

## Eficacia y estabilidad del proceso de amonificación como tecnología de descontaminación de aflatoxina B<sub>1</sub> en arroz (*Oriza sativa*)

Félix Rafael Millán Trujillo y Amaury José Martínez Yépez

Universidad Simón Bolívar, Universidad Central de Venezuela – Caracas, Venezuela

**RESUMEN.** El arroz es un cereal utilizado en Venezuela para la nutrición humana y animal, susceptible a la contaminación con aflatoxinas en el campo y durante el almacenamiento en silos. En tal sentido, la investigación tuvo por finalidad evaluar la eficacia y reversibilidad del proceso de amonificación, en las modalidades de alta presión/alta temperatura (AP/AT) y presión atmosférica/temperatura moderada (PA/TM) en muestras de arroz contaminadas con aflatoxina B<sub>1</sub>. Para ello se construyó un diseño 2<sup>2</sup> considerado como variables de temperatura, humedad y el tiempo de proceso. En sus dos modalidades, el proceso permitió la reducción de la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> en un rango entre 90% y 100%. Se observó además la reversión de la toxina en un rango entre 0% y 19% luego de la simulación *in vitro* de la digestión estomacal. La eficacia y permanencia del proceso estuvo determinada por la utilización de altas temperaturas y largo tiempo de exposición en las modalidades AP/AT y PA/TM, respectivamente.

**Palabras clave:** Aflatoxina B<sub>1</sub>, descontaminación, amonificación, arroz.

**SUMMARY.** Efficacy and stability of ammoniation process as aflatoxin B<sub>1</sub> decontamination technology in rice (*Oriza sativa*). Rice, a cereal widely used in Venezuela for human and animal nutrition, is susceptible to aflatoxin contamination in the field and during storage. Therefore, the goal of this research was the evaluation of the efficacy and permanence of the ammoniation process through high pressure/high temperature (HP/HT) and atmospheric pressure/moderate temperature (AP/MT) conditions applied to rice samples artificially contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub>. For this purpose a 2<sup>2</sup> design was drawn up considering the temperature, the rice moisture and the process time as variables. Under both sets of conditions, aflatoxin B<sub>1</sub> concentration was reduced in a range of 90% to 100%. After *in vitro* stomach digestion simulation, toxin reversion ranged from 0% to 19%. In conclusion, the process efficacy and permanence were achieved through the use of high temperature and long process time for both sets of conditions (HP/HT and AP/MT), respectively.

**Key words:** Aflatoxin B<sub>1</sub>, decontamination, ammoniation, rice.

### INTRODUCCION

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por los mohos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, los cuales pueden colonizar diversos productos agrícolas tales como el maíz, arroz, algodón, sorgo y maní, tanto en el campo como durante el almacenamiento postcosecha (1-3).

Entre las micotoxinas, aflatoxina B<sub>1</sub> es especialmente importante en la producción agropecuaria, debido a su efecto mutagénico y hepatotóxico en diversos animales, lo cual sugiere a su vez un peligro potencial para el hombre (4).

La activación de la molécula original por el sistema oxidasa citocromo P-450 a 8,9 epoxi-aflatoxina B<sub>1</sub>, es un proceso que desencadena una serie de mecanismos bioquímicos tales como la disminución del transporte de glucosa al interior de las células hepáticas y el aumento de la síntesis celular de lípidos, ocasionando, en especies animales como ratas, monos, truchas y pollos, la aparición de hígado graso, el cual puede posteriormente dar origen a

procesos necróticos y a la formación del tejido cicatrizal que caracteriza a la cirrosis hepática. Además, la forma activa de la aflatoxina B<sub>1</sub> también es capaz de interactuar e inducir mutaciones en genes como el antioncogen P-53, el cual codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína P-53, la cual está involucrada en la regulación del crecimiento de las células hepáticas. En tal sentido, una proteína P-53 mutante es incapaz de controlar adecuadamente el crecimiento de los hepatocitos, ocasionando un crecimiento celular con características neoplásicas (5-11).

Los procesos bioquímicos descritos pueden afectar diversas especies animales (pollos, truchas, ganado bovino y porcino) a través de la ingestión de materias primas contaminadas. Ello constituye un riesgo para la salud humana debido a la producción de alimentos de origen animal y potencialmente contaminados con aflatoxinas. Además, existe un riesgo económico debido a posibles pérdidas y a la reducción de la productividad, derivados de la enfermedad y muerte de las especies de cría (3,6,12).

A fin de minimizar los riesgos, que para la salud humana y animal representará el procesamiento y consumo de materias primas agrícolas contaminadas con aflatoxina B<sub>1</sub>, se ha desarrollado una serie de tecnologías basadas en métodos físicos, químicos y biológicos, orientadas a la disminución de micotoxinas en productos agrícolas (13).

Un método químico como la amonificación, el cual reduce la toxicidad de aflatoxina B<sub>1</sub> mediante su conversión en aflatoxina D<sub>1</sub>, la cual es alrededor de cuatrocientas veces menos tóxica que aflatoxina B<sub>1</sub>, ha sido utilizada con éxito para la reducción de la micotoxina en maíz, maní y algodón, aún cuando la eventual reversión de la toxina en condiciones similares al ambiente estomacal, considerando que la amonificación es un proceso que se verifica bajo condiciones de alcalinidad, no se ha estudiado bajo diversidad de condiciones (13,14).

En Venezuela, el arroz es un cultivo agrícola que constituye una fuente importante de energía tanto en la alimentación humana como animal (354 Kcal/100 g., 8,5% de proteína, 1,5% de grasas totales y 80.3% y 76.7% de carbohidratos totales y disponibles, respectivamente), exhibiendo, para el año 1999, un consumo aparente de 357440 toneladas métricas anuales en el renglón de arroz pulido para el consumo humano y de 69697 toneladas métricas anuales en el renglón de salvado y germen destinado al consumo animal (15,16).

En tal sentido, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficacia del proceso de amonificación en un cultivo agrícola de amplio consumo humano y animal en Venezuela como lo es el arroz, mediante la aplicación de dos modalidades de proceso: alta presión/alta temperatura (AP/AT) y presión atmosférica/temperatura (PA/TM). Además, se estudió la posibilidad del proceso mediante la simulación *in vitro* de la digestión gástrica, a fin de establecer las condiciones que garantizan la estabilidad de la técnica de amonificación.

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación de las muestras

Las muestras de arroz integral (*Oriza sativa*), fueron obtenidas de un establecimiento comercial de la localidad, a fin de conformar un lote de producto. El lote se sometió a un proceso de molienda mediante un molino de martillo "Royal Triumph" y posterior cribado a través de un tamiz con abertura de malla de 20 mesh. Seguidamente, se tomaron tres muestras aleatorias para la determinación del contenido de humedad mediante gravimetría indirecta (17). Por último, el lote de arroz cargo molido se dividió en dos sub-lotes, los cuales se contaminaron intencionalmente con 20 ng/g y 200 ng/g de aflatoxina B<sub>1</sub> ("Sigma Chemical Company", USA), respectivamente. Cada lote se sometió a una operación de

mezclado mecánico mediante una mezcladora Hobart (modelo KS-A) durante 45 minutos, para asegurar la distribución homogénea de la toxina en el lote. De cada sub-lote, se tomaron aleatoriamente muestras analíticas de 50 g., con las cuales se desarrollaron los tratamientos contemplados en el diseño experimental contenido en las Tablas 1 y 2.

### Diseño experimental del proceso de amonificación

Se aplicaron dos modalidades del proceso de amonificación: alta presión/alta temperatura (AP/AT) y presión atmosférica/temperatura moderada (PA/TM), en muestras aleatorias de 50 g. De arroz contaminado con 20 ng/g y 200 ng/g de aflatoxina B<sub>1</sub> (ver preparación de las muestras), contenidas en Erlenmeyers de 500 ml. Para ello, se desarrollaron sendos diseños multifactoriales 2<sup>k</sup>, considerando como variables de operación la concentración de hidróxido de amonio ("Sigma Chemical Company", USA), humedad del arroz, tiempo de proceso y temperatura, en la modalidad AP/AT y la concentración de hidróxido de amonio, humedad del arroz y tiempo de proceso en la modalidad PA/TM (Tablas 1 y 2). Para el desarrollo del proceso de amonificación en la primera modalidad, se utilizó una retorta a escala de planta piloto para el tratamiento de las muestras y en la segunda modalidad se utilizó un cuarto con temperatura controlada en 35°C. Se efectuaron cuatro réplicas de los tratamientos contemplados en los diseños, dos para evaluar la eficacia del proceso y dos para el estudio de la reversibilidad bajo condiciones de simulación *in vitro* de la digestión estomacal. La eficacia se expresó como porcentaje de toxina inactivada (tomando como referencia el nivel de contaminación del sub-lote respectivo), luego del proceso de amonificación.

### Reversibilidad del proceso de amonificación

Luego de someter las muestras de arroz contaminadas, a los diferentes tratamientos de amonificación contemplados en los diseños experimentales, para las dos modalidades de proceso estudiadas, se utilizaron dos réplicas de cada tratamiento para evaluar la reversibilidad del proceso de amonificación. Para ello, las muestras procesadas se colocaron en una campana de extracción durante 30 min para permitir que el amoníaco se volatilizara. Luego, se mezclaron con 40 ml de ácido clorhídrico 0,2 N ("Sigma Chemical Company", USA) y se colocaron en un baño de agua con agitación a 37°C ± 1°C durante 2 horas (18,19). Posteriormente, se determinó la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> y se expresó el porcentaje de reversibilidad tomando como referencia la concentración final de aflatoxina B<sub>1</sub> en las muestras sometidas al proceso de amonificación.

TABLA 1

Concentración residual de aflatoxina B<sub>1</sub>, luego del proceso de amonificación y evaluación de la reversibilidad, en muestras de arroz cargo tratadas bajo la modalidad de alta presión y alta temperatura, para un nivel de contaminación inicial de 200 ng/g de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Tratamiento	Variables del proceso			Temperatura (°C)	Amonificación		Simulación de digestión gástrica	
	Amoníaco (%)	Humedad (%)	Tiempo (min)		Aflatoxina B <sub>1</sub> (ng/g)	Reducción (%)	Aflatoxina B <sub>1</sub> (ng/g)	Revisión (%)
(1)	1	16.6	20	105	10	95	40	15
a	2	16.6	20	105	2	99	20	9
b	1	18.6	20	105	2	99	40	19
ab	2	18.6	20	105	2	99	10	4
c	1	16.6	40	105	2	99	40	19
ac	2	16.6	40	105	ND	100	5	2.5
bc	1	18.6	40	105	2	99	10	4
abc	2	18.6	40	105	ND	100	10	5
d	1	16.6	20	121	ND	100	2.5	1.25
ad	2	16.6	20	121	ND	100	2	1
bd	1	18.6	20	121	ND	100	2	1
abd	2	18.6	20	121	ND	100	2	1
cd	1	16.6	40	121	ND	100	ND	ND
acd	2	16.6	40	121	ND	100	ND	ND
bcd	1	18.6	40	121	ND	100	ND	ND
abcd	2	18.6	40	121	ND	100	ND	ND

ND: Concentración no detectada en la cromatografía de capa fina (menor de 1 ng/g).

Los valores reportados constituyen el promedio de dos réplicas del diseño.

TABLA 2

Concentración residual de aflatoxina B<sub>1</sub>, luego del proceso de amonificación y evaluación de la reversibilidad, en muestras de arroz cargo tratadas bajo la modalidad de presión atmosférica y temperatura moderada, para un nivel de contaminación inicial de 200 ng/g de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Tratamiento	Variables del proceso			Tiempo (Hr)	Amonificación		Simulación de digestión gástrica	
	Amoníaco (%)	Humedad (%)	Aflatoxina B <sub>1</sub> (ng/g)		Reducción (%)	Aflatoxina B <sub>1</sub> (ng/g)	Revisión (%)	
(1)	1	16.6	1	20	90	40	10	
a	2	16.6	1	5	97.5	10	2.5	
b	1	18.6	1	5	97.5	20	7.5	
ab	2	18.6	1	5	97.5	10	2.5	
c	1	16.6	2	10	95	20	5	
ac	2	16.6	2	ND	100	2	1	
bc	1	18.6	2	5	97.5	5	ND	
abc	2	18.6	2	ND	100	ND	ND	

ND: Concentración no detectada en la cromatografía de capa fina (menor de 1 ng/g).

Los valores reportados constituyen el promedio de dos réplicas del diseño.

### Determinación de aflatoxina B<sub>1</sub>

La determinación de aflatoxina B<sub>1</sub> se realizó mediante cromatografía de capa fina, de acuerdo a la metodología de Trucksess y colaboradores (20). La confirmación de toxina se hizo mediante derivatización de la molécula con ácido trifluoroacético (21). Mediante pruebas preliminares, se evaluó la capacidad de recuperación de la metodología de determinación de aflatoxina B<sub>1</sub> en arroz, de cuyo ensayo se construyó la ecuación  $y = 0,0059 x^2 - 0,215 x + 4,7885$  (y representa la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> recuperada por la metodología de Trucksess y colaboradores, y x representa la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> inoculada en las muestras del estudio de recuperación). La ecuación, cuyo ajuste permitió predecir la variabilidad experimental en un 99,85% ( $R^2 = 0,9985$ ), hizo posible la predicción de concentraciones de la toxina suficientemente aproximadas a la realidad, a partir de las concentraciones obtenidas en la metodología de recuperación.

### Análisis estadístico

El desarrollo del diseño experimental, el establecimiento del orden aleatorio de corrida de los tratamientos y el análisis de efectos significativos, se hizo con el programa estadístico "Design Ease" ("Stat-Ease Incorporated", USA), (22).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para un nivel de contaminación de 20 ng/g de aflatoxina B<sub>1</sub> en las muestras de arroz integral molido, no se detectó la presencia de la micotoxina en la cromatografía de capa fina, luego de aplicar el proceso de amonificación, en las dos modalidades consideradas en la investigación. De igual forma, tampoco se detectó la presencia de la toxina, en las dos modalidades, después de la simulación *in vitro* de la digestión gástrica de las muestras previamente descontaminadas, evidenciándose la eficacia y permanencia de la técnica en muestras contaminadas con el nivel de alerta sugerido por la FDA (20 ng/g) (13).

Para un nivel de contaminación de 200 ng/g la eficacia y permanencia del proceso de amonificación, estuvo en función de los niveles de los factores considerados en el diseño experimental, para las dos modalidades de proceso.

En la Tabla 1 se observa la concentración residual de aflatoxina B<sub>1</sub> luego del proceso de amonificación en la modalidad AP/AT y después de la simulación *in vitro* de la digestión gástrica. A partir de los datos, el análisis estadístico se orientó a la evaluación de los efectos de los factores principales y sus interacciones, entendiéndose estos como el cambio en la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub>, producida por un cambio de nivel del factor (amoníaco, humedad, tiempo, temperatura), promediado sobre los niveles de los demás factores, para el caso de los efectos principales, y como la

diferencia promedio entre el efecto de un factor en el nivel superior de otro factor y su efecto en el nivel inferior de dicho factor, para la evaluación de las interacciones (22).

En la modalidad AP/AT, los factores amoníaco, tiempo y temperatura y las interacciones amoníaco-temperatura y tiempo-temperatura, resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), y permitieron maximizar la eficacia del proceso, es decir se evidenció un cambio significativo en la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> al pasar del nivel bajo al alto de cada factor. Sin embargo, dado que los factores amoníacos y tiempo resultaron involucrados en sendas interacciones significativas con la temperatura (Tabla 3), sus efectos principales pierden importancia. De hecho, la utilización de cada factor en su nivel superior, maximizó la eficacia de la técnica. Sin embargo, la utilización de altas temperaturas de proceso (121°C), permitió maximizar la eficacia del proceso de amonificación y minimizar la cantidad de toxina revertida a concentraciones no detectables en la cromatografía de capa fina, empleando las variables amoníaco y tiempo en sus niveles bajos. Así, la utilización de 1% de hidróxido de amonio, 16,6% de humedad y 121°C durante un tiempo de exposición de 20 minutos, resultó, en la modalidad AP/AT, una alternativa tecnológica eficaz y estable para la descontaminación del arroz integral contaminado con altas concentraciones de aflatoxina B<sub>1</sub> (200 ng/g).

TABLA 3

Efectos principales e interacciones significativas en la evaluación de la eficacia y permanencia del proceso de amonificación, en las dos modalidades aplicadas, para un nivel de contaminación de 200 ng/g de aflatoxina B<sub>1</sub>

Proceso de amonificación	Condición evaluada	Efecto principal e interacciones
AP/AT	Eficacia del proceso	Amoníaco (A)+ Tiempo (C)* Temperatura (D)* Amoníaco-Temperatura (AD)* Tiempo-Temperatura (CD)*
	Reversibilidad del proceso	Amoníaco (A)* Temperatura (D)* Amoníaco-Temperatura (AD)*
PA/TM	Eficacia del proceso	Amoníaco (A)**
	Reversibilidad del proceso	Amoníaco (A)* Humedad (B)* Tiempo (C)* Amoníaco-Humedad (AB)* Amoníaco-Tiempo (AC)**

\* Efectos estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ )

\*\* Efectos estadísticamente significativos ( $p < 0,10$ )

En la modalidad PA/TM (Tabla 2), se obtuvieron mayores concentraciones residuales de aflatoxina B<sub>1</sub>, al aplicar el proceso de amonificación y después del estudio de reversibilidad, resultando el factor amoníaco, la única variable estadísticamente significativa ( $p < 0,10$ ), en la determinación de la eficacia de la técnica. Sin embargo, tanto el tiempo de proceso como la concentración de humedad del arroz, resultaron de gran importancia para disminuir la cantidad de toxina revertida luego de la simulación de la digestión gástrica. Investigaciones previas han sugerido la importancia de la humedad del cereal para maximizar la difusión del amoníaco acuoso y aumentar la eficacia de la técnica (23,24), lo cual se evidenció en la presente investigación para la modalidad PA/TM. Sin embargo, dado el riesgo microbiológico que representa un elevado contenido de humedad del cereal, es conveniente aplicar la tecnología con bajas concentraciones de humedad. En tal sentido, la utilización de 2% de amoníaco, 16,6% de humedad y 35°C, por un período de 2 horas logró maximizar el proceso de descontaminación y minimizar la cantidad de toxina revertida en la modalidad PA/TM.

En la investigación realizada, se logró demostrar la factibilidad técnica de la utilización del amoníaco acuoso, como tecnología orientada a la descontaminación de lotes de arroz integral contaminados con aflatoxina B<sub>1</sub>, destinadas a la nutrición animal, en donde el arroz se ha utilizado como un sustituto del maíz, trigo o cebada, en Japón, sin afectar la producción avícola. Sin embargo, en la práctica su uso es de sustituto parcial de los cereales ante mencionados, debido a las restricciones que impone el contenido de fibra y sílice de la cáscara, siendo la inclusión de esta última hasta de un 20% en la formulación de alimentos balanceados para animales, sin que se afecte la producción y el tracto digestivo de animales (25).

La modalidad AP/AT se perfila como una tecnología que garantiza cortos tiempos de exposición de la materia prima, pero al mismo tiempo requeriría, a nivel industrial, de la inversión en reactores de amonificación, en tanto que la modalidad PA/TM, constituye una tecnología más económica, dado que no se requiere la utilización de altas temperaturas de proceso, pero que al mismo tiempo requiere del ajuste cuidadoso de las variables de proceso para garantizar un proceso de descontaminación eficaz y permanente (23,24,26,27).

En trabajos previos en maíz, se ha sugerido la posibilidad que el proceso de descontaminación se revirtiera en un ambiente ácido como el imperante en la digestión gástrica, dado que la inactivación de aflatoxina B<sub>1</sub> mediante su conversión en aflatoxina D<sub>1</sub> (400 veces menos tóxica que aflatoxina B<sub>1</sub>), se lleva a cabo en un medio alcalino durante la amonificación (27). Sin embargo, como se demostró en la investigación, la reversibilidad del proceso se verifica solo

bajo ciertas condiciones de proceso, las cuales se lograron ajustar para la aplicación de un proceso eficaz y permanente en el rubro agrícola estudiado.

En conclusión, la amonificación, como técnica de descontaminación, está siendo aplicada en países como los Estados Unidos de Norteamérica, Francia y Suráfrica y su aplicación podría considerarse en Venezuela para la recuperación de lotes de arroz contaminados con aflatoxina B<sub>1</sub>, para su utilización posterior en la alimentación animal, aún cuando es necesario la realización de investigaciones orientadas a descartar la introducción de cambios indeseables en el alimento que puedan alterar la conversión alimento/músculo en animales de cría, aún cuando los resultados de la aceptación sensorial de materias primas originalmente contaminadas y tratadas mediante amonificación, en truchas y ganado bovino, han sido favorables (28,29). Es conveniente señalar, sin embargo, que la tecnología de descontaminación nunca debe ser considerada como un sustituto de las medidas preventivas que deben adoptarse en el manejo postcosecha de granos de cereales, sino como una técnica alternativa para la eventual recuperación de lotes de materias primas agrícolas contaminadas.

## REFERENCIAS

1. Northolt MD and Bullerman LB. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J Food Protect* 1982;45:519-526.
2. Karki TB, Bothast RJ and Stubblefield RD. Note on microbiological and aflatoxin analyses of cereal grains from the Tarai Plain of Southern Nepal. *Cereal Chem.* 1979;56:41-42.
3. Scudamore KA, Hetmanski MT, Chan HK and Collins S. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit Contam.* 1997;14:157-173.
4. Kress S, Jahn U, Buchmann A, Bannasch P and Schwarz M. p53 mutations in human hepocellular carcinomas from Germany. *Cancer Res.* 1992;52:3320-3323.
5. Scorsone KA, Zhou YZ, Buter JS and Slagle BL. P53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepocellular carcinomas from China. *Cancer Res.* 1992;52:1635-1638.
6. Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepocellular carcinoma in humans. *Cancer Res.* 1992;52:2114s-2118s.
7. Aguilar F, Hussain SP and Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G -T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:8586-8590.
8. Shimada T and Guengerich FP. Evidence for cytochrome P-450 NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:462-465.

9. Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ and Henderson BE. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. *Cancer Res.* 1989;49:2506-2509.
10. Vogelstein B, and Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-526.
11. Hooper ML. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci.* 1994;18:13-17.
12. Purwoko HM, Hald B, Wolstrup J. Aflatoxin content and number of fungi in poultry feedstuffs from Indonesia. *Lett Appl Microbiol.* 1991;12:212-215.
13. Park DL, Lee LS, Price RL, and Pohland EA. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *J Assoc Off Ana Chem.* 1988;71:685-702.
14. Lee LS and Cucullu AF. Conversion of Aflatoxin B1 to Aflatoxin D1 in ammoniated peanut and cottonseed meals. *J Agr Food Chem.* 1978;26:881-884.
15. INN. Tabla de composición de alimentos para uso práctico. Revisión 1999.
16. INN. Hoja de Balance de Alimentos. 1999.
17. AOAC. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed., international. 1990.
18. Weng CY. Efficacy and safety evaluation of ammonia treatment for reducing aflatoxin levels in corn. PhD Thesis. University of Arizona USA.
19. Weng CY, Martinez AJ and Park DL. Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Addit Contam.* 1994;11:649-658.
20. Trucksess MW, Stoloff L, Pons WA, Cucullu AF, Lee LS, and Franz AO. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin B1. *J Assoc Off Anal Chem.* 1969;60:795-798.
21. Przybylski W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J Assoc Off Anal Chem.* 1975;58:163-164.
22. Montgomery D. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 1991.
23. Bagley EB. Decontamination of corn containing aflatoxin by treatment with ammonia. *J Am Oil Chem Soc.* 1979;56:808-811.
24. Jorgensen KW and Price RL. Atmospheric pressure-ambient temperature reduction of aflatoxin B1 in ammoniated cottonseed. *J Agr Food Chem.* 1981;29:555-558.
25. Lon Wo E. Utilización de recursos energéticos tropicales en la alimentación de las aves. V Encuentro sobre nutrición y producción de animales monogástricos. Maracay-Venezuela. 1999.
26. Brekke OL, Stringfellow AC and Peplinski A. Aflatoxin inactivation in corn by ammonia gas: laboratory trials. *J Agr Food Chem.* 1978;26:1383-1389.
27. Koltun SP, Rayner ET, Wadsworth JI and Gardner HK. Inactivation of aflatoxin in cottonseed meal by ammoniation: I. Reaction studies. *J Am Oil Chem Soc.* 1979;56:803-806.
28. Brekke OL, Sinnhuber RO, Peplinski AJ, Wales JH, Putnam GB, Lee DJ and Ciegler A. Aflatoxin in corn: ammonia inactivation and bioassay with rainbow trout. *Appl Environ Microbiol* 1977;34:34-37.
29. McKinney JD, Cavanagh GC, Bell JT, Hoversland AS, Nelson DM, Pearson J and Selkirk RJ. Effects of ammoniation on aflatoxin in rations fed lactating cows. *J Am Oil Chem Soc.* 1973;50:79-84.

Recibido:08-11-2002

Aceptado:12-06-2003