

CARACTERIZAÇÃO DA DOSE LETAL MÍNIMA POR IRRADIAÇÃO GAMA PARA *PENICILLIUM CITRINUM*.

A. N. NORBERG (1) & N. M. SERRA-FREIRE (2)

RESUMO

O uso das radiações ionizantes na destruição de microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos ou causadores de infecções ou toxinfecções alimentares, constituiu-se aplicação da energia nuclear, para fins verdadeiramente pacíficos. *Penicillium citrinum* é um fungo produtor de micotoxinas, responsáveis por intoxicações em humanos e animais que se utilizam de alimentos contaminados. Há escassez de informações sobre a resistência de *P. citrinum* à irradiação gama; assim esta pesquisa objetivou determinar a dose letal por irradiação gama para esse microrganismo. Foram irradiadas 76 suspensões, contendo aproximadamente 100.000 esporos por mililitro, com doses entre 0,2 e 2,2 KGy (KiloGray), sendo os sobreviventes re-irradiados com doses até 3,0 KGy. O fungo foi totalmente destruído com dose de 2,2 KGy. *P. citrinum* descendentes dos sobreviventes de 2,0 KGy, quando re-irradiados também foram totalmente destruídos com dose de 2,2 KGy. Observou-se um aumento da resistência às doses mais baixas em relação ao fungo não irradiado.

UNITERMOS: *Penicillium citrinum* irradiado; Irradiação gama; Alimentos irradiados.

INTRODUÇÃO

A conservação de alimentos por irradiação constitui uma das aplicações da energia atômica para fins pacíficos. A utilização das radiações ionizantes para eliminar contaminantes de alimentos, deriva da capacidade que possuem estas radiações em destruir microrganismos que deterioram alimentos ou são responsáveis por infecções ou intoxicações em humanos e animais. *P. citrinum* é um fungo produtor de micotoxinas responsáveis pela intoxicação de humanos e animais, quando se utilizam desses alimentos contaminados^{24,29}.

Proliferando sobre alimentos, os fungos alteram profundamente os mesmos, razão pela qual a profilaxia e o tratamento do "emboloramento" constituem um dos

grandes problemas industriais. Nas contaminações maciças, tais bolores modificam os caracteres físicos, químicos e organolépticos dos alimentos. Embora queijo seja produzido tecnologicamente pela ação de fungos apatogênicos, é um dos alimentos frequentemente contaminados, e, geralmente por espécies tóxicas do gênero *Penicillium*. Os prejuízos econômicos decorrentes da contaminação fúngica nos derivados do leite são incalculáveis, porque a contaminação compromete a qualidade do produto¹⁸, além da possibilidade do acúmulo de micotoxinas que colocariam em risco a saúde dos consumidores¹⁸.

Quadros clínicos graves de micotoxicoses em ani-

(1) MSc. Ph.D., Chefe da Seção de Parasitologia do Instituto de Biologia do Exército. Rua Francisco Manuel, 102. Benfica. 20911-270 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

(2) MSc. D.Sc., Prof. Titular em Parasitologia, DPA/UFRRJ, Km 47 antiga rodovia Rio-São Paulo, Seropédica. Itaguaí. 23851-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

mais ocorrem pela ingestão de alimentos deteriorados por fungos produtores de micotoxinas, dentre os quais se destaca a citrinina. O efeito nefrotóxico desta micotoxina foi estudado em ratos²⁶, em camundongos e cobaias², aves²⁸ e em cães⁴. Sobre casos humanos, ainda não há profundo conhecimento sobre a extensão e a gravidade desse problema¹⁴.

A citrinina (C₁₃H₁₄O₃) é um metabólito fúngico secundário, isolado pela primeira vez em 1931¹², de cultivos de *P. citrinum*.

No Brasil, fungos citrinogênicos têm sido isolados de cereais e alimentos deteriorados, tais como: *P. steckii*¹ e *P. citrinum*^{6,11}; já tendo sido detectada em níveis de 1.000 microgramas por quilo em cevada fermentada utilizada na alimentação de suínos²⁵.

Uma doença grave, denominada nefropatia micotóxica suína, tem sido relatada em diversos países, em animais alimentados com ração e cereais contaminados com citrinina^{8,16,17}.

Com a descoberta das radiações ionizantes por RONTGEN e BEQUEREL em 1895, teve início uma série de pesquisas sobre suas propriedades letais em organismos. Desde então, a resistência dos microrganismos às radiações tem sido investigada no campo da radiação biológica relacionadas com alimentos.

Os processamentos tecnológicos empregados na preparação de alimentos não são suficientes para evitar a contaminação fúngica, correndo o risco da ingestão de metabólitos fúngicos, danosos à saúde dos consumidores.

Uma possibilidade muito promissora na proteção do consumidor contra os perigos das contaminações de alimentos é o uso da irradiação para eliminar esses microrganismos; foi sugerido o tratamento de alimentos por irradiação com uso de raios gama^{20,27}, pelo seu alto poder de penetração.

A esterilização de alimentos com raios gama, além de prolongar a vida dos produtos dispensa o uso de aditivos ou preservativos químicos, tecnologias que podem causar danos ao organismo dos manipuladores, bem como, alterar as características dos alimentos transformando-os em produtos danosos, colocando em risco a saúde dos consumidores¹⁵. Soma-se a essa vantagem o fato de que a irradiação poderá contribuir para a redução da incidência de micotoxicoses, cujos agentes etio-

lógicos ou suas toxinas encontram nos alimentos, um dos principais veículos de transmissão⁹.

Considerando a escassez de informações sobre a resistência do *P. citrinum* à irradiação gama e o número relativamente elevado de intoxicações em que é responsabilizado, pretende-se analisar um processo viável para a eliminação desses microrganismos contaminantes de alimentos.

Este trabalho tem como objetivo identificar a dose letal por irradiação gama, para *P. citrinum*.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de *P. citrinum* utilizada no experimento foi isolada de laranja da área geográfica de Itaguaí, RJ, pelo laboratório de Micologia do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e fornecida ao Instituto de Biologia do Exército, onde é mantida na micoteca.

Confirmação da amostra de *P. citrinum*

Efetou-se o plantio da amostra em placas de Petri de 100x20 mm, contendo meio de "Sabouraud Dextrose Agar"⁷ em camada de aproximadamente 5 mm de espessura. Após a semeadura as placas foram rigorosamente vedadas com fita adesiva e incubadas em posição invertida em temperatura ambiente (30°C ± 3°C), na presença de luz natural, durante dez dias. O crescimento obtido, foi analisado observando-se as características morfológicas e culturais do *Penicillium citrinum*^{18,21,22}.

Preparação das suspensões de esporos

Após comprovar a identidade da amostra de *P. citrinum*, a mesma foi repicada para garrafas de Roux, contendo meio de "Sabouraud Dextrose Agar"⁷, incubando-se em temperatura ambiente por dez dias.

Então foi introduzido 50 ml de solução de Tween 80 na concentração de 0,05% em água desmineralizada estéril¹⁵, em cada uma das culturas em garrafas de Roux, agitando-se levemente para obtenção dos esporos em suspensão; seguiu-se então com filtração em filtro de algodão hidrófilo esterilizado, com a finalidade de remover os fragmentos micelianos. A suspensão de esporos foi transferida, com auxílio de pipeta estéril, para tubos de ensaio contendo pérolas de vidro que foram fechadas com rolhas de borracha atóxica, esterilizadas. Esses tubos foram submetidos a agitação mecânica no agitador de Khan por vinte minutos, para desagregação dos esporos.

Preparo dos esporos para serem irradiados e contagem dos sobreviventes

Suspensões contendo aproximadamente 100.000 esporos/ml, foram preparadas pela técnica da contagem em câmara de Neubauer¹⁹. A suspensão obtida foi distribuída em alíquotas de 10 ml, em frascos de vidro esterilizados, fechados com rolhas de borracha atóxica, esterilizadas. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente, por tempo não superior a três horas, até serem expostos à irradiação.

Irradiação dos esporos

Cada frasco contendo dez ml da suspensão de esporos de *P. citrinum*, totalizando 76 frascos, foi irradiado com raios gama do Césio-137. Frascos foram tratados com doses diferentes que variavam de 0,2 a 3,0 KGy.

Esporos que sobreviveram a irradiação e cresceram no meio de cultura, foram novamente submetidos a radiação pela mesma metodologia e nas mesmas dosagens, aqui caracterizada como re-irradiação.

Contagem global dos esporos

A contagem dos esporos viáveis por mililitro na suspensão não irradiada, bem como a contagem dos sobreviventes de cada dose de irradiação foram feitas pelo processo de contagem de colônias em placa³, empregando-se diluições de 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000, obedecendo a seguinte metodologia:

- a- Cada suspensão foi vigorosamente agitada por 25 vezes.
- b- Usando-se pipetas e tubos estéreis, preparou-se a partir da amostra, diluições múltiplas de 10, em solução estéril de cloreto de sódio 0,15 molar.
- c- Com pipeta estéril, depositou-se 0,1 ml da suspensão e 0,1 de cada diluição em superfície de "Sabouraud Dextrose Agar"⁷, distribuídos em placas de Petri de 150x20 mm, espalhando-se o inóculo com auxílio de alça de Drigalski, sendo cada placa, rigorosamente vedada com fita gomada.
- d- Leitura e interpretação: as contagens dos esporos sobreviventes foram efetuadas nas placas que permitiram crescimento de no mínimo 20 e, no máximo 50 colônias. O número de esporos sobreviventes por mililitro foi calculado por média aritmética da contagem de cinco placas, multiplicando-se o número de colônias pelo título da diluição, vezes dez. A presença de crescimento nos

meios de cultura, permitiu também a identificação dos fungos de acordo com o critério anteriormente citado.

Concentração dos esporos irradiados para comprovação da inviabilidade

As suspensões irradiadas foram centrifugadas a 1.130 g por dez minutos, sendo o sedimento semeado em "Sabouraud Dextrose Agar"⁷, e incubado em temperatura ambiente aguardando-se o crescimento ou a comprovação da inviabilidade dos esporos.

RESULTADOS

Cultura do fungo e confirmação

Os meios de cultura utilizados para isolamento e conservação do fungo mostraram-se suficientemente bons para suportar todo o trabalho experimental. O plantio da amostra do fungo trabalhado, em meio de "Sabouraud Dextrose Agar"⁷ permitiu o crescimento de colônias com as seguintes características peculiares favorecendo a identificação: a principal característica de reconhecimento do *P. citrinum* é o penicílio, o qual consta de 3 a 5 métulas divergentes que suportam longas cadeias de conídios. A massa conidial apresenta coloração cinza azulada e no centro da colônia observa-se freqüentemente um exsudato de coloração marron amarelado. O crescimento é denso devido a conidiogênese abundante. A colônia pode produzir pigmento amarelado que se difunde no meio de cultura²¹.

TABELA 1

Valores numéricos do efeito de diferentes doses de irradiação gama em esporos de *P. citrinum*, avaliado pelo número de esporos viáveis por ml de suspensão (nº/ml).

Lote Dose (KGy)	A-10* (nº/ml)	A-20* (nº/ml)	A-30* (nº/ml)	$\bar{x} \pm s$ (nº/ml)
0	104.000	112.000	117.000	111.000 ± 6.557,44
0,2	102.000	109.000	114.000	108.333 ± 6.027,71
0,4	99.000	105.000	109.000	104.333 ± 5.033,22
0,6	95.000	102.000	106.000	101.000 ± 5.567,76
0,8	74.000	84.000	88.000	82.000 ± 7.211,10
1,0	52.000	61.000	63.000	58.666 ± 5.859,46
1,2	24.000	30.000	34.000	29.333 ± 5.033,22
1,4	12.000	17.000	20.000	16.333 ± 4.041,45
1,6	4.100	5.400	6.800	5.433 ± 1.350,31
1,8	1.880	2.200	2.300	2.126 ± 219,39
2,0	240	310	420	323 ± 90,74
2,2	0	0	0	0

* A = 1ª irradiação
10, 20, 30 = nº do lote

Avaliação do efeito da radiação

As características morfológicas e culturais empregadas para a identificação do *P. citrinum*, não apresentaram diferenças entre o lote irradiado e o não irradiado. Entretanto a viabilidade dos esporos revelou-se alterada após tratamento por radiação gama.

O número de esporos viáveis de *P. citrinum* dos três lotes irradiados com doses de 0,2 a 2,2 KGy apresentou redução significativa, com correspondência inversa entre viabilidade e dose de radiação; apenas um número reduzido de esporos viáveis foi encontrado nas suspensões irradiadas com 2,0 KGy, e não houve viabilidade dos esporos expostos as doses igual e superior a 2,2 KGy (Tab. 1 e 2).

A curva de sobrevivência média para os três lotes de esporos de *P. citrinum* tratados com radiação gama com doses entre 0,2 e 2,2 KGy demonstrou que o decréscimo da viabilidade dos esporos acentua-se criticamente a partir da dose de 0,6 KGy (Fig. 1); por essa curva calculou-se a dose de sobrevivência de 10% dos esporos (D_{10}) como de 1,5 KGy.

Esporos de *P. citrinum* sobreviventes da dose de 2,0 KGy deram origem a descendentes; esses, re-irradiados, também foram sensíveis a radiação, mas alguns sobreviveram à dose de 2,2 KGy. Outra constatação importante foi o significativo aumento da resistência às doses mais baixas em relação aos fungos não irradiados (Tab. 3, Fig.2).

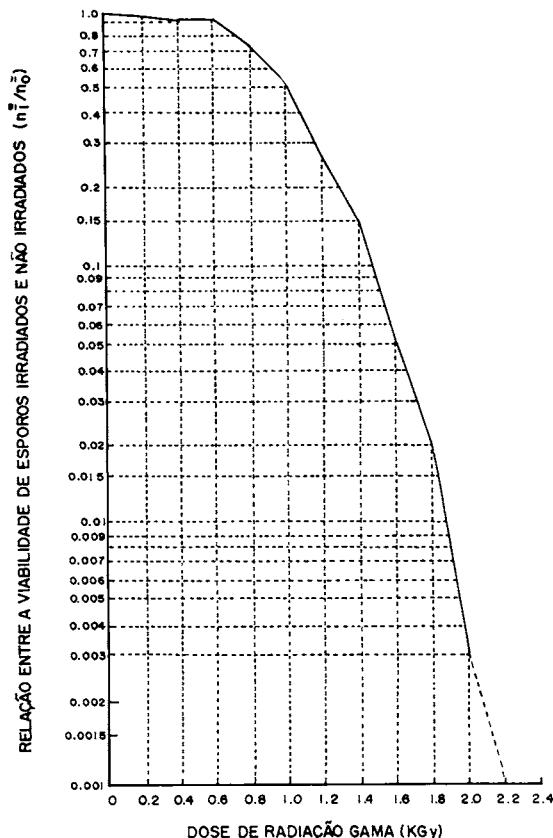


Fig. 1 - Curva da média de sobrevivência entre três lotes de *P. citrinum* tratados com diferentes doses de radiação gama, e não tratados.

TABELA 2

Valores relativos do efeito de diferentes doses de irradiação gama em esporos de *P. citrinum* avaliados pela relação entre os valores numéricos encontrados para a viabilidade de esporos irradiados e não irradiados.

Lote	$\bar{x} \pm s$			
Dose (KGy)	A-10*	A-20*	A-30*	
0,2	0,9808	0,9732	0,9743	0,9761 ± 0,0041
0,4	0,9519	0,9375	0,9316	0,9403 ± 0,0104
0,6	0,9135	0,9107	0,9060	0,9101 ± 0,0079
0,8	0,7115	0,7500	0,7521	0,7379 ± 0,0228
1,0	0,5000	0,5446	0,5385	0,5277 ± 0,0241
1,2	0,2308	0,2678	0,2906	0,2631 ± 0,0301
1,4	0,1154	0,1518	0,1709	0,1460 ± 0,0282
1,6	0,0394	0,0482	0,0581	0,0486 ± 0,0094
1,8	0,0181	0,0196	0,0197	0,0191 ± 0,0009
2,0	0,0023	0,0028	0,0036	0,0029 ± 0,0007

* A = 1ª irradiação
10, 20, 30 = n° do lote

TABELA 3

Valores numéricos e relativos do efeito de diferentes doses de irradiação gama em esporos de *P. citrinum* (Lote B-20) sobreviventes do tratamento com irradiação na dose de 2,0 KGy (Lote A-20), avaliados pelo número de esporos viáveis por ml de suspensão (n°/ml) e pela relação desses valores entre esporos irradiados e não irradiados (n°/n°).

Dose (KGy)	n°/ml	n°/n°
0	108.000	1,0000
0,8	95.000	0,8796
1,0	70.000	0,6481
1,2	46.000	0,4259
1,4	19.000	0,1759
1,6	9.600	0,0888
1,8	2.200	0,0203
2,0	640	0,0059
2,2	*	0,0000

* - Nessa dosagem observou-se pouquíssimos sobreviventes, não detectáveis pelo processo de contagem de colônias. O número extremamente baixo de esporos viáveis pós-reirradiação com 2,2 KGy, apresentou desenvolvimento quando foi semeado o sedimento dos 5 ml da suspensão de esporos no meio de Sabouraud; com esse mesmo procedimento demonstrou-se que 100% dos esporos reirradiados com 2,4 KGy não estavam viáveis.

DISCUSSÃO

As características morfológicas e culturais do *Penicillium citrinum*, não foram alteradas com as doses utilizadas de irradiação gama. Porém a literatura registra que essas alterações podem ocorrer¹³. Os autores verificaram que muitas espécies de microrganismos podem sofrer mutações como resultado da irradiação e exemplificam essa assertiva com as variações nas provas bioquímicas e sorológicas relacionadas com a identificação dos microrganismos, além de variações na virulência e modificações morfológicas.

Constatou-se que houve decréscimo da viabilidade de *P. citrinum* com o aumento da dose de irradiação (Tab. 1), porém a relação inversa não tem razão constante; o aumento de 0,2 KGy entre os três primeiros tratamentos determinou perdas de viabilidade calculadas entre 2,0 e 4,0% com essa mesma razão de aumento da dose de radiação nos três tratamentos seguintes, a percentagem de destruição dos esporos aumentou em faixas de 20 a 27% (Tab. 2).

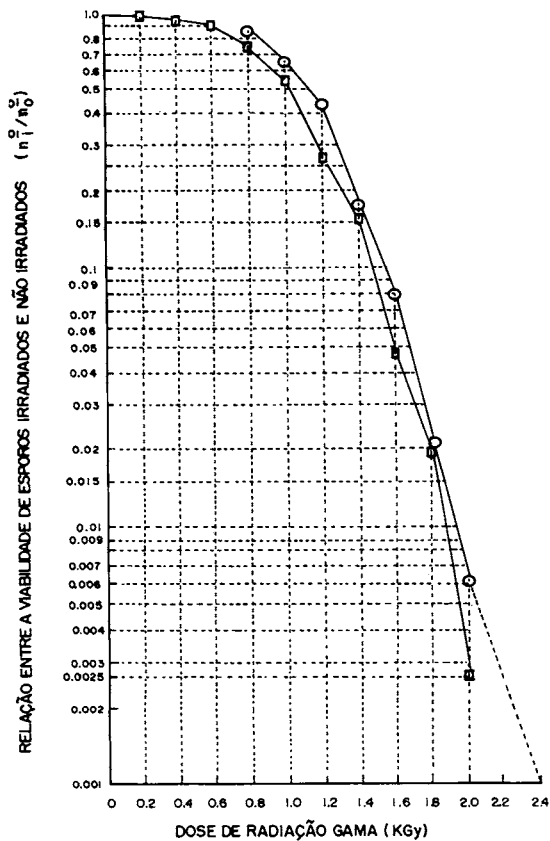


Fig. 2 - Curva da média de sobrevivência do lote A-20 (primeira irradiação) (□) de *P. citrinum* e do lote B-20 (re-irradiados do lote A-20) (○). Lote A-20 irradiado com 2,0 KGy apresentou $n^{\circ}/n^{\circ} = 0,0028$.

A curva de sobrevivência desse fungo tratado com raios gama (Fig. 2) demonstrou claramente esse fenômeno, e nos permite calcular rapidamente as doses percentuais de viabilidade. Para *P. citrinum* a D_{10} encontrada foi de 1,50 KGy (Fig. 1), sendo a $D_{0,2}$ 2,2 KGy.

Embora o traçado da curva de sobrevivência (Fig. 2) destaque o aumento da resistência desse fungo às doses mais baixas de radiação gama, a resistência virtual à dose de 2,2 KGy não foi registrada permitindo aceitar que, nas condições trabalhadas, não houve modificação final da resistência do fungo. Esse pressuposto serviu de base para afirmar que não foram registradas alterações morfológicas e culturais nesse fungo, mesmo considerando que aumento da capacidade de resistência à irradiação é considerado nas colônias¹³.

Quando se comparou a D_{10} da primeira série de *P. citrinum* irradiada com a dos sobreviventes de 2,0 KGy, cultivados e re-irradiados comprovou-se que houve aumento para D_{10} : 1,57 KGy (Fig.2). Não apenas a D_{10} foi maior, como todas as doses de sobrevivência a partir das doses de re-irradiação mostraram valores bem mais altos e um traçado menos crítico.

O aumento da resistência no início da curva de sobrevivência dos fungos re-irradiados, poderia ser explicada pela ocorrência de seleção de fungos mais resistentes dentro de uma população heterogênea, ou da indução de mutantes pela irradiação através da indução de sistemas de reparo tipo SOS - reparo não fiel - tal como supôs ALCÂNTARA GOMES, R. (Instituto de Biofísica-UERJ. Comunicação Pessoal). De acordo com essa hipótese, os resultados ora obtidos poderiam sugerir a indução de "mecanismo de reparo não fiéis" que seriam utilizados pelos microrganismos. Tais mecanismos seriam utilizados principalmente nos casos de tratamento com doses elevadas, quando os sistemas de reparo constitutivos não seriam suficientes para garantir a sobrevivência celular. Os mecanismos de reparo induzidos tipo SOS são eminentemente mutagênicos.

Outra possibilidade para explicar o fenômeno seria uma resposta adaptativa ao ambiente agressor (irradiação).

Após se reunir em Roma em 1964, o Comitê Misto FAO/IAEA/OMS⁹, sugeriu para destruir microrganismos, especialmente salmonelas em carnes, ovos e outros alimentos, a irradiação com doses variáveis entre três e dez KGy. Em atenção a essa sugestão os resultados deste

trabalho avalizam a recomendação de que doses menores seriam suficientes para eliminação de *P. citrinum*, contaminantes de alimentos; destaque-se que no presente estudo o substrato foi água desmineralizada.

As culturas desse fungo do qual irradiou-se aproximadamente 100.000 esporos por ml de suspensão revelaram que não houve sobreviventes a partir de tratamentos com dose de 2,2 KGy. Sab-se porém, que essa dose não é suficiente para destruição de todas as espécies de microrganismos contaminantes; certos microrganismos, principalmente bactérias esporuladas, necessitam de doses maiores⁹. Para se conseguir esterilização do produto, a recomendação é aplicação de doses entre 40 e 60 KGy⁹.

Na presente investigação não foi quantificada essa micotoxina entretanto REED (apud REIMANN)²³ estimou que a D_{10} para toxinas de microrganismos era de 104 KGy.

As irradiações com doses muito elevadas podem atingir o limiar necessário para inativar vitaminas do grupo B, especialmente o ácido fólico em carne bovina, capaz de resistir a dose de 30 KGy¹⁰.

Portanto, as doses calculadas para inativação do fungo estudado no presente trabalho, não destruiriam outros constituintes úteis dos alimentos.

Baseados no fato de não ter ocorrido crescimento do fungo, no meio de "Sabouraud Dextrose Agar"⁷, nos experimentos irradiados com 2,2 KGy, em solução com concentração aproximada de 100.000 esporos por ml e considerando não ter mais encontrado referência a trabalho semelhante, sugere-se que a dose letal mínima (DLM) para esse microrganismo, que não tenha sido anteriormente irradiado, deva ser superior a 2,2 KGy. Por outro lado, considerando-se o aumento da resistência desse fungo à radiação discorda-se da opinião¹¹, que preconiza doses baixas de radiação capazes de reduzir o número de microrganismos presentes nos alimentos.

Para inibir o crescimento de eventuais microrganismos resistentes às doses consideradas radioesterilizantes, é indispensável que os alimentos irradiados sejam acondicionados em embalagens herméticas para evitar recontaminação, e o controle do aparecimento de variantes rádio-resistentes, deverá ser realizado rotineiramente por testes radiomicrobiológicos.

CONCLUSÃO

Da análise dos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1- A dose de radiação gama capaz de destruir todos os esporos de *Penicillium citrinum*, suspensos em água desmineralizada (Dose Letal Mínima - DLM), é de 2,2 KGy.
- 2- Descendentes de *P. citrinum* sobreviventes à irradiação com 2,0 KGy são mais resistentes à radiação gama em dosagens baixas, mas a DLM na re-irradiação continua sendo 2,2 KGy.

SUMMARY

Characterization of minimum lethal dose of gamma irradiation to *Penicillium citrinum*.

The use of nuclear power through radiation for the destruction of microrganisms which cause food decay, and toxicosis, is specifically for peaceful purposes.

Penicillium citrinum is a fungus which produce mycotoxins responsible for intoxication in humans and animals as a result of eating contaminated food.

There is little informations on the resistance of *P. citrinum* to radiation. The objective of this research is to determine the lethal dose of gama radiation for these microrganisms. Seventy six suspensions containing approximately 100,000 spores/ml received a dose of radiation between 0.2 and 2.2 KGy (KiloGray), being one sample still alive re-irradiated with doses up to 3.0 KGy. The fungus were totally destroyed with a 2.2 KGy. Seventy six suspensions containing approximately 100,000 spores/ml received a dose of radiation between 0.2 and 2.2 KGy, being one sample still alive re-irradiated with doses up to 3.0 KGy. The fungus were totally destroyed with a 2.2 KGy dose. An increase in the resistance to lower dose levels of radiation was observed, in relation to the fungus which had not received irradiation. Conclusion: the Minimum Lethal Dose (MLD) of gamma irradiation, for *P. citrinum* is 2.2 KGy; the re-irradiation of the surviving fungus demonstrate that occur appearance of radio-resistant mutants.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, L.A.B.; BASTOS, S.G.T.; CAVALCANTI, M.S. & PRADO, M.C.G. - Produção de citrinina por *Penicillium steckii*, isolado de bacon. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 9., São Paulo, 1983. Anais. p. 152.

2. AMBROSE, A.M. & DeEDS, F. - Some toxicological and pharmacological properties of citrini. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 88: 173, 1946.
3. BIER, O. - *Bacteriologia e imunologia*. 24. ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. cap. 50, p. 931.
4. CARLTON, W.W.; SANSING, G. & SZCZECI, G.M. - Citrinin mycotoxicosis in Beagle dogs. *Food Cosmet. Toxicol.*, 12: 479-490, 1974.
5. CHANG, G.H. & LEE, H.B. - Radiation sensitivity of some food decay fungi. *Kor. J. Microbiol.*, 1: 1-6, 1980.
6. CRUZ, L.C.H.; ROSA, C.A.R. & CAMPOS, S.G. - Fungos produtores de citrínina isolados de alimentos. *Bol. inform. Soc. bras. Ciên. Tecnol. Alimentos*, (Rio de J.), 8: 3-6, 1984
7. DIFCO MANUAL. - Difco Laboratories Incorporated. 9. ed. Detroit, 1972. p. 64, 87, 90, 126, 138, 242, 243.
8. ELLING, F. & MOLLER, T. - Mycotoxic nephropathy in pigs. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 49: 411-418, 1973.
9. FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION - Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados. (Informe de un Comité mixto FAO/OIEA/OMS de expertos). Roma, 1966. p. 6, 8, 9, 23, 38, 39, 54, 57, 58.
10. GALATZEANU, I. & ANTONINI, F. - Effects des rayons gamma (Cobalt-60) sur la vitamine B6 et l'acide folique. In: *Radiosterilization of medical products*, IAEA. Vienna, 1966. p. 33-48.
11. GERRITS, A.R.; GERMS, A.C.; MULDER, R.W.A.W. & FRIJTERS, J.E.R. - Food-borne infection and intoxications. Spelderholt, Institute for Poultry Research, 1973. (Report nº 9973)
12. HEATHERINGTON, A.C. & RAISTRICK, H. - Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum*. *Phil. Trans. B*, 220B: 169-295, 1931.
13. IDZRAC, E. & THATHICHER, F.S. apud Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados. *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, (316): 55-56, 1966.
14. JARVICE, B. - Mold spoilage of foods. *Process Biochem.*, 7: 11, 1972.
15. KOUIJ, I. VAN. - Food preservation by irradiation. *Int. atom. Energ. Ag. Bull.*, 23: 33-36, 1981.
16. KROGH, P. & ELLING, F. - Mycotoxic nephropathy. *Advanc. vet. Sci. comp. Med.*, 1: 51-53, 1977.
17. KROGH, P.; HIALD, B. & PETERSON, V.E. - Occurance of Ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta path. microbiol. scand.*, 81B: 689-695, 1973.
18. LACAZ, C. S.; PORTO, E. & MARTINS, J.E.C. - *Micologia médica*. 7. ed. São Paulo, Sarvier, 1984. p. 2-5, 7, 71, 306, 430-432, 449.
19. LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J. & CANÇADO, J.R. - *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977.
20. MULDER, R.W.A.W.; NOTERMANS, S. & KAMPELMACHER, E.H. - Application of radiation for the control of Salmonellae in various foods. *J. appl. Bact.*, 52: 69, 1977.
21. PITT, I.J. - *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. London, Academic Press, 1979. cap. 9, p. 291-294.
22. RAPER, B.K. & FENNEL, I.D. - *The genus Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1965. cap. 18, p. 361-368.
23. REIMANN, H., ed. - *Food-borne infections and intoxications*. New York, Academic Press, 1966.
24. ROSA, C.A.R. - Perfil bioquímico e sérico de suínos intoxicados experimentalmente com citrínina. Rio de Janeiro, 1986. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro).
25. ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A. & VEIGA, C.E.M.O. - Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrínina. *Rev. bras. Med. vet.*, 7: 87-90, 1985.
26. ROSA, C.A.R.; FIGUEIREDO, M.J.; CRUZ, L.C.H. & PIMENTEL, I.V.O. - Determinação da dose letal média de (DL 50) citrínina em ratos e camundongos pela via intraperitoneal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18., Camboriú, 1982. *Anais*. p. 12-15.
27. SNIJDERS, J.M.A. - *Hygiene bij het slachten van varkens*. Utrecht, 1976. (Thesis-University of Utrecht).
28. VESELA, D.; VESELY, D. & JELINEK, R. - Toxic effects of Ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos. *Appl. environ. Microbiol.*, 45: 91-93, 1993.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION - *Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals*. Part I. Geneve, WHO, 1976. p. 272-275. (Environmental Health Criteria nº 6).

Recebido para publicação em 16/04/1993
Aceito para publicação em 09/08/1993