

ESTUDO MACROESTRUTURAL EM CEPAS DE REFERÊNCIA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* EM GRÃOS DE AMENDOIM IRRADIADOS.

Valéria Barbosa Borges ✉

Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto

Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos,
Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

Mauro Carlos Lopes Souza

LIN/COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

Zander Barreto de Miranda

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

Áurea Maria Lage de Moraes

Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos (LTBBF)
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Manguinhos -Rio de Janeiro, RJ.

✉ valeriabborges@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho investigou as alterações morfológicas do fungo *Aspergillus flavus* inoculados em grãos de amendoim e irradiados com raios gama de ^{137}Cs . O objetivo foi estudar por macroscopia o efeito da radiação sobre a morfologia de cepas de *Aspergillus flavus* em grãos de amendoim. Os experimentos foram realizados com amostras de grãos de amendoim *in natura* (cru e descascado), adquirido em supermercados da Cidade do Rio de Janeiro. Para o estudo foi selecionada a espécie

Aspergillus flavus – CMT 00079. Os grãos de amendoim foram inoculados com a cepa fúngica e as placas foram incubadas em câmara de germinação BOD, à 25°C, por 5 dias. No sexto dia as amostras foram submetidas à radiação gama de uma fonte de césio-137, com uma taxa de dose de valor médio em torno de 1,6 kGy/h. As doses absorvidas foram: 0; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 e 8.0 kGy. Observou-se a radiosensibilidade do fungo com doses absorvidas de 4.5 a 8.0 kGy com 1, 7 e 15 dias, obtendo-se a inativação com 8.0 kGy. Verificou-se ainda que,

após repiques em meios nutritivos, os isolados irradiados recuperaram a taxa de crescimento em 15 dias até a dose de 7.5 kGy.

Palavras-chave: Morfologia. Radiação gama. Radiossensibilidade.

SUMMARY

*This study investigated the morphologic changes of the fungus *Aspergillus flavus*, inoculated in peanuts and irradiated with gamma rays from ^{137}Cs . The effects of radiation on the morphology of *Aspergillus flavus**

were evaluated macroscopically. The experiments were performed with samples of peanuts in natura (raw and peeled) purchased in supermarkets in the city of Rio de Janeiro. For the study was selected the species *Aspergillus flavus* - CMT 00079. The peanuts were inoculated with the fungal strain and the plates were incubated in a germination chamber BOD, at 25 °C for 5 days. On the sixth day the samples were subjected to gamma radiation from a source of cesium-137, with an average dose rate of approximately 1.6 kGy/h. The absorbed doses were 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0 kGy. Radiosensitivity in the fungus was observed with doses between 4.5 and 8.0 kGy, at 1, 7 and 15 days after the irradiation; inactivation was achieved with the dose of 8.0 kGy. The samples irradiated with doses up 7.5 kGy, recovered the growth rate within 15 days, after being subcultured in nutrient media.

Keywords: Morphology. Gamma irradiation. Radiosensitivity.

INTRODUÇÃO

Os grãos adaptam-se à larga faixa climática dentro das regiões tropicais e subtropicais, com exceção daquelas excessivamente úmidas. O cultivo de grãos apresenta todo um ecossistema próprio. Após a colheita, com o processo de secagem e armazenamento, produz-se uma intensa mudança nos fatores ecológicos, a qual tem repercussão sobre a microbiota que provém do campo. Dessa forma, passam a predominar fungos como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. O Brasil apresenta deficiências nos processos de produção de grãos, seja na colheita e pós-colheita. No período de safra, a carência na rede de armazenamento,

que implica na permanência dos grãos no campo, fora dos silos, sujeitos às intempéries ambientais torna-se nitidamente percebida. Em relação ao transporte, em sua maioria, é realizado através de precária malha rodoviária. Os grãos são sujeitos a períodos prolongados sob condições de alta temperatura, aumento de umidade, fatores importantes para a perda da qualidade, seja pelo crescimento fúngico, como também pela produção de micotoxinas. Essa situação é preocupante para o agronegócio.

Os fungos são micro-organismos ubíquos, presentes em diversos climas, dominando especialmente em áreas mais quentes e são mais comuns nos trópicos, onde ocorre a maior diversidade de espécies (PITT & HOCKING, 1997). Nestas regiões, é necessário maior atenção com a contaminação e crescimento de espécies toxígenas nos produtos agrícolas (ALMEIDA et al., 2000).

O *Aspergillus* é um gênero de fungos anamórficos que se reproduzem pela produção de fialoconídios (KLICH, 2002). Possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Podem manter-se em desenvolvimento sob condições adversas, tais como baixa umidade e atividade de água (DIONELLO et al., 2000). Possuem espécies encontradas como contaminantes em todos locais da Terra. Dominam especialmente em áreas mais quentes e são mais comuns nos trópicos (PITT e HOCKING, 1997).

Várias espécies de *Aspergillus* têm especial importância para humanos e animais devido à capacidade de produzir metabólitos tóxicos quando presentes nos alimentos (principalmente, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. ochraceus*). São mais encontradas como contaminantes de alimentos e outros materiais nas áreas de clima tropical e subtropical. Muitas espécies têm grande capacidade de crescimento e metabolismo em baixa atividade

de água (PITT e HOCKING, 1997). O gênero é considerado a maior causa de degradação de produtos agrícolas, tanto antes como após a colheita. Além da deterioração do alimento, representantes deste gênero tem a capacidade de produzir uma grande variedade de micotoxinas, configurando como o toxígeno mais comum, afetando a cadeia alimentar, podendo contaminar produtos como amendoim, nozes, sorgo, soja e outras oleaginosas (KLICH, 2002), sendo o *A. flavus* de particular importância devido ao seu impacto sobre a agropecuária e a saúde humana (DURAN et al., 2007). O crescimento fúngico reduz o valor nutricional e a digestibilidade do alimento. Ademais, a produção de micotoxinas nos grãos pode ocasionar danos diretos à saúde dos animais por meio de casos de intoxicação, chamados de micotoxicose, que podem se apresentar de forma aguda, subaguda ou, mais comumente, crônica (FIGUEIRA et al., 2003). Com base na literatura disponível, pode-se dizer que o melhor método para controlar a contaminação por micotoxinas em alimentos é prevenir o crescimento de fungos (SANTURIO, 2000).

A irradiação tem sido utilizada para reduzir ou eliminar a microbiota de diferentes substratos, como: amendoim, arroz, aveia e trigo (BORGES, 2004); milho (AQUINO et al., 2005); livros e documentos antigos (SILVA, 2006); amendoim (PRADO, 2006) e guaraná em pó usado como estimulante (AQUINO et al., 2007).

Os raios gama são ondas eletromagnéticas, com alto poder de penetração, que passam através dos alimentos sem deixar resíduos. Essa técnica se constitui numa vantagem quando comparada a outros tratamentos de desinfecção, como, por exemplo, aqueles que utilizam produtos químicos. A irradiação além de eliminar ou reduzir o número de micro-organismos presentes no substrato, tem por proposta melhorar

a qualidade higiênica por redução de agentes deteriorantes, em especial os fungos (ICGFI, 1995). A irradiação de alimentos é eficiente na redução ou eliminação de fungos toxígenos. Contribui na comercialização dos produtos inócuos, mantendo a qualidade dos alimentos no mercado nacional, podendo contribuir também para tornar mais competitiva a exportação de grãos, com benefícios diretos para toda cadeia produtiva (ICGFI, 1995). A dose absorvida depende da contaminação inicial, sensibilidade dos organismos e proposta do tratamento (ICGFI, 1995).

Há ainda muitas lacunas sobre os efeitos da irradiação sobre a microbiota do amendoim e são necessários mais estudos sobre os efeitos desse tratamento físico sobre fungos toxígenos do gênero *Aspergillus* spp. O presente trabalho objetivou estudar, por macroscopia, o efeito da radiação sobre a morfologia de cepas de *Aspergillus flavus* em grãos de amendoim.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de grãos de amendoim, *in natura* e descascado, foram adquiridas em supermercados da cidade do Rio de Janeiro (RJ). A verificação da atividade de água foi realizada no Laboratório de Reologia e Moagem da EMBRAPA, Guaratiba/RJ.

Para o estudo, foi selecionada a espécie *Aspergillus flavus* – CMT 00079. A cepa foi cedida pelo Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, da Coleção Micológica de *Trichocomaceae* do IOC/FIOCRUZ. Para a reativação da cepa liofilizada, esta foi inoculada em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) em triplicata, por 10 dias, incubadas em câmara de germinação BOD (Fanem-347F), à temperatura de 25 °C. As análises micológicas foram realizadas no Laboratório de

Taxonomia, Bioquímica e Bioprospeção de Fungos (LTBBF) do IOC/FIOCRUZ

Após o crescimento da cepa de referência - *Aspergillus flavus* CMT 00079, esta foi inoculada em grãos de amendoim e as placas foram incubadas em câmara de germinação BOD, à temperatura de 25 °C, onde permaneceram por 5 dias para o crescimento das colônias fúngicas. No sexto dia as amostras foram submetidas às doses de radiação gama: 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 kGy, no Centro Tecnológico do Exército (CTEx) em Guaratiba, RJ. As placas de Petri com as amostras foram inseridas no irradiador que possui fonte de Césio-137 e posicionadas no volume central do irradiador, onde a taxa de dose é de 1,6 kGy/h. No interior do irradiador, a temperatura média foi de 33 °C. Na metade do tempo de irradiação, as amostras eram reposicionadas para receber a dose mais uniforme possível. Os tempos de irradiação foram calculados para cada dose, usando-se um programa desenvolvido para essa finalidade. O programa considera o decaimento da fonte, altura, geometria, densidade das amostras e baseia-se no mapeamento dosimétrico do irradiador (VITAL, 2000). A incerteza total nas doses foi de $\pm 15\%$. Após a irradiação, as placas foram levadas ao LTBBF-IOC/FIOCRUZ onde de cada uma das placas irradiadas, foram retirados grãos que foram inoculados diretamente em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA, para verificar a ausência ou presença de crescimento de colônias e demais características fúngicas, após a irradiação. As placas foram incubadas em câmara de germinação BOD, à temperatura de 25 °C, e observou-se o crescimento das colônias no 1^o, 7^o e 15^o dia.

As características macromorfológicas das colônias foram observadas de acordo com o roteiro preconizado

por Klich, 2002 para identificação de espécies do gênero *Aspergillus*, com o objetivo de se observar cor, textura, reverso, diâmetro das colônias e presença de estruturas de resistência, como os esclerócios. As colônias crescidas e uma colônia controle (não irradiada) foram transferidas para as placas de Petri, contendo o meio de cultura MEA (Extrato de Malte Agar), sendo inoculadas em 3 pontos equidistantes e incubadas por 7 dias para a observação da taxa de crescimento e das características macroscópicas das colônias. No 7^o dia, foram feitas as leituras das taxas de crescimento das colônias com auxílio de um paquímetro eletrônico, a observação da coloração, aparência geral da colônia e de seu reverso para futura comparação com a literatura específica, visando a confirmação da radiosensibilidade fúngica através da análise das características macromorfológicas da espécie *Aspergillus flavus* – CMT 00079.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a irradiação, a taxa de crescimento das colônias com 1,7 e 15 dias podem ser observadas na Tabela 1. Foi observado que do 1^o ao 7^o dia após a irradiação, houve crescimento com doses 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 kGy, demonstrando inativação com 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 kGy. No 15^o dia após a irradiação, houve crescimento com doses 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 kGy, demonstrando inativação com a dose de 8,0 kGy.

Segundo Klich (2002), o diâmetro normal das colônias em 7 dias sobre o MEA mede de 65-70 (50) mm e em 10 dias sobre o MEA mede de 60 a 70 mm. As medidas de crescimento após as diferentes doses de irradiação podem ser observadas na Tabela 2.

De acordo com as medidas realizadas, foi observado que de 0 a 4.0

Tabela 1 - Crescimento de *A. flavus* CMT 00079 após diferentes doses de radiação gama.

kGy	1 dia	7 dias	15 dias
0	+	+	+
1,0	+	+	+
1,5	+	+	+
2,0	+	+	+
2,5	+	+	+
3,0	+	+	+
3,5	+	+	+
4,0	+	+	+
4,5	-	-	+
5,0	-	-	+
5,5	-	-	+
6,0	-	-	+
6,5	-	-	+
7,0	-	-	+
7,5	-	-	+
8,0	-	-	-

Obs. (+) = houve crescimento; (-) = não houve crescimento

Tabela 2 - Diâmetro das colônias de *A. flavus* (CMT 00079) incubada por 7 dias sobre MEA.

Doses absorvidas (kGy)	Diâmetro (mm)
0	65,02
1,0	62,72
1,5	57,89
2,0	56,14
2,5	55,50
3,0	53,17
3,5	50,66
4,0	50,23
4,5	46,32
5,0	36,72
5,5	25,23
6,0	19,17
6,5	15,48
7,0	12,53
7,5	8,45
8,0	N.C.

As medidas descritas foram feitas em triplicatas e calculada as suas respectivas médias; NC = não cresceu

kGy as colônias se portaram dentro do intervalo, tendendo a diminuir em diâmetro com o aumento da dose. A partir de 4.5 kGy, a medida de crescimento tendeu a diminuir, ficando bem menor em 7.5 kGy. De 4.5 a 7.5 kGy, os diâmetros das colônias diferiram com os de Klich (2002), pois ficaram menores que os valores descritos. A partir de 8.0 kGy não houve crescimento.

Segundo Klich (2002), as características macroscópicas da espécie do gênero *A. flavus* sobre o meio MEA em 7 dias estão descritas como: colônias pulverulentas com coloração esverdeada; textura flocosa; micélio submerso branco, com reverso de colorido às vezes amarelo opaco. O esclerócio, se presente, assume cor marrom para preto (Tabela 3).

Foram também observadas na Tabela 3 variações morfológicas entre cepas controle e irradiadas, tais como: cor, textura e reverso das colônias. Em placas com doses absorvidas de 0 a 4.5 kGy foi constatado nas colônias a presença de esclerócios. Nas placas irradiadas com doses de 3.0 a 4.5 kGy, foi observada uma gradativa diminuição de esclerócios na cor marrom claro, desaparecendo completamente em 5.0 kGy. As alterações macroscópicas encontradas das doses de 5.0 a 8.0 kGy não estão dentro das variações já observadas para a espécie, de acordo com Klich (2002).

Diferenças na radiosensibilidade entre gêneros fúngicos são discutidas na literatura, porém não se discutem tempo de incubação após irradiação para as análises micológicas, o que é de extrema importância para avaliação da radiosensibilidade dos fungo, o que pode levar a erros conclusivos de inativação ou eliminação.

Blank e Corrigan (1995), verificaram que esporos de *Alternaria* spp., *Curvularia* spp. *Cladosporium* spp. foram pelo menos três vezes mais resistentes à irradiação, quando comparados aos gêneros *Aspergillus*

Tabela 3 - Características morfológicas e coloração das colônias inoculadas em amendoim, irradiadas e isoladas em meio de cultura MEA 25°C.

Dose (kGy)	Características físicas e coloração das colônias <i>A. flavus</i> CMT 00079 isoladas em meio de cultura MEA
0.0-2.0	Colônia esférica, centro elevado, verde oliva, textura flocosa; micélio branco com reverso de verde
2.5	Colônia esférica, centro elevado, verde oliva, textura flocosa; micélio branco com reverso de branco
3.0	Colônia esférica, centro elevado, verde oliva, textura flocosa; micélio branco com reverso de verde
3.5	Colônia esférica, centro elevado, verde oliva, textura flocosa; micélio branco com reverso de verde
4.0	Colônia esférica, centro elevado, verde oliva, textura flocosa; micélio branco com reverso de verde
4.5	Colônia esférica, centro elevado, verde oliva, textura flocosa; micélio branco com reverso verde
5.0	Colônia esférica, verde oliva castanho, textura flocosa; micélio branco com reverso verde
5.5	Colônia esférica, amarelo cinzento, textura flocosa, micélio branco amarelado com reverso laranja
6.0	Colônia esférica, verde oliva, textura flocosa; micélio branco amarelado com reverso de verde
6.5	Colônia esférica, verde oliva, textura flocosa; micélio branco amarelado com reverso de verde oliva
7.0	Colônia esférica, verde opaco, textura flocosa; micélio verde opaco com reverso verde cinzento
7.5	Colônia esférica, verde claro, textura aveludada; micélio verde opaco com reverso verde cinzento

spp. e *Penicillium* spp. A resposta diferencial desses fungos sugere a presença de macroconídeo de parede espessa, que pode conferir proteção (as análises micológicas nesse experimento foram inoculadas em um dia e observadas no sétimo dia). Maity (2004), ao irradiar sementes, verificou que *Aspergillus* submetido a 4.0 kGy não sobreviveu, enquanto *Alternaria* persistiu, sendo que as análises micológicas nesse experimento foram inoculadas em um dia e observadas no sétimo. Este autor demonstrou a radissensibilidade do fungo do gênero *Aspergillus* spp. em 4.0 kGy o que é coerente com o fator tempo de 7 dias. Borges (2004), observou no sétimo dia após a inoculação a radiosensibilidade entre

espécies de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em grãos de amendoim, aveia, arroz e trigo irradiados. Esse autor descreve *A. parasiticus* como o mais radiorresistente das espécies estudadas, com D50 e D0 de 3.1 kGy e 4.7 kGy, respectivamente e *A. flavus*, com D50 e D0 de 3.5 kGy e 4.5 kGy, respectivamente, o que é coerente com o trabalho em estudo.

O crescimento de *Aspergillus* spp. endógeno é relatado por Farias (2000), que obteve vários isolados de grãos de milho aparentemente saudáveis. A menor produção de conídios, com crescimento mais lento e grande presença de esclerócios (estrutura de resistência em isolados irradiados), foi observada por Ribeiro et al., (2008) quando irradiou milho

picado contaminado por *Aspergillus* spp. com doses 0; 2.0; 3.5 e 5.0 kGy. Observou-se que houve significativa diminuição com a dose de 2.0 kGy e completa inibição a partir de 4.0 kGy; as análises micológicas foram inoculadas em 1 dia e avaliadas no 7º dia.. Esses autores citam a espécie de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, porém estes resultados diferem com o trabalho em discussão, pois a inibição foi a partir de 4,5 kGy no período de 1 e 7 dias e com 8.0 kGy em 15 dias. O crescimento fúngico em grãos de amendoim submetidos à irradiação foi observado por Prado (2006) para dose de até 5 kGy, a qual proporcionou redução no percentual de infecção de 82% para 17,3% dos grãos.

Segundo Ribeiro et al (2009), o fubá quando submetido a 3.5 kGy, permitiu crescimento de fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp e *Penicillium* spp. No entanto, ao serem repicados para identificação da espécie, esses fungos evidenciaram o crescimento apenas de micélio estéril. No trabalho em discussão houve crescimento após repiques de 15 dias, logo os micélios não eram estéreis.

CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, ampliou-se a visão geral da macromorfologia de *Aspergillus flavus* (CMT 00079) com diferentes doses de radiação gama. Variações morfológicas foram observadas entre cepas controle e irradiadas, tais como: cor, textura, reverso, diâmetro das colônias e presença de estruturas de resistência, como os esclerócios. Constataram-se alterações morfológicas nesta espécie a partir de 4.5 kGy, em relação ao controle (não irradiado). Porém, a inativação deste fungo com 1 e 7 dias ocorreu com doses absorvidas de 4.5 a 8.0 kGy e em 15 dias somente com 8.0 kGy ocorreu a inativação. Logo, as colônias do 1º e 7º dias são mais radiosensíveis. E as do 15º dia apresentaram um comportamento mais radorresistentes, demonstrando a resistência de alguns macroconídios. Com 1, 7 e 15 dias, a inativação da micobiota foi intensificada com o aumento da dose e que 8.0 kGy foi a dose necessária para inativar a contaminação fúngica do amendoim.

Portanto, ao submeter os fungos irradiados a repiques sucessivos em meios de cultura, estes tendem a retomar características morfológicas muito próximas ao padrão não irradiado, dependendo do número de dias de incubação. Os nutrientes disponíveis no meio, associados às condições adequadas de tempo e temperatura, favorecem o crescimento dos fungos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Bras. J. Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.
- AQUINO, S.; FERREIRA, F.; RIBEIRO, D.H.B.; CORRÊA, B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. **Bras. J. Microbiology**, v. 36, p.352-356, 2005.
- AQUINO, S. FERREIRA, F.; RIBEIRO, D.H.B.; CORRÊA, B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Effect of gamma- irradiation on micoflora of guaraná (*Paullinia cupana*). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76 (8-9), p.1470-1473, 2007.
- BLANK, G; CORRIGAN, D. Comparison of resistance of fungal spores to gamma and electron beam radiation. **International Journal of Food Microbiology**, v.26 (3), p.269-277, 1995.
- BORGES, V.B. **Radiossensibilidade de espécies toxígenas do gênero Aspergillus Fr.Fr. em meio CYA e em grãos**, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, 75 páginas, 2004.
- DIONELLO, R.G.; RADUNZ, L.L.; ELIAS, M.C.; MEIRELES, M.C.A. Método de secagem e sistema de armazenamento na ocorrência de micotoxinas em milho. **Rev. Bras. Armazenamento**, v.25, p.09-15, 2000.
- DURAN, R.M.; CARY, J.W.; CALVO, A.M. Production of cyclopiazonic acid, aflatoxin, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73(5), p.1158 – 1168, 2007.
- FARIAS, A.X. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesq. Agropec. Brasileira**, v.35 (3), p.617-621, 2000.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; COELHO, A.R.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. 2003. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24 (2), p. 359 -378, 2003.
- INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION (ICGFI). **Code of good irradiation practice for the control of pathogenic microorganisms in poultry food**. Document n.19. Vienna, 1995.
- KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* Species. Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 116 paginas, 2002
- MAITY, J.P. Radiation-induced effects on some common storage edible seeds in India infested with surface microflora. **Radiation Physics and Chemistry**, v.75 (5), p.1965-1072, 2004.
- PITT, J.I.; HOCIKING, A.D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: PITT, J.I, **Fungi and food spoilage**. London: Chapman e Hall, p.339 – 416, 1997.
- PRADO, G. Efeito da irradiação gama (cobalto 60) na frequência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira. **Ciênc. e Agrotecnol.**, v.30 (5), p.930-936, 2006.
- RIBEIRO, J.M.M.; VITAL H.C; MAGNOLI, C; MERKIS, C; CRISTOFOLILI A; ROSA, C.A.R. Alterações Ultraestruturais em Cepas de Referência de *Aspergillus* spp. Induzidas por Irradiação Gama. **Rev. Universidade Rural - Ciência da Vida**. Seropédica, EDUR, v. 28, suplemento, 2008.
- RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; VITAL H.C; KRUGER C.D.; ROSA, C.A.R. Radiação Gama Sobre a Micobiota de Ração Avícola e *Aspergillus* spp.. **Rev. Ciência Rural**. Santa Maria, v. 39,n.5 p.1452-1458,ago, 2009.
- SANTURIO, J.M. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Poultry. **Rev. Bras. Ciênc. Avícolas**, v.2 (1), p 1-12, 2000.
- SILVA, M. da. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. **International Biodeterioration & biodegradation**, v.57 (3), p.163-167, 2006.
- VITAL, H.C; PIRES L. F. G; LIMA, R. Q; VELLOSO, S. O., “Experimentos Dosimétricos no Irradiador Gama do CETEX”, **Anais do 5º Encontro Nacional de Aplicações Nucleares (ENAN)**, Oct. 15-20, Rio de Janeiro, Brazil (2000). ❖