

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

Andrieli Stefanello

**SENSIBILIDADE DE FUNGOS TERMORRESISTENTES AOS
SANITIZANTES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES SOBRE A
EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DESTES AGENTES**

Santa Maria, RS
2021

Andrieli Stefanello

**SENSIBILIDADE DE FUNGOS TERMORRESISTENTES AOS
SANITIZANTES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES SOBRE A
EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DESTES AGENTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Venturini Copetti

Santa Maria, RS.
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Stefanello, Andrieli
SENSIBILIDADE DE FUNGOS TERMORRESISTENTES AOS
SANITIZANTES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES SOBRE A
EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DESTES AGENTES / Andrieli
Stefanello.- 2021.
58 p.; 30 cm

Orientadora: Marina Venturini Copetti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2021

1. Sanitizantes 2. Fungos termorresistentes 3. Águas
eletrolisadas I. Venturini Copetti, Marina II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ANDRIELI STEFANELLO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Andrieli Stefanello

**SENSIBILIDADE DE FUNGOS TERMORRESISTENTES AOS
SANITIZANTES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES SOBRE A
EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DESTES AGENTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovada em 20 de agosto de 2021:

Marina Venturini Copetti
(Presidente/ Orientadora)

Alessandra Marcon Gasperini

Liliana de Oliveira Rocha



Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria
Coordenação do Programa/Curso de PG Ciência e Tecnologia dos Alimentos - M

ATA DE DEFESA - PROCESSO Nº 23081.059489/2021-10

Aos vinte dias do mês de Agosto do ano de dois mil e vinte e um, às quatorze horas, no(a) Google Meet, realizou-se a prova de Defesa de Dissertação, intitulada **SENSIBILIDADE DE FUNGOS TERMORRESISTENTES AOS SANITIZANTES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES SOBRE A EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DESTES AGENTES**, de autoria da Candidata **ANDRIELI STEFANELLO (201960457)**, aluna do Programa de PG Ciência e Tecnologia dos Alimentos - M, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos professores: **MARINA VENTURINI COPETTI** Presidente, **ALESSANDRA MARCON GASPERINI** e **LILIANA DE OLIVEIRA ROCHA**. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a candidata foi **APROVADA** pela Comissão Examinadora, que parabenizou a qualidade do trabalho realizado pela candidata. Foi concedido um prazo de 30 dias, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

MARINA VENTURINI COPETTI

ALESSANDRA MARCON GASPERINI

LILIANA DE OLIVEIRA ROCHA

() Por sugestão da Comissão Examinadora, o novo título passa a ser:

.....
.....
.....

() Declaração:

.....
.....
.....

À PRPGP

Certifico que o candidato cumpriu com as exigências da Comissão Examinadora e do Regimento Interno dos Programas de Pós-Graduação da UFSM.

Em ___/___/___



Coordenador:

Ao DERCA

Para emissão do Certificado/Diploma.

Em ___/___/___

Pró-Reitor:

NUP: 23081.067800/2021-96	Prioridade: Normal
Homologação de ata de banca de defesa de pós-graduação 134.332 - Bancas examinadoras: indicação e atuação	
COMPONENTE	
Ordem	Descrição
1	Ata de defesa de dissertação/tese (134.332)
	Nome do arquivo ataDefesa_958 andrieli.pdf
Assinaturas	
23/08/2021 09:57:04 PAULO CEZAR BASTIANELLO CAMPAGNOL (PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR) 03.10.07.00.0.0 - CURSO-PROGRAMA PG e CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CPPGCTA	
23/08/2021 10:52:01 ALESSANDRA MARCON GASPERINI (Aluno de Pós-Graduação) 01.09.04.01.0.0 - Programa de Pós-Doutorado da UFSM - 1003	
23/08/2021 12:40:30 MARINA VENTURINI COPETTI (PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR) 03.39.00.00.0.0 - DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA ALIMENTOS - DTCA	
23/08/2021 12:56:17 Liliana de Oliveira Rocha (Pessoa Física) Usuário Externo (269.***.***.**) <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>	
Código Verificador: 803090 Código CRC: 85ee50ff Consulte em: https://portal.ufsm.br/documentos/publico/autenticacao/assinaturas.html	
	

DEDICATÓRIA

A minha família Victor, Susana, Alesandra e Marcos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida e a oportunidade de estar realizando esse grande sonho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade de ingresso e realização do mestrado.

Aos meus pais Victor e Susana, que sempre me incentivaram a buscar meus sonhos e me ensinaram que se queremos algo na vida devemos correr atrás, vocês são os grandes responsáveis por tudo que acontece de bom em minha vida.

Aos meus irmãos Alesandra e Marcos, agradeço por serem meu porto seguro e minha inspiração todos os dias. A minha irmã, tudo que fizeste e faz por mim vou guardar para sempre, obrigada por toda a paciência que tem comigo. Ao meu irmão, sou grata pela nossa parceria nas horas de alegria e dificuldade, obrigada por me orientar para seguir sempre pelo caminho certo.

Ao meu namorado Marcus, pelo incentivo e apoio em todos os momentos de dificuldade, além da enorme paciência que teve nessa etapa, você é muito importante em minha vida e faz parte dessa conquista.

Aos meus tios Erlaine e Eduardo, obrigada por serem meus maiores incentivadores a seguirem nesta caminhada árdua que é a vida acadêmica.

À minha orientadora, Prof^a Marina Venturini Copetti, ao longo desses cinco anos de orientação, não tenho palavras para agradecer todo ensinamento, paciência e confiança que depositou em mim. Aprendi a sempre buscar algo mais e nunca desistir, por qualquer caminho que eu siga você será sem dúvidas a minha grande inspiração.

As IC's Lísia, Juliana e Marina que foram meu braço direito na realização desse trabalho, obrigada por deixarem os dias longos de experimentos mais leves e divertidos. A amizade que criamos vou guardar para sempre em meu coração.

Ao meu amigo e colega Marcelo, obrigada por toda ajuda nos momentos em que mais precisei. Saiba que onde quer que você esteja torço para teu sucesso.

A minha amiga e colega Angélica, agradeço por todos os ensinamentos, por me fazer lembrar e acreditar sempre no meu potencial, sem dúvidas se eu consegui realizar esse sonho devo muito a você.

Aos colegas do Laboratório de Micologia de Alimentos (4311), Angélica, Marcelo, Camila, Gilson, Tiago, Jéssica, Raquel, Tamíres, Lísia, Marina, Juliana, Thaís, Graziela, Larissa e Alessandra, agradeço por todos os momentos compartilhados, vocês fazem parte dessa conquista.

A minha amiga Bruna Lago, não existe como descrever essa parceria e fidelidade que temos a mais de dez anos uma com a outra. Agradeço muito por tudo que fez e faz por mim dentro e fora da UFSM. Saiba que você faz parte disso.

Aos meus amigos e colegas Cassandra, Lídia, Maritiele, Thaiane, Maximiliano, Felipe e Alisson.

Aos meus amigos Ani Carla, Julian, Arlei, Daniele e Anselmo.

As minhas amigas Bethina e Giovana.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade, sugestões e contribuições para a melhoria do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, a minha gratidão e reconhecimento.

A CAPES (COD 001) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

SENSIBILIDADE DE FUNGOS TERMORRESISTENTES AOS SANITIZANTES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES SOBRE A EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DESTES AGENTES

AUTORA: Andrieli Stefanello

ORIENTADORA: Marina Venturini Copetti

Este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de fungos termorresistentes (*Aspergillus australensis* MB 2579; NFF 02; *Aspergillus aureoluteus* NFC1; *Paecilomyces fulvus* PFF 01; *Paecilomyces niveus* PNT 01; PNDC 01; PNB1 01; PV 01; e *Paecilomyces variotii* PV 01; PV 01; PVCH 03) para um desinfetante fumigante (orto-fenilfenol) desinfetantes químicos (cloreto de benzalcônio, biguanida, iodo, ácido peracético e hipoclorito de sódio) e água eletrolisada (ácida e alcalina) e para avaliar a influência de diferentes variáveis (tipo, concentração, tempo de exposição, temperatura e presença/ausência de carga orgânica) na eficácia de sanitizantes químicos contra cepa padrão para ensaios de sanitização *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Para avaliar a sensibilidade de fungos termorresistentes à água eletrolisada e desinfetantes químicos, bem como para avaliar a influência de variáveis na eficácia dos desinfetantes, os testes foram realizados de acordo com as normas do Comitê Europeu de Normalização (CEN), com adaptações. Para os testes com gerador de fumaça higienizante contra as espécies termorresistentes, foram seguidas as regras do protocolo francês NF-T-72281, específico para desinfetantes difundidos por via aérea. Dentre os desinfetantes testados contra as espécies termorresistentes, os desinfetantes como ácido peracético (1%) e o gerador de fumaça a base de ortofenilfenol apresentaram os melhores resultados em relação às espécies testadas. O contrário foi observado para os sanitizantes hipoclorito de sódio e biguanida, que foram ineficazes em relação à maioria das espécies estudadas. As diferentes concentrações de água eletrolisada testadas, nos tipos ácido e alcalino, foram ineficazes e não atingiram a redução mínima de 3 log UFC exigida pela regulamentação. Além disso, observou-se que as espécies termorresistentes apresentaram variação na sensibilidade quando expostas a diferentes compostos. Quanto ao estudo dos fatores interferentes, observou-se que todas as variáveis testadas influenciaram na eficácia antifúngica dos sanitizantes contra a cepa padrão *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). A presença de carga orgânica foi capaz de reduzir a eficácia do desinfetante em até 1,5 log UFC. A concentração do produto também interferiu significativamente na eficácia de cada composto, com a concentração máxima de uso recomendada pelo fabricante atingindo a melhor inativação microbiana, mas mesmo assim não atingindo os requisitos regulamentares em alguns casos. Alguns compostos como o iodo e o ácido peracético foram mais eficazes em temperaturas mais altas (40 °C), enquanto o cloreto de benzalcônio apresentou melhor eficácia a 10 °C. O tempo de exposição do composto também foi um fator importante, sendo o tempo mínimo de 5 minutos não foi suficiente para garantir a eficácia do composto, sendo recomendada a exposição por pelo menos 15 minutos. Os resultados deste estudo são importantes, mas são necessários estudos adicionais que avaliem a sensibilidade de espécies fúngicas isoladas de determinados produtos deteriorados aos sanitizantes atualmente usados no setor de alimentos em diferentes situações. Principalmente devido à tolerância fúngica a esses compostos, que está bem estabelecida em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa. Assim, é fundamental definir as condições para atingir a máxima eficácia destes produtos e sucesso no processo de higiene.

Palavras-chaves: Fungos termorresistentes. Higienização. Controle fúngico. Ácido peracético.

ABSTRACT

SENSITIVITY OF THERMO RESISTANT FUNGI TO SANITIZERS AND INFLUENCE OF DIFFERENT CONDITIONS ON THE ANTIFUNGAL EFFECTIVENESS OF THESE AGENTS

AUTHOR: Andrieli Stefanello
ADVISOR: Marina Venturini Copetti

This study aimed to evaluate the sensitivity of thermoresistant fungi (*Aspergillus australensis* MB 2579; NFF 02; *Aspergillus aureoluteus* NFC1; *Paecilomyces fulvus* PFF 01; *Paecilomyces niveus* PNT 01; PNDC 01; PNB1 01; e *Paecilomyces variotii* PV 01; PV 01; PVCH 03) to a fumigant sanitizer (ortho-phenylphenol) to chemical sanitizers (benzalkonium chloride, biguanide, iodine, peracetic acid, and sodium hypochlorite) and electrolyzed water (acidic and alkaline) and to evaluate the influence of different variables (type, concentration, exposure time, temperature, and presence of organic load absence) on the effectiveness of chemical sanitizers against the standard strain for sanitization tests *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). To assess the sensitivity of thermoresistant fungi to electrolyzed water and chemical sanitizers, as well as to assess the influence of variables on the effectiveness of sanitizers, the tests were carried out in accordance with the standards of the European Committee for Standardization (CEN), with adaptations. For the tests using the sanitizing smoke generator against the thermoresistant species, the norms of the French protocol NF-T-72281, specific for disinfectants spread by air, were followed. Among the sanitizers tested against the thermoresistant species, the peracetic acid (1%) and the smoke generator based on orthophenylphenol showed the best results compared to the tested species. The opposite was observed for the sodium hypochlorite and biguanide sanitizers, which were ineffective in relation to most of the studied species. The different concentrations of electrolyzed water tested, in both acid and alkaline types, were ineffective and did not reach the minimum reduction of 3 log UFC required by regulation. In addition, it was observed that the thermoresistant species showed variation in sensitivity when exposed to different compounds. Regarding the study of interfering factors, it was observed that all the variables tested influenced the antifungal efficacy of sanitizers against the standard strain *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). A presence of organic load was able to reduce a sanitizer efficacy by up to 1.5 log UFC. The concentration of product also had significant interference in the effectiveness of each compound, with the maximum concentration recommended by the manufacturer reaching the best microbial inactivation but even then not achieving the regulation requirements in some cases. Some compounds such as iodine and peracetic acid were more effective at higher temperatures (40 °C), whereas benzalkonium chloride showed better efficacy at 10 °C. The compound exposure time was also an important factor, and the minimum time of 5 minutes was not enough to guarantee the compound efficacy, being recommended the exposure of at least 15 minutes. The findings of this study are important but additional studies evaluating the sensitivity of fungal species isolated from particular spoiled products to sanitizers currently used in the food sector under different situations are necessary. Mainly due to fungal tolerance to these compounds that are well established by studies carried out by our research group. Thus, it is essential to define the conditions to achieve maximum effectiveness of these products and success in the hygiene process.

Keywords: Thermo-resistant fungi. Sanitation. Fungal control. Peracetic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida de espécies fúngicas termorresistentes.....20

Artigo 1

Figura 1 - Mapa de calor referente à redução de unidades formadoras de colônias (UFC) de sanitizantes contra espécies HRM e cepas padrão. Eficácia para sanitizantes líquidos: redução de pelo menos 3 log CFU nas contagens de fungos viáveis, de acordo com CEN 13697: 2015. * Eficácia para desinfetantes fumigantes redução de pelo menos 4 log UFC em contagens de fungos viáveis, de acordo com NF-T-72281.....32

Figura 2 - Mapa de calor demonstrando a redução da unidade formadora de colônias (UFC) da água eletrolisada contra espécies HRM e cepas padrão.....33

Artigo 2

Figura 1 (material suplementar) - Mapa de calor comparando os efeitos das diferentes variáveis testadas (tipo e concentração do sanitizante, presença ou ausência de carga orgânica, temperatura, tempo e concentração) na redução fúngica.....46

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Cepas de fungos usadas para testar a eficácia do desinfetante e fonte de isolamento..30

Tabela 2 - Composição dos desinfetantes comerciais testados, concentrações recomendadas em seus rótulos e solução neutralizante utilizada nos testes.....31

Tabela 3 - Água eletrolisada (EW) com seus respectivos valores de pH, potencial de oxidação e o neutralizador utilizado para ambos.....31

Artigo 2

Tabela 1 - Variáveis usadas para testes de eficácia antifúngica.....42

Tabela 2 - Influência de diferentes parâmetros (tipo e concentração do sanitizante, presença ou ausência de carga orgânica, temperatura, tempo e concentração) na eficácia antifúngica dos sanitizantes.....43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO GERAL	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 ESPÉCIES FÚNGICAS TERMORRESISTENTES E AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	19
3.2 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS NA EFICÁCIA DE SANTIZANTES QUÍMICOS.....	24
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS INTEGRADOS	28
4.1 ARTIGO 1 - Comparison of electrolyzed water and multiple chemical sanitizer action against heat-resistant molds (HRM).	28
4.2 ARTIGO 2: Influence of type, concentration, exposure time, temperature, and presence of organic load on the antifungal efficacy of industrial sanitizers against <i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404).....	40
5 DISCUSSÃO GERAL	43
6 CONCLUSÃO GERAL	51
7 REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são associados a diversos casos de deterioração de alimentos, devido à facilidade dos seus esporos serem transportados entre os ambientes de uma indústria de alimentos, tanto através do ar, água ou matérias-primas (DAMIALIS et al., 2017). Na sua maioria, os fungos apresentam sensibilidade às operações unitárias usadas para processamento térmico dos alimentos. No entanto, algumas espécies como *Paecilomyces fulvus* (anteriormente *Byssochlamys fulva*), *Aspergillus fischeri* (anteriormente *Neosartorya fischeri*), *Aspergillus spinosus* (anteriormente *Neosartorya spinosa*) conseguem sobreviver à esta barreira, e são denominadas termorresistentes (HOFFMANN, 2004; SALOMÃO et al., 2008).

O ciclo de vida de um fungo resistente ao calor é dividido na fase assexual, onde são produzidos conídios sensíveis ao calor, e fase sexual, em que são produzidos esporos altamente resistentes ao calor, chamados de ascósporos (DIJKSTERHUIS et al., 2007). Devido a esta característica, os ascósporos são capazes de tolerar processos de pasteurização e alta pressão, empregados pela indústria de alimentos e bebidas, predispondo a casos de deterioração principalmente em produtos à base de frutas, visto que a fase sexual muitas vezes ocorre no solo (PITT & HOCKING, 1997; SILVA et al., 2014). Além dos prejuízos econômicos causados, algumas espécies fúngicas termorresistentes são potencialmente produtoras de micotoxinas, podendo trazer riscos à saúde dos consumidores (FRISVAD & SAMSON, 1991; SANT'ANA et al., 2010).

O controle da contaminação microbiana do ar ambiente, superfícies de equipamentos e utensílios pode ser efetuado com a adoção de medidas higiênicas-sanitárias ao longo do processamento dos alimentos (KUAYE, 2017). Além disso, o controle das matérias-primas é essencial, visto que podem possuir uma alta contaminação com esporos fúngicos termorresistentes, resultando em produtos não estáveis e/ou inseguros para o consumo (TRANQUILINI et al., 2017). No entanto, para o sucesso no processo de higienização é necessário conhecer a sensibilidade do micro-organismo considerado problema ao princípio ativo que está sendo utilizado. Estudos recentes demonstram que espécies fúngicas possuem diferença de sensibilidade quando expostas a diferentes sanitizantes (BERNARDI et al., 2018; BERNARDI et al., 2019).

Entretanto, outros fatores devem ser considerados importantes para a realização de um processo de higienização eficaz. Parâmetros como concentração do sanitizante, tempo de exposição, temperatura em que é realizado o processo e presença de matéria orgânica também devem ser observados. Estudos demonstraram que a eficácia de alguns sanitizantes pode ser

afetada pela presença de matéria orgânica (SHEN, 2014; TENG et al., 2018), que é extremamente comum na indústria de alimentos (CHEN & HUNG, 2017); pela temperatura e tempo de aplicação do composto (BELTRAME et al., 2012) e pela concentração do produto (BERNARDI et al., 2019; LEMOS et al., 2020). No entanto, existem poucos estudos que avaliam a interferência destes diferentes parâmetros, quando combinados, sobre a eficácia dos agentes sanitizantes para o controle fúngico.

Apesar da evolução do conhecimento sobre a interação fungos e sanitizantes apresentada à comunidade científica principalmente pelo nosso grupo de pesquisa em anos recentes, informações disponíveis na literatura sobre as principais condições de uso mais adequadas para os sanitizantes químicos frente a espécies fúngicas seguem escassas, assim como informações sobre a resistência de espécies fúngicas termorresistentes aos sanitizantes comumente utilizados na indústria de alimentos. Além disso, ainda existe uma lacuna de informações na literatura sobre a eficácia de águas eletrolisadas frente a espécies fúngicas termorresistentes. Dessa maneira, a partir das informações trazidas anteriormente, ressaltamos a importância da realização desse estudo para sanar essas lacunas ainda existentes, contribuindo para que o processo de higienização realizado na indústria de alimentos seja cada vez mais eficaz, colaborando para a redução das perdas devido a espécies fúngicas deteriorantes.

2 OBJETIVO GERAL

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade de fungos termorresistentes a águas eletrolisadas e cinco sanitizantes comerciais líquidos e um fumigante, e verificar a influência de diferentes parâmetros sobre a eficácia de sanitizantes químicos frente a *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), cepa padrão para testes com sanitizantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a eficácia individual de cinco sanitizantes líquidos (ácido peracético, biguanida, cloreto de benzalcônio, hipoclorito de sódio e iodo) e um sanitizante gerador de fumaça a base de ortofenilfenol, ambos autorizados para o uso em indústrias de alimentos, frente a isolados fúngicos termorresistentes das espécies *Paecilomyces*

variotii, *Paecilomyces niveus*, *Paecilomyces fulvus*, *Aspergillus australensis* e *Aspergillus aureoluteus* e duas cepas padrão *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) e *Candida albicans* (ATCC 24433).

- Testar a atividade *in vitro* de diferentes águas eletrolisadas (ácida e alcalina) na redução da contaminação por fungos resistentes ao calor.
- Avaliar a influência de parâmetros como concentração do agente, tempo de exposição, temperatura do processo e presença de matéria orgânica, sobre a eficácia de quatro sanitizantes químico (ácido peracético, cloreto de benzalcônio, hipoclorito de sódio e iodo) frente ao *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESPÉCIES FÚNGICAS TERMORRESISTENTES E AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os fungos filamentosos termorresistentes estão associados a diversos casos de deterioração de produtos alimentícios termicamente processados, como geleias, sucos, purês, frutas enlatadas, pela sua capacidade de resistir aos processos de alta pressão e pasteurização (FRAC et al., 2015; SILVA et al., 2014; SILVA & GIBBS, 2009). Os gêneros que estão mais comumente relacionados à deterioração destes produtos são *Paecilomyces* (anteriormente *Byssochlamys*), *Aspergillus* (anteriormente *Neosartorya*), *Talaromyces* (anteriormente *Penicillium*) e *Penicillium* (anteriormente *Eupenicillium*) (HOCKING & PITT, 2009; HOUBRAKEN & SAMSON, 2017).

A resistência térmica dos micro-organismos, em geral, é bastante limitada. Conforme a Figura 1, na fase assexuada (conidial) representado a esquerda, os fungos filamentosos são destruídos após 5 minutos em 60 °C, semelhante ao comportamento das células vegetativas bacterianas (TOURNAS, 1994). No entanto, alguns micro-organismos resistem ao tratamento térmico pela capacidade de produzirem esporos sexuais, os chamados ascósporos (produzidos pelos representantes do filo Ascomycota) representados ao lado direito da Figura 1. Com a aplicação de calor no processo de pasteurização, esses esporos são ativados, saindo do seu estado de dormência, que permite a germinação e o crescimento quando estão em condições favoráveis (BEUCHAT, 1986; SPLITTSTOESSER et al., 1993).

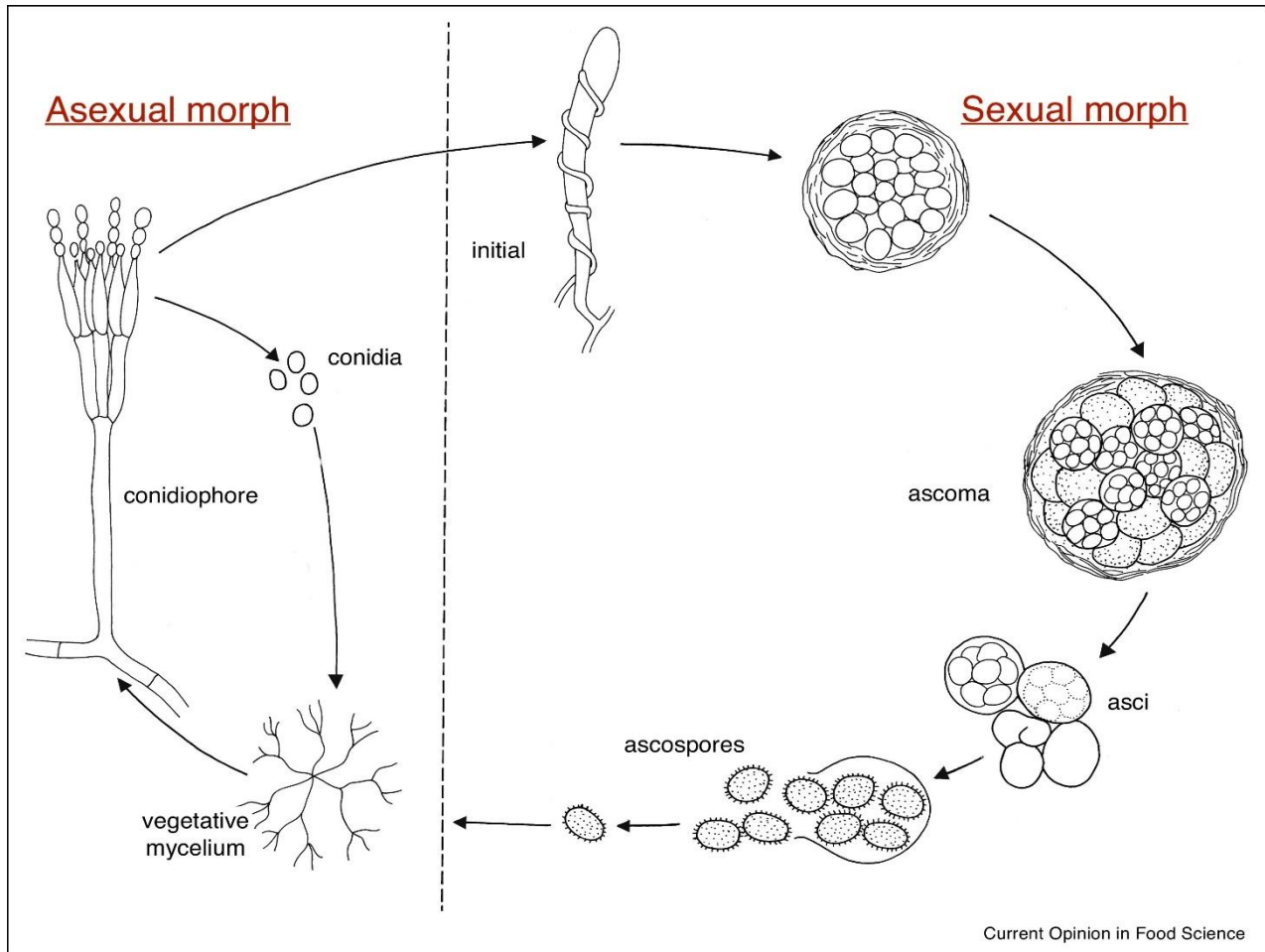


Figura 1: Ciclo de vida de espécies fúngicas termorresistentes.
 Fonte: Rico-Munoz & Santos, 2019.

O primeiro estudo relacionado a fungos termorresistentes foi realizado na Inglaterra nos anos 30. Olliver & Rendle (1934), reconheceram a espécie *Paecilomyces fulvus* (*Byssochlamys fulva*) como a primeira espécie fúngica termorresistente deteriorante de enlatados a base de frutas e produtos engarrafados. A partir disso, devido ao aumento da diversidade de produtos à base de frutas ofertados pelo mercado, outras espécies foram identificadas como termorresistentes.

A presença da espécie *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) foi relatada como deteriorante de produtos vegetais ácidos (KAVANAGH et al., 1963). Hocking & Pitt (1984), observaram em diversas ocasiões a contaminação fúngica em sucos de frutas com o gênero *Penicillium*. Outros gêneros como *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Penicillium* foram isolados de polpas de morango que haviam passado por um tratamento térmico a 70 °C/2 horas (ARAGÃO, 1989).

Diversos estudos foram realizados, comparando a resistência térmica de diferentes espécies fúngicas termorresistentes (KING JUNIOR, 1997; KOTZEKIDOU, 1997; SLONGO & ARAGÃO, 2007). Welke et al. (2009), relataram que a pasteurização empregada para a produção

do suco de maçã não é eficaz para eliminar esporos do gênero fúngico *Paecilomyces*, sendo essencial o controle desta contaminação através da adoção de boas práticas na colheita, transporte e armazenamento dessas frutas.

Ferreira et al. (2011), avaliaram a termorresistência das espécies *Paecilomyces fulvus* e *Paecilomyces niveus* (*Byssosclamyces nivea*), isoladas de néctar de maracujá e abacaxi. O processo de pasteurização empregado pela indústria alimentícia não foi suficiente para a inativação de isolados destas espécies. Os autores também observaram, que a espécie *P. niveus* se mostrou mais resistente que a espécie *P. fulvus*.

A resistência ao tratamento térmico das espécies *Talaromyces flavus* e *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*), foi verificada por Scott & Bernard (1987). Os autores relatam que sob certas condições, e se os ascósporos estiverem em quantidades suficientes, as duas espécies testadas são capazes de resistir ao processo térmico. Kotzekidou (1997), observou o crescimento de uma determinada cepa de *Paecilomyces fulvus*, em polpa de tomate concentrada, mesmo após o tratamento térmico de 90 °C/20 minutos.

Além dos problemas econômicos para as indústrias de alimentos causados por fungos termorresistentes, Sant'ana et al. (2010) relataram que alguns gêneros são capazes de produzir micotoxinas, em elevadas concentrações, se tornando um risco a saúde do consumidor. A espécie *Talaromyces flavus* é capaz de se desenvolver em condições aeróbicas e microaeróbicas, podendo produzir micotoxinas como talaromicina ou mitorrubrina (PROKSA, 2010). *Paecilomyces sp.* são conhecidos por sintetizar diversas micotoxinas, incluindo a patulina. Vários estudos demonstraram nas últimas décadas que a patulina pode causar problemas de saúde ao consumidor devido à sua toxicidade, a União Europeia (2006) estabelece níveis máximos permitidos de patulina de 50 µg/mL em sucos de maçã, o mesmo é estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o Brasil (BRASIL, 2021; DALIÉ et al., 2010; PUEL et al., 2010; SANZANI et al., 2012).

Para o controle e inativação desses esporos termorresistentes, o aumento da temperatura nos processos industriais seria a maneira mais prática, porém, a utilização de temperaturas elevadas pode provocar perda de nutrientes e aromas devido a fácil volatilização de compostos, no caso de sucos. Sendo assim, além das boas práticas na colheita, transporte e armazenamento, deve-se ter o cuidado com a contaminação do ar ambiente de salas de processamentos de alimentos. Muitos estudos relatam que o ar é um importante meio de contaminação (GARCIA et al., 2019; MASOTTI et al., 2019; PARUSSOLO et al., 2018; SANTOS et al., 2016).

Em um estudo realizado por Garcia et al. (2019), foi avaliado a correlação da contaminação fúngica do ar ambiente em padarias com o nível de adequação das boas práticas de fabricação pela aplicação do checklist. Neste estudo, os autores observaram uma alta contaminação do ar ambiente, apesar das padarias apresentarem, em sua maioria, uma classificação considerada como boa para o nível de adequação das boas práticas de fabricação.

O ar ambiente atua como meio de transporte, permitindo a disseminação dos micro-organismos (CURIEL et al., 2000). Na forma de aerossóis, partículas microscópicas líquidas ou sólidas, os micro-organismos são facilmente translocados pelas correntes de ar entre os diferentes ambientes das indústrias de alimentos (FERGUSON et al., 2019; MULLANE et al., 2007). A implementação de medidas regulares de desinfecção do ar, contribuem para melhorar a vida útil e segurança dos produtos. Uma alternativa para o controle da contaminação do ar ambiente, são os sanitizantes geradores de fumaça, por serem considerados relativamente baratos e de fácil manuseio (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

São autorizados para a desinfecção em indústria de alimentos, geradores de fumaça a base de ortofenilfenol (OPP) (ANVISA, 2013). Os fenóis possuem não só ação bactericida, como ação fungicida, agem desnaturando as proteínas e na parede celular das células. Em um estudo realizado por Bernardi et al. (2019), o sanitizante gerador de fumaça a base de ortofenilfenol obteve melhores resultados no controle da espécie toxigênica *Aspergillus westerdijkiae*, quando comparado aos sanitizantes químicos.

Além da contaminação do ar ambiente, é de extrema importância o controle da contaminação fúngica das superfícies de equipamentos, utensílios e matérias-primas. Saneantes químicos clorados, como hipoclorito de sódio, atuam oxidando as proteínas nas células pelo ácido hipocloroso (RUTALA et al., 1997) e são amplamente utilizados pela indústria alimentícia, por serem compostos antimicrobianos de amplo espectro, apresentarem atividade mesmo em baixas temperaturas e baixo custo (KUAYE, 2017; WAGHMARE & ANNAPURE, 2015). Por outro lado, este composto pode irritar a pele, vias respiratórias e a mucosa dos manipuladores (RACIOPPI et al., 1994). Além disso, sempre que o hipoclorito de sódio for utilizado como desinfetante, deve ser realizada uma pré-limpeza, devido que o cloro pode reagir com a matéria-orgânica presente, diminuindo a sua atividade antimicrobiana (JAGLIC et al., 2012; WOOD, 1992).

O ácido peracético vem sendo mencionado como um saneante bastante eficaz no controle de micro-organismos. Flores et al. (2019), observaram em seu estudo, a eficácia bactericida do ácido peracético na concentração de 1% para diferentes cepas de bactérias patogênicas como *Salmonella* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aureginosa e *Listeria monocytogenes*. Espécies fúngicas deteriorantes de produtos de panificação também apresentaram baixa resistência quando expostas a este composto (BERNARDI et al., 2019). Este agente, além de seu composto ativo, contém em sua composição peróxido de hidrogênio e ácido acético (MCDONNELL et al., 2002). Além de ser considerado um importante composto antimicrobiano, o ácido peracético não deixa resíduos, não produz subprodutos prejudiciais ao meio ambiente, é considerado de baixo custo e apresenta um nível menor de corrosão, diferente de outros saneantes como o hipoclorito de sódio (ABREU et al., 2013; CHASSOT et al., 2006).

Compostos quaternário de amônia também são comumente utilizados na indústria de alimentos. Dentre eles, o cloreto de benzalcônio é um agente antimicrobiano que possui um amplo espectro, agindo contra fungos, bactérias e vírus (FAZLARA & EKHTELAT, 2012). Outros saneantes químicos são autorizados para a utilização em indústrias de alimentos como iodo e derivados, biguanidas, peróxido inorgânico, aldeídos e fenólicos (BRASIL, 2007).

A utilização da água eletrolisada (AE) como possível agente antimicrobiano vem sendo estudada por diversos autores (ATHAYDE et al., 2017; CICHOSKI et al., 2019; OKANDA et al., 2019). O processo de eletrolisação da água faz uso dos elementos naturais da água, do sal e da eletricidade. Prange et al. (2005), descreveram a AE como uma solução gerada pela passagem de uma solução salina diluída, geralmente cloreto de sódio (NaCl), através de uma célula eletrolítica, que contém cloro livre como principal agente de inativação microbiana. A AE pode ser utilizada em diferentes formas: água eletrolisada ácida (AEA), água eletrolisada levemente ácida (AELA) e água eletrolisada básica (AEB). As diferenças entre essas águas eletrolisadas está na concentração de salmoura, tempo de eletrólise e corrente elétrica aplicada (HSU, 2005).

As principais vantagens na utilização da AE estão relacionadas ao menor impacto ao meio ambiente, visto que, não são adicionados produtos químicos tóxicos na sua produção, não representando nenhum risco a saúde dos manipuladores (MORI et al., 1997). A AE quando entra em contato com a matéria orgânica ou é diluída pela água da torneira ela se transforma novamente em água comum (TANAKA et al., 1999). O ponto negativo da AE é que a solução perde rapidamente sua atividade antimicrobiana, em torno de 90 dias, após isso, deve ser novamente fornecida de H₂, HOCl e Cl₂ por eletrólise (KIURA et al., 2002).

Lyu et al. (2018), avaliaram o efeito da AEA e AEB com diferentes valores de pH na eliminação da micotoxina desoxinivalenol (DON) e na inativação de fungos em grãos de trigo contaminados. As duas águas eletrolisadas testadas reduziram a contaminação de DON e de fungos nos grãos de trigo, no entanto, a AEA apresentou um efeito melhor sobre a qualidade dos grãos de trigo.

A água eletrolisada neutra (AEN) foi testada pelos autores Guentzel et al. (2010) para inativar culturas puras de *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola* para diminuir a infecção fúngica em superfícies de frutos. Os micro-organismos foram expostos por 10 minutos a água eletrolisada neutra, resultando em uma redução de 6 log UFC de ambos. A imersão de uvas em AEN, impediu sua infecção por 24 dias. Os autores concluem que a utilização da AEN pode aumentar a vida útil das frutas quando for realizada a higienização com a mesma antes da embalagem.

Diferentes concentrações de água eletrolisada foram aplicadas em carne de porco para avaliar a qualidade microbiológica e oxidativa da carne (ATHAYDE et al., 2017). Neste estudo, os autores relatam que nenhuma das AEs utilizadas aumentaram a oxidação lipídica da carne de porco e a combinação da AEA e AEB pode melhorar a qualidade microbiológica da carne.

O mecanismo de ação das águas eletrolisadas ainda não foi descrito, Al-haq et al. (2005) presumiram que a combinação de cloro, potencial hidrogeniônico (pH) e elevado potencial de oxirredução (ORP) são os principais fatores envolvidos na atividade antimicrobiana. A AEA possui um baixo valor de pH e altos valores de ORP, essas condições facilitam a entrada do agente antimicrobiano na membrana externa e interna dos micro-organismos (FABRIZIO & CUTTER, 2003).

Existem poucos estudos relacionados ao controle de fungos termorresistentes com a aplicação de diferentes tipos de saneantes. Mais pesquisas são necessárias para definir a melhor forma de controlar a contaminação dos alimentos por fungos resistentes ao calor (RICO-MUNOZ, 2017).

3.2 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS NA EFICÁCIA DE SANITIZANTES QUÍMICOS

O uso de sanitizantes químicos na indústria de alimentos é uma das principais ferramentas utilizadas para controlar a contaminação microbiológica (ANDRADE et al., 2018). Esses compostos, cujo uso é controlado por órgãos fiscalizadores, devem preferencialmente possuir um amplo espectro de ação, serem capazes de destruir os micro-organismos rapidamente, apresentar baixa corrosividade e serem estáveis nas diversas condições de uso. Dentre os princípios ativos autorizados estão ácido peracético, compostos clorados, compostos iodados e compostos de amônia quaternária, os mais utilizados pela indústria de alimentos (BRASIL, 2007).

O processo de higienização é considerado complexo, devido que a eficácia desses compostos pode ser afetada pela presença de substâncias interferentes, como matéria orgânica, a

concentração do produto, o tempo de exposição e a temperatura de aplicação (BELTRAME et al., 2012).

Durante a limpeza de equipamentos e superfícies na indústria alimentícia é relativamente comum a presença de matéria orgânica, como os componentes alimentares (proteínas, lipídios, polissacarídeos e aminoácidos) (ARAÚJO et al., 2013). Alguns estudos já relatam a baixa eficácia de alguns sanitizantes na presença dessas substâncias (CHEN & HUNG, 2017; FANG et al., 2016)

Em um estudo realizado por Jo et al. (2018), os autores avaliaram por meio de análises *in vitro*, o efeito de diferentes matérias orgânicas na concentração de cloro durante o processo de lavagem. Os resultados desse estudo mostraram que os compostos proteicos apresentam maiores efeitos prejudiciais do que os lipídios e os carboidratos na eficácia de desinfecção. Além disso, os autores relatam que o cloro foi consumido mais rapidamente onde continha a presença de matéria orgânica de carnes quando comparado a produtos vegetais.

O hipoclorito de sódio foi avaliado frente a 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. Esse composto foi avaliado na ausência e na presença de matéria orgânica (1% leite integral). Os autores concluíram que esse composto deve ser utilizado com pelo menos 200 ppm de cloro livre e resíduos orgânicos na superfície inferiores a 1% (BOTH et al., 1992).

Teng et al. (2018), realizaram um estudo fazendo uma abordagem do decaimento de cloro livre presente para a inativação de *Escherichia coli* (O157:H7) em condições de lavagem estabilizadas. Nesse estudo os autores relatam que a eficácia do sanitizante foi diminuída com o aumento da carga orgânica.

Os sanitizantes quaternário de amônio, ácido peracético, clorexidina, iodo e hipoclorito de sódio foram confrontados com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e dois pools das bactérias. Quando os desinfetantes agiram sobre os isolados na ausência de matéria orgânica, todos inativaram todas as bactérias sempre na menor concentração testada (MOLINA et al., 2010). Este estudo descrito anteriormente também reporta a importância do cuidado com o tempo de exposição do produto e a concentração do mesmo, fazendo com que esses equívocos possam acarretar na sobrevivência dos micro-organismos. Os sanitizantes apresentaram tempos e concentrações diferentes para serem eficazes frente aos micro-organismos estudados. As menores concentrações e os menores tempos de contato para inativação de todas as bactérias foram: quaternário de amônio 25 ppm/20 min ou 50 ppm/5 min; ácido peracético 6,25 ppm/10 min ou 25 ppm/5 min; clorexidina 12,5 ppm/15 min ou 200 ppm/5 min; iodo 50 ppm/5 min e hipoclorito de sódio 200 ppm/5 min (MOLINA et al., 2010).

Kich et al. (2004), avaliaram a eficácia de seis sanitizantes comerciais (amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo, hipoclorito de sódio (1 e 0,1%), fenol e ácido peracético) frente a *Salmonella* sp. Esse trabalho foi conduzido em duas etapas, primeiramente foram testados na presença e ausência de matéria orgânica pelo tempo de 15 minutos e depois 5 minutos. Todos os sanitizantes foram eficazes na ausência de matéria orgânica, somente o hipoclorito de sódio (1%), fenol e o ácido peracético foram eficazes na presença da mesma. Os desinfetantes a base de hipoclorito de sódio (1%), fenol e ácido peracético foram os mais eficazes frente a todas amostras testadas após cinco minutos de contato.

O ácido peracético foi testado frente a diferentes bactérias consideradas problema na indústria da carne, como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Os autores descrevem que esse composto apresentou resultados satisfatórios em em concentração e tempo de contato inferior aos sugeridos pelos fornecedores, reforçando ainda mais a importância de estudar cada sanitizante em diferentes variáveis de aplicação (BELTRAME et al., 2012).

Concentrações dos sanitizantes inadequadas podem afetar diretamente no sucesso do processo de higienização. Lemos et al. (2020) avaliaram a eficácia de diferentes sanitizantes em três concentrações para cada composto frente a espécies de *Aspergillus* toxigênicos. Dentre os resultados desse estudo, o ácido peracético foi eficaz frente a duas cepas de *A. ochraceus* produtoras de ocratoxina A na concentração mais baixa testada. Por outro lado, o hipoclorito de sódio mesmo na concentração mais alta testada foi ineficaz frente a espécies fúngicas toxigênicas.

Bernardi et al. (2019) também apresentaram variações de eficácia conforme a concentração de cada composto. Cepas fúngicas responsáveis pela deterioração de produtos de panificação foram testadas contra cinco sanitizantes em três concentrações diferentes. O cloreto de benzalcônio foi eficaz frente a todas as cepas de *Penicillium roqueforti* nas três concentrações testadas. Já o quaternário de amônio, em ambas as concentrações testadas para esse composto não foi eficaz para a cepa de *P. roqueforti* (PR 67).

A temperatura de cada composto no momento da exposição também deve ser considerada um parâmetro de suma importância (NASCIMENTO et al., 2010). Beltrame et al. (2012) avaliaram a eficácia de quatro sanitizantes comerciais (ácido peracético, clorexidina, amônio quaternário e uma mistura de ácidos orgânicos) frente as bactérias *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. O ácido peracético apresentou eficácia na temperatura de 10 °C frente a todos os micro-organismos testados, a clorexidina apresentou um aumento da eficácia

na temperatura de 45 °C, o amônio quaternário foi eficaz em ambas as temperaturas 10 e 45° C e os ácidos orgânicos apresentaram baixa eficácia em ambas as temperaturas testadas.

Nascimento et al. (2010) apresentaram como uma das principais vantagens do ácido peracético a sua eficácia em baixas temperaturas, os compostos iodoforos por sua vez não devem ser aplicados a temperatura superior de 45 °C. Camilotti et al. (2015) avaliaram a eficácia do composto químico cloreto de benzalcônio frente a *Salmonella radar*, isolada de carcaças de aves. Esse composto foi testado em duas temperaturas diferentes 20 ± 2 °C e 8 ± 2 °C. Os autores relatam que o cloreto de benzalcônio foi eficaz na temperatura de 20 °C para todos os isolados de *Salmonella radar*, quando exposto na temperatura de 8 °C teve a sua eficácia reduzida, sendo um fator que limita a indicação do seu uso.

A partir dos trabalhos descritos acima, observamos a carência de estudos que corroborem a influência de diferentes fatores e condições de uso na eficácia antifúngica desses sanitizantes, micro-organismos que são responsáveis por boa parcela das perdas econômicas devido a deterioração dos produtos alimentícios. Estudos mais aprofundados sobre esse assunto, com resultados direcionados para a realização de um processo higiênico cada vez mais satisfatório visam contribuir para as indústrias de alimentos em geral, fazendo com que a vida útil desses produtos seja mais longa e segura.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS INTEGRADOS

4.1 ARTIGO 1: Comparação de água eletrolizada e ação de sanitizantes químicos múltiplos frente a fungos resistentes ao calor (HRM).

Comparison of electrolyzed water and multiple chemical sanitizer action against heat-resistant molds (HRM).

Artigo publicado no periódico International Journal of Food Microbiology, ISSN 0168-1605, Área de avaliação em Ciência dos Alimentos, Classificação A1.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Comparison of electrolized water and multiple chemical sanitizer action against heat-resistant molds (HRM)

Andrieli Stefanello, Lísia Nicoloso Magrini, Jéssica Gonçalves Lemos, Marcelo Valle Garcia, Angélica Oliver Bernardi, Alexandre José Cichoski, Marina Venturini Copetti*

Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria - UFSM, Postal 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Fungi
Sanitization
Food industry
Smoke Tech
Peracetic acid
Benzalkonium chloride

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the sensitivity of heat-resistant molds isolated from spoiled thermally processed foods to antimicrobial compounds used for food industry sanitation. An ortho-phenylphenol-based smoke generator sanitizer, liquid chemical sanitizers (benzalkonium chloride, biguanide, iodine, peracetic acid, and sodium hypochlorite), and acidic and alkaline electrolyzed water were used against *Aspergillus australensis* (MB 2579; NFF 02), *Aspergillus aureoluteus* (NFC1), *Paecilomyces fulvus* (PFF 01), *Paecilomyces niveus* (PNT 01; PNDC 01; PNB1 01), and *Paecilomyces variotii* (PV 01; PV 01; PVCH 03). The fungal strains were exposed separately to liquid sanitizers and electrolyzed water in stainless steel discs for 15 min following the European Committee for Standardization (CEN) recommendations. Moreover, the fungal strains were exposed to the smoke generator sanitizer for 7 h following French protocol NF-T-72281. The best results of fungal inactivation were achieved when the highest concentration specified in the label of these sanitizers was tested. On the opposite, the lowest concentration specified in the label should be avoided since it was ineffective in most cases (94%). The ortho-phenylphenol-based smoke generator sanitizer and peracetic acid (1%) showed the best results of spore inactivation, while iodine and benzalkonium chloride achieved satisfactory results against the strains evaluated. Sodium hypochlorite and biguanide were ineffective against most of the fungi studied at all concentrations tested. Acidic and basic electrolyzed water was also ineffective to achieve the 3-log CFU reduction required in the concentrations tested. In general, *Paecilomyces* spp. was more sensitive than *Aspergillus* spp. against all sanitizers evaluated, whereas *A. aureoluteus* NFC1 was resistant to all agents and concentrations tested. The heat-resistant fungal strains showed varied sensitivity against the different agents. Notably, the two most effective commercial sanitizers against the heat-resistant strains were ineffective against the filamentous fungi recommended for sanitizer testing (*A. brasiliensis* ATCC 16404), which demonstrates the relevance of testing fungal isolates that cause spoilage to choose the most effective compound and obtain the best results of fungal control.

1. Introduction

Heat-resistant molds (HRM) are responsible for the spoilage of various thermally processed products, especially pasteurized fruit-based products such as juices, canned fruits, concentrates, fruit pulp, and jellies (dos Santos et al., 2018; Scaramuzza and Berni, 2014; Silva et al., 2014; Tranquillini et al., 2017). The most common heat-resistant species in food spoilage are *Paecilomyces fulvus* (formerly *Byssoschlamys fulva*), *Aspergillus spinosus* (formerly *Neosartorya spinosa*), *Paecilomyces niveus* (formerly *Byssoschlamys nivea*), and *Paecilomyces variotii* (formerly *Byssoschlamys spectabilis*) (Beuchat and Pitt, 2001; Hoffmann, 2004; Nakayama et al., 2010; Salomão et al., 2008; Sant'Ana et al., 2010; Ueda et al., 2010).

The thermal resistance of these fungi is attributed to the production of heat-resistant spores within a mother cell, the so-called ascospores (Panagou et al., 2010; Pitt and Hocking, 2009). Ascospores can survive pasteurization and high-pressure procedures, which may lead to major economic losses in the food industry (Filipa and Silva, 2020; Sant'Ana et al., 2009). Recent studies have reported that ascospores of the species *P. niveus* and *Aspergillus fisheri* were not inactivated in the thermal process of 75 °C for 30 min (Evelyn and Silva, 2015; Evelyn et al., 2016). In addition, some HRM are potentially mycotoxin-producing species, including fumitremorgins (A, B, C), verruculogen, patulin, and byssochlamic acid, which may cause consumer health problems when ingested (Kotzekidou, 2014; Tournas, 1994).

Several methods considerably reduce HRM contamination in raw

* Corresponding author.

E-mail address: mvc@smail.ufsm.br (M.V. Copetti).

materials, including the use of high-quality fruits for the production of different fruit-based products, washing the fruits with drinking water, and using disinfectants at appropriate concentrations (Rico-Munoz, 2017). However, reducing fungal contamination in fruit surfaces is a challenge, with molds having higher resistance when compared with bacteria (Sapers, 2002; Wei et al., 2017).

Moreover, the HRM ascospores and conidia present in the environment (including air) of the food industry usually arrive through raw materials and can be dispersed to all areas of the production facilities, thus, they may deposit on the work surfaces and equipment, consequently coming into contact with other raw materials, packages, packing devices, and ingredients. For example, dos Santos et al. (2018) observed that *Aspergillus fumigatus* (23.6%), *Aspergillus fischerianus* (16.1%), and *A. niveus* (5.1%) were isolated from samples collected throughout the processing area of pasteurized high-acid fruit products.

Rico-Munoz (2017) showed that the presence of ascospores in processing environments is widespread and was the most concentrated in the areas of empty bottle receiving, the depalletizer, and palletizer, although these organisms were also found in slip sheets between empty bottles, wooden pallets, palletizers, cap boxes, airveyors, and bottle conveyors, as well as many of the processing areas tested. Because ascospores can survive most thermal processes, once they reach the manufactured food, either through the raw materials or processing environment, the HRM can subsequently spoil the final product. Hence, preventing the spoilage of heat-processed products by HRM requires reducing or eliminating soil contamination and ascospores from the ingredients, packaging, and processing environment (Rico-Munoz, 2017).

Parussolo et al. (2019) reported that air contamination by fungal spores is a critical control point for food contamination. It is not possible to dissociate air and work surface contamination because, eventually, the spores dispersed as aerosols will deposit on the surfaces of foods, facilities, and equipment. Therefore, it is important to properly adopt the correct hygienic-sanitary measures and sanitation processes (Kuaye, 2017). Furthermore, choosing an active principle that is effective against HRM influences the success of the sanitization process and reduces contamination in the production environment and on the surface of raw materials, which may decrease the number of products contaminated by HRM during the manufacturing process. Additionally, selecting effective sanitizer concentrations, as well as defining the exposure time against this group of microorganisms is essential for successful ascospore inactivation (Dijksterhuis et al., 2018; Rico-Munoz and Santos, 2019).

Conventional chemical compounds such as chlorine, peroxide, and other commercial liquid sanitizers are the most commonly used methods to minimize microbial contamination in the food industry due to their low prices and antimicrobial efficacy (Visvalingam and Holley, 2018). On the other hand, these compounds may produce by-products that are harmful to consumer health, including trihalomethanes (THMs), organohalogen by-products and others (Bull et al., 2011; Kinani et al., 2016). Menegaro et al. (2016) reported that the main sanitizing agents used in the food industry in southwestern Parana (Brazil) were sodium hypochlorite (70%), peracetic acid (20%), and biguanide (10%) for the sanitation of equipment and utensils, while sodium hypochlorite (60%), peracetic acid (20%), and other compounds (e.g. biguanide and quaternary ammonia) (20%) were used for the facilities.

Smoke generator sanitizers are an interesting alternative for microbial control in the food industry, as they are considered cheap, easy to handle, and usually leave residue low concentrations (Chitarra and Chitarra, 2005; Sholberg et al., 2004). Since these sanitizers are dry and spread by the air, they can be applied in different kinds of industrial environments and easily spread through the facilities, acting against spores in aerosols and reaching points that are difficult to reach using liquid sanitizers.

However, due to growing restrictions on chemical sanitizers in the

food industry, innovative methods for microbial control are continuously being studied, such as the use of electrolyzed water (EW). Several studies have already reported the use of acidic EW as a disinfectant in the food industry (Athayde et al., 2017; Huang et al., 2008; Liu and Su, 2006; Wang et al., 2019), in addition to treating bacterial inactivation (Cichoski et al., 2019; Cui et al., 2009; Deza et al., 2003; Guentzel et al., 2008). Liu and Su (2006) applied acidic oxidized EW and reduced more than 4.6 log colony-forming units (CFU) of *Listeria monocytogenes* on seafood processing gloves. However, studies evaluating this efficacy against fungi are limited to in vitro studies with mycotoxigenic *Aspergillus* sp., such as one reporting low efficacy of EW (Lemos et al., 2020) and its application in wheat to inhibit *Fusarium* sp. growth (Audenaert et al., 2012; Lyu et al., 2018).

As previously mentioned, it is important to know the sensitivity of the main species involved in the spoilage of different classes of food products to the different sanitizers available in order to adequately choose the best method and agent for fungal control (Bernardi et al., 2019c). Nevertheless, information regarding the sensitivity of HRM to commercial sanitizers is still limited. After evaluating the ascospores of four HRM (*Aspergillus fischeri*, *Talaromyces macrosporus*, *Paecilomyces niveus*, and *Paecilomyces variotii*), Dijksterhuis et al. (2018) showed a clear variation in their sensitivity to acidified sodium chlorite, chlorine dioxide, and iodine solutions. No studies evaluating the efficacy of EW and smoke generators against this relevant group of fungi were found. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficacy of acidic and basic EW, five liquid commercial sanitizers (benzalkonium chloride, biguanide, iodine, peracetic acid, and sodium hypochlorite), and an ortho-phenylphenol-based smoke generator sanitizer, which are all allowed for use in the food industry against different heat-resistant strains of *Aspergillus* and *Paecilomyces* genera.

2. Materials and methods

2.1. Strains

Ten HRM strains isolated from spoiled thermally-processed foods and 2 standard strains recommended for chemical sanitizer testing were used in this assay (Table 1). The isolates were lyophilized and kept refrigerated until inoculation one week before the analysis.

2.2. Inocula preparation

Initial inocula were prepared by inoculating the lyophilized fungi in tubes containing Malt Extract Agar (MEA) [glucose, 20 g (Neon, Sao Paulo, Brazil); peptone, 0.1% (Himedia, Mumbai, India); malt extract, 30 g (Bacto™, MD, USA)] and incubating for 14 days at 30 °C to stimulate ascospore maturation. Mycelium scraping was performed using a sterile disposable handle cover and sterile Tween 80 aqueous solution (0.05%). This suspension was diluted with 0.1% sterile peptone water [peptone, 0.1 g (Himedia, Mumbai, India)], agitated in a vortex with

Table 1
Fungal strains used for testing sanitizer efficacy and source of isolation.

Strain	Source
<i>Paecilomyces variotii</i> PV 01	Grape juice
<i>Paecilomyces variotii</i> PV 02	Bread
<i>Paecilomyces variotii</i> PVCH 03	Chocolate
<i>Paecilomyces niveus</i> PNT 01	Grape juice
<i>Paecilomyces niveus</i> PNDC 01	Grape juice
<i>Paecilomyces niveus</i> PNBI 01	Isotonic drink
<i>Paecilomyces fulvus</i> PFF 01	Raspberry
<i>Aspergillus aureoliteus</i> NFC1	Fruit pulp
<i>Aspergillus australensis</i> MB 2579	Fruit pulp
<i>Aspergillus australensis</i> NFF 02	Raspberry
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	Nail infection
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC16404	<i>Vaccinium</i> sp.

Table 2

Composition of the commercial sanitizers tested, concentrations recommended in their label, and neutralizing solution used in the tests.

Sanitizer	Chemical composition	Concentrations	Neutralizing solution
Benzalkonium chloride ^b	Aquil dimethyl benzyl ammonium chloride (22.0%), neutralizing, supporting, chelating, carrier	(0.30, 1.20, and 2.00%)	Nutrient broth with 0.5% of Tween 80 and tryptone 1%
Biguanide ^c	Hexamethylene hydrochloride biguanide	(2.00, 3.50, and 5.00%)	Nutrient broth with 0.5% of Tween 80 and tryptone 1%
Iodine ^b	Iodine (3.80%), nitric acid, synergists, thickener, carrier	(0.20, 0.60, and 1.00%)	Nutrient broth with 0.6% of sodium thiosulphate
Peracetic acid ^{a,b}	Peracetic acid (4.00%), hydrogen peroxide (23.0%), glacial acetic acid, sequestrant, carrier	(0.30, 0.60, and 1.00%)	Nutrient broth with 0.6% of sodium thiosulphate
Sodium hypochlorite ^b	Sodium hypochlorite with (8.00%), sequestrant, carrier	(0.50, 0.75, and 1.00%)	Nutrient broth with 0.6% of sodium thiosulphate
Ortho-phenylphenol (Smoke Tech) ^f	Ortho-phenylphenol 15%, supporting, carrier	1 g/m ³	Nutrient broth with 0.5% of Tween 80 and tryptone 1%

^a Commercial Peracetic acid is sold in solution as a mixture with acetic acid and hydrogen peroxide for stability reasons.

^b Kalyclean, Brazil.

^c Higex, Brazil.

glass spheres, and then filtered in sterile glass wool. Standardization of the inoculum at a concentration of 10⁷ spores/mL (both conidia and ascospores) was performed using the Neubauer chamber (CRAL/C1010/Brazil) and later confirmed by surface inoculation on plates containing MEA. The samples were incubated for seven days at 30 °C.

2.3. Sanitizers and electrolyzed water preparation

The concentrations used for the liquid chemical sanitizers were defined as the minimum and maximum recommended by the manufacturer, plus an intermediate concentration (Table 2). All active principles tested were authorized by RDC No. 14/2007 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) for use in the food industry (Brasil, 2007).

The ortho-phenylphenol-based smoke generator sanitizer (SmokeTech, Higex, Brazil) was also authorized for use in the food industry. The exposure time selected was the maximum recommended by the manufacturer, which is 7 h (Table 2).

The EW was obtained from 0.05% sodium chloride (Dinâmica, Rio de Janeiro, Brazil) using a portable electrolyzer (Envirolyte, Tallin, Estonia). Three concentrations of EW were produced, which simultaneously resulted in acidic electrolyzed water (AEW) with distinct chlorine concentrations (60, 85, and 121 ppm) and 3 basic electrolyzed water (BEW) (Table 3).

2.4. Sanitizers and EW testing

The assays of liquid sanitizers and EW were performed according to the model proposed for antimicrobial efficacy tests by the European Committee for Standardization (European Standard 13697, 2001), with modifications in the initial spore concentrations (Bernardi et al., 2018). The fumigant test was performed following the standards of the Association Française de Normalization (AFNOR), French protocol NF-T-72281 (Norme Française, 2014), with adaptation, using 10 mL of recovering liquid instead of 100 mL as described in the standard technique.

Microorganisms were inoculated using 304 2-cm diameter stainless steel discs, in which a 50 µL aliquot of the previously obtained initial

suspension (10⁷ spores/mL) was deposited for the test. A solution of 0.05% reconstituted milk powder (Elegê, São Paulo, Brazil) was used to simulate the presence of organic matter. Three discs were used for the effective sensitivity test and two discs for the positive control. After inoculation, the discs were taken to an incubation oven at 35 °C for approximately 40 min to dry and fix the inoculum on the target site.

2.4.1. Liquid sanitizers and EW assays

A total of 100 µL of each sanitizer or EW at different concentrations were added separately to the discs containing the fixed fungal inoculum. At the same time, 100 µL of sterile distilled water was used for positive control. The contact time was 15 min.

After the exposure time, the discs were immersed in 10 mL of a specific neutralizing solution (Table 2) for 5 min, which was prepared weekly and stored at 5 °C until use. The purpose of using the neutralizer is to ensure that the antimicrobial agents only acted during the 15 min of exposure (Jaenisch et al., 2010). About 5 g of glass beads were added for easy detachment of the inoculum and recovery of viable cells. Serial dilutions were prepared in 0.1% peptone water [peptone, 0.1 g (Hi-media, Mumbai, India); distilled water, 1 L] and 1 mL of each dilution were added to sterile Petri dishes and then 20 mL of Malt Extract Agar was pour plated. Petri dishes were incubated at 30 °C for seven days and the colonies counted after. The results are expressed as log CFU. Heat shocks were not employed to avoid additional sources of stress in cells already stressed by sanitizers.

All tests were performed in triplicate and sanitizer efficacy was analyzed by the difference in logarithmic reduction between the positive control and the test according to European Standard N13697 (2001). The liquid sanitizers or EW were considered effective if they were able to reduce 3 log CFU (99.9%) of the initial amount of fungal cells recovered from the positive control according to European Standard N13697 (2001).

2.4.2. Smoke generator assays

The smoke generator sanitizer was used at a concentration of 1 g of product per m³ and for an exposure time of 7 h, according to the manufacturer's recommendations, after which the door was opened to ventilate for 15 min. This product is authorized by ANVISA for

Table 3

Electrolyzed water (EW) with its respective pH values, oxidation potential, and the neutralizer used for both.

EW	Neutralizing solution
Acidic	Alkaline
AEW (1) (pH 2.67; 1147 mV)	BEW (1) (pH 11.29; -869 mV)
AEW (2) (pH 2.65; 1120 mV)	BEW (2) (pH 11.12; -209 mV)
AEW (3) (pH 2.76; 1188 mV)	BEW (3) (pH 11.02; -909 mV)

sanitation in the food industry, however, it cannot get in contact with raw materials or food products.

Tests were performed in an enclosed room of approximately 32 m³. Hygienization of the room was performed before the tests to prevent contamination.

In the test room, the discs were positioned 2.6 m away from the point where the smoke generator was released, at an upright position, and with the surface where the fungal inoculum was placed in the opposite direction from where the disinfectant was triggered. With the discs in place, the smoke generator sanitizer was activated by removing the seal and lighting the wick. After seven hours of exposure, the discs were taken to the laboratory where both discs (positive control and exposed samples) were immersed in 5 g glass beads and 10 mL neutralizing solution for 5 min (Table 2). After inoculum detachment, serial dilutions were performed with 0.1% peptone water [peptone, 0.1 g (Himedia, Mumbai, India); distilled water (1 L)], and 1 mL of the dilutions were added on Petri dishes, where MEA was pour plated. The plates were incubated for five days at 30 °C. Heat shocks were not employed to avoid additional sources of stress on cells already stressed by sanitizers.

The tests were performed on two different days and the results were expressed as log CFU. According to NF-T-72281 (Norme Francaise, 2014), a smoke generator is considered effective if it can reduce 4 log CFU (99.99%) from the initial counting when compared to the non-exposed control.

2.5. Statistical analysis

Data analysis was performed by variance analysis (ANOVA). Fungal recovery after exposure to the sanitizers, electrolyzed water, and smoke generator sanitizer was analyzed by the Scott-Knott test ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed using SISVAR® software version 5.6 (Ferreira, 2011).

3. Results and discussion

Summarizing the findings of HRM reduction by the antimicrobial agents tested (Figs. 1 and 2), the best results were achieved using the ortho-phenylphenol-based smoke generator sanitizer (SmokeTech) and the liquid sanitizer peracetic acid, followed by iodine and benzalkonium chloride. The highest concentrations specified in the labels of these sanitizers are the ones recommended because they reflect the best results for fungal reduction. On the other hand, the lowest concentration specified in the label should be avoided since it was ineffective in most cases (94%).

Biguanide and sodium hypochlorite should not be used for HRM

control, at least in the concentrations usually recommended worldwide for use in the food industry, because they were unable to reduce the 3 log CFU of the tested strains at all tested concentrations.

Similar results were achieved by EW at all concentrations and types (acidic and alkaline) tested. Though their efficacy increased when increasing their concentration, EW were not able to induce at least 3 log CFU reduction in the viable fungal counts recovered from the positive control. Therefore, the EW cannot be considered effective in reducing HRM spores at safe levels in the concentrations tested here.

Regarding fungal sensitivity, the HRM strains evaluated showed different population reduction values when exposed to the different agents, making it important for the food industry to test fungal isolates causing trouble against the sanitizers available and raising awareness on which is the best active compound required for its control. Notably, the two most effective commercial sanitizers against HRM, according to this study (ortho-phenylphenol-based smoke generator and peracetic acid), were not effective against the standard filamentous fungi for sanitizer testing (*A. brasiliensis* ATCC 16404). This proves the relevance of testing fungal isolates causing spoilage problems as a way to reach the best results of fungal reduction in the production environment during sanitization and, consequently, in spoilage prevention. In the case of the HRM species tested here, if just the standard strain had been tested, the most effective agents for their control would have likely been discarded.

Among the HRM tested, in general, *Paecilomyces* spp. were more sensitive than *Aspergillus* spp. against all sanitizers. Furthermore, the *A. aureolutes* NFC1 strain was resistant to all agents and concentrations tested here.

3.1. Conventional agents for controlling HRM

The ortho-phenylphenol-based smoke generator sanitizer showed satisfactory results for eight of the ten HRM strains tested, showing a reduction of more than 4 log CFU, thus proving to be an important agent when aiming to control contamination by HRM species in the environment (including air) of the food industry.

Furthermore, the results found here differ from the data described by Bernardi et al. (2019a), who reported that several common food spoilage fungal strains exposed to an ortho-phenylphenol-based smoke sanitizer usually reduced 3 log CFU (99.9% population) instead of the 4 log CFU (99.99% population) required for this type of sanitizer.

The presence of HRM ascospores in the processing environment is widespread (Rico-Munoz, 2017). Recently, *P. variotii* ascospores have been isolated, representing the highest percentage of occurrence among heat-resistant fungal species isolated from the environmental air of processing rooms in a beverage industry (Rico-Munoz and Santos,

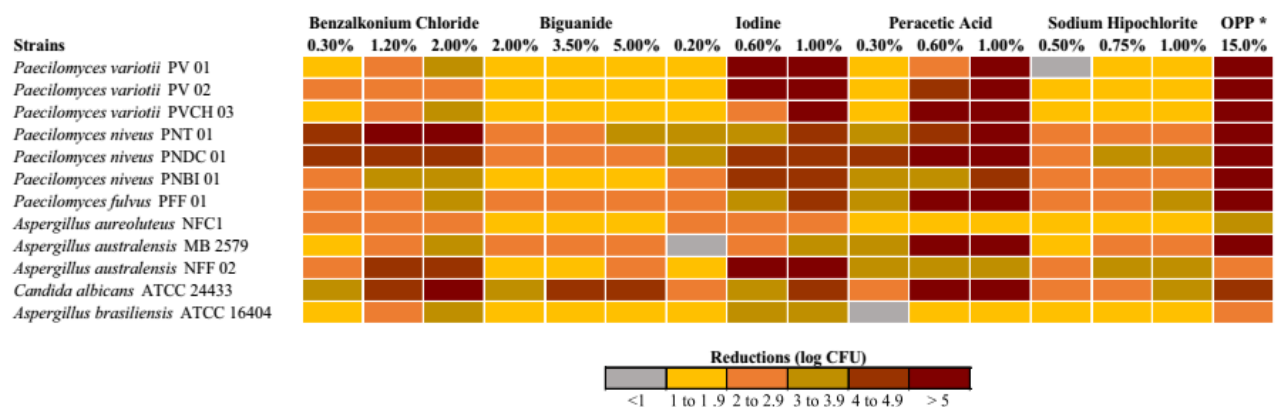


Fig. 1. Heat map referring to log colony-forming units (CFU) reduction of sanitizers against HRM species and standard strains. Efficacy for liquid sanitizers: at least 3 log CFU reduction in viable fungal counts, according to CEN 13697:2015. *Efficacy for fumigant sanitizers at least 4 log CFU reduction in viable fungal counts, according to NF-T-72281.

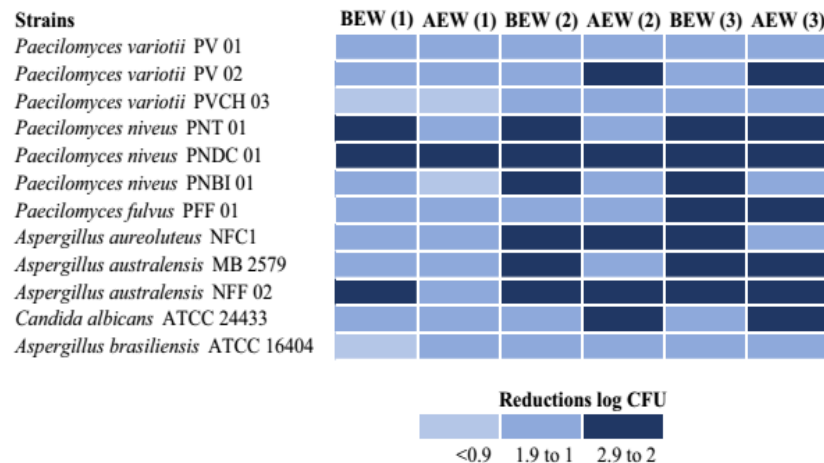


Fig. 2. Heat map demonstrating log colony-forming unit (CFU) reduction of electrolyzed water against HRM species and standard strains.

2019). Air acts as a transport medium for microorganisms in the form of aerosols, where microorganisms can reach the industry through raw materials and are easily distributed by the airstream to different industrial sites, making ambient air one of the main sources of contamination with fungal conidia or ascospores (Ferguson et al., 2019; Garcia et al., 2019).

Sholberg et al. (2004) described one positive aspect of employing smoke generator sanitizers, as they can access specific points of microbial contamination in the food industry, which other sanitizers, such as chemicals, do not normally have access to. Furthermore, these disinfectants are important for controlling microbial contamination in “dry food” industrial environments, such as the candy and flour industry. Smoke generator sanitizers can be very helpful in HRM control since, according to Rico-Munoz (2017), the highest ascospore concentrations are in areas that are usually cleaned using dry-cleaning methods (depalletizers, palletizers, ingredient storage areas, wooden pallets, packaging materials and their storage areas, airveyors, etc.).

On the other hand, ortho-phenylphenol products cannot be in contact with food and its handling should be performed with caution by food handlers, as this sanitizer is known to irritate the skin, eyes, and respiratory tract (PubChem, 2018).

Peracetic acid is an important antifungal agent and was effective at concentrations of 0.60 and 1.00% for eleven of the thirteen strains tested (85%), although it did not achieve a reduction at the intermediate concentration (0.60%) in just the *P. variotii* PV 01 and *A. aureoluteus* NFC1 strains. Bernardi et al. (2019b) evaluated the efficacy of different chemical sanitizers against spoilage fungal species of bakery products. The species tested (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*) showed similar behavior to those described here, which means low resistance to this acid at the intermediate and high concentrations. Lemos et al. (2020) also reported the good efficacy of this compound against ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae*.

Due to its antimicrobial activity, peracetic acid is an effective and safe alternative, in addition to having a low cost, leaving no residues, and not producing environmentally-harmful by-products (Chassot et al., 2006). Its mode of action is through cell membrane oxidation and it is not deactivated by catalase or peroxidase, which are enzymes that break down hydrogen peroxide and are part of the family of toxicologically safe acid disinfectants (McDonnell et al., 2002). However, this compound can be extremely irritating to the skin and mucous membranes of handlers and potentially corrosive to stainless steel (Andrade, 2008).

Iodine also showed great results for *P. variotii* strains at the highest concentrations tested (0.60; 1.00%), achieving reductions of more than 5 log CFU. At the same concentrations for the *P. niveus* strains, this

compound reduced between 4 and 5 log CFU. Iodine was also the sanitizer that showed the best results against aflatoxigenic *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, and *Aspergillus parasiticus* (Lemos et al., 2020).

The mechanism of action of iodine is known for the rapid penetration of its molecules into the cell wall of microorganisms, inactivating their cells, altering cell membranes, and impairing protein synthesis. This compound has a broad spectrum of action and acts against fungi, bacteria, and viruses (McDonnell, 2007). However, it can alter the odor and taste of food, besides possibly staining some plastic materials (Nascimento et al., 2010).

Benzalkonium chloride was only ineffective against *P. variotii* PV 02 and *A. aureoluteus* NFC 1 at all tested concentrations and did not achieve the minimum reduction of 3 log CFU. According to Kemper and White (1991), benzalkonium chloride is an effective disinfectant, and resistance to this compound by food-associated microorganisms is not common. This agent usually acts on the cell membrane of microorganisms, changes their permeability, causes cell depletion, and has a broad spectrum of action. On the other hand, the disadvantages of using this compound include high costs and low efficacy when in contact with proteins and acid media (Nascimento et al., 2010).

Sodium hypochlorite was not effective for any of the isolates at the lowest tested concentration recommended in the label by the manufacturer (0.50%; 400 ppm). Only three strains (*A. australensis* NFF 02, *P. fulvus* PFF 01, and *P. niveus* PNDC 01) were sensitive to the highest concentration tested of this agent (1%; 800 ppm). Since this agent appears to be the most common sanitizer used in the Brazilian food industry (Menegaro et al., 2016), its use for controlling food spoilage by HRM should be avoided.

Chlorine-based compounds are commonly used in numerous environments in the food industry and widely used to disinfect countertops, floors, and clean fruits and vegetables (Menegaro et al., 2016), although several studies have reported the low efficacy of sodium hypochlorite against fungi (Bernardi et al., 2019a, 2019b, 2019c; Lemos et al., 2020).

Biguanide presented the lowest efficacy and varied sensitivity among the strains and three concentrations tested. Previous studies have demonstrated the poor efficacy of biguanide for controlling spoilage fungi in the food industry (Bernardi et al., 2018, 2019b, 2019c; Lemos et al., 2020). Based on these results and previous studies, the use of this compound for microbial control is a cause for concern regarding molds. Biguanide is a sanitizer commonly used in the food industry of Brazil (Menegaro et al., 2016), mainly for bacterial control. *Aspergillus aureoluteus* (NFC1) showed low sensitivity and none of the chemical sanitizers achieved a 3 log CFU reduction in order to be considered effective, as proposed by CEN.

In general, *P. variotii* strains showed different sensitivity to the

different sanitizers tested and were the most resistant when exposed to different chemical sanitizers. Only peracetic acid, benzalkonium chloride, and iodine were effective (3 log CFU reduction) at the highest concentration. Among heat-resistant fungal species, the ascospores of this species can survive for more than 30 min at 85 °C (Houbraken et al., 2006). Since some food products need to undergo relatively high-temperature processes to eliminate heat-resistant spores, which ultimately reduces the nutrients and affects the sensory quality of these foods, reducing HRM load present before processing by employing adequate cleaning measures and disinfection of the environmental air, raw materials or the surfaces of equipment and facilities is extremely relevant.

P. niveus species is recognized as one of the major heat-resistant food spoilage species (Biang-Daniels et al., 2019). In addition to surviving thermal processing, this species can grow in finished products stored over a wide range of temperatures (4–38 °C) as a facultative anaerobic organism at low oxygen pressures (0.5%) (Taniwaki et al., 2009). Among the chemical sanitizers tested here, the strains of this species showed low resistance when exposed to intermediate and high concentrations of peracetic acid, benzalkonium chloride, and iodine sanitizers.

Dijksterhuis et al. (2018) evaluated the efficacy of different industrial disinfectants against HRM species and reported that *P. niveus* with low spore density showed sensitivity when exposed to iodine at a concentration of 75 ppm and an exposure time of at least 30 min, although it was unable to prevent the outgrowth of *P. variotii* when exposed to this same concentration for 60 min. The authors reported that some visible cell damage seemed to occur after iodine treatment.

3.2. Innovative agents for controlling HRM

The use of EW as a possible agent to replace sanitizers is quite recent in the food industry (Rahman et al., 2016). Due to the low number of agents authorized for use in the food industry and the tendency to reduce this number even more, besides the impacts of environmental chemical contamination caused by chemical sanitizers, EW is a sustainable alternative as no chemicals are added to their production. Additionally, EWs are not harmful to their handlers, unlike some sanitizers (Koseki et al., 2002; Lee et al., 2004).

The electrolyzing process of water uses natural elements of water, salt, and electricity. The production of EW is performed using an electrolytic cell, in which a saline solution is passed through, producing two types of water: acidic electrolyzed water (AEW) and basic electrolyzed water (BEW). Acidic electrolyzed water has a low pH and high potential for oxo-reduction, while BEW has a high pH value and low oxo-reduction potential (Hsu, 2005).

Lemos et al. (2020) evaluated EW efficacy in its acidic and basic form against toxigenic species of *Aspergillus*. The authors described that both types of water were ineffective against the different strains tested.

P. fulvus was one of the species that presented the highest resistance when exposed to EW, and the reduction of more than two log CFU occurred only in AEW (3) and BEW (3). This species is relatively important due to its high economic impact when spoiling heat processed beverages or foods. When compared to other species of the genus *Paecilomyces*, *P. fulvus* presented the highest heat resistance when submitted to typical heat treatments used in the food industry, presenting D values of 89.6 and 16.7 min at 80 and 85 °C (Hosoya et al., 2012).

Audenaert et al. (2012) evaluated whether neutral EW was capable of reducing the fungal growth of species of the genus *Fusarium* spp. in wheat grains. The authors described that neutral EW effectively reduced *Fusarium* spp. growth. However, the use of this water may trigger the biosynthesis of deoxynivalenol (DON), which is a mycotoxin produced by species of this fungal genus.

Two types of EW (acidic and alkaline) were also used to evaluate the inhibition of fungal growth in wheat grains. The authors described that

wheat grains treated with EW had lower fungal counts compared to wheat grains that were not treated with both acidic and alkaline EW (Lyu et al., 2018). The mechanism of action of EW is different for both types of water. For Park et al. (2004), AEW action is related to its low pH. The BEW or alkaline is a diluted solution of sodium hydroxide and its mechanism of action is related to the OH radical derived from HOCl (Abadias et al., 2012).

4. Conclusions

The present study evaluated the efficacy of different antimicrobials against HRM. The fungal species tested presented differences in sensitivity to the commercially available sanitizers to which they were exposed. In particular, peracetic acid and the ortho-phenylphenol-based smoke generator presented the best efficacy results against the HRM tested. Biguanide and sodium hypochlorite showed unsatisfactory results and should not be chosen by the food industry when the objective is to control HRM species through environment sanitization. Furthermore, both types of EW were ineffective and at the concentrations tested, however, further studies using higher concentrations are suggested. The application of effective sanitizers for the disinfection of fruit surfaces and food processing environments may contribute to reducing HRM contamination in packages, equipment, and products being manufactured, thus helping to improve spoilage prevention.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through Master's degree and PhD scholarships for J. G. L., A. S., and M.V.G. (Financial code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process 428454/2018-6), a research grant for M.V.C. (Process 303570/2019-9), and undergraduate scholarships for L.N.M. We thank Dr. Jens Frisvad for his assistance in identifying *Aspergillus* strains.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108856>.

References

- Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., Viñas, I., 2012. Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control* 27, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.032>.
- Andrade, N.J., 2008. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo, Varela, pp. 412.
- Athayde, D.R., Flores, D.R.M., Silva, J.S., Genro, A.L.G., Silva, M.S., Klein, B., Mello, R., Campagnol, P.C.B., Wagner, R., Menezes, C.R., Barin, J.S., Cichoski, A.J., 2017. Application of electrolyzed water for improving pork meat quality. *Food Res. Int.* 100, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.009>.
- Audenaert, K., Monbaliu, S., Deschuyffeleer, N., Maene, P., Vekeman, F., Haesaert, G., Saeger, S., Eeckhout, M., 2012. Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium* spp. in vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis. *Food Control* 23, 515–521.
- Bernardi, A.O., Stefanello, A., Garcia, M., Parussolo, G., Stefanello, R.F., Moro, C.B., Copetti, M.V., 2018. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. *LWT* 97, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.037>.
- Bernardi, A.O., Silva, T.S., Stefanello, A., Garcia, M., Parussolo, G., Dornelles, R.C.P., Copetti, M.V., 2019a. Sensitivity of food spoilage fungi to a smoke generator sanitizer. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.004>.
- Bernardi, A.O., Stefanello, A., Lemos, J.G., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2019b. Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: bakery spoilage fungi.

- Food Microbiol. 83, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.005>.
- Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2019c. Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Curr. Opin. Food Sci.* 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>.
- Beuchat, L.R., Pitt, J.I., 2001. Detection and enumeration of heat-resistant molds. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), *Compendium of the Methods for the Microbiological Examination of Food*. APHA, Washington, DC, pp. 217–222.
- Biango-Daniels, M.N., Snyder, A., Worobo, R.W., Hodge, K.T., 2019. Fruit infected with *Paeciliomyces niveus*: a source of spoilage inoculum and patulin in apple juice concentrate? *Food Control* 97, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.020>.
- Brasil. Resolução RDC n° 14 de 28 de fevereiro. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC n° 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF (2007). <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>, Accessed June 27, 2020.
- Bull, R.J., Reckhow, D.A., Li, X., Humpage, A.R., Joll, C., Hrudey, S.E., 2011. Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: haloquinones, halocyclopentene and cyclohexene derivatives, N-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines. *Toxicology* 286, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.05.004>.
- Chassot, A.L., Poisl, M.L., Samuel, S.M., 2006. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz. Dent. J.* 17, 117–121. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402006000200006>.
- Chitarra, M.L.F., Chitarra, A.B., 2005. Pós-Colheita de Frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio, 2 ed. UFPA, Brasil: Lavras, pp. 785.
- Cichoski, A.J., Flores, D.R.M., Menezes, C.R., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Wagner, R., Barin, J.S., Flores, E.M.M., Fernandes, M.C., Campagnol, P.C.B., 2019. Ultrasound and slightly acid electrolyzed water application: an efficient combination to reduce the bacterial counts of chicken breast during pre-chilling. *Int. J. Food Microbiol.* 301, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.004>.
- Cui, X., Shang, Y., Shi, Z., Xin, H., Cao, W., 2009. Physicochemical properties and bactericidal efficiency of neutral and acidic electrolyzed water under different storage conditions. *J. Food Eng.* 91, 582–586. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.006>.
- Deza, M., Araujo, M., Garrido, M., 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Lett Appl Microbiol.* 37, 482–487. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01433.x>.
- Dijksterhuis, J., Meijer, M., Doorn, T.V., Samson, R., Rico-Munoz, E., 2018. Inactivation of stress-resistant ascomycetes of *Eurotiales* by industrial sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.* 285, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.018>.
- dos Santos, J.L.P., Samapundo, S., Biyikli, A., Van Impe, J., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E.N., Sant'Ana, A.S., Devlieghere, F., 2018. Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. *Inter J Food Microbiol.* 281, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.019>.
- European Standard, 2001. Chemical Disinfectants and Antiseptics – Quantitative Non-Porous Surface Test for the Evaluation of Bactericidal and/or Fungicidal Activity of Chemical Disinfectants Used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas - Test Method and Requirements Without Mechanical Action (phase 2, step 2). Public review draft, n. 13697.
- Evelyn, F.V.M., Silva, 2015. Inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascomycetes in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.031>.
- Evelyn, H.J., Kim, F.V.M., Silva, 2016. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascomycetes in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control* 59, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.033>.
- Ferguson, R., Cumbrell, A.J., Whitby, C., 2019. Bioaerosol biomonitoring: sampling optimization for molecular microbial ecology. *Mol. Ecol. Resour.* 19, 672–690. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13002>.
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciê n e Agrotec.* 35, 1039–1042.
- Filipa, V.M., Silva, Evelyn, 2020. Resistant moulds as pasteurization target for cold distributed high pressure and heat assisted high pressure processed fruit products. *J. Food Eng.* 282, 109998. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109998>.
- Garcia, M.V., Bernardi, A.O., Parussolo, G., Stefanello, A., Lemos, J.G., Copetti, M.V., 2019. Spoilage fungi in a bread factory in Brazil: diversity and incidence through the bread-making process. *Food Res. Int.* 126, 108593. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108593>.
- Guentzel, J.L., Lam, K.L., Callan, M.A., Emmons, S.A., Dunham, V.L., 2008. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiol.* 25, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.08.003>.
- Hoffmann, M.V.G.S., 2004. Estudo de resistência térmica de *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Florianópolis, SC: Dissertação (Mestrado Engenharia Química). Universidade do sul de Santa Catarina, Santa Catarina, pp. 102.
- Hosoya, K., Nakayama, M., Matsuzawa, T., Imanishi, Y., Hitomi, J., Yaguchi, T., 2012. Risk analysis and development of a rapid method for identifying four species of *Byssoschlamys*. *Food Control* 26, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.024>.
- Houbraeken, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2006. *Byssoschlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. *Advances in Food Mycology*. 571, 211–224. https://doi.org/10.1007/0-387-28391-9_14.
- Hsu, S.Y., 2005. Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *J. Food Eng.* 66, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.003>.
- Huang, Y.R., Hung, Y.C., Hsu, S.Y., Huang, Y.W., Hwang, D.F., 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19, 329–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.012>.
- Jaenisch, R.F.F., Kuchiishi, S.S., Coldebella, A., 2010. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Cien Rural.* 40, 384–388.
- Kemper, R.A., White, W.C., 1991. Sustained reduction of aerobiological densities in buildings by modification of interior surfaces with silane modified quaternary amines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 47–58.
- Kinani, A., Kinani, S., Richard, B., Lorthioy, M., Bouchonnet, S., 2016. Formation and determination of organohalogen by-products in water - part I. Discussing the parameters influencing the formation of organohalogen by-products and the relevance of estimating their concentration using the AOX (adsorbable organic halide) method. *TRAC Trends Anal Chem* 85. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.008>.
- Koseki, S., Fujiwara, K., Itoh, K., 2002. Decontaminative effect of frozen acidic electrolyzed water on lettuce. *J. Food Prot.* 65, 411–414. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.2.411>.
- Kotzekidou, P., 2014. *Byssoschlamys*. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 344–350. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00051-3>.
- Kuaye, A.Y., 2017. Limpeza e Sanitização na Indústria de Alimentos, 1 ed. Rio de Janeiro, Cap, Brasil, pp. 6.
- Lee, J.H., Rhee, P.L., Kim, J.K., Kim, J.J., Paik, S.W., Rhee, J.C., Song, J.H., Yeom, J.S., Lee, N.Y., 2004. Efficacy of electrolyzed acid water in reprocessing patient-used flexible upper endoscopes: comparison with 2% alkaline glutaraldehyde. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 897–903. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03375.x>.
- Lemos, J.G., Stefanello, A., Garcia, M.V., Magrini, L.N., Silva, M., Copetti, M.V., 2020. Antifungal efficacy of food industries sanitizers against toxigenic fungi. *Food Res. Int.* 137, 109451. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109451>.
- Liu, C.C., Su, Y.C., 2006. Efficiency of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing gloves. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.004>.
- Lyu, F., Gao, F., Zhou, X., Zhang, J., Ding, Y., 2018. Using acid and alkaline electrolyzed water to reduce deoxynivalenol and mycological contaminations in wheat grains. *Food Control* 88, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.036>.
- McDonnell, G., 2007. Antisepsis, Disinfection and Sterilization. ASM Press, Washington, DC.
- McDonnell, G., Grignol, G., Antloga, K., 2002. Vapor phase hydrogen peroxide decontamination of food contact surfaces. *Dairy. Food and Environmental Sanitation.* 22, 868–873.
- Menegaro, A., Flores, A.F., Simer, P., Silva, F.I., Sbardelotto, P.R.R., Pinto, E.P., 2016. Sanitizantes: Concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. *Sci Agrar Paran.* 15, 171–174.
- Nakayama, M., Hosoya, K., Matsuzawa, T., Hiro, Y., Sako, A., Tokuda, H., Yaguchi, T., 2010. A rapid method for identifying *Byssoschlamys* and *Hamigera*. *J. Food Prot.* 73, 1486–1492. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.8.1486>.
- Nascimento, H.M., Delgado, D.A., Barbaric, I.F., 2010. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Revista Ceciliania* 2, 11–13.
- Norme Française, NF T 72-281, 2014. Procédés de désinfection des surfaces par voie aérobie - Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, mycobactéricide, tuberculocide sporicide et virucide incluant les bactériophages.
- Panagou, E.Z., Chelonas, S., Chatzipavlidis, I., Nychas, G.J.E., 2010. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Food Microbiol.* 27, 618–627. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.005>.
- Park, H., Hung, Y.C., Chung, D., 2004. Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00334-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00334-9).
- Parussolo, G., Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Stefanello, A., Silva, T.S., Copetti, M.V., 2019. Fungi in ar, raw materials and surface of dry fermented sausage produced in Brazil. *LWT.* 108, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.073>.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer, US.
- PubChem, 2018. Compound identifier: CID 7017. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7017>, Accessed date: 25 November 2019.
- Rahman, S.M.E., Khan, I., Oh, D.H., 2016. Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: current trends and future perspectives. *Compre Rev Food Sci.* 15, 471–490. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12200>.
- Rico-Munoz, E., 2017. Heat resistant molds in foods and beverages: recent advances on assessment and prevention. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.011>.
- Rico-Munoz, E., Santos, J.L.P., 2019. The fungal problem in thermal processed beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 29, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.003>.
- Salomão, B.C.M., Massaguer, P.R., Costa, C.A., Aragão, G.M.F., 2008. Influência de diferentes pH do meio de aquecimento na resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado do processo produtivo de néctar de maçã. *Alimentos e Nutrição.* 15, 115–117.
- Sant'Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssoschlamys fulva* ascomycetes in clarified apple juice. *J. Appl. Microbiol.* 107, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>.
- Sant'Ana, A.S., Simas, R.C., Almeida, C.A.A., Cabral, E.C., Rauber, R.H., Mallmann, C.A., Eberlin, M.N., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.017>.
- Sapers, G., 2002. Washing and Sanitizing Raw Materials for Minimally Processed Fruit

- and Vegetable Products. <https://doi.org/10.1201/9781420031850.ch11>.
- Scaramuzza, N., Berni, E., 2014. Heat-resistance of *Hamigeracavellana* and *Thermoascus crustaceus* isolated from pasteurized acid products. *Int. J. Food Microbiol.* 168-169, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.007>.
- Sholberg, P.L., Shephard, T., Randall, P., Moys, L., 2004. Use of measured concentrations of acetic acid vapour to control postharvest decay in d'Anjou pears postharvest. *Biol. Technol.* 32, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.014>.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P.A., Nunez, H., Almonacid, S., Simpson, R., 2014. Thermal processes: pasteurization. *Encyclopedia of Food Microbiol* 577–595.
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2009. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.005>.
- Tournas, V., 1994. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 243–263.
- Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Berni, E., 2017. Occurrence and ecological distribution of Heat Resistant Moulds Spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.023>.
- Ueda, S., Kawara, N., Yaguchi, T., Udagawa, S., 2010. Identification and heat-resistance characteristics of *Byssosclamyces lagunculariae*, a mold isolated from citrus raw material of spoiled fruit jelly products Japanese. *J. Mycol.* 51, 10. <https://doi.org/10.18962/jjom.jjom.H21-07>.
- Visvalingam, J., Holley, R.A., 2018. Evaluation of chlorine dioxide, acidified sodium chlorite and peroxyacetic acid for control of *Escherichia coli* O157: H7 in beef patties from treated beef trim. *Food Res. Int.* 103, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.051>.
- Wang, H., Duan, D., Wu, Z., Xue, S., Xu, X., Zhou, G., 2019. Primary concerns regarding the application of electrolyzed water in the meat industry. *Food Control* 95, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.049>.
- Wei, W., Wang, X., Xie, Z., Wang, W., Xu, J., Liu, Y., Gao, H., Zhou, Y., 2017. Evaluation of sanitizing methods for reducing microbial contamination on fresh strawberry, cherry tomato, and red bayberry. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02397>.

Table 1. Efficacy of commercial sanitizers against heat-resistant fungal species.

Benzalkonium chloride													
Strains	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433	
Initial count (log)	5.51 ^{aA}	5.66 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.54 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.27 ^{aA}	5.47 ^{aA}	5.45 ^{aA}	5.53 ^A	5.67 ^A	5.28 ^A	
	0.30%			0.30%			0.30%			0.30%	0.30%	0.30%	
Final recovery (log)	3.60 ^{bB}	3.26 ^{cB}	4.02 ^{dB}	1.17 ^{bB}	1.77 ^{cB}	2.74 ^{dB}	3.69 ^{bB}	2.69 ^{cB}	3.23 ^{dB}	2.95 ^B	3.9 ^B	1.50 ^B	
	1.20%			1.20%			1.20%			1.20%	1.20%	1.20%	
Final recovery (log)	3.11 ^{bC}	2.92 ^{cC}	3.13 ^{bC}	0.00 ^{bC}	1.69 ^{cB}	2.30 ^{dB}	2.3 ^{bC}	1.47 ^{cC}	3.00 ^{dB}	2.69 ^B	2.84 ^C	1.15 ^B	
	2.00%			2.00%			2.00%			2.00%	2.00%	2.00%	
Final recovery (log)	1.95 ^{bD}	2.69 ^{cC}	2.30 ^{dB}	0.00 ^{bC}	1.39 ^{cC}	1.81 ^{dB}	1.47 ^{bD}	1.17 ^{cD}	2.95 ^{dB}	2.47 ^C	1.84 ^D	0.00 ^C	
Biguanide													
Strains	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433	
Initial count (log)	5.51 ^{aA}	5.66 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.54 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.27 ^{aA}	5.47 ^{aA}	5.45 ^{aA}	5.53 ^A	5.67 ^A	5.28 ^A	
	2.00%			2.00%			2.00%			2.00%	2.00%	2.00%	
Final recovery (log)	4.35 ^{bB}	4.53 ^{bB}	4.41 ^{bB}	3.00 ^{bB}	3.33 ^{cB}	3.97 ^{dB}	2.97 ^{bB}	3.25 ^{cB}	3.87 ^{dB}	3.84 ^B	4.67 ^B	1.39 ^B	
	3.50%			3.50%			3.50%			3.50%	3.50%	3.50%	
Final recovery (log)	4.24 ^{bB}	4.38 ^{bB}	4.02 ^{cC}	2.65 ^{bC}	3.21 ^{cB}	3.65 ^{dB}	2.9 ^{bB}	2.9 ^{bC}	3.87 ^{cB}	3.65 ^C	4.56 ^C	1.15 ^B	
	5.00%			5.00%			5.00%			5.00%	5.00%	5.00%	
Final recovery (log)	4.19 ^{bB}	4.31 ^{bB}	3.9 ^{cC}	2.54 ^{bC}	3.16 ^{cB}	3.47 ^{cC}	2.84 ^{bB}	2.84 ^{bC}	3.84 ^{cB}	3.39 ^C	4.43 ^C	1.00 ^B	
Iodine													
Strains	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433	
Initial count (log)	5.51 ^{aA}	5.66 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.54 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.27 ^{aA}	5.47 ^{aA}	5.45 ^{aA}	5.53 ^A	5.67 ^A	5.28 ^A	
	0.20%			0.20%			0.20%			0.20%	0.20%	0.20%	
Final recovery (log)	4.30 ^{bB}	4.29 ^{bB}	4.36 ^{bB}	2.17 ^{bB}	2.47 ^{cB}	2.92 ^{dB}	4.52 ^{bB}	2.6 ^{cB}	3.35 ^{dB}	4.04 ^B	4.38 ^B	2.35 ^B	
	0.60%			0.60%			0.60%			0.60%	0.60%	0.60%	
Final recovery (log)	0.00 ^{bC}	0.00 ^{bC}	2.65 ^{cC}	1.74 ^{bC}	1.65 ^{bC}	1.17 ^{cC}	3.16 ^{bC}	0.00 ^{cC}	3.11 ^{bB}	2.87 ^C	2.43 ^C	1.48 ^C	
	1.00%			1.00%			1.00%			1.00%	1.00%	1.00%	
Final recovery (log)	0.00 ^{bC}	0.00 ^{bC}	0.00 ^{bD}	1.47 ^{bD}	1.54 ^{bD}	1.00 ^{cC}	2.07 ^{bD}	0.00 ^{cC}	2.95 ^{dB}	1.47 ^D	2.34 ^C	1.18 ^C	

Peracetic acid												
Strains	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433
Initial count (log)	5.51 ^{aA}	5.66 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.54 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.27 ^{aA}	5.47 ^{aA}	5.45 ^{aA}	5.53 ^A	5.67 ^A	5.28 ^A
	0.30%			0.30%			0.30%			0.30%	0.30%	0.30%
Final recovery (log)	4.30 ^{bB}	4.07 ^{cB}	3.6 ^{dB}	1.65 ^{bB}	1.17 ^{cB}	2.36 ^{dB}	1.84 ^{bB}	2.16 ^{cB}	4.04 ^{dB}	2.00 ^B	4.83 ^B	3.15 ^B
	0.60%			0.60%			0.60%			0.60%	0.60%	0.60%
Final recovery (log)	2.77 ^{bC}	1.39 ^{cC}	0.0 ^{dC}	1.17 ^{bC}	0.00 ^{cC}	1.54 ^{dC}	0.00 ^{bC}	1.54 ^{cC}	3.90 ^{dB}	0.00 ^C	4.75 ^B	0.00 ^C
	1.00%			1.00%			1.00%			1.00%	1.00%	1.00%
Final recovery (log)	0.00 ^{bD}	0.00 ^{bD}	0.00 ^{bC}	0.00 ^{bD}	0.00 ^{bC}	1.17 ^{cD}	0.00 ^{bC}	1.00 ^{cD}	3.65 ^{dC}	0.00 ^C	4.42 ^C	0.00 ^C
Sodium hypochlorite												
Strains	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433
Initial count (log)	5.51 ^{aA}	5.66 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.54 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.27 ^{aA}	5.47 ^{aA}	5.45 ^{aA}	5.53 ^A	5.67 ^A	5.28 ^A
	0.50%			0.50%			0.50%			0.50%	0.50%	0.50%
Final recovery (log)	4.58 ^{bB}	4.04 ^{cB}	4.37 ^{bB}	3.46 ^{bB}	2.84 ^{cB}	3.19 ^{bB}	4.02 ^{bB}	2.74 ^{cB}	3.74 ^{dB}	2.65 ^B	4.72 ^B	3.17 ^B
	0.75%			0.75%			0.75%			0.75%	0.75%	0.75%
Final recovery (log)	4.30 ^{bB}	3.90 ^{cB}	4.14 ^{cC}	3.16 ^{bB}	2.60 ^{cC}	3.11 ^{bB}	3.00 ^{bC}	2.39 ^{cC}	3.54 ^{dB}	2.54 ^B	4.00 ^C	2.84 ^B
	1.00%			1.00%			1.00%			1.00%	1.00%	1.00%
Final recovery (log)	4.23 ^{bB}	3.90 ^{cB}	3.95 ^{cC}	2.92 ^{bC}	1.87 ^{cD}	3.02 ^{bC}	2.87 ^{bC}	2.00 ^{cC}	3.47 ^{dB}	2.39 ^C	3.92 ^C	2.24 ^B
Ortofenilfenol (Smoke Tech)												
Strains	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433
Initial count (log)	5.51 ^a	5.66 ^a	5.38 ^a	5.54 ^a	5.50 ^a	5.38 ^a	5.27 ^a	5.47 ^a	5.45 ^a	5.53 ^a	5.67 ^a	5.28 ^a
	15.0%			15.0%			15.0%			15.0%	15.0%	15.0%
Final recovery (log)	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	3.07 ^c	1.57 ^d	0.00 ^b	3.25 ^b	1.10 ^b

¹Different lower case letters in the same line indicate statistical difference between strains, different upper case letters in the same column indicate statistical difference between the concentrations of sanitizers used according to the Scott-Knott test (p < 0.05).

Table 2. Efficacy of electrolyzed water against heat-resistant fungal species.

Strains	EW											
	PV 01	PV 02	PVCH 03	PNT 01	PNDC 01	PNBI 01	MB 2579	NFF 02	NFC1	PFF 01	ATCC 16404	ATCC 24433
Initial count (log)	5.51 ^{aA}	5.66 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.54 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.38 ^{aA}	5.27 ^{aA}	5.47 ^{aA}	5.45 ^{aA}	5.53 ^A	5.67 ^A	5.28 ^A
	basic (1)			basic (1)			basic (1)			basic (1)	basic (1)	basic (1)
Final recovery (log)	4.40 ^{bb}	4.61 ^{cb}	4.64 ^{cb}	3.84 ^{bb}	3.54 ^{cb}	4.43 ^{db}	3.87 ^{bb}	3.65 ^{bb}	3.54 ^{bb}	4.24 ^B	4.77 ^B	3.90 ^B
	acid (1)			acid (1)			acid (1)			acid (1)	acid (1)	acid (1)
Final recovery (log)	4.06 ^{bc}	4.36 ^{cc}	4.40 ^{cc}	3.47 ^{bc}	3.77 ^{cc}	4.16 ^{dc}	3.32 ^{bb}	3.17 ^{cc}	3.74 ^{bb}	3.87 ^B	4.86 ^B	3.32 ^C
	basic (2)			basic (2)			basic (2)			basic (2)	basic (2)	basic (2)
Final recovery (log)	4.30 ^{bb}	3.39 ^{cd}	4.36 ^{bc}	3.84 ^{bb}	3.47 ^{cb}	4.27 ^{db}	3.65 ^{bb}	3.47 ^{bb}	2.92 ^{cc}	4.13 ^B	4.33 ^C	3.85 ^B
	acid (2)			acid (2)			acid (2)			acid (2)	acid (2)	acid (2)
Final recovery (log)	3.92 ^{bd}	4.32 ^{cc}	4.21 ^{dd}	3.30 ^{bc}	3.60 ^{bb}	3.04 ^{cd}	3.06 ^{bc}	3.02 ^{bc}	3.39 ^{cb}	3.84 ^B	4.38 ^C	3.05 ^C
	basic (3)			basic (3)			basic (3)			basic (3)	basic (3)	basic (3)
Final recovery (log)	4.11 ^{bc}	3.30 ^{cd}	4.29 ^{dc}	2.81 ^{bd}	3.30 ^{cd}	4.09 ^{dc}	3.54 ^{bb}	3.39 ^{bb}	2.81 ^{cc}	3.95 ^B	4.2 ^C	3.30 ^B
	acid (3)			acid (3)			acid (3)			acid (3)	acid (3)	acid (3)
Final recovery (log)	3.65 ^{be}	3.84 ^{ce}	4.11 ^{dd}	3.39 ^{bc}	3.39 ^{cd}	2.97 ^{be}	3.02 ^{bc}	2.97 ^{bc}	3.30 ^{bc}	3.69 ^B	4.27 ^C	2.84 ^C

¹Different lower case letters in the same line indicate statistical difference between strains, different upper case letters in the same column indicate statistical difference between the different types of electrolyzed water used according to the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

4.2 ARTIGO 2: Influência do tipo, concentração, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica na eficácia antifúngica de sanitizantes industriais contra *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Influence of type, concentration, exposure time, temperature, and presence of organic load on the antifungal efficacy of industrial sanitizers against *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Artigo publicado no periódico Food Microbiology, ISSN 0740-0020. Área de avaliação em Ciência dos Alimentos, Classificação A1.



Influence of type, concentration, exposure time, temperature, and presence of organic load on the antifungal efficacy of industrial sanitizers against *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)

Andrieli Stefanello, Juliana Copetti Fracari, Marina Silva, Jéssica Gonçalves Lemos, Marcelo Valle Garcia, Bibiana Alves dos Santos, Marina Venturini Copetti*

Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria - UFSM, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aspergillus brasiliensis (ATCC 16404)
Food industry
Peracetic acid
Benzalkonium chloride
Inactivation
Parameter

ABSTRACT

Parameters such as type and concentration of the active compound, exposure time, application temperature, and organic load presence influence the antimicrobial action of sanitizers, although there is little data in the literature. Thus, this study aimed to evaluate the antifungal efficacy of different chemical sanitizers under different conditions according to the European Committee for Standardization (CEN). *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) was exposed to four compounds (benzalkonium chloride, iodine, peracetic acid, and sodium hypochlorite) at two different concentrations (minimum and maximum described on the product label), different exposure times (5, 10, and 15 min), temperatures (10, 20, 30, and 40 °C), and the presence or absence of an organic load. All parameters, including the type of sanitizer, influenced the antifungal efficacy of the tested compounds. Peracetic acid and benzalkonium chloride were the best antifungal sanitizers. The efficacy of peracetic acid increased as temperatures rose, although the opposite effect was observed for benzalkonium chloride. Sodium hypochlorite was ineffective under all tested conditions. In general, 5 min of sanitizer exposure is not enough and >10 min are necessary for effective fungal inactivation. The presence of organic load reduced sanitizer efficacy in most of the tested situations, and when comparing the efficacy of each compound in the presence and absence of an organic load, a difference of up to 1.5 log CFU was observed. The lowest concentration recommended on the sanitizer label is ineffective for 99.9% fungal inactivation, even at the highest exposure time (15 min) or under the best conditions of temperature and organic load absence. Knowledge of the influence exerted by these parameters contributes to successful hygiene since the person responsible for the sanitization process in the food facility can select and apply a certain compound in the most favorable conditions for maximum antifungal efficacy.

1. Introduction

Molds are widely distributed in the environment of the food industry in the form of aerosols, which are easily translocated by air, raw materials, and deposited on equipment, packing devices, work surfaces, and ready-to-eat products (Wigmann et al., 2018; Garcia et al., 2019; Parussolo et al., 2019).

After getting into contact and contaminating food, fungi can multiply and subsequently spoil them under favorable conditions. These undesirable sensory and composition modifications cause relevant economic losses in the food industry and raise consumer health concerns since some fungal species are potential mycotoxin producers (Biango-Daniels et al., 2019; Pitt and Hocking, 2009).

Hence, the food industry can work on the sanitization process, both in the processing environment and the surface of raw materials, especially vegetables, in order to reduce the initial load of microorganisms to prevent food contamination and postpone or even avoid their spoilage (Germano and Germano, 2003; Rico-Munoz, 2017). Therefore, chlorine-based compounds, quaternary ammonium, iodine, and peracetic acid are the most commonly used sanitizers in the food industry and reduce the microorganisms in the air, raw materials, and utensil surfaces (Campana and Baffone, 2017; Coroneo et al., 2017; Xue et al., 2017).

Studies have suggested that sanitizer efficacy may reduce in the presence of organic load (Shen, 2014; Teng et al., 2018), which is very common in the food industry due to the presence of food components

* Corresponding author.

E-mail address: marina.copetti@ufsm.br (M.V. Copetti).

(proteins, lipids, sugar, and amino acids), blood, among others (Araújo et al., 2013; Chen and Hung, 2017; Fang et al., 2016). Furthermore, sanitizer efficacy can also be modified by two factors: temperature and time of exposure to chemical compounds. Thus, longer contact times improve the performance of the sanitizing process, while higher temperatures help to accelerate the activation of the components in the sanitizers. Lastly, it is also paramount to correctly choose the concentration of these chemicals for effective sanitization. However, few studies have reported the influence of these parameters on sanitizer efficacy against microorganisms of interest in the food industry (Beltrame et al., 2012). In addition, no studies were found relating sanitizer efficacy and the mentioned parameters on fungal reduction.

In this context, the objective of this study was to evaluate the efficacy of four commercial sanitizers commonly used in the food industry (benzalkonium chloride, iodine, peracetic acid, and sodium hypochlorite) against *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), which is the standard mold strain recommended for chemical sanitizer testing. Sanitizer concentration, exposure time, temperature, and presence or absence of organic load were tested.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and standardization of the initial inoculum

A standard *A. brasiliensis* (ATCC 16404) strain was inoculated into tubes containing malt extract agar (MEA) [glucose, 20 g (Neon, São Paulo, Brazil); peptone, 1 g (Himedia, Mumbai, India); malt extract, 30 g (Bacto™, MD, USA)]. After seven days of incubation at 25 °C, the mycelium was scraped with a sterile disposable loop and serial dilutions were made with sterile peptone water at 0.1% [peptone, 0.1 g (Himedia, Mumbai, India); distilled water, 1 L]. The initial inoculum was standardized between 1.5 and 5×10^7 spores/mL using a Neubauer chamber (CRAL/C1010/Brazil).

2.2. Variables tested

The tested sanitizers authorized by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) for use in the food industry and their respective concentrations, neutralizing solution, and different conditions (temperature, exposure time, and presence or absence of organic load) are shown in Table 1.

2.3. Application of variables in the *in vitro* test

Tests were carried out according to the model proposed for testing antimicrobial effects by the European Committee for Standardization (CEN) (European Standard 13,697, 2001), and powdered milk was used as the interfering substance instead of bovine albumin. In short, 50 µL of the initial suspension (10^7 spores/mL) was inoculated onto 304 2-cm stainless steel discs. Tests with organic load presence were performed by adding 0.05% of reconstituted powdered milk (Elegê, São Paulo, Brazil) to 50 µL of the initial suspension on the discs. Discs were taken to a 35 °C incubator for 40 min for inoculum adhesion to the discs. The discs were then removed and placed at 10, 20, 30, and 40 °C for 30 min with the sanitizers at their test concentrations (which were already in the incubators for about 3 h) for temperature stabilization. Subsequently, 100 µL of each sanitizer was added to the discs, separately at

their concentrations and tested temperatures, and exposed for 5, 10, or 15 min to evaluate the influence of the different variables on sanitizer efficacy. For the non-exposed microorganisms, 100 µL of sterile distilled water was added at 20 °C for 15 min since different tests were previously performed with the tested variables, including time and temperature, and no significant differences were noted.

After exposure, the discs were submerged in a neutralizing solution (Table 1), as proposed by Jaenisch et al. (2010), and 5 g of glass beads were used to improve inoculum detachment. After 5 min of neutralization, serial dilutions were made in 0.1% peptone water. Finally, 1 mL aliquots of the dilutions were added to sterile Petri plates, and then about 20 mL of simple malt extract agar (malt extract 30 g/L, agar 15 g/L) was pour plated. Finally, the plates were incubated at 25 °C for five days, the colonies were counted, and the results were expressed in logarithm colony-forming units (log CFU). A sanitizer is considered effective when it can reduce 3 log CFU compared to non-exposed microorganisms (European Standard 13,697, 2001).

2.4. Statistical analysis

Variance analysis (ANOVA) was performed to verify differences in the fungal reductions between treatments. Fungal recovery after sanitizer exposure was analyzed by the Scott-Knott test ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed using the SISVAR® software, version 5.6 (Ferreira, 2001).

A clustering heat map was created for fungal recovery count for each of the conditions tested (Supplementary Fig. 1) using XLSTAT-OMICS module (XLSTAT® 2018.6, www.xlstat.com). The sanitizers that obtained similar results were mathematically grouped close together. The fungal recovery counts for each treatment were colored in shades of red (high values) to yellow (low values), as shown in the color key.

3. Results

The non-exposed *A. brasiliensis* (ATCC 16404) recovery value was 5.6 log CFU, whose counting was not affected by the different parameters assayed in tests previously carried out (time, temperature, and organic load). All studied variables influenced, to some extent, the antifungal efficacy of the chemical compounds tested, and the sanitizers showed differences among each other. Fungal recovery after sanitizer exposure with different times and temperatures in tests carried out with and without organic load are shown in Table 2. A heat map was created with the reductions promoted by each sanitizer in different situations (Supplementary Fig. 1).

The antifungal efficacy was a variable among the tested sanitizers. The best results were achieved by peracetic acid and benzalkonium chloride. Iodine was also effective in several specific situations, although sodium hypochlorite was never effective under the tested conditions.

The product concentration had significant relevance in the sanitizer efficacy. The lowest concentration recommended on the product label was never able to produce the minimum 3 log CFU reduction required by sanitizer test efficacy according to CEN standards, even at longer exposure (15 min) or different temperatures ($p < 0.05$).

The compounds showed statistical differences in efficacy at different temperatures (10, 20, 30, and 40 °C). Iodine and peracetic acid had higher efficacy when the temperature was increased from 10 to 40 °C. However, benzalkonium chloride showed higher efficacy at lower

Table 1
Variables used for antifungal efficacy testing.

Sanitizers	Concentration (%)	Temperature (°C)	Time (min)	Organic load	Neutralizing
Benzalkonium chloride	(0.3/2.0)	(10/20/30/40)	(5/10/15)	(With/Without)	Nutrient broth with 0.5% of tween 80 and tryptone 1%
Iodine	(0.2/1.0)	(10/20/30/40)	(5/10/15)	(With/Without)	Nutrient broth with 0.6% of sodium thiosulphate
Peracetic acid	(0.3/1.0)	(10/20/30/40)	(5/10/15)	(With/Without)	Nutrient broth with 0.6% of sodium thiosulphate
Sodium hypochlorite	(0.5/1.0)	(10/20/30/40)	(5/10/15)	(With/Without)	Nutrient broth with 0.6% of sodium thiosulphate

Table 2

Influence of different parameters (type and concentration of sanitizer, presence or absence of organic load, temperature, time, and concentration) in the antifungal efficacy of sanitizers.

Sanitizers	Concentration (%)	Time (minutes)	Absence of organic load (Log CFU)				Presence of organic load (Log CFU)			
			Temperature (°C) 10 20 30 40				Temperature (°C) 10 20 30 40			
Benzalkonium chloride	0.30%	5	1.77 ^{aA}	1.72 ^{aA}	1.58 ^{aA}	1.58 ^{aA}	1.72 ^{aA}	1.65 ^{aA}	1.54 ^{aA}	1.54 ^{aA}
		10	2.34 ^{aB}	2.23 ^{aB}	2.02 ^{bB}	1.93 ^{bB}	1.80 ^{aAa}	2.12 ^{bB}	2.36 ^{bBa}	1.75 ^{aA}
		15	2.75 ^{aC}	2.61 ^{aC}	2.07 ^{bB}	2.03 ^{bB}	1.95 ^{aAa}	2.24 ^{bBa}	2.58 ^{cBa}	1.92 ^{aB}
	2.00%	5	3.11^{aD}	2.43 ^{bC}	2.14 ^{cB}	1.63 ^{dA}	2.93 ^{aB}	2.35 ^{bB}	1.72 ^{cAa}	1.54 ^{cA}
		10	3.46^{aE}	3.40^{aD}	3.16^{bC}	2.60^{cC}	3.01^{aBa}	2.99^{aCa}	3.02^{aC}	2.43^{bB}
		15	4.67^{aE}	3.38^{bD}	3.63^{bD}	3.44^{bD}	3.21^{aCa}	3.35^{aD}	3.29^{aDa}	3.13^{aCa}
Iodine	0.20%	5	1.21 ^{aA}	1.17 ^{aA}	1.29 ^{aA}	1.44 ^{aA}	0.97 ^{aA}	1.08 ^{aA}	1.21 ^{bA}	1.29 ^{bA}
		10	1.33 ^{aA}	1.48 ^{aA}	1.44 ^{aA}	1.53 ^{aA}	1.12 ^{aA}	1.37 ^{bB}	1.36 ^{bA}	1.47 ^{cB}
		15	1.44 ^{aA}	1.54 ^{aA}	1.86 ^{bB}	1.90 ^{bB}	1.24 ^{aB}	1.54 ^{bC}	1.61 ^{bB}	1.65 ^{bB}
	1.00%	5	1.80 ^{aB}	2.13 ^{bB}	2.13 ^{bC}	2.70 ^{aC}	1.63 ^{aC}	1.86 ^{bD}	2.07 ^{cC}	2.28 ^{dCa}
		10	2.13 ^{aC}	2.37 ^{bC}	2.75 ^{cD}	2.98 ^{dD}	1.93 ^{aD}	2.02 ^{aE}	2.50 ^{bD}	2.83 ^{cD}
		15	2.70 ^{aD}	2.77 ^{aD}	2.93 ^{bE}	3.50^{cE}	2.37 ^{aEa}	2.37 ^{aEa}	2.70 ^{bE}	2.98 ^{cDa}
Peracetic acid	0.30%	5	0.94 ^{aA}	0.94 ^{aA}	1.29 ^{bA}	1.46 ^{cA}	0.87 ^{aA}	0.99 ^{aA}	1.21 ^{bA}	1.35 ^{cA}
		10	1.21 ^{aB}	1.16 ^{aB}	1.36 ^{bB}	1.80 ^{cB}	1.05 ^{aB}	1.16 ^{aA}	1.22 ^{aA}	1.75 ^{bB}
		15	1.24 ^{aB}	1.22 ^{aB}	1.54 ^{bC}	1.65 ^{bA}	1.14 ^{aB}	1.22 ^{aB}	1.47 ^{bB}	2.56 ^{bCa}
	1.00%	5	2.54 ^{aC}	2.70 ^{bC}	2.98 ^{cD}	5.67^{dC}	2.36 ^{aC}	2.54 ^{bC}	2.75 ^{bC}	5.67^{cD}
		10	3.16^{aD}	4.02^{bD}	5.67^{cE}	5.67^{cC}	2.72 ^{aDa}	2.78 ^{aCa}	4.37^{bDa}	5.67^{cD}
		15	3.21^{aD}	5.67^{bE}	5.67^{bE}	5.67^{bC}	3.16^{aE}	4.50^{bDa}	5.67^{cE}	5.67^{cD}
Sodium hypochlorite	0.50%	5	1.10 ^{aA}	1.19 ^{aA}	1.21 ^{aA}	1.33 ^{aA}	1.09 ^{aA}	1.00 ^{aA}	1.18 ^{aA}	1.18 ^{aA}
		10	1.19 ^{aA}	1.20 ^{aA}	1.40 ^{aA}	1.41 ^{aA}	1.18 ^{aA}	1.12 ^{aA}	1.29 ^{bB}	1.35 ^{bB}
		15	1.35 ^{aA}	1.24 ^{aA}	1.51 ^{bB}	1.60 ^{bB}	1.33 ^{aB}	1.16 ^{bA}	1.33 ^{aB}	1.56 ^{cC}
	1.00%	5	1.19 ^{aA}	1.19 ^{aA}	1.56 ^{bB}	1.65 ^{bB}	1.15 ^{aA}	1.14 ^{aA}	1.46 ^{bC}	1.63 ^{bC}
		10	1.65 ^{aB}	1.63 ^{aB}	1.65 ^{aB}	1.67 ^{aB}	1.60 ^{aC}	1.58 ^{aB}	1.58 ^{aC}	1.63 ^{aC}
		15	1.83 ^{aB}	1.75 ^{aB}	2.13 ^{cC}	2.67 ^{dC}	1.86 ^{aC}	1.63 ^{aB}	1.65 ^{aCa}	1.75 ^{aCa}

Difference between temperatures under a same parameter of organic load is represented by lowercase letters in the same line, difference between the times of a single sanitizer under a same parameter of organic load is represented by uppercase letter in the same column. * represent difference due the presence of organic load. Results in bold highlight the combination of conditions where a sanitizer reached the efficacy, reducing >3 log CFU.

temperatures. No temperature influence pattern was observed for sodium hypochlorite, although more significant reductions usually occurred at the highest temperature (40 °C).

Exposure time was also an important parameter, and 5 min of exposure was generally not enough to guarantee antifungal efficacy except for the highest peracetic acid concentration (1.0%) at the highest temperature (40 °C) or the highest benzalkonium chloride concentration (2.00%) at the lowest temperature (10 °C). For these two compounds, 10 min of exposure was usually enough when using the highest concentration, regardless of the temperature. Nevertheless, at least 15 min was typically necessary for treatments with organic load presence.

Organic load presence interfered with the action of all sanitizers at different exposure times, temperatures, and concentrations. The highest efficacy reduction was observed for benzalkonium chloride at the highest concentration (2%), exposure time of 15 min at 10 °C, and in the presence of organic load (1.4 log CFU reduction). Nevertheless, interference was also observed for peracetic acid and the other tested sanitizers.

3.1. Discussion

Peracetic acid completely inactivated the fungal inocula at 30 and 40 °C at the highest concentration (1%) for 10 and 15 min. Furthermore, this reduction was also achieved at the lowest exposure time (5 min) at 40 °C in both conditions (with/without organic load). As observed in our study, the favorable antifungal efficacy of peracetic acid is well established in the literature and also corroborated by Bernardi et al. (2018; 2019b), Lemos et al. (2020), and Stefanello et al. (2020), who reported good results when testing peracetic acid at room temperature. Additionally, Scaramuzza et al. (2020) obtained low fungal recovery using high temperatures.

Benzalkonium chloride is the best compound against fungal species at low temperatures (10 °C). However, it was only effective at the highest concentration recommended on the product label. Lemos et al. (2020) reported its effectiveness in controlling species of aflatoxigenic *Aspergillus* spp., and Stefanello et al. (2020) also observed promising

efficacy against heat-resistant fungal strains. Paulino (2010) demonstrated reduced efficacy of quaternary ammonium compounds in the presence of organic load and, more specifically, Kich et al. (2004) noted the same for benzalkonium chloride. Nevertheless, there is no consensus since some authors have reported that benzalkonium chloride-based compounds are stable in organic load presence (Gilbert and Moore, 2005; McDonnell and Russell, 1999).

Iodine showed increased efficacy at higher temperatures and proved to be more effective at 40 °C. Moreover, it was only considered effective (>3-log reduction) at the highest concentration without an organic load at 15 min of exposure. Iodine was evaluated at room temperature against heat-resistant (Stefanello et al., 2020) and toxigenic (Lemos et al., 2020) fungal strains, including the standard *A. brasiliensis* (ATCC 16404) strain in both studies, and satisfactory results were reported against most of the studied species at intermediate and high concentrations considering the recommendations on the product label. This compound is less commonly used in the food industry compared to the other sanitizers previously mentioned. According to Andrade (2008), iodine may introduce odors to some products and is less effective than chlorinated compounds for bacterial spores. Nonetheless, this was not observed in our study for fungi, given that iodine showed better results than sodium hypochlorite, as also demonstrated by Stefanello et al. (2020) and Lemos et al. (2020).

Furthermore, sodium hypochlorite was the only sanitizer ineffective (unable to reduce 99.9% of the exposed population) against *A. brasiliensis* (ATCC 16404) at all concentrations tested, even in the absence of an organic load. Therefore, this compound should not be chosen when the objective is to control fungal contamination (Bernardi et al., 2019b; Lemos et al., 2020; Stefanello et al., 2020) unless higher concentrations are applied and above those recommended on the product label (Bernardi et al., 2019a).

Regarding concentration, all sanitizers tested were ineffective at the lowest concentration recommended on the sanitizer label. Conversely, the most commonly employed concentrations by food facilities are similar to the lowest concentration tested in this study (Menegaro et al., 2016; Bernardi et al., 2021). Likewise, Bernardi et al. (2018)

emphasized that the choice of the concentration used for correct sanitization must be reviewed, especially for fungal control, and the highest concentration indicated by the manufacturer should be used preferably. Nevertheless, this high concentration is not commonly applied in the food industry due to the strong odor, irritation to humans, and damage to equipment, such as oxidation.

Sodium hypochlorite showed the second largest reduction in effectiveness due to organic load presence, a difference of 0.92 log CFU compared to the absence of this interferent when tested at the highest concentration for 15 min at 40 °C. Besides enhancing sanitizer efficacy, eliminating organic load also reduces biofilm (Chaves, 2004) and trihalomethane formation (Gómez-López et al., 2017). From a practical point of view, a cleaning step in the sanitization process should be carried out correctly and routinely to minimize the presence of substances that can affect the efficacy of the sanitizer that will be applied to inactivate pathogenic and spoilage microorganisms (Grezzi, 2008). This action allows the antimicrobial agents to act more directly and efficiently on the surfaces to be disinfected.

The parameters tested in our study are practical and relevant to adapt hygiene protocols in the food industry while aiming to improve fungal control. The need for adequate removal of organic load in the cleaning steps to improve sanitizer efficacy, the importance of using products with active principles of antifungal action, and the use of effective concentrations are explicit, given that the lowest concentrations recommended on the product label were not enough in all tested cases. The significant effects of temperature and exposure time in sanitizer efficacy for mold inactivation was also observed. Regarding the temperature of the solution applied in the sanitization processes, benzalkonium chloride should be prioritized when using well water (with no heating), while peracetic acid should be used at higher temperatures in the sanitizing process. Moreover, the sanitizer must come into contact with the surface to be sanitized for at least 10 min for effective sanitation.

The information demonstrated herein can serve as a reference point. However, the variation in the sensitivity of fungal species and isolates causing problems in different food facilities (dairy, bakery, meat, juice, among others) to different sanitizers compared to the standard strain *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) may occur and have already been reported (Bernardi et al., 2019b; Lemos et al., 2020; Stefanello et al., 2020). Therefore, it is highly recommended that each particular industrial facility test the sensitivity of the main spoilage agents isolated from their respective food products, under the specific sanitization parameters applied, to choose the best option for controlling these contaminants, which may consequently lead to fewer cases of early spoilage and reduce losses.

4. Conclusion

After evaluating the influence of parameters such as the type and concentration of sanitizers, temperature, concentration, exposure time, and organic load presence on the efficacy of four commercial sanitizers against *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), it was possible to conclude that all parameters studied influenced the antifungal efficacy of the compounds tested. Peracetic acid and benzalkonium chloride were the best antifungal sanitizers, as peracetic acid showed higher antifungal efficacy as the temperature increased, while the opposite effect was observed for benzalkonium chloride. The lowest concentration recommended on the product label was ineffective for the 99.9% fungal inactivation required, even at the highest exposure time (15 min) or the best conditions of temperature and absence of organic load for all tested sanitizers. In general, 5 min of sanitizer exposure is not enough, and at least 10 min is necessary for effective fungal inactivation. The results also showed that organic load presence reduced sanitizer efficacy in most situations. With this study, the importance of closely studying sanitizer action to understand which parameters can be modified during a hygiene process to improve the sanitizer action was highlighted.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processes 428454/2018–6 and 303570/2019–9); and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through graduate grants to AS, JGL, MVG, and BAS (Financial code 001), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for undergraduate scholarships for J. C. F., and M. S.

Appendix A. Supplementary data

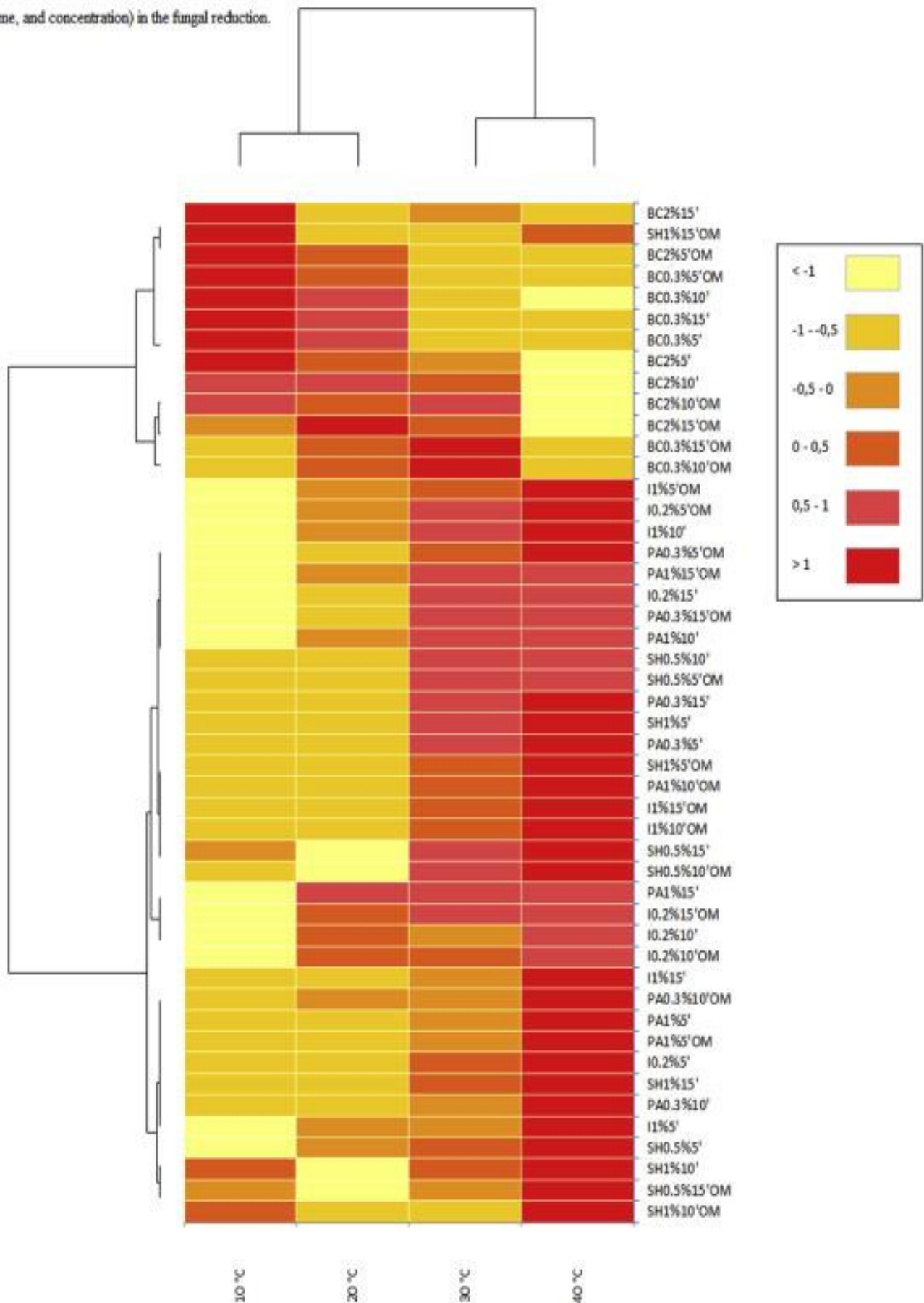
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103740>.

References

- Andrade, N.J., 2008. Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo, Varela, p. 412.
- Araújo, P.A., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M., 2013. The influence of interfering substances on the antimicrobial activity of selected quaternary ammonium compounds. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/237581>.
- Beltrame, C.A., Kubiak, G.B., Lerin, L.A., Rottava, I., Mossi, A.J., Oliveira, D., Cansian, R. L., Treichel, H., Toniazzo, G., 2012. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 32, 228–233. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000046>.
- Bernardi, A.O., Stefanello, A., Garcia, M., Parussolo, G., Stefanello, R.F., Moro, C.B., Copetti, M.V., 2018. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. *Lebensm. Wiss. Technol.* 97, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.037>.
- Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2019a. Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Curr Opin Food Sci* 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>.
- Bernardi, A.O., Stefanello, A., Lemos, J.G., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2019b. Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: bakery spoilage fungi. *Food Microbiol.* 83, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.005>.
- Bernardi, A.O., Stefanello, A., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2021. The control of cheese and meat products spoilage fungi by sanitizers: in vitro testing and food industry usage. *Submitted*.
- Biango-Daniels, M.N., Snyder, A.B., Worobo, R.W., Hodge, K.T., 2019. Fruit infected with *Paecilomyces niveus*: a source of spoilage inoculum and patulin in apple juice concentrate? *Food Contr.* 97, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.020>.
- Campana, R., Baffone, W., 2017. Assessment of antimicrobial activity in different sanitizer products commonly used in food processing environment and home setting. *EC Microbiol.* 12, 260–268.
- Chaves, L.C.D., 2004. Estudo da ciência de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável. 139p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga.
- Chen, X., Hung, Y.C., 2017. Effects of organic load, sanitizer pH and initial chlorine concentration of chlorine-based sanitizers on chlorine demand of fresh produce wash waters. *Food Contr.* 77, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.026>.
- Coroneo, V., Carraro, V., Marras, B., Marrucci, A., Succa, S., Meloni, B., Schintu, M., 2017. Presence of Trihalomethanes in ready-to-eat vegetables disinfected with chlorine. *Food Addit. Contam.* 34, 1–7. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1382723>.
- Fang, J.L., Cannon, J.L., Hung, Y.C., 2016. The efficacy of EO waters on inactivating norovirus and hepatitis A virus in the presence of organic load. *Food Contr.* 61, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.011>.
- Ferreira, D.F., 2001. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cienc. E Agrotecnol* 35, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.
- Garcia, M.V., Bernardi, A.O., Parussolo, G., Stefanello, A., Lemos, J.G., Copetti, M.V., 2019. Spoilage fungi in a bread factory in Brazil: diversity and incidence through the bread-making process. *Food Res. Int.* 126, 108593. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108593>.
- Germano, P.M.L., Germano, M.I.S., 2003. Higiene e vigilância sanitária na indústria de alimentos. São Paulo, Livraria Varela.

- Gilbert, P., Moore, L.R., 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 99, 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>.
- Gómez-López, V.M., Gil, I.M., Allende, A., 2017. A novel electrochemical device as a disinfection system to maintain water quality during washing of ready to eat fresh produce. *Food Contr.* 71, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.001>.
- Grezzi, G., 2008. Limpeza e desinfecção na avicultura. Ergomix [online]. Available at: <http://pt.engormix.com/MAavicultura/saude/artigos/limpezadesinfeccao-avicultura-100/165-p0.htm>. (Accessed 1 April 2020).
- Jaenisch, F.R.F., Kuchiishi, S.S., Coldebella, A., 2010. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Ciência Rural.* 40, 384–388.
- Kich, J.D., Borowsky, L.M., Silva, V.S., Ramenzoni, M., Triques, N., Kooler, F.L., Cardoso, M.R.L., 2004. Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella Typhimurium* strains isolated from swine. *Acta Sci. Vet.* 32, 33–39.
- Lemos, J.G., Stefanello, A., Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Magrini, L.N., Cichoski, A.J., Wagner, R., Copetti, M.V., 2020. Antifungal efficacy of sanitizers and electrolyzed waters against toxigenic *Aspergillus*. *Food Res. Int.* 137, 109451. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109451>.
- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>.
- Parussolo, G., Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Stefanello, A., Silva, T.S., Copetti, M.V., 2019. Fungi in air, raw materials and surface of dry fermented sausage produced in Brazil. *Lebensm. Wiss. Technol.* 108, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.073>.
- Paulino, C.A., 2010. Anti-sépticos e desinfetantes. In: Spínosa, H.S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. (Eds.), *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 440–452.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer, US.
- Rico-Munoz, E., 2017. Heat resistant molds in foods and beverages: recent advances on assessment and prevention. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.011>.
- Scaramuzza, N., Mutti, P., Cigarini, M., Berni, E., 2020. Effect of peracetic acid on ascospore-forming molds and test microorganisms used for bio-validations of sanitizing processes in food plants. *Int. J. Food Microbiol.* 332, 108772. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108772>.
- Shen, C., 2014. Evaluation of chlorine efficacy against *Escherichia coli* O157: H7 survival and cross-contamination during continuous produces washing process with water quality change. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* 3, 89–93. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400018>.
- Stefanello, A., Magrini, L.N., Lemos, J.G., Garcia, M.V., Bernardi, A.O., Cichoski, A.J., Copetti, M.V., 2020. Comparison of electrolyzed water and multiple chemical sanitizer action against heat-resistant molds (HRM). *Int. J. Food Microbiol.* 335, 108856. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108856>.
- Teng, Z., Luo, Y., Alborzi, S., Zhou, B., Chen, L., Zhang, J., Zhang, B., Millner, P., Wang, Q., 2018. Investigation on chlorine-based sanitization under stabilized conditions in the presence of organic load. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.027>.
- Wigmann, E.F., Jahn, R.C., Sherer, C.D., Saccomori, F., Alcano-Gonzales, M.J., Copetti, M.V., 2018. Detection and identification of *Penicillium* spp. in a frozen chicken nuggets production facility. *Food Microbiol.* 70, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.002>.
- Xue, R., Shi, H., Ma, Y., Yang, J., Hua, B., Inniss, E.C., Eichholz, T., 2017. Evaluation of thirteen haloacetic acids and ten trihalomethanes formation by peracetic acid and chlorine drinking water disinfection. *Chemosphere* 189, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.059>.

Figure 1. Heatmap comparing the effects of the different variables tested (type and concentration of sanitizer, presence or absence of organic load, temperature, time, and concentration) in the fungal reduction.



BC= Benzalkonium chloride, I= Iodine, PA= Peracetic acid, SH= Sodium hypochlorite. %= sanitizer concentration. '=exposure time (minute).

5 DISCUSSÃO GERAL

As espécies fúngicas termorresistentes são consideradas preocupantes para a indústria alimentícia devido a sua resistência aos processos de alta pressão e pasteurização empregados no processamento de alimentos (RICO-MUNOZ, 2017), assim os processos de sanitização adquirem relevância para prevenir que este grupo de micro-organismos adentre ao processamento através da inativação dos esporos presentes tanto no ambiente fabril ou nas matérias-primas. Assim, esse estudo teve como propósito investigar a sensibilidade de diferentes espécies termorresistentes aos sanitizantes químicos, um sanitizante gerador de fumaça e águas eletrolisadas, visto que o sucesso do processo de higienização depende fundamentalmente da eficácia dos agentes antimicrobianos na inativação das espécies potencialmente deteriorantes e/ou patogênicas.

Com esse estudo pode-se observar que a biguanida e o hipoclorito de sódio apresentaram baixa eficácia, enquanto que os sanitizantes a base de ácido peracético, ortofenilfenol e iodo foram os agentes mais eficaz frente as espécies termorresistentes confrontadas. Mesmo assim, entre as espécies testadas, o *A. aureoluteus* (NFC1) foi resistente a todos os agentes nas concentrações avaliadas. As AE também não induziram reduções microbianas em nível suficiente para serem consideradas eficazes frente às cepas termorresistentes, tendo reduzido em média 40% da população exposta.

O ácido peracético apresentou eficácia nas concentrações 0,60 e 1,00% para a maioria das cepas fúngicas termorresistentes testadas. No entanto, Bernardi et al. (2020) relataram que as indústrias de alimentos utilizam concentrações abaixo da intermediária e comumente próxima a concentração mais baixa recomendada no rótulo do produto, sendo assim, essa informação seria um fator limitante para o controle dessas espécies termorresistentes.

O sanitizante gerador de fumaça a base de ortofenilfenol é uma das alternativas utilizadas para a redução da carga microbiana presente na indústria de alimentos, nesse estudo esse sanitizante atingiu eficácia para oito (PV 01; PV 02; PVCH 03; PNT 01; PNDC 01; PNBI 01; PFF 01; MB 2579) das dez cepas fúngicas termorresistentes testadas reduzindo 4 log UFC, se mostrando um importante agente no controle desse grupo de micro-organismos. O ar ambiente da indústria de alimentos é um meio importante para disseminação da contaminação. Os esporos fúngicos usualmente oriundos das matérias-primas e liberados na forma de aerossóis no ar, se depositarão nas superfícies dos equipamentos e matérias-primas, elevando a carga microbiana no ambiente e predispondo à contaminação do produto ao longo ou após seu processamento. A preocupação é ainda maior quando se trata de espécies fúngicas termorresistentes, pois estas não são

completamente inativadas por parte dos processos de calor e alta-pressão aplicados pela indústria de alimentos (FILIPA & SILVA, 2020).

O gerador de fumaça por ser difundido por via aérea, consegue acessar locais de difícil acesso em indústrias de alimentos (SHOLBERG et al., 2004), diferentemente dos sanitizantes químicos. Mas, esse composto não pode entrar em contato com os alimentos e seu manuseio deve ser realizado com bastante cuidado pelos manipuladores, devido ao fato que ele pode irritar a pele e os olhos. Estes fatores ainda limitam a sua utilização com uma maior frequência na indústria de alimentos. Bernardi et al. (2020), realizaram um levantamento em 20 estabelecimentos alimentícios onde foram solicitadas informações sobre os produtos, composição e diluições utilizadas no processo de sanitização, os autores relatam que em nenhum dos 20 estabelecimentos fazem o uso do sanitizante gerador de fumaça a base de ortofenilfenol.

Assim como o ácido peracético e o ortofenilfenol, o iodo apresentou resultados satisfatórios frente as espécies estudadas nas concentrações de 0,60 e 1,00%, reduzindo mais de 5 log UFC para as cepas de *P. variotii*. Lemos et al. (2020) também observaram eficácia desse composto frente as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus*. No entanto, devido à algumas características desse composto serem indesejáveis, como a liberação de odor e sabor nos alimentos, esse sanitizante é pouco utilizado pela indústria de alimentos (Bernardi et al., 2021; Nascimento et al., 2010).

Diferentemente do iodo, a biguanida e o hipoclorito de sódio são amplamente utilizados pela indústria alimentícia, essa informação acaba sendo preocupante devido aos resultados desse estudo e de estudos anteriores da eficácia desses sanitizantes em relação aos fungos. A biguanida foi o sanitizante que apresentou menor eficácia frente as espécies fúngicas termorresistentes, sendo eficaz apenas para a cepa *Paecilomyces niveus* (PT 01) na concentração mais alta testada (5,00%) e para a cepa padrão *Candida albicans* (ATCC 24433) nas três concentrações testadas. Lemos et al. (2020) descreveram resultados semelhantes encontrados desse composto no controle fúngico de *Aspergillus* toxigênicos, onde não foi observada eficácia frente a nenhuma cepa estudada, apenas para a cepa padrão *Candida albicans* (ATCC 24433). Bernardi et al. (2020) relataram que geralmente a concentração utilizada pela indústria de alimentos para esse composto é entre 0,3 a 1%, concentrações ineficazes para o controle fúngico. Com isso, esse estudo reforça ainda mais a ineficácia da biguanida no controle fúngico, demonstrando que esse composto não deve ser o escolhido para o processo de higienização e se escolhido não devem ser utilizadas as concentrações trazidas pelo rótulo, e sim concentrações mais altas.

O hipoclorito de sódio foi eficaz apenas para três cepas termorresistentes (*A. australensis* NFF 02, *P. fulvus* PFF 01 e *P. niveus* PNDC 01) na concentração mais alta testada (1%; 800 ppm). Na concentração mais baixa testada que é a geralmente a utilizada pela indústria de alimentos conforme Bernardi et al. (2021), esse composto não foi eficaz para nenhuma das cepas estudadas.

O cloreto de benzalcônio apresentou resultados satisfatórios quando confrontado com espécies termorresistentes, não atingindo a redução mínima de 3 log UFC para apenas duas cepas testadas *P. variotii* (PV 02) e *A. aureoluteus* (NFC 1).

Além dos experimentos para avaliação da eficácia de sanitizantes frente às espécies fúngicas termorresistentes, foram avaliados fatores que poderiam influenciar a atividade antifúngica dos sanitizantes. Poucos estudos relacionados à diferença de eficácia dos sanitizantes químicos em diferentes condições de uso foram encontrados (BELTRAME et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2010), sendo ainda mais raros os que avaliam múltiplos fatores e fungos. Desta maneira foi realizado um estudo com os principais sanitizantes químicos utilizados na indústria alimentícia avaliando sua eficácia em diferentes condições de uso como tempo, temperatura, concentração e matéria orgânica (presença ou ausência) frente ao micro-organismo *A. brasiliensis* (ATCC 16404), cepa padrão para testes com sanitizantes.

Os sanitizantes químicos quando foram expostos em diferentes condições frente a cepa padrão, apresentaram diferença de eficácia para todas as variáveis testadas, demonstrando que as mesmas interferem na eficácia de cada composto. Além disso, também foi observado que alguns sanitizantes são mais eficazes em temperaturas mais baixas como o cloreto de benzalcônio (10 °C), outros em temperatura mais alta como o iodo e ácido peracético (40 °C). A presença de matéria orgânica foi umas das variáveis mais relevantes estudadas, reduzindo a eficácia em até 1,5 log UFC do composto cloreto de benzalcônio.

Quando avaliado em diferentes variáveis, o ácido peracético frente a cepa padrão para testes de desinfetantes *A. brasiliensis* (ATCC 16404), reduziu em 5 log UFC a população exposta em temperatura de 40 °C tanto em presença quanto na ausência de matéria orgânica. Entre os sanitizantes químicos autorizados para uso na indústria de alimentos, o ácido peracético vem apresentando resultados interessantes frente à diferentes espécies fúngicas (BERNARDI et al., 2018; BERNARDI et al., 2019). Em um estudo realizado por Menegaro et al. (2016), onde um levantamento de dez estabelecimentos de alimentos no estado do Paraná (Brasil) foi realizado, o ácido peracético foi o segundo sanitizante mais utilizado por esses estabelecimentos para o processo de sanitização.

O hipoclorito de sódio foi uns dos mais afetados pela presença de matéria orgânica, reduzindo aproximadamente 1 log UFC na sua eficácia frente ao *A. brasiliensis* (ATCC 16404.) Esse composto é considerado um dos mais utilizados pela indústria de alimentos para o controle microbiano (MENEGARO et al., 2016), apesar de trabalhos recentes demonstrarem sua baixa eficácia para o controle de fungos (BERNARDI et al., 2019, LEMOS et al., 2020; MENEGARO et al., 2016). A presença de matéria orgânica durante o processo de higienização é bastante comum na indústria de alimentos. Gómez-lopez et al. (2017), descreveram que o cloro pode reagir com matéria orgânica podendo levar a formação de trialometano, e muitos desses são considerados compostos químicos cancerígenos.

O cloreto de benzalcônio também teve sua eficácia reduzida na presença de matéria orgânica em aproximadamente 1,50 log UFC. Nascimento et al. (2010) haviam descrito a baixa eficácia do quaternário de amônia na presença de proteínas. Outro resultado interessante observado em nosso estudo, demonstrou que esse composto apresenta melhores resultados de eficácia quando aplicado em baixas temperaturas (10 °C), diferentemente do iodo e ácido peracético que agiram melhor em temperatura de 40 °C. Esse resultado pode ser vantajoso para algumas indústrias de alimentos, visto que nesta etapa do processo de higienização não seria necessário aquecer a água para a realização da sanitização dos equipamentos e do ambiente.

O tempo de aplicação de 15 minutos geralmente é estipulado no rótulo dos sanitizantes pelos fornecedores, embora nem sempre seja respeitado pelas indústrias. Com este estudo pudemos observar que o tempo de exposição do sanitizantes durante 5 minutos não seria suficiente para uma efetiva ação dos sanitizantes estudados, exceto para o ácido peracético na concentração de 1,00% na temperatura de 40 °C ou para o cloreto de benzalcônio na concentração 2,00% na temperatura de 10 °C. Para esses dois compostos o tempo de exposição de 10 minutos na concentração mais alta testada já seria suficiente para a redução de 3 log UFC da cepa padrão *A. brasiliensis* (ATCC 16404).

Outra variável que deve ser avaliada com cuidado no momento do processo de higienização é a concentração do sanitizante que será utilizada. As concentrações mais baixas testadas não foram eficazes quando esses compostos foram aplicados nas diferentes variáveis de tempo, temperatura e presença/ausência de matéria orgânica. Mostrando mais uma vez, que as concentrações mais baixas estipuladas no rótulo devem ser evitadas quando o objetivo for o controle fúngico. Bernardi et al., (2019) haviam relatado em seu estudo a baixa eficácia das concentrações mais baixas trazidas no rótulo de cada sanitizante.

6 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que as espécies fúngicas termorresistentes apresentam diferença de sensibilidade quando expostas a diferentes agentes antimicrobianos. Entre as espécies estudadas, *Aspergillus aureoluteus* apresentou tolerância a todos os compostos testados. O gerador de fumaça a base de ortofenilfenol e o ácido peracético apresentaram os melhores resultados para o controle dessas espécies fúngicas. O gerador de fumaça apresentou eficácia frente a oito das dez cepas termorresistentes avaliadas, sendo um resultado interessante apesar desse composto ainda ser pouco utilizado pela indústria alimentícia. Já o ácido peracético apresentou eficácia na sua concentração mais alta para nove cepas termorresistentes. Além disso, para a obtenção dos melhores resultados em todos os sanitizantes químicos estudados deve-se priorizar a concentração mais alta estipulada no rótulo do produto, visto que nesse estudo as concentrações mais baixas estipuladas pelos fabricantes não foram eficazes.

As AE nas concentrações testadas nesse estudo não foram eficazes para nenhuma das espécies termorresistentes, nas concentrações mais baixas testadas de ambos os tipos de AE foram capazes de reduzir apenas 12-18% da população exposta da cepa *Paecilomyces variotii* (PVCH 03). Mas em geral, as AE de ambos os tipos e concentrações reduziram em média 45% das populações testadas quando expostas frente a esses agentes. Com isso, seria necessário a realização de trabalhos futuros avaliando as águas eletrolisadas em concentrações mais altas.

Foi possível concluir que diferentes parâmetros como temperatura, tempo, concentração e presença de matéria orgânica frente a cepa padrão *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), influenciaram na eficácia dos sanitizantes. A presença de matéria orgânica reduziu em até 1,5 log UFC a eficácia do composto cloreto de benzalcônio. O tempo de exposição deve ser de 15 minutos, sendo que em 5 minutos de exposição não houve uma inativação fúngica adequada para nenhum dos compostos estudados. O ácido peracético e o iodo apresentaram melhores resultados de inativação fúngica na temperatura mais alta estudada (40° C), diferentemente do cloreto de benzalcônio cuja maior ação ocorreu na temperatura de 10 °C.

O desenvolvimento desse trabalho contribuiu para diminuir algumas lacunas existentes no tema abordado, fornecendo informações relevantes sobre o controle fúngico de espécies termorresistentes, bem como sobre as condições de uso mais adequadas para obtenção da maior eficácia para compostos sanitizantes de uso comum em indústrias alimentícias.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C.; TAVARES, R. R.; BORGES, A.; MERGULHÃO, F.; SIMÕES, M. Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2718–2732, 2013.
- AL-HAQ, M. I.; SUGIYAMA, J.; ISOBE, S. Applications of electrolyzed water in agriculture and food industries. **Food Science and Technology Research**, v. 11, p. 135-150, 2005.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. Minas Gerais: Editora Varela, p. 411, 2008.
- ANVISA (National Health Surveillance Agency). Consultation with authorized sanitizing products. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saneantes/produtos/25351204436201319/>. Acesso em: 26 jul 2019.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed), **American Public Health Association**, Washington, DC, USA (1998).
- ARAGÃO, G. M. F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados de polpa de morango**. 1989. 139p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.
- ARAÚJO, P. A., LEMOS, M., MERGULHÃO, F., MELO, L., SIMÕES, M. 2013. The influence of interfering substances on the antimicrobial activity of selected quaternary ammonium compounds. **International Journal Food Science and Technology**, p. 9, 2013.
- ATHAYDE, D. R.; FLORES, D. R. A.; SILVA, J. S.; GENRO, A. L. G.; SILVA, M. S.; KLEIN, B.; MELLO, R.; CAMPAGNOL, P. C. B.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CICHOSKI, A. J. Application of electrolyzed water for improving pork meat quality. **Food Research International**, v. 100, p. 757-763, 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN N° 88, de 26 de março de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598>. Acesso em: 25 ago 2021.
- BELTRAME, C. A., KUBIAK, G. B., LERIN, L. A., ROTTAVA, I., MOSSI, A. J., OLIVEIRA, D., CANSIAN, R. L., TREICHEL, H., TONIAZZO, G. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 32, 2012.
- BERNARDI, A. O. et al. Antifungal activity of comercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: Bakery spoilage fungi. **Food Microbiology**, v. 83, p. 59-63, 2019.

BERNARDI, A. O. STEFANELLO, A.; GARCIA, M. V.; PARUSSOLO, G.; STEFANELLO, R. F.; MORO, C. B.; COPETTI, M. V. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. **LWT**, v. 97, p. 25-30, 2018.

BERNARDI, A. O.; STEFANELLO, A.; GARCIA, M. V.; COPETTI, M. V. The control of cheese and meat product spoilage fungi by sanitizers: *in vitro* testing and food industry usage. **LWT**, v. 144, 111204, 2021.

BERNARDI, A. O.; GARCIA, M.V; COPETTI, M.V. Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p.28-34, 2019.

BEUCHAT, L. R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1506-1510, 1986.

BOTH, J. M. C., LONGARAY, S. M., AVANCINI, C. A. M. The disinfectant sodium hypochlorite as a sanitary barrier: activity conditions against *Staphylococcus aureus* isolated from foods implicated in foodborne disease outbreaks. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 254-8, 1992.

BRASIL. Resolução RDC n° 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC n° 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de agosto de 2010.

CHASSOT, A. L. C.; POISL, M. I. P.; SAMUEL, S. M. W. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid based disinfectant for decontamination of acrylic resins. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 2, p. 117-121, 2006.

CHEN, X., HUNG, Y. C. Effects of organic load, sanitizer pH and initial chlorine concentration of chlorine-based sanitizers on chlorine demand of fresh produce wash waters. **Food Control**, 77, p. 96-101, 2017.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-Colheita de Frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio** (2 ed.), UFLA, Brasil: Lavras, p. 785, 2005.

CICHOSKI, A. J. et al. Ultrasound and slightly acid electrolyzed water application: An efficient combination to reduce the bacterial counts of chicken breast during pre-chilling. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, p. 27-33, 2019.

CURIEL, G. J. et al. Risk and Control of Airborne Contamination. **Encyclopedia of food microbiology**. Academic Press, Londres, p. 1816-1822, 2000.

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. **Food Control**, v. 21, p. 370-380, 2010.

DAMIALIS, A.; KAIMAKAMIS, E.; KONOGLU, M.; AKRITIDIS, I.; TRAIID-HOFFMANN, C.; GIOLEKAS, D. Estimating the abundance of airborne pollen and fungal spores at variable elevations using an aircraft: how high can they fly? **Scientific Reports**, v. 7, p. 44535, 2017.

DIJKSTERHUIS, J.; NIJSSE, J.; HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E. A. High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 157-170, 2007.

FABRIZIO, K. A.; CUTTER, C. N. Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 66, p.1379-84, 2003.

FANG, J.L., CANNON, J. L., HUNG, Y. C. The efficacy of EO waters on inactivating norovirus and hepatitis A virus in the presence of organic load. **Food Control**, 61, pp. 13-19, 2016.

FAZLARA, A.; EKHTELAT, M. The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. American-Eurasian. **Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, p. 23-29, 2012.

FERGUSON, R. Bioaerosol biomonitoring: Sampling optimization for molecular microbial ecology. **Molecular Ecology Resources**, v. 19, p. 672-690, 2019.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039 -1042, 2011.

FERREIRA, E. H. et al. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, p. 164-171, 2011.

FILIPA, V. M., SILVA, E. Resistant moulds as pasteurization target for cold distributed high pressure and heat assisted high pressure processed fruit products. **Journal of Food Engineering**, v. 282, p. 109998, 2020.

FLORES, V. A. **Avaliação da eficiência de sanitizantes comerciais e de um fumígeno utilizados no controle da contaminação bacteriana do ambiente em indústrias alimentícias**. 2019. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

FRĄC, M.; JEZIEWSKA-TYSX, S.; YAGUCHI, T. Occurrence, detection, and molecular and metabolic characterization of heat resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. **Advances in Agronomy**, v. 132, p. 161-204, 2015.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; **Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals**. Chelkowski, J. (Ed.), *Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi, and Quality in Drying and Storage*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 441-476, 1991.

GARCIA, M. V. et al. Effect of temperature on inactivation kinetics of three strains of *Penicillium paneum* and *P. roqueforti* during bread baking. **Food Control**, v. 96, p. 456-462, 2019.

GARCIA, M. V. et al. Incidence of spoilage fungi in the airo f bakeries with different hygienic status. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 254-261, 2019

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M., GIL, I. M., ALLENDE, A. A novel electrochemical device as a disinfection system to maintain water quality during washing of ready to eat fresh produce. **Food Control**, v. 71, p. 242-247, 2017.

GUENTZEL, J. L. et al. Postharvest management of gray mold and brown rot on surfaces of peaches and grapes using electrolyzed oxidizing water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 54-60, 2010.

HAN, D.; HUNG, Y.C.; WANG, L. Evaluation of the antimicrobial efficacy of neutral electrolyzed water on pork products and the formation of viable but nonculturable (VBNC) pathogens. **Food Microbiology**, v. 73, p. 227-236, 2018.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. **Food spoilage fungi II**. Heat Resistant Fungi. CSIRO Division of Food Research, North Ryde, N.S.W., 2113, v.44, p.73-82, 1984.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Current taxonomy and identification of foodborne fungi. **Current Opinion in Food Science**, v. 17, p. 84-88, 2017.

HSU, S. Y. Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 171-176, 2005.

JAGLIC, Z.; CERVINKOVA, D.; VIKOVA, H.; MICHU, E.; KUNOVA, G.; BABAK, V. Bacterial biofilms resist oxidising agents due to the presence of organic matter. **Journal of Food Sciences**, v. 30, p. 178-187, 2012.

JO, H., TANGO, C. N., OH, D. Influence of different organic materials on chlorine concentration and sanitization of slightly acidic electrolyzed water. **LWT**, v. 92, p. 187-194, 2018.

KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. Occurrence of heat resistance species of *Aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v. 198, p. 1322, 1963.

KICH, J. D., BOROWSKY, L. M., SILVA, V. S., RAMENZONI, M., TRIQUES, N., KOOLER, F. L., CARDOSO, M. R. I. Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella Typhimurium* strains isolated from swine. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 33-39, 2004.

KING JUNIOR, A. D. Heat resistance of *Talaromyces flavus* ascospores as determined by two phase slug flow heat exchanger. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 147-151, 1997.

KIURA, H. et al. Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, p. 285-293, 2002.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, p.410-412/437, 1997.

KUAYE, A.Y. **Limpeza e sanitização na indústria de Alimentos**. Atheneu. Rio de Janeiro. 2017.

LEMOS, J. G., STEFANELLO, A., BERNARDI, A. O., GARCIA, M. V., MAGRINI, L. N., CICHOSKI, A. J., WAGNER, R., COPETTI, M. V. 2020. Antifungal efficacy of sanitizers and electrolyzed waters against toxigenic *Aspergillus*. **Food Rest Int.** 137, 109451.

MCDONNELL, G. GRIGNOL, G.; ANTLOGA, K. Vapor phase hydrogen peroxide decontamination of food contact surfaces. Dairy. **Food and Environmental Sanitation**, v. 22, p. 868-873, 2002.

MENEGARO, A., FLORES, A. F., SIMER, P., SILVA, F. I., SBARDELOTTO, P. R. R., PINTO, E. P. Sanitizantes: Concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, p. 171-174, 2016.

MOLINA, P. D. S., KINDLEIN, L., BERGAMANN, G. B., AVANCINI, C. A. M. In vitro simulations of use conditions of disinfectants and evaluation of its efficacy on survivors bacteria to surfaces hygienization in bovine slaughterhouse. **Revista Brasileira de Ciência Veerinária**, v. 17, p. 134-138, 2010.

MORI, Y.; KOMATSU, S.; HATA, Y. Toxicity of electrolyzed strong acid aqueous solution-subacute toxicity test and effect on oral tissue in rats. **Odontology**, v. 84, p. 619-626, 1997.

MULLANE, N. R. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 73-81, 2007.

NASCIMENTO, H. M., DELGADO, D. A., BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de diferentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, p. 11-12, 2010.

NORME FRANÇAISE, NF T 72-281. **Procedés de Déinfection des Surfaces à Volei Aérea** - Determinação de l'activité bactéricide, fongicide, leveduricide, mycobactéricide, tuberculocida esporicida et virucida incluant lês bactériophages, 2014.

OKANDA, T. et al. Slightly acidic electrolyzed water disrupts biofilms and effectively disinfects *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, p. 452-457, 2019.

OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 53, p. 166, 1934.

PARUSSOLO, G. et al. Fungi in air, raw materials and surface of dry fermented sausage produced in Brazil. **LWT**, v. 108, p. 190-198, 2019.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, p. 413, 1985.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic and Professional, UK, 1997.

PRANGE, A. et al. Fusarium -inoculated wheat: Deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. **Food Control**, v. 16, p. 739-745, 2005.

PROKSA, B. *Talaromyces flavus* and its metabolites. **Chemical Papers**, v. 64, p. 696-714, 2010.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**, v. 2, p. 613-631, 2010.

RACIOPPI, F. et al. Household bleaches based on sodium hypochlorite: review of acute toxicology and poison control center experience. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 845-861, 1994.

RICO-MUNOZ, E. Heat resistant molds in foods and beverages: recent advances on assessment and prevention. **Current Opinion in Food Science**, v. 17, p. 75-83, 2017.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J.; Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. **Journal of Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 597 - 610, 1997.

SANT'ANA, A. S.; SIMAS, R. C.; ALMEIDA, C. A. A.; CABRAL, E. C.; RAUBER, R. H.; MALLMANN, C. A.; EBERLIN, M. N.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 156-163, 2010.

SANTOS, J. L.; BERNARDI, A. O.; MORASSI, L. L. P.; SILVA, B. S.; COPETTI, M. V.; SANT'ANA, A. S. Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. **Food Research International**, v. 87, p. 103-108, 2016.

SANZANI, S. M.; REVERBERI, M.; PUNELLI, M.; IPPOLITO, A.; FANELLI, C. Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 323-331, 2012.

SCOTT, V. N.; BERNARD, D.T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 50, p. 18-20, 1987.

SHEN, C. Evaluation of chlorine efficacy against *Escherichia coli* O157: H7 survival and cross-contamination during continuous produces washing process with water quality change. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 89-93, 2014.

SHOLBERG, P. L., SHEPHARD, T., RANDALL, P., MOYLS, L. Use of measured concentrations of acetic acid vapour to control postharvest decay in d'Anjou pears postharvest. **Biology and Technology**, v. 32, p. 89-98, 2004.

SILVA, F. V. M. **Thermal processes: pasteurization**. Batt, C. A.; Tortorello, M. L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, Amsterdam, p. 577-595, 2014.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. A. **Principles of thermal processing: pasteurization** Simpson, R. (Ed.), *Engineering Aspects of Thermal Food Processing*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA, p. 577-595, 2009.

SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Avaliação da resistência térmica de *Byssoschlamys nivea* e de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 217-224, 2007.

SPLITTSTOESSER, D. F.; NIELSEN, P. V.; CHUREY, J. J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 599-603, 1993.

TANAKA, N.; FUJISAWA, T.; DAIMON, T.; FUJIWARA, K.; YAMAMOTO, M.; ABE, T. The effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on hemodialysis equipment. **Artificial Organs**, v. 23, p. 1055-1062, 1999.

TENG, Z., LUO, Y., ALBORZI, S., ZHOU, B., CHEN, L., ZHANG, J., ZHANG, B., MILLNER, P., WANG, Q. Investigation on chlorine-based sanitization under stabilized conditions in the presence of organic load. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 150-157, 2018.

TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, p 243-263, 1994.

TRANQUILINI, R.; SCARAMUZZA, N.; BERNI, E. Occurrence and ecological distribution of Heat Resistant Moulds Spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 116-123, 2017.

WAGHMARE, R. B.; ANNAPURE, U. S. Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 3, p. 62-69, 2015.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Occurrence of heat resistant fungi in apple juice. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, 2009.

WOOD, P.R. **Cross infection control in dentistry**. A practical illustrated guide. (1 ed.), Mosby, London, p. 99-106, 1992.