

Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos

Identification of the airborne fungal microbiota in a fruit pulp industry and antifungal susceptibility to terpenes

RIALA6/1661

Viviane Priscila Barros de MEDEIROS¹, Gezaildo Santos SILVA¹, Edeltrudes de Oliveira LIMA², Fillipe de Oliveira PEREIRA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Olho D'Água da Bica, s/n, Cuité, Paraíba, Brasil, CEP: 58175-000. Tel: 83 3372-1900 / 9816-8410. E-mail: fillipepereira@ufcg.edu.br

²Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

Recebido: 24.06.2015 - Aceito para publicação: 27.08.2015

RESUMO

Os fungos anemófilos são importantes agentes contaminantes e deteriorantes de alimentos, especialmente frutas e seus produtos. Neste estudo foram identificados os principais gêneros fúngicos presentes na microbiota anemófila de uma indústria de polpas de frutas, localizada no interior da Paraíba, e foi investigada a ação antifúngica de terpenos como possível alternativa de controle do crescimento fúngico. Os fungos foram coletados pela exposição de placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (50 µg/mL). Após a incubação a 28 °C durante sete dias, foram realizadas a contagem das unidades formadoras de colônias e sua descrição. Os fungos foram identificados pela análise morfológica das colônias isoladas. O principal gênero isolado em toda indústria foi o dematiáceo *Cladosporium* spp. Os ensaios de sensibilidade foram efetuados aplicando-se a técnica de difusão em meio sólido com discos contendo os terpenos: carvacrol, citronelal, citral, linalol, timol, terpinoleno, p-cimeno e β-cariofileno. A efetividade de alguns destes terpenos frente a cepas do *Cladosporium* spp foi demonstrada, com destaque para o citral e carvacrol. A indústria de polpas de frutas apresenta ar de ambiente vulnerável, especialmente contaminação por *Cladosporium* spp. Pretende-se impulsionar novos estudos com produtos naturais na perspectiva de diminuir a contaminação fúngica em alimentos.

Palavras-chave. fungos anemófilos, *Cladosporium*, indústria, polpa de frutas, terpenos.

ABSTRACT

Airborne fungi are important food contaminants and spoiling agents, especially in fruits and their derivatives. This study aimed at identifying the main fungi in the airborne microbiota in a fruit pulp industry, located in Paraíba State, and to investigate the antifungal action of terpenes as an alternative for controlling fungal growth. The Petri plates containing Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (50 µg/mL) were exposed for collecting the fungi. The plates were incubated at 28 °C for seven days; then the colony forming units counting, and description were performed. The identification of fungi was performed by the morphological analysis of isolated colonies. The main group of fungi isolated throughout the industry was *Cladosporium* spp. Antifungal tests were performed by diffusion technique in solid medium with discs containing terpenes: carvacrol, citronellal, citral, linalool, thymol, terpinolene, p-cymene and β-caryophyllene. The effectiveness of some of these terpenes against *Cladosporium* spp. strains was shown, especially citral and carvacrol. Based on these results, the fruit pulp industry shows vulnerable ambient air, notably with high contamination by *Cladosporium* spp. Thus, it is aimed at promoting further studies with natural drugs in order to reduce the fungal contamination in food.

Keywords. airborne fungi, *Cladosporium*, industry, fruit pulp, terpenes.

INTRODUÇÃO

Devido ao seu conteúdo nutricional e qualidades organolépticas, os alimentos são excelentes substratos para a multiplicação de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo facilmente contaminados durante sua manipulação e processamento¹. Na indústria de alimentos, os fungos anemófilos são micro-organismos que se apresentam como importantes agentes contaminantes de alimentos, causando sua deterioração, redução no valor nutricional e alterando suas qualidades organolépticas².

Especialmente nas frutas e em seus produtos como polpas de frutas, os fungos são responsáveis por causar mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto na estrutura e aparência, que podem levar ao seu descarte, e ocasionar perda econômica³. Em alguns casos, a contaminação de alimentos por fungos pode se tornar um problema de saúde pública, pois alguns gêneros são produtores de toxinas e micotoxinas oriundas de seu metabolismo secundário⁴.

Segundo Zandonadi et al⁵, a contaminação dos alimentos se inicia na produção da matéria-prima e se estende às etapas de transporte, recepção, armazenamento. Durante a manipulação das frutas, pode ocorrer contaminação devido condições precárias de higiene dos manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente e condições inadequadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo. Em virtude de sua composição, as polpas de frutas constituem-se em bons substratos para o desenvolvimento de fungos, que podem causar deterioração e sérios danos à saúde do consumidor. Para garantir a oferta de um produto isento de contaminações, é necessário que se realize um rigoroso controle do processo produtivo e do produto final⁶.

Portanto, a caracterização dos fungos anemófilos é um fator importante para avaliar se os locais de produção industrial possuem microbiota fúngica equilibrada para evitar possíveis contaminações. A higiene industrial e o monitoramento microbiológico do ar

ambiente asseguram boas condições sanitárias para evitar a ocorrência de contaminações nos produtos produzidos⁷.

Considerando a linha de produção de uma indústria, fonte potencial de contaminação, torna-se importante estudar estratégias seguras que possam minimizar ou eliminar o risco de contaminação. É dentro desse contexto que muitos estudos de atividade biológica *in vitro*, incluindo atividade antifúngica, têm sido realizados com produtos naturais, a exemplo de terpenos. Os terpenos são compostos largamente distribuídos na natureza, constituindo uma ampla variedade de compostos vegetais e dotados de potencial atividade antifúngica contra fungos patogênicos e contaminantes⁸.

O objetivo deste estudo foi analisar a microbiota fúngica do ar ambiente de uma indústria produtora de polpas de frutas situada no estado da Paraíba/Brasil, verificar os principais setores de maior veiculação fúngica e a sensibilidade de alguns isolados fúngicos frente à ação de terpenos. Desta forma, este trabalho colabora para futuros estudos com fungos anemófilos e sua relação com alimentos, impulsionando a implementação de estratégias higiênico-sanitárias como forma de contribuir para um controle efetivo das condições higiênico da escala produtiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram realizadas coletas de amostras do ar ambiente em setores representativos da linha de produção de uma indústria de polpas de frutas, localizada no estado da Paraíba/Brasil, entre agosto e novembro de 2013, em dias alternados e sempre no turno da manhã, pois por ser um período sem ocorrência de chuvas na região onde se localiza a indústria, haveria possibilidade de ocorrer maior circulação aérea entre os setores e provável disseminação das estruturas fúngicas.

A indústria analisada foi subdividida em seis setores distintos, cujas funções no processo de produção de polpas de frutas compreenderam: (I) área do processamento

de polpa de frutas, por ser o local destinado a todos os processos de acabamento ou refino e embalagem como obtenção do produto final; (II) área de recebimento da matéria prima, onde são realizados os procedimentos de pré-preparo das frutas, como seleção, pré-lavagem, higienização, descasque, corte e despulpamento das frutas; (III) câmara de congelamento, local de armazenamento das frutas semiprocessadas e das polpas; (IV) câmara de refrigeração, para armazenamento das polpas embaladas e prontas para a comercialização; (V) área livre, local de armazenamento de caixas plásticas para o transporte de frutas, plataforma de descarga de alguns produtos, bem como de entrada e saída de fornecedores, visitantes e funcionários da empresa; e (VI) área de empacotamento das polpas de frutas, onde é realizado o empacotamento das polpas em embalagens destinadas comercialização.

A coleta de fungos anemófilos foi feita pela técnica de exposição de placas de Petri (90 x 15 mm), descartáveis e estéreis, contendo o meio ágar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol (50 µg/mL). Para a coleta da amostra do ar ambiente, foram expostas 05 placas em cada setor da indústria, em pontos equidistantes do ambiente, com distância mínima de 1,50 m do solo. Cada uma das placas foi exposta por 15 minutos para coleta de possíveis contaminantes presentes no ar ambiente por gravitação^{9,10}.

Identificação dos fungos anemófilos

Após o tempo de exposição, as placas foram fechadas, identificadas e conduzidas ao Laboratório de Bioquímica e de Microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Brasil. As placas foram incubadas a temperatura de 28 °C, por 5 a 7 dias, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), isolamento e descrição. A identificação de fungos anemófilos isolados foi realizada com base no estudo da macromorfologia e micromorfologia das colônias, sendo que a macromorfologia baseou-se na observação da pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas e da velocidade de

crescimento das mesmas, enquanto que a micromorfologia foi realizada pela técnica de microcultivo, onde foram visualizadas as estruturas como presença de blastoconídios, pseudohifas, clamidoconídios, forma e coloração das hifas vegetativas e reprodutivas, a disposição dos órgãos de frutificação com os conídios ou esporos, o que proporciona uma correta identificação das colônias selecionadas nas placas de coleta^{10,11}.

A técnica de microcultivo para fungos filamentosos foi realizada sobre lâmina em uma câmara úmida. Com o auxílio de alça descartável estéril, pequenos blocos do ASD foram transferidos para a superfície de uma lâmina de microscopia estéril, em uma câmara úmida. Em seguida, dois fragmentos do micélio das cepas isoladas foram dispostos sobre a superfície dos blocos de ASD e cobertos com uma lamínula. As lâminas foram incubadas a 28 °C por cinco dias. Após o período de incubação, as lâminas foram coradas com lactofenol algodão e cobertas com uma lamínula. As estruturas micromorfológicas foram examinadas em microscópio óptico comum, com aumento de 400x.

Para as leveduras, a técnica de microcultivo foi adaptada: uma pequena porção de ágar fubá, estéril e fundido, foi colocada sobre uma lâmina. Após solidificação, foram feitas três estrias partindo de colônias jovens de cada cepa de levedura, sobre o meio de cultura. Uma lamínula flambada foi colocada sobre o ágar inoculado. As lâminas foram incubadas por 48 horas em câmara úmida, semelhante a que foi descrita acima^{9,10}.

Avaliação da atividade antifúngica

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram selecionadas quatro cepas de *Cladosporium* spp, o gênero predominante no ar ambiente da indústria de polpas de frutas. As cepas, isoladas do setor V foram devidamente etiquetadas com os seguintes códigos de identificação: 5A7, 5B5, 5E3 e 5D1, sendo o número 5 para identificar o setor V, a letra para identificar a placa (de A a E) e segundo número para identificar a colônia isolada.

Para induzir a formação de conídios, as cepas de *Cladosporium* spp foram cultivadas em agar batata a 28 °C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação, os conídios foram contados utilizando-se hemocitômetro e ajustados com solução salina para fornecer um inóculo de aproximadamente 10⁶ conídios/mL^{11,12}.

O teste de sensibilidade para avaliar a atividade antifúngica dos terpenos foi realizado pela técnica de difusão em meio sólido com discos de papel de filtro¹³. Em placas de Petri (90 x 15 mm), descartáveis e estéreis, foi dispensado 1 mL da suspensão fúngica. Em seguida, 20 mL do meio ASD, fundido a 50 °C, foram acrescidos e o sistema foi homogeneizado. Após solidificação do meio, discos de papel de filtro (CECON[®]) embebidos com 10 µL dos terpenos carvacrol, citronelal, citral, linalol, timol, terpinoleno, p-cimeno e β-cariofileno (Sigma-Aldrich[®]) *in natura* foram depositados na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 28 °C por até 7 dias, sendo que após a incubação, procedeu-se à leitura das zonas de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indústria analisada foi subdividida em seis setores distintos, onde eram realizadas diferentes atividades no processo de produção de polpas de frutas, sendo que, considerando a indústria como um todo, foram obtidos 196 isolados fúngicos, com identificação de 13 gêneros distintos (Tabela 1).

Os gêneros de maior incidência de isolamento foram, em ordem decrescente, *Cladosporium* spp (142 UFC), seguido por *Rhizopus* spp (14 UFC), *Mycelia sterilia* (11 UFC), *Penicillium* spp (9 UFC) e as leveduras do gênero *Candida* (9 UFC). O gênero *Aspergillus* aparece em menor frequência (8 UFC), sendo encontrado apenas nos dois últimos setores analisados. Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*

foram encontradas somente na câmara de refrigeração (2 UFC). *Hendersonula* spp, *Hortaea werneckii*, *Acremonium* spp, *Rhodotorula rubra*, *Curvularia* spp e *Chaetomium* spp foram encontrados em menor incidência (1 UFC, cada um).

A Tabela 1 também apresenta a frequência de detecção de fungos anemófilos em função da área amostrada, sendo possível verificar maior incidência de população fúngica no ar ambiente dos setores II e V da empresa, área onde é recebida a matéria prima e área livre da indústria, respectivamente. Segundo Stelato et al¹⁴, os fungos podem contaminar os alimentos por diversos meios, como a água, o solo, o ar e manipuladores, podendo causar a deterioração microbiana dos alimentos. Considerando a forma de veiculação das estruturas fúngicas pelo ar e as características de cada setor, pode-se inferir que estes resultados provavelmente se devem ao fato destas áreas estarem expostas à grande circulação de ar, devido o trânsito de pessoas e mercadorias, o qual é um importante disseminador de esporos e conídios fúngicos.

Com relação aos demais setores da indústria, deve-se destacar o setor III - câmara de congelamento, na qual não foi verificado crescimento fúngico. De forma contrária, a câmara de refrigeração apresentou resultados positivos em relação ao desenvolvimento de fungos.

Fungos anemófilos podem surgir a partir de diversas fontes, incluindo matérias primas, sistemas de ar condicionado e durante a produção de alimentos específicos. Para o seu desenvolvimento, necessitam de quantidade de água livre, pH e temperatura adequados, além da disponibilidade de nutrientes. Entretanto, sabe-se que algumas condições, como baixas temperaturas, podem inibir o desenvolvimento de alguns isolados fúngicos detectados neste estudo; alguns podem manter-se em estado de latência, até que encontrem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, quando podem crescer e afetar negativamente a segurança e a qualidade dos produtos. Fungos psicrofílicos, em especial, apresentam esta capacidade de resistência e são bastante isolados em ambientes que refrigeram alimentos como carnes, frutas

Tabela 1. Frequência de isolamento de fungos anemófilos em uma indústria de polpas de frutas

Isolado	N isolados					
	Na indústria	Setor				
		I	II	IV	V	VI
<i>Cladosporium</i> spp	142 (72,5%)	20	24	15	68	15
<i>Mycelia sterilia</i>	11 (5,6%)	4	5	-	-	2
<i>Rhizopus</i> spp	9 (4,6%)	4	4	-	1	-
<i>Penicillium</i> spp			-	-	8	1
<i>Candida glabrata</i>	6 (3,1%)	1	-	4	-	1
<i>Aspergillus flavus</i>	5 (2,6%)	-	-	-	-	5
<i>Aspergillus niger</i>	3 (1,5%)	-	-	1	2	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 (1,0%)	-	-	2	-	-
<i>Curvularia</i> spp	1 (0,5%)	-	1	-	-	-
<i>Hortaea werneckii</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Acremonium</i> spp	1 (0,5%)	-	-	-	1	-
<i>Hendersonula</i> spp	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Chaetomium</i> spp	1 (0,5%)	-	1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Candida krusei</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	1 (0,5%)	-	-	-	1	-
Total	196	29	36	34	74	23

e produtos hortícolas^{15,16}. Altunatmaz et al¹⁵ identificaram, em refrigeradores de alimentos na cidade de Edirne (Turquia), os gêneros fúngicos *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Botrytis* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Mucor* spp, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp, *Candida* spp e *Saccharomyces* spp, alguns destes semelhantes aos fungos isolados no presente estudo.

Os fungos podem causar danos para à saúde humana devido a sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos denominados micotoxinas, as quais podem causar afecções de saúde como náuseas, dermatites, danos hepáticos e renais, até óbito de acordo com composto ou quantidade ingerida⁶. É importante salientar que essas toxinas não são eliminadas totalmente durante os processos industriais, podendo provocar imunocomprometimento e muitas doenças em geral crônicas, ressaltando-se afecções renais e hepáticos

aos consumidores de possíveis alimentos contaminados¹⁷. Dentre os fungos isolados, algumas espécies do gênero *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* são importantes produtores de micotoxinas. Segundo Vecchia e Castilho-Fortes¹⁸, entre os tóxicos contaminantes de alimentos, podemos destacar as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais são tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia. A micotoxina patulina pode ser produzida por várias espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo frequentemente encontrada em frutas, verduras e cereais.

O gênero *Cladosporium*, detectado em praticamente todos os setores analisados, abrange muitas espécies de fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos, sendo encontrados ubiquamente como saprófitas no solo e no ar de

ambientes, incluindo áreas de processamento de alimentos¹⁹. De acordo com Zoppaset al²⁰, *Cladosporium* spp é um dos fungos de maior concentração no ar, particularmente em regiões quentes, como no Curimataú da Paraíba onde está localizada a indústria produtora de polpa de frutas avaliada. Estes autores afirmam, ainda, que há uma correlação positiva entre a temperatura e negativa com umidade²⁰. Embora não seja relatado que espécies de *Cladosporium* produzem micotoxinas de grande preocupação, é válido ressaltar que são fungos produtores de compostos orgânicos voláteis associados com odores que alteram as características organolépticas dos alimentos²¹.

Conhecer o nível de contaminação, os tipos e a persistência de fungos anemófilos em locais de estoque de alimentos como polpa de frutas, além dos ambientes envolvidos no processamento, são importantes itens de efetivos programas de monitoramento higiênico-sanitário da indústria²². Souza et al²³ afirmam que a microbiota que contamina os produtos de frutas é normalmente proveniente das condições da matéria-prima e da lavagem às quais estas são submetidas, além das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores, equipamentos e ambiente industrial em geral.

Diante do fato do ar ambiente da linha de produção de uma indústria ser uma fonte potencial de contaminação, torna-se importante estudar estratégias seguras que possam minimizar ou eliminar este risco de contaminação. Nesta perspectiva de controle higiênico-sanitário e, considerando que o gênero *Cladosporium* spp foi o mais prevalente, foi verificada a atividade antifúngica de alguns terpenos, como o carvacrol, citronelal, citral, linalol, timol, terpinoleno, p-cimeno e β -cariofileno, frente a algumas cepas de *Cladosporium* spp isoladas. A atividade antifúngica dos produtos naturais foi considerada positiva quando a média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição foram superiores ou iguais a 10 mm, em pelo menos 50 % das cepas testadas²⁴. Os resultados referentes à sensibilidade das cepas fúngicas frente à ação de terpenos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Diâmetros médios das zonas de inibição de crescimento fúngico (mm) produzidas pelos terpenos frente às cepas de *Cladosporium* spp

Terpenos	<i>Cladosporium</i> spp			
	5A7	5B5	5E3	5D1
Carvacrol	35	30	30	40
Citral	40	42	46	45
Citronelal	0	17	0	15
Linalol	0	0	0	0
Timol	0	0	0	0
Terpinoleno	0	0	0	0
p- cimeno	0	0	0	0
β -cariofileno	0	0	0	0

Os terpenos que apresentaram maior atividade antifúngica foram citral e carvacrol. Os demais terpenos não exerceram atividade frente às cepas de *Cladosporium* spp testadas.

Estudos comprovam a potente atividade antifúngica do citral frente a leveduras do gênero *Candida*²⁵ e outros fungos como *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium subglutinans* sp.²⁶, *Penicillium italicum* e *Rhizopus stolonifer*²⁷. Estudo realizado por Lima et al²⁸ comprova a atividade antifúngica do carvacrol sobre levedura *Candida albicans*, possivelmente pela interação com ergosterol da membrana fúngica. Abbaszadeh et al²⁹ comprovaram a atividade antifúngica de carvacrol frente a fungos de importância na área de alimentos, como os gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium*.

A partir dos resultados apresentados neste estudo, nota-se a grande vulnerabilidade do ar ambiente, tendo em vista o elevado número de colônias encontradas, em especial do gênero *Cladosporium*. Isto pode representar risco diário de contaminação da matéria-prima e até mesmo das polpas fabricadas, podendo ainda causar danos à saúde dos consumidores. Partindo desta problemática, o presente trabalho pode impulsionar indústrias de alimentos a adotar padrões higiênicos que visem minimizar possíveis contaminações fúngicas.

Diante da diversidade de gêneros

fúngicos encontrados na indústria e dos resultados encontrados nos testes de sensibilidade antifúngica frente aos terpenos, são necessários outros estudos na perspectiva de tornar possível o desenvolvimento de formulações que auxiliem na diminuição da contaminação fúngica de frutas e de outras matérias-primas a partir destes produtos naturais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, a Universidade Federal de Campina Grande e à indústria de polpas de frutas pelo auxílio na execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Riedel G. Controle sanitário dos alimentos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
2. Mageste JO, Pereira TCD, Silva GA, Barros RAM. Estudo da microbiota fúngica anemófila de uma indústria farmacêutica de juiz de fora – MG. *Rev Facider*.2012;1(1):1-7.
3. Silva LF. Fungos: um estudo sobre sua ocorrência nos alimentos [trabalho de conclusão de curso]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
4. Souza PMS, Andrade SL, Lima AF. Pesquisa, isolamento e identificação de fungos anemófilos em restaurantes self-service do centro de Maceió /AL. *Cad Grad Cienc Biol Saúde*.2013;1(3):147-54.
5. Zandonadiet RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. *Rev Nutr*.2007;20(1):19-26. [DOI: dx.doi.org/10.1590/S1415-52732007000100002].
6. Dal RI, Sebastiany E. Avaliação do Processo Produtivo e da Qualidade de Polpas de Frutas Comercializadas em Boa Vista/RR [dissertação de mestrado]. Boa Vista (RR): Universidade Federal de Roraima;2006.
7. Corrêa B. Micotoxinas humanas e micetismos. *In: Zaitz, C Campbell, Marques AS, Ruiz LRB, Souza VM. Compêndio de micologia médica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1998.
8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol*.2008;46(2):446-75. [DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106].
9. Kern ME, Blevins KS. *Micologia Médica: texto e atlas*. 2ed. São Paulo: Premier; 1999.
10. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
11. Rasooli I, Abyaneh MR. Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*.2004;15(6):479-83. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2003.07.002].
12. Mota KSL, Pereira FO, Oliveira WA, Lima IO, Lima EO. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules*.2012;17(12):14418-33. [DOI: 10.3390/molecules171214418].
13. Hadecek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal*. 2000;11(3):137-47. [DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I].
14. Stelato MM, Concon MM, Shimada D, Srebernich SM. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(3):285-90.
15. Altunatmaz SS, Issa G, Aydin A. Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Braz J Microbiol*.2012;43(4):1436-43. [DOI: dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400027].
16. Sorensen LM, Jacobsen T, Nielsen PV, Frisvad JC, Koch AG. Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(1):58-64. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.019].
17. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de alimentos: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Nobel; 2009.
18. Vecchia AD, Fortes CR. Contaminação fúngica em granola comercial. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):324-7. [DOI: dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200020].

19. Engelhart S, Glasmacher A, Simon A, Exner M. Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the Merck MAS-100 portable bioaerosol sampler. *Inter J Hyg Environ Health*. 2007;210(6):733-9. [DOI: 10.1016/j.ijheh.2006.10.001].
20. Zoppas BCA, Valencia-Barrera RM, Fernández-González D. Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp. no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2011;34(2):55-8.
21. Rivas S, Thomas CM. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Ann Rev Phytopathol*. 2005;43:395-436. [DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140224].
22. Portnoy JM, Barnes CS, Kennedy K. Sampling for indoor fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(2):189-98. [DOI: 10.1016/j.jaci.2003.11.021].
23. Souza GC, Carneiro JGG J, Gonsalves HRO. Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas produzidas no município de Russas - CE. *ACSA*. 2011;7(3):1-5.
24. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 1993;36(9-10):333-6. [DOI: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00777.x].
25. Lima IO, de Medeiros Nóbrega F, de Oliveira WA, de Oliveira Lima E, Albuquerque Menezes E, Cunha FA, et al. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharm Biol*. 2012;50(12):1536-41. [DOI: 10.3109/13880209.2012.694893].
26. Garcia R, Alves ESS, Santos MP, Viegas Aquije GMF, Fernandes AAR, dos Santos RB, et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol*. 2008;39(1):163-8. [DOI: 10.1590/S1517-838220080001000032].
27. Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochem Physiol*. 2010;98(1):89-93. [DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.05.004].
28. Lima IO, Pereira FO, Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J Essent Oil Res*. 2013;25(2):138-42.
29. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Med*. 2014;24(2):51-6. [DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063].