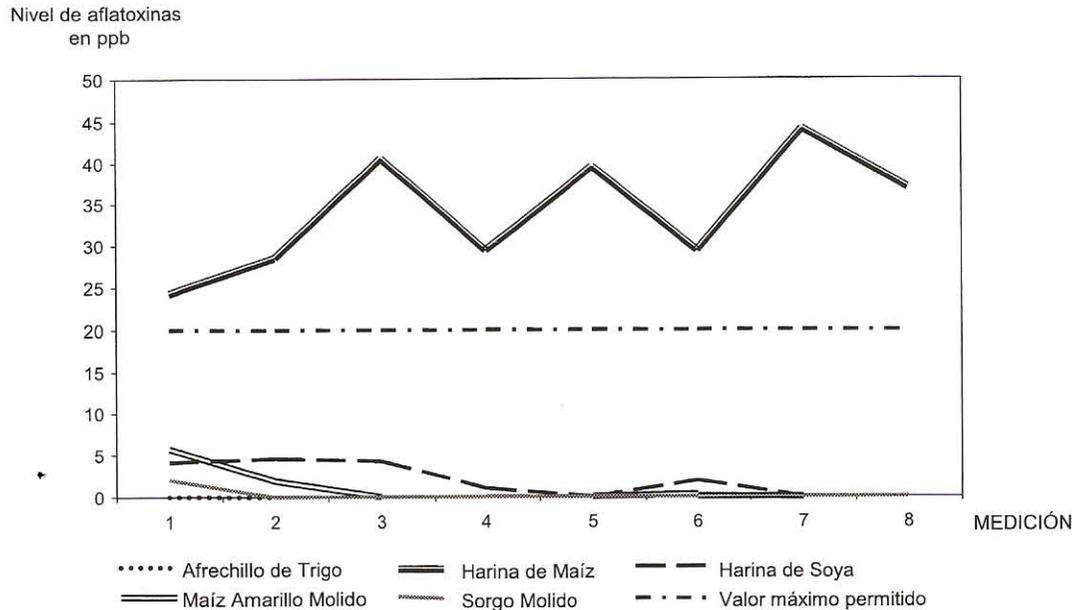


FIGURA 2. NIVELES DE AFLATOXINAS ENCONTRADOS EN LAS 5 MATERIAS PRIMAS ESTUDIADAS

## RECOMENDACIONES

Se sugiere la divulgación de material informativo a las empresas productoras de alimento concentrado, referente al potencial tóxico de las aflatoxinas en productos de consumo animal, así como sobre sus medidas de control y prevención. Igualmente se recomienda establecer la cuantificación de los niveles de aflatoxinas como una práctica de rutina en estas empresas, medida indispensable para el control de calidad del producto. Finalmente, se sugiere a los organismos gubernamentales encargados del control sanitario de productos de origen y consumo animal, y a las instituciones dedicadas a la investigación en el área, desarrollar proyectos de investigación que contemplen evaluaciones constantes de los niveles de aflatoxinas en todos aquellos productos susceptibles de contaminación con estas toxinas.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su sincero agradecimiento a la División de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ, a la Corporación Droguería Veterinaria C.A. (Corpodroveca) y a Granjas Avícolas Vilva S.A., por el apoyo recibido para la realización de este estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALI, N.; SARDJONO; YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and Fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Addit. Contam.** 15(4):377-384. 1998.
- [2] BUCK, W.; OSWEILER, G. Aflatoxina. **Toxicología Veterinaria Clínica y Diagnóstica**. Editorial Acribia. 2<sup>da</sup> Edición. Madrid, España: 325. 1990.
- [3] CÉSPEDES, E.; DÍAZ, G. Analysis of Aflatoxins in Poultry and Pig Feeds and Feedstuffs Used in Colombia. **J. AOAC Int.** 80(6):1215-1219. 1997.
- [4] DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxinivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia.** 137:179-184. 1997.
- [5] DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia.** 141:37-43. 1998.
- [6] DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B.; MORTON, M. Immunosuppression in poultry caused by aflatoxins and its alleviation by *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc<sup>1026</sup>) and mannanoligosaccharides (Mycosorb). **Biotechnology in the Feed Industry**. Nottingham University Press. Nottingham, United Kingdom: 205-215. 1997.
- [7] HUMPHREYS, D. Hepatotoxinas. **Toxicología Veterinaria**. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 3<sup>ra</sup> Edición. Madrid, España: 295. 1990.
- [8] LAREZ, A. Extracción General de Muestras Biológicas. **Compendio de Análisis Quimiotóxico en Emergencias Asistenciales**. Tipografía Stockprint. Caracas, Venezuela: 63. 1985.
- [9] NEPOTE, M.; PIONTELLI, E.; SAUBOIS, A. Occurrence of *Aspergillus flavus* strains and aflatoxins in corn from

- Santa Fe, Argentina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. 47(3):262-264. 1997.
- [10] PARK, D. L.; MILLER, B. M.; NESHEIM, S.; TRUCKSESS, M. W.; VEKICH, A.; BIDIGARE, B.; MCVEY, J. L.; BROWN, L. H. Visual and Semiquantitative Spectrophotometric ELISA Screening Method for Aflatoxin B<sub>1</sub> in Corn and Peanut Products: Follow-up Collaborative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 72(4):638-643. 1989.
- [11] PARK, D. L.; POHLAND, A. E. Sampling and Sample Preparation for Detection and Quantitation of Natural Toxicants in Food and Feed. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 72(3):399-404. 1989.
- [12] QURESHI, M.; BRAKE, P.; HAMILTON, W.; HAGLER, JR.; NESHEIM, S. Dietary Exposure of Broiler Breeders to Aflatoxin Results in Immune Dysfunction in Progeny Chicks. **Poultry Sci.** 77:812-819. 1998.
- [13] RICHARD, J.; BENNETT, A.; ROSS, P.; NELSON, P. Analysis of Naturally Occurring Mycotoxins in Feedstuffs and Food. **J. Anim. Sci.** 71:2536-2574. 1993.
- [14] SABINO, M.; PRADO, G.; IKEJIRI, I.; DE OLIVEIRA, M.; BALEIRO, R. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Addit. Contam.** 6(3):327-331. 1989.
- [15] SASHIDAR, R. Dip-Strip Method for Monitoring Environmental Contamination of Aflatoxin in Food and Feed: Use of a Portable Aflatoxin Detection Kit. **Environmental Health Perspectives Supplements**. 101(3):43-46. 1993.
- [16] SCUDAMORE, K.; HETMANSKI, M.; NAWAS, S.; NAYLOR, J.; RAINBIRD, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Addit Contam.** 14(2):175-186. 1997.
- [17] SCUDAMORE, K.; HETMANSKI, M.; CHANG, H.; COLLINS, S. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1.992. **Food Addit Contam.** 14(2):157-173. 1997.
- [18] SCUDAMORE, K.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M.; RAINBIRD, S. Mycotoxins in ingredients of animal stuffs: III. Determination of mycotoxins in rice bran. **Food Addit Contam.** 15(2):185-194. 1998.
- [19] SCUDAMORE, K.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addit Contam.** 15(1):30-55. 1998.
- [20] SILVOTTI, L.; PETERINO, C.; CABASSI, E. Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins. **Vet Rec.** 141:469-472. 1997.
- [21] STATISCAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT™ Guide for Personal Computers**. Version 6 Edition. Cary, NC. 378 pp. 1985.
- [22] TORRES, E.; ASKAR, K.; TORRES, L.; OLVERA, R.; CASTRELLÓN, J. Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. **Food Addit Contam.** 12(3):387-393. 1995.