

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**MARISTELA MENDES AGUIAR**

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TECNOLÓGICO: REDUÇÃO DE RECURSOS  
ECONÔMICOS UTILIZADOS NO MÉTODO *CLEAN IN PLACE* (CIP)**

**UBERABA**

**2021**

**MARISTELA MENDES AGUIAR**

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TECNOLÓGICO: REDUÇÃO DE RECURSOS  
ECONÔMICOS UTILIZADOS NO MÉTODO *CLEAN IN PLACE* (CIP)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, área de Processos Tecnológicos, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Tecnológica.

Nome da orientadora: Profa. Dra. Emiliane Andrade Araújo Naves

Nome da coorientadora: Profa. Dra. Aline Dias Paiva

**UBERABA**

**2021**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

A23o Aguiar, Maristela Mendes  
Otimização de processo tecnológico: redução de recursos econômicos  
utilizados no método *Clean in Place* (CIP) / Maristela Mendes Aguiar. --  
2021.  
75 f. : il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021  
Orientadora: Profa. Dra. Emiliane Andrade Araújo Neves  
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Dias Paiva

1. Alimentos - Manuseio - Medidas de segurança. 2. Higiene dos  
alimentos. 3. Leite - Medidas de segurança. 4. *Bacillus cereus*. 5. Biofilmes.  
I. Neves, Emiliane Andrade Araújo. II. Universidade Federal do Triângulo  
Mineiro. III. Título.

CDU 641:613

**MARISTELA MENDES AGUIAR**

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TECNOLÓGICO: REDUÇÃO DE RECURSOS  
ECONÔMICOS UTILIZADOS NO MÉTODO CLEAN IN PLACE (CIP)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 17 de dezembro de 2021

**Banca Examinadora:**

Dra. Emiliane Andrade Araújo Naves – Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Priscila Cristina Bizam Vianna  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Patrícia Campos Bernardes  
Universidade Federal do Espírito Santo



Documento assinado eletronicamente por EMILIANE ANDRADE ARAUJO NAVES, Professor do Magistério Superior, em 17/12/2021, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA CRISTINA BIZAM VIANNA, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2021, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Campos Bernardes, Usuário Externo**, em 17/12/2021, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0631623** e o código CRC **E85A3521**.

Dedico ao meu irmão, Murilo, que estará eternamente no meu coração.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me proporcionado força e amparo.

À minha família Vera (mãe), Luzia (vó), Rafael (marido). E de modo especial, ao meu irmão, Murilo, que sempre foi meu companheiro, mas infelizmente faleceu sendo mais uma vítima da covid-19, em 2021.

À professora e orientadora Dra. Emiliane Andrade Araújo Naves pela amizade e por todos os ensinamentos e orientações, que contribuíram com meu projeto.

Ao professor e amigo Lucas Donizete Silva por todos os ensinamentos e contribuições com meu projeto. Agradeço ainda a sua disponibilidade e parceria.

À professora Dra. Aline Dias Paiva que cedeu gentilmente a bactéria do estudo. Agradeço ainda sua disposição em colaborar com esse trabalho.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para realização desse trabalho.

## RESUMO

As linhas de processamento de alimentos, especialmente as de laticínios, oferecem uma ampla variedade de microambientes, nos quais uma diversidade de micro-organismos pode multiplicar e formar biofilmes. Outro desafio para a indústria de alimentos, são os recursos econômicos e ambientais associados aos processos de higienização. Assim, é imprescindível manter, periodicamente, procedimentos eficientes de higienização industrial, sendo o método mais comumente realizado o *clean in place* (CIP). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes condições do método CIP e propor uma otimização do processo convencional. Para realização deste trabalho foi utilizado um protótipo de uma linha de circulação de leite de aço inoxidável. Nessa linha, foram utilizadas superfícies de prova em diferentes geometrias: trecho reto, tê, cotovelo, expansão e redução, a fim de representarem trechos e acessórios comuns da indústria láctea. As geometrias após a sua higienização foram preenchidas com leite UHT integral e inoculadas com células de *Bacillus cereus*, previamente ativado. Após a incubação, foram inseridas na linha de circulação de leite para submissão ao CIP convencional. Logo após o processo convencional, as geometrias foram submetidas à técnica de *swab* para a remoção das células microbianas para obtenção do número final de células aderidas. A fim de otimizar o processo CIP, foram propostas configurações do fluxo pulsado na etapa de sanitização, nas quais as variáveis concentração da solução sanitizante e o tempo de execução foram variadas. Por fim, a superfície de resposta avaliou a influência das variáveis em estudo e a desejabilidade determinou as melhores condições operacionais do CIP para todas as geometrias. A geometria tê foi a mais desafiante do estudo, possivelmente pela presença de áreas de recirculação e de estagnação de fluidos, que reduzem a velocidade do fluxo. As variáveis estudadas foram estatisticamente significativas na redução decimal de *Bacillus cereus* aderidos nas superfícies. O ponto ótimo, determinado pela desejabilidade, reduziu o tempo de parada do processo e minimizou o consumo de energia e do agente sanitizante e, ainda, foi capaz de produzir as mesmas reduções decimais nas geometrias cotovelo, expansão e redução, quando comparado com o CIP convencional, e de aumentar a redução decimal na geometria trecho reto. Apesar da significativa diminuição da presença de micro-organismos na geometria tê, em dois ciclos, essa superfície permaneceu sem atender às recomendações de órgãos oficiais ou de entidades científicas em relação à quantidade de UFC.cm<sup>-2</sup> presente nesta superfície. Com isso, sugere-se que haja a continuidade nesta linha de pesquisa para que uma configuração seja ajustada a fim de otimizar ainda mais a higienização desta geometria.

Palavras-chave: *Clean in place*. Sanitizantes. Biofilme. *Bacillus cereus*. Leite.



## ABSTRACT

Food processing lines, especially the dairy, offer a wide variety of microenvironments in which a variety of microorganisms can multiply and form biofilms. Another challenge for the food industry is the economic and environmental resources associated with sanitation processes. Thus, it is essential to periodically maintain efficient industrial hygiene procedures, with the clean in place (CIP) being the most commonly performed method. In this context, the objective of this work was to evaluate different conditions of the CIP method and to propose an optimization of the conventional process. To carry out this work, a prototype of a stainless steel milk circulation line was used. In this line, test surfaces in different geometries were used: straight stretch, tee, elbow, expansion and reduction, in order to represent common stretches and accessories in the dairy industry. The geometries after cleaning were filled with whole UHT milk and inoculated with previously activated *Bacillus cereus* cells. After incubation, they were inserted into the milk circulation line for submission to conventional CIP. Right after the conventional CIP process, the geometries were submitted to the swab technique to remove the microbial cells to obtain the final number of adhered cells. In order to optimize the CIP process, pulsed flow configurations were proposed in the sanitization step, in which the variables sanitizing solution concentration and execution time were varied. Finally, the response surface evaluated the influence of the variables under study and the desirability determined the best operating conditions for the CIP for all geometries. The tee geometry was the most challenging in the study, possibly due to the presence of areas of recirculation and stagnation of fluids, which reduce the flow velocity. The variables studied were statistically significant in the decimal reduction of *Bacillus cereus* adhered to surfaces. The optimal point, determined by desirability, reduced process downtime and minimized energy and sanitizing agent consumption, and was also able to produce the same decimal reductions in elbow, expansion and reduction geometries when compared to CIP conventional, and to increase the decimal reduction in straight stretch geometry. Despite the significant decrease in the presence of microorganisms in the tee geometry, in two cycles, this surface did not meet the recommendations of official bodies or scientific entities in relation to the amount of CFU.cm<sup>-2</sup> present on this surface. With this, it is suggested that there is continuity in this line of research so that a configuration is adjusted in order to further optimize the hygiene of this geometry.

Keywords: Clean in place. Sanitizers. Biofilm. *Bacillus cereus*. Milk.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas da produção de lácteos.....	19
Figura 2 – Processamento do leite no laticínio.....	20
Figura 3 – Forças superadas para remoção de resíduos.....	22
Figura 4 – Adesão da incrustação do leite na superfície .....	25
Figura 5 – Representação dos estágios de formação e desenvolvimento do biofilme .....	27
Figura 6 – Perfil de velocidade para fluxos laminar e turbulento .....	30
Figura 7 – Perfil de velocidade de vazão pulsada para diferentes ondulações.....	32
Figura 8 – Efeito dos surfactantes .....	35
Figura 9 – Funções de desejabilidade individuais para otimização simultânea .....	37
Figura 10 – Representação esquemática do modelo de linha de circulação de leite .....	40
Figura 11 – Pulsação do fluxo quadrático .....	44
Figura 12 – Cinética de adesão na superfície do cupom de aço inoxidável .....	48
Figura 13 – Espectro FTIR-ATR do biofilme de <i>Bacillus cereus</i> no aço inoxidável após 16 horas de incubação.....	50
Figura 14 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria trecho reto, em função das variáveis tempo e concentração.....	55
Figura 15 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria tê, em função das variáveis tempo e concentração. ....	57
Figura 16 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria cotovelo, em função das variáveis tempo e concentração.....	58
Figura 17 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria expansão, em função das variáveis tempo e concentração.....	60
Figura 18 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria redução, em função das variáveis tempo e concentração.....	61
Quadro 1 – Riscos da higienização de um pasteurizador de leite .....	24
Quadro 2 – Etapas da higienização industrial .....	33
Quadro 3 – Solubilidade dos resíduos .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor mínimo da composição do leite cru refrigerado, a partir de 2018, Brasil.....	17
Tabela 2 – Programa de higienização CIP.....	43
Tabela 3 – Níveis codificados e reais das variáveis que foram estudadas. ....	45
Tabela 4 – Matriz de planejamento em variáveis reais e codificadas. ....	46
Tabela 5 – Redução decimal e contagem final de <i>Bacillus cereus</i> nas diferentes geometrias, submetidas ao CIP convencional.....	51
Tabela 6 – Reduções decimais para cada geometria do planejamento experimental.....	52
Tabela 7 – Comparação da redução decimal da geometria t $\hat{e}$ , no CIP convencional e no ponto central do planejamento do CIP com fluxo pulsado.....	53
Tabela 8 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria trecho reto.....	54
Tabela 9 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria trecho reto.....	54
Tabela 10 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria t $\hat{e}$ .....	56
Tabela 11 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria t $\hat{e}$ .....	56
Tabela 12 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria cotovelo.....	57
Tabela 13 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria cotovelo.....	58
Tabela 14 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria expansão.....	59
Tabela 15 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria expansão.....	59
Tabela 16 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria redução. ....	60
Tabela 17 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria redução.....	61
Tabela 18 – Valores da desejabilidade.....	62
Tabela 19 – Valor estimado para a redução decimal e média da redução decimal obtida para cada geometria, a partir da metodologia da desejabilidade.....	62
Tabela 20 – Média da redução decimal nos processos do CIP convencional e otimizado.....	63
Tabela 21 – Comparação dos dados da etapa de sanitização do CIP convencional e com fluxo pulsado, que refletem nos recursos econômicos e ambientais.....	64

## LISTA DE SIGLAS

CIP – *Clean-in-place* (Limpeza no local)

FAO – *Food and Agriculture Organization* (Organização de Alimentos e Agricultura)

FTIR – *Fourier Transform Infra Red*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

PCA – *Plate Count Agar* (Ágar padrão para contagem)

RD – Redução Decimal ou Redução Logarítmica

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UHT – *Ultra High Temperature* (Temperatura Ultra Alta)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1 LEITE.....	17
<b>3.1.1 Composição</b> .....	17
<b>3.1.2 Mercado</b> .....	18
<b>3.1.3 Processo tecnológico</b> .....	19
3.2 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	21
3.3 MÉTODO DE HIGIENIZAÇÃO INDUSTRIAL <i>CLEAN IN PLACE</i> (CIP) .....	21
3.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO <i>CLEAN IN PLACE</i> (CIP) .....	22
3.5 FATORES QUE INTERFEREM NA HIGIENIZAÇÃO .....	23
<b>3.5.1 Incrustação</b> .....	24
3.5.1.1 Adesão e formação de biofilmes .....	25
<b>3.5.2 Tempo e temperatura</b> .....	28
<b>3.5.3 Projeto higiênico</b> .....	28
<b>3.5.4 Qualidade da água</b> .....	29
<b>3.5.5 Força mecânica</b> .....	30
3.5.5.1 <i>Pulsção do fluxo</i> .....	31
3.6 ETAPAS DA HIGIENIZAÇÃO INDUSTRIAL .....	32
<b>3.6.1 Pré-lavagem e enxágue</b> .....	33
<b>3.6.2 Limpeza com detergentes</b> .....	33
<b>3.6.3 Sanitização</b> .....	35
3.7 MÉTODOS: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E DESEJABILIDADE .....	36
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	40
4.1 UNIDADE EXPERIMENTAL .....	40

4.2 ADESÃO MICROBIANA .....	41
<b>4.2.1 Cinética de adesão .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.2 Compostos exopoliméricos (EPS) do biofilme .....</b>	<b>42</b>
4.3 PROCESSO CIP CONVENCIONAL .....	43
4.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO CIP CONVENCIONAL .....	44
<b>4.4.1 Funções de desejabilidade .....</b>	<b>46</b>
4.5 CONSUMO DE ENERGIA .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1 ADESÃO MICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	48
<b>5.1.1 Cinética de adesão .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2 Compostos exopoliméricos (EPS) do biofilme .....</b>	<b>49</b>
5.2 PROCESSO CIP CONVENCIONAL .....	50
5.3 PROCESSO CIP COM FLUXO PULSADO .....	52
<b>5.3.1 Trecho reto .....</b>	<b>54</b>
<b>5.3.2 Tê .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.3 Cotovelo .....</b>	<b>57</b>
<b>5.3.4 Expansão .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.5 Redução .....</b>	<b>60</b>
5.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO CIP .....	62
5.5 REDUÇÃO DE RECURSOS ECONÔMICOS UTILIZADOS NO MÉTODO CIP .....	63
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos é uma preocupação mundial, inclusive em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nesse contexto, destaca-se a necessidade de as indústrias de alimentos garantirem a qualidade microbiológica, visto que a inexistência de um processo eficiente pode resultar na deterioração dos alimentos; causar perdas econômicas; produzir alimentos contaminados por patógenos; afetar a satisfação e a saúde do consumidor (DJUKIC et al., 2016).

Assim, no processo tecnológico um conjunto de etapas deve ser seguido a fim de que a indústria de alimentos, especialmente de laticínios, entregue o produto final com qualidade ao consumidor, bem como alcance os resultados esperados, sem prejuízo ao meio ambiente (TETRA PAK, 2020).

Entre essas etapas, na indústria de alimentos, destaca-se a higienização, que deve ser realizada periodicamente, a fim de garantir a qualidade microbiológica final dos produtos (CLETO et al., 2012; MØRETRØ; LANGSRUD, 2017). A higienização é fundamental, visto que os resíduos indesejáveis presentes nas superfícies de processamento de alimentos podem comprometer a qualidade do produto, por meio da contaminação cruzada e microbiana, além de reduzir a eficiência dos equipamentos (STIER, 2020; PALABIYIK et al., 2015).

Entre os contaminantes presentes nas superfícies incluem-se os biofilmes, cuja remoção é mais difícil, além de representarem sérios problemas econômicos e de saúde pública (FRYER; ASTERIADOU, 2009; FRYER et al., 2011; GALIÉ et al., 2018).

Os biofilmes podem ser formados por comunidades de vários micro-organismos, tais como de bactérias, vírus, protozoários e fungos. Durante sua formação, eles são inseridos em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares, constituída principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Assim, o biofilme apresenta mais vantagens aos micro-organismos do que quando na forma livre, visto que essa matriz os protege de agentes antimicrobianos, além de fornecer a estabilidade mecânica, mediante sua adesão às superfícies (FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016).

Nas indústrias de alimentos diversas superfícies podem ser colonizadas por biofilme, em temperaturas distintas e com diferentes espécies colonizadoras (CLETO et al., 2012; GALIÉ et al., 2018). Nos laticínios, o *Bacillus cereus* é um dos micro-organismos mais preocupantes desse segmento, principalmente na forma de biofilmes, visto que sua multiplicação pode resultar em vários defeitos nos produtos lácteos, causar intoxicações alimentares e provocar

danos aos equipamentos (KUMARI; SARKAR, 2016).

A higienização industrial geralmente é realizada pelo método *clean in place* (CIP), em razão das soluções de limpeza e sanitização circularem nas tubulações e nos equipamentos, sem a necessidade da desmontagem de nenhum componente da linha de produção (PALABIYIK et al., 2015; THOMAS; SATHIAN, 2014; TRINH et al., 2017). Os procedimentos de higienização são definidos a partir do tipo de resíduo a ser removido, mas basicamente compreendem as etapas de lavagens com água, limpeza com detergente e sanitização química ou térmica (GOODE et al., 2013).

O método CIP tem várias vantagens, entre elas: custos reduzidos de mão-de-obra, automação, uso de soluções mais concentradas, operação mais rápida, menos vazamentos e possíveis danos ao equipamento pela desmontagem, recirculação de soluções, higienização mais eficaz (STIER, 2020).

No entanto, os processos de higienização representam um dos maiores desafios na indústria de alimentos em razão dos fatores econômico e ambientais, assim como a indispensabilidade diária de interromper a produção para realizá-los (FRYER et al., 2011; PAUL et al., 2014). De acordo com o trabalho realizado por Yang et al. (2018), no método CIP, a sanitização, seguida da limpeza com detergente, são as etapas que mais consomem tempo para serem executadas nesse processo. Além de que a sanitização representa o maior custo econômico no método CIP convencional, seguida pelos custos das etapas de enxágue com água.

Portanto, é necessário que os processos de higienização, especialmente o método CIP, sejam otimizados a fim de reduzirem recursos econômicos, tais como tempo, energia, soluções de limpeza e sanitização, consumo de água, além de garantirem a qualidade final dos produtos (KUMARI; SARKAR, 2016; PETTIGREW et al., 2015; PIEPIÓRKA-STEPUK; DIAKUN; MIERZEJEWSKA, 2016).

Uma alternativa para melhorar a eficiência do método CIP é por meio da pulsação do fluxo, que consiste na aplicação de um fluxo estacionário, seguido de um fluxo oscilante, visando obter maior tensão de cisalhamento em direção à parede (AUGUSTIN et al., 2010; GOODE et al., 2013; WEIDEMANN; VOGT; NIRSCHL, 2014). De acordo com estudos anteriores, a aplicação da pulsação do fluxo possibilita: i) aumentar a remoção dos esporos bacterianos aderidos à superfície (BLEL et al., 2009a; BLEL et al., 2009b); ii) reduzir o tempo necessário do processo (BODE et al., 2007; SILVA et al., 2020a); iii) melhorar a higienização de superfícies complexas e remover células de biofilme (SILVA et al., 2020a); iv) difundir os agentes químicos na superfície e reduzir os recursos econômicos que refletem nos custos da higienização (AUGUSTIN et al., 2010; SILVA et al., 2020a).



Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes condições do método CIP e propor uma otimização do processo, por meio da pulsação do fluxo na etapa de sanitização, visando melhorar a qualidade microbiológica final dos produtos e reduzir o consumo dos recursos econômicos de energia, solução sanitizante e tempo, utilizados no processo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes condições do método CIP e propor uma otimização do processo convencional sem perder eficiência da higienização.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a inserção da pulsação do fluxo na etapa de sanitização;
- b) Estudar os níveis alcançados de redução decimal na carga microbiana de *Bacillus cereus* utilizados na contaminação desafio;
- c) Otimizar os recursos econômicos de: energia, solução sanitizante e tempo, utilizados no método *clean in place* (CIP).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LEITE

Segundo o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, o leite, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017b). No geral, o leite é opaco branco, tem odor fraco e o sabor levemente adocicado (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

De acordo com a Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o leite cru refrigerado é o produzido em propriedades rurais, refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial (BRASIL, 2018).

##### 3.1.1 Composição

O leite é composto de água, o que representa aproximadamente 88% de sua composição, e de sólidos, como gordura, lactose, proteínas e minerais. A legislação determina a porcentagem mínima da composição do leite, no entanto essa quantidade depende de fatores como idade e raça da vaca, nível de atividade, estágio da lactação e intervalo entre ordenhas (VACLAVIK; CHRISTIAN, 2014).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, determina o teor mínimo de gordura, proteína, lactose e sólidos não gordurosos e totais do leite cru refrigerado, conforme Tabela 1 (BRASIL, 2018).

Tabela 1 – Teor mínimo da composição do leite cru refrigerado, a partir de 2018, Brasil

<b>Composição</b>	<b>Teor mínimo g/100g</b>
Gordura	3,0
Proteína	2,9
Lactose	4,3
Sólidos não gordurosos	8,4
Sólidos totais	11,4

Fonte: Adaptado de Brasil, 2018

A gordura representa aproximadamente 3,5% da composição no leite integral, tem uma densidade baixa e pode ser centrifugada ou desnatada, produzindo o leite semidesnatado ou

desnatado. Vários ácidos graxos individuais são identificados na gordura do leite, como os fosfolípidios que representam aproximadamente 1% dessa gordura (VACLAVIK; CHRISTIAN, 2014).

A composição proteica do leite é formada por uma mistura de proteínas. A caseína está presente em maior quantidade, cerca de 80%, sendo que seus principais tipos são alfa, beta e kappa-caseína ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína). As frações de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseína são muito hidrofóbicas, no entanto a  $\kappa$ -caseína possui carboidratos ácidos (carregados) e, portanto, é mais hidrofílica. A caseína se organiza em micelas, que é composta também de matéria inorgânica, principalmente de fosfato de cálcio. Entre as funções das micelas, elas são responsáveis por determinarem a estabilidade física dos produtos lácteos durante o tratamento térmico, a concentração e o armazenamento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

O carboidrato principal do leite é a lactose, que representa de 4 a 6% da composição no leite (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Já os minerais, como cálcio e fósforo, estão presentes em níveis de aproximadamente 1% nessa composição (VACLAVIK; CHRISTIAN, 2014).

### **3.1.2 Mercado**

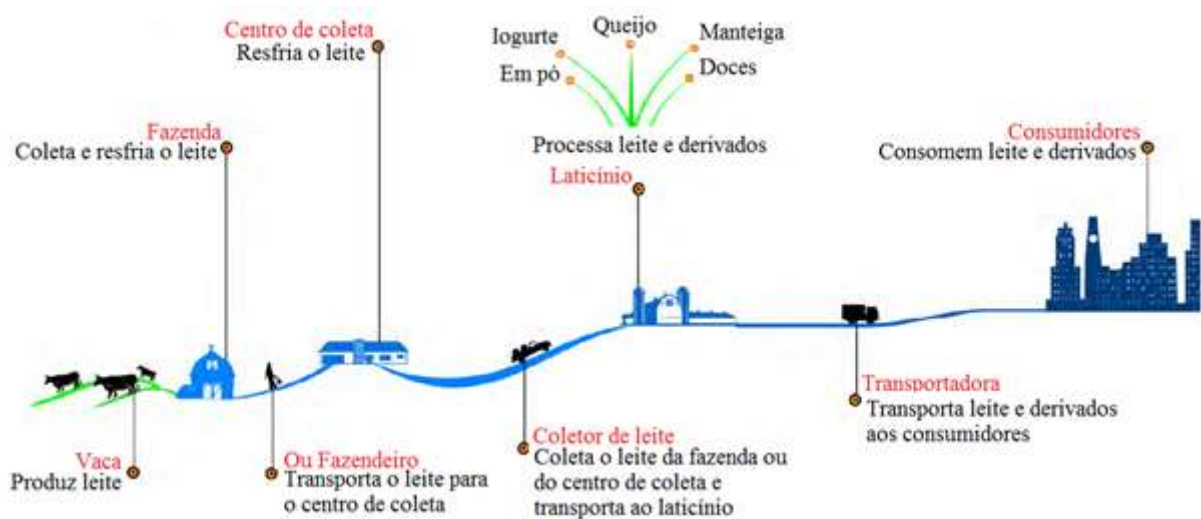
A forte demanda por lácteos está associada às questões nutricionais importantes para a saúde e as oportunidades econômicas (GROUT et al., 2020). No Brasil, em 2020, o ano de início da pandemia da Covid-19, a produção e o consumo de leite cresceram. O volume de leite adquirido pelos laticínios inspecionados atingiu recorde de 25,525 bilhões de litros, alta de 2,1% em relação a 2019, segundo os dados da Pesquisa Trimestral do Leite/IBGE. Entre os possíveis motivos que impactaram em tais crescimentos foi a vivência de hábitos antigos de preparar refeições, sobremesas, bolos e pães, o que aumentou o consumo médio de vários alimentos, entre eles do leite (EMBRAPA, 2021).

No país, a quantidade de leite cru adquirido no primeiro semestre de 2021 foi de aproximadamente 12,3 bilhões de litros. Entre os estados, Minas Gerais se destaca por representar 25% da quantidade total nesse período. A quantidade média do leite cru adquirido e industrializado no Brasil, nos últimos quatro anos, foi de aproximadamente 6 bilhões de litros, em cada trimestre do ano (IBGE, 2021).

### 3.1.3 Processo tecnológico

A transformação do leite cru em leite e derivados engloba várias etapas de produção, desde a propriedade rural até o laticínio e, após o processamento desses, os produtos são transportados aos consumidores finais, conforme a Figura 1 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2014).

Figura 1 – Etapas da produção de lácteos



Fonte: Adaptado de FAO, 2014

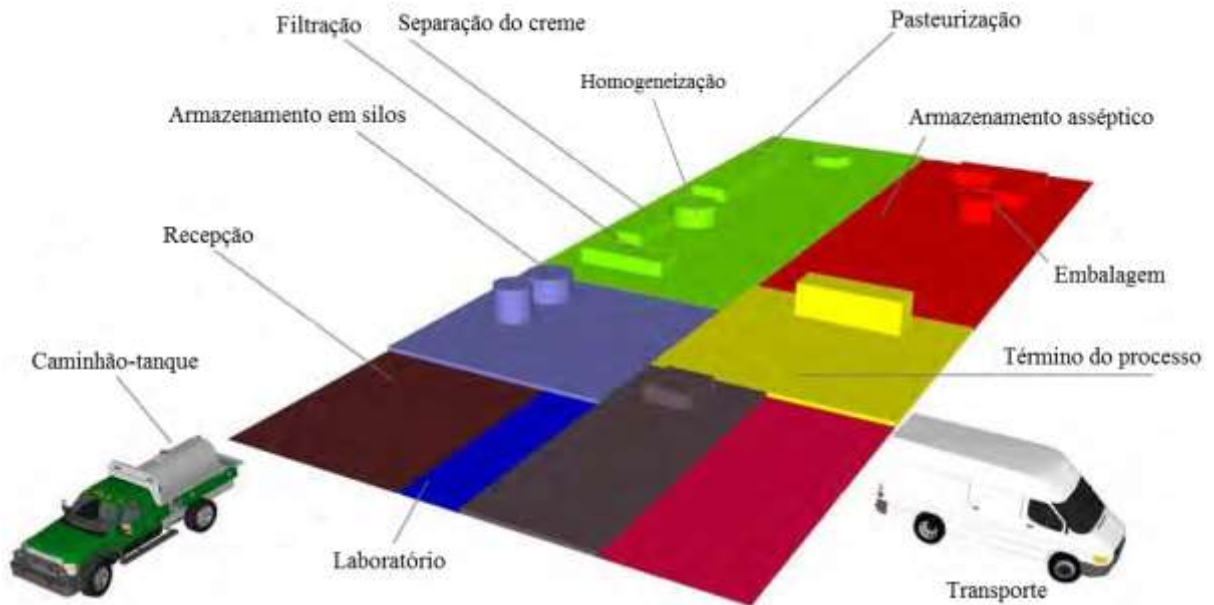
Nas propriedades rurais, a ordenha deve ser realizada em condições higiênicas e o armazenamento do leite cru deve ser refrigerado. Posteriormente, esse leite é transportado sob condições refrigeradas e higiênicas da propriedade rural (ou do centro de coleta) aos laticínios para processamento, por meio de caminhões-tanque (TETRA PAK, 2020).

Nos laticínios o processamento visa produzir produtos com qualidade e possui várias operações, tais como recepção, análises laboratoriais, estocagem, filtração, separação, homogeneização e pasteurização, conforme a Figura 2 (FAO, 2014).

As análises laboratoriais do leite são realizadas para verificar sua qualidade, como sabor e odor, condições de higiene, contagem de células somáticas e de bactérias totais, teor de proteína e gordura e outras análises físico-químicas (TETRA PAK, 2020). Legislações brasileiras regulamentam critérios de qualidade e de inspeção que devem ser seguidos, sendo o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, e a Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, que

dispõe, entre outras diretrizes, do regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado.

Figura 2 – Processamento do leite no laticínio



Fonte: Adaptado de FAO, 2014

Entre essas operações, a pasteurização visa eliminar todos os micro-organismos patogênicos e reduzir o número de alteradores, de forma a prolongar a vida útil e tornar o leite seguro para o consumo do ponto de vista microbiológico (VACLAVIK; CHRISTIAN, 2014).

As linhas de processamento de leite são apropriadas à multiplicação de micro-organismos, visto que possuem abundância de oxigênio e nutrientes, bem como são constituídas de vários microambientes (CLETO et al., 2012). Assim, perdas significativas de produtos de laticínios podem ser ocasionadas pela deterioração microbiana, devido à contaminação pós-pasteurização, ocorrida pela falha na higienização (HERVERT et al., 2016).

Pelos motivos mencionados, esse processo tecnológico exige que a higienização das linhas de processamento de leite seja eficiente, objetivando reduzir o risco de bactérias aderidas e consequente formação de biofilmes (CLETO et al., 2012). Portanto, a higienização industrial visa garantir que as instalações sejam mantidas em condições sanitárias adequadas, minimizando ou prevenindo significativamente os riscos de contaminações, tais como de patógenos ambientais e também de alergênicos alimentares (STIER, 2020).

### 3.2 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

No início do milênio, quando a ciência abriu caminhos para tecnologias cada vez mais eficazes, junto com o aumento da produtividade, vivenciou-se novas doenças. Entre elas, integram-se as transmitidas pelos alimentos, podendo atribuí-las à falta de higienização, incluindo a higiene pessoal, de equipamentos e do ambiente de processamento (DJUKIC et al., 2016).

Assim, dados sobre segurança microbiana, origem e rastreabilidade, impacto ambiental, higiene, vias de contaminação e avaliação de riscos são aspectos muito importantes na indústria de alimentos (MATUSZEK, 2012).

Nos produtores de alimentos, especialmente nos laticínios, a produção segura é realizada por meio da adesão às medidas de segurança alimentar e aos sistemas de gestão de riscos, como Boas Práticas de Higiene, Boas Práticas de Fabricação, Boas Práticas de Laboratório, Boas Práticas Agrícolas, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (DJUKIC et al., 2016; NADA et al., 2012).

Como parte dos sistemas de controle de qualidade, as indústrias de alimentos limpam e sanitizam regularmente os ambientes de produção, visando remover os resíduos de alimentos, a água e os contaminantes microbianos que se acumulam nas superfícies durante a produção. Assim, o possível risco microbiano pode ser contido, garantindo a qualidade microbiológica final dos produtos (MØRETRØ; LANGSRUD, 2017).

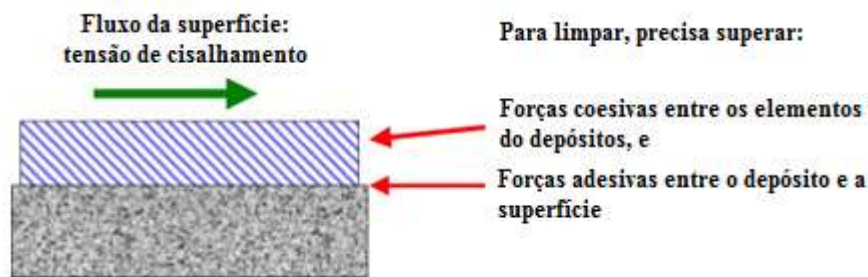
A fim de eliminar esses materiais indesejáveis, que proporcionam contaminação cruzada e interferem na eficiência dos equipamentos, muitos setores industriais realizam a higienização pelo método *clean in place* (CIP), que consiste em circular as soluções do processo de higienização, junto com processos térmicos, sem a desmontagem de nenhum componente da linha de produção (PALABIYIK et al., 2015).

### 3.3 MÉTODO DE HIGIENIZAÇÃO INDUSTRIAL *CLEAN IN PLACE* (CIP)

O método *clean in place* (CIP) refere-se ao processo de higienização, em que soluções de limpeza e sanitização circulam nas superfícies internas de tubulações e equipamentos, sem desmontá-los (THOMAS; SATHIAN, 2014). Esse processo é realizado para a produção de alimentos, após a execução de um processamento ou ao alterar uma linha para outra (TETRA PAK, 2015).

Durante a higienização deve-se superar as forças coesivas que unem os elementos do resíduo e forças de adesão entre o resíduo e a superfície, conforme a Figura 3 (PALABIYIK et al., 2015).

Figura 3 – Forças superadas para remoção de resíduos



Fonte: Adaptado de Fryer; Asteriadou, 2009

Os sistemas CIP têm várias vantagens, entre elas: custos reduzidos de mão-de-obra, automação, uso de soluções mais concentradas, operação mais rápida (tempo), menos vazamentos e possíveis danos ao equipamento pela desmontagem, recirculação de soluções e higienização mais eficaz (STIER, 2020).

Apesar das vantagens desse método, cabe frisar que a redução de desperdícios e de custos relacionados à higienização representam um dos maiores desafios na indústria de alimentos. Assim, a redução do consumo de tempo, água, produtos químicos e energia devem ser considerados a fim de otimizar a higienização de uma planta industrial, além de refletirem no impacto ambiental (FRYER et al., 2011).

### 3.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO *CLEAN IN PLACE* (CIP)

Diariamente, é necessário interromper a produção para limpar a planta de processamento de alimentos, especialmente de laticínios, a fim de remover as sujidades e incrustações formadas, visto que essas podem comprometer a qualidade do produto, por contaminação cruzada ou multiplicação microbiana (PAUL et al., 2014).

O método *clean in place* (CIP) está associado com o alto consumo de energia, água e produtos químicos (PAUL et al., 2014; PETTIGREW et al., 2015). As soluções do processo de higienização geram grandes custos econômicos e ambientais, além de que o aquecimento delas representa um consumo significativo de energia (DIF et al., 2013; EIDE; HOMLEID; MATTSSON, 2003).



Com o início da pandemia, a demanda de produtos de higienização aumentou e, conseqüentemente, houve uma alta dos preços desses produtos. No último trimestre de 2020, a tendência de contágio e morte pela doença esteve decrescente, tendo efeito direto na queda do custo desses itens. No entanto, o aumento dos casos a partir do início de 2021 elevou novamente a demanda e os preços desses itens. E esses custos foram refletidos no processo de produção do leite (EMBRAPA, 2021).

Outro fator muito importante no setor industrial é o consumo da água, inclusive para a realização da higienização. Nos laticínios, em média, 19% do consumo de água é dedicado ao processo de higienização (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA; FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017). Na Índia, que atualmente é o maior país produtor de leite, um estudo foi realizado em um laticínio e identificou-se que o método CIP, antes de um processo de otimização, era responsável por aproximadamente 75% do consumo total de água (BUABENG-BAIDOO et al., 2017).

Contudo, com o aumento da consciência ambiental, as indústrias de alimentos e de bebidas estão cada vez mais preocupadas com as questões ambientais, como o consumo de água, energia, tempo e soluções utilizadas durante a higienização. Nesse sentido, com o objetivo de reduzir custos econômicos e ambientais, é fundamental a otimização dos processos de higienização, especialmente do CIP (PETTIGREW et al., 2015; PIEPIÓRKA-STEPUK; DIAKUN; MIERZEJEWSKA, 2016).

Além dos fatores econômicos e ambientais, a otimização do processo CIP é essencial para os laticínios, visto que esse processo pode ser mais eficiente na eliminação de biofilmes, melhorando a qualidade dos produtos e processos (KUMARI; SARKAR, 2016).

Para otimização desse processo, devem ser considerados fatores que interferem na higienização, como incrustação, composição do alimento, tempo e temperatura, projeto higiênico, qualidade da água, força mecânica, soluções químicas (TAMIME, 2008).

### 3.5 FATORES QUE INTERFEREM NA HIGIENIZAÇÃO

Nos procedimentos, práticas e processos de higienização, devem ser considerados alguns elementos importantes, tais como tempo, temperatura, concentração das soluções, água, natureza dos materiais fabricados, superfícies, vazão, questões operacionais (STIER, 2020). Se esses elementos não forem considerados, eles poderão afetar a eficiência da higienização, conforme o Quadro 1 que apresenta os riscos da higienização de um pasteurizador de leite (ANDRADE, 2008).

Quadro 1 – Riscos da higienização de um pasteurizador de leite

<b>Etapa</b>	<b>Risco</b>
Remoção de resíduos	Se incompleta pode afetar a qualidade da higienização.
Enxágue	A água quente pode desnaturar proteína e a água fria pode solidificar gordura.
Preparo e aplicação de detergente e sanitizante	Se em tempo de contato curto e em concentração, velocidade e temperatura baixa podem afetar a qualidade da higienização. Em concentração mais alta pode gerar perda econômica e corrosão.
Enxágue intermediário	Pressão e fluxo altos podem originar aerossóis. Se incompleto pode ocasionar a presença de resíduos de solução de limpeza e a inativação de sanitizante.
Enxágue final	Se água de má qualidade microbiológica pode afetar a qualidade da higienização.

Fonte: Adaptado de Andrade, 2008

### 3.5.1 Incrustação

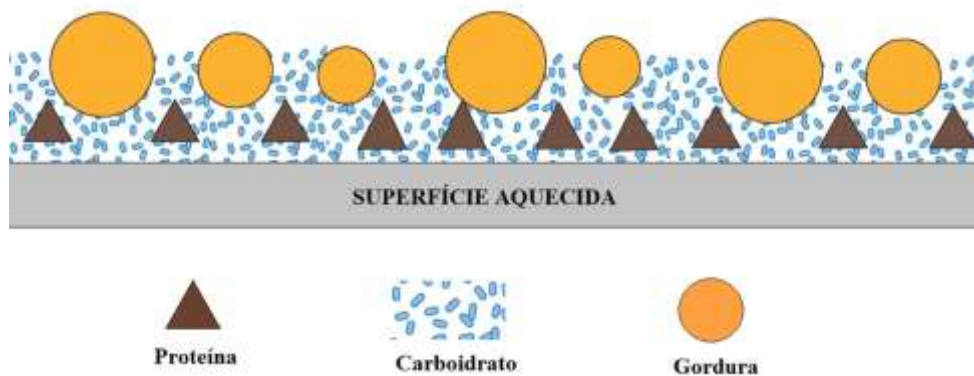
A incrustação é formada rapidamente, à medida que a superfície do equipamento de processamento entra em contato com o material alimentício (FRYER et al., 2011).

Inicialmente, as incrustações podem ser divididas em dois tipos básicos, as solúveis e insolúveis em água. As solúveis em água, como açúcares e alguns minerais, são facilmente removidas. Já as insolúveis em água são mais difíceis de remover e são divididas em orgânicas e inorgânicas (TETRA PAK, 2015):

- a) orgânicas: incluem gorduras, óleos, proteínas, amido e outros carboidratos. Essas incrustações são dissolvidas por detergentes alcalinos;
- b) inorgânicas: incluem os minerais. Essas incrustações são dissolvidas por detergentes ácidos.

A incrustação representa um problema oneroso na indústria de alimentos. Sua formação é geralmente inevitável devido ao tratamento térmico necessário para que os produtos desenvolvam determinadas características e para garantir a segurança microbiana do alimento (GOODE et al., 2013). Nos laticínios, quando o leite é aquecido, a incrustação começa a se formar e os resíduos aderem firmemente às superfícies, conforme a Figura 4 (TETRA PAK, 2020).

Figura 4 – Adesão da incrustação do leite na superfície



Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 2020

Portanto, nas indústrias de alimentos são formados uma grande variedade de resíduos de incrustações, que requerem diferentes níveis de higienização. Entre os resíduos mais difíceis de higienizar incluem os biofilmes, nos quais exigem que os processos de higienização eliminem os micro-organismos aderidos (FRYER; ASTERIADOU, 2009; FRYER et al., 2011).

### 3.5.1.1 Adesão e formação de biofilmes

Os biofilmes podem ser formados por comunidades de vários micro-organismos, tais como de bactérias, vírus, protozoários e fungos. Durante sua formação, eles são inseridos em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares, constituída principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Assim, o biofilme apresenta mais vantagens aos micro-organismos do que quando na forma livre, visto que essa matriz protege o biofilme de agentes antimicrobianos, além de fornecer a estabilidade mecânica, mediante sua adesão às superfícies (FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016).

Os biofilmes nas indústrias de alimentos constituem um sério problema econômico, visto que, por exemplo, podem corroer as superfícies metálicas ou, devido a presença de bactérias alteradoras, podem gerar odores e sabores indesejáveis. Nesses casos, os lotes de fabricação afetados devem ser removidos e eliminados, podendo inclusive prejudicar a marca da empresa no mercado. Além do fator econômico, a formação de biofilme nas fábricas de alimentos representa uma questão crucial de saúde pública, pois esses biofilmes podem conter espécies bacterianas patogênicas, que podem causar intoxicações alimentares, gastroenterite e doenças sistêmicas (GALIÉ et al., 2018).

Nos laticínios numerosos processos e estruturas, como tanques de leite cru, centrífugas de manteiga, tanques de queijo, pasteurizadores e equipamentos para embalagem, atuam como substratos de superfície para a formação de biofilme, em temperaturas distintas e com diferentes espécies colonizadoras (GALIÉ et al., 2018).

*Bacillus cereus* é um dos micro-organismos mais preocupantes das indústrias de laticínios, visto que sua multiplicação pode resultar em vários defeitos lácteos, além de causar intoxicações alimentares. Biofilmes desse micro-organismo podem ser formados, especialmente por sua excelente capacidade de adesão às superfícies de aço inoxidável, gerando sérios problemas de higiene e perdas econômicas, devido à deterioração de produtos lácteos e danos aos equipamentos (KUMARI; SARKAR, 2016).

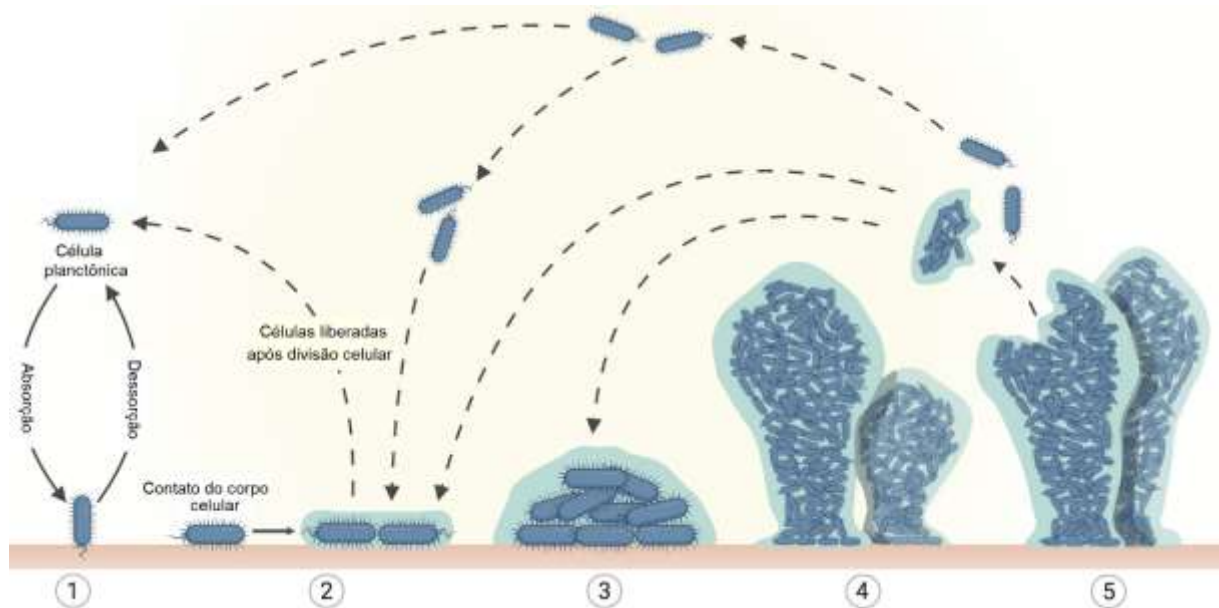
Portanto, em ambientes de processamento de alimentos, micro-organismos podem aderir às superfícies, sobreviver, multiplicar e formar biofilmes. As populações de biofilmes são densas, complexas e altamente estruturadas, encapsuladas em uma matriz extracelular autoproduzida e apresentam comportamento coordenado e coletivo (GIAOURIS et al., 2015).

A adesão das células microbianas à superfície ocorre rapidamente, sendo que inicialmente é realizado o condicionamento da superfície do material e a ligação reversível das células a essa superfície. Em seguida, a ligação se torna irreversível e o desenvolvimento de micro-colônias começa. Finalmente, a estrutura tridimensional do biofilme é formada, dando origem a um ecossistema complexo pronto para dispersão (GALIÉ et al., 2018; MIZAN; JAHID; HA, 2015).

Conforme a Figura 5, os principais estágios que representam a formação e o desenvolvimento do biofilme bacteriano podem ser dado como: (1) adsorção, (2) adesão, (3) formação de micro-colônias, (4) maturação e (5) dispersão. No entanto, esses estágios em estruturas reais são mais complexos e variados (GUZMÁN-SOTO et al., 2021).

As propriedades do material da superfície desempenham um papel importante na adesão bacteriana. Geralmente, as superfícies, tais como plástico, vidro, metal e madeira, são vulneráveis ao desenvolvimento de biofilme (SREY; JAHID; HA, 2013). Além desses fatores, características do meio, como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, também influenciam nessa adesão (NILSSON; ROSS; BOWMAN, 2011).

Figura 5 – Representação dos estágios de formação e desenvolvimento do biofilme



Fonte: Adaptado de Guzmán-Soto et al., 2021

No processo de fixação inicial, as forças de van der Waals governam as interações e são responsáveis pela estabilidade de complexos intermoleculares e pela adsorção de diferentes elementos na superfície. Além dessa força, à medida que a célula se aproxima da superfície as interações eletrostáticas começam a atuar, podendo resultar em interações atrativas ou repulsivas (ARAÚJO et al., 2010).

Na adesão, as propriedades físico-químicas de rugosidade e hidrofobicidade das superfícies também devem ser consideradas. Geralmente, quando a rugosidade média é aproximadamente do tamanho bacteriano (cerca de 1,0  $\mu\text{m}$ ) o processo de adesão é favorecido (SALUSTIANO et al., 2010).

As superfícies hidrofóbicas são mais propensas à adesão do biofilme em comparação com as hidrofílicas, pois facilitam o contato direto entre a célula e a superfície, visto que as interações hidrofóbicas contribuem para remoção do filme de água entre a célula e a superfície, para que as interações específicas e o contato físico da célula com a superfície sejam estabelecidos. Esse contato físico pode ocorrer pelos apêndices celulares, como flagelos e fímbrias (BERNARDES; ARAÚJO; ROSÁRIO, 2019).

Contudo, o processo de formação de biofilme é muito complexo, por esse motivo deve-se considerar todos os fatores mencionados para determinar se a adesão do biofilme é favorável (BERNARDES; ARAÚJO; ROSÁRIO, 2019). Essa complexidade, junto com a alta diversidade de ambientes de processamento de alimentos e as variedades de espécies

bacterianas colonizadoras dificultam a erradicação do biofilme nas indústrias de alimentos (GALIÉ et al., 2018).

### **3.5.2 Tempo e temperatura**

O tempo está associado com outros parâmetros, como o tipo de incrustação, temperatura, fluxo, reação química envolvida (FRYER et al., 2011). No trabalho de Silva et al. (2020a) e Silva et al. (2020b) o CIP convencional foi executado em um protótipo de uma linha industrial com incrustação de leite, nos seguintes tempos: pré-enxágue e enxágue por 5 minutos; limpeza com detergente por 15 minutos; sanitização por 15 minutos. Esse parâmetro é importante para a higienização, que deve ser considerado em combinação com outros, no trabalho de Silva et al. (2020a) foi possível reduzir o tempo de execução do processo e melhorar a redução de células microbianas presentes na superfície, com a aplicação do fluxo pulsado na etapa de sanitização.

A temperatura interfere diretamente no tempo e na taxa da higienização, pois à medida que a temperatura aumenta, os efeitos da reação aceleram e refletem no tempo da ação (TRINH et al., 2017). No entanto, algumas temperaturas são recomendadas, sendo: água deve ser em temperatura mediana, pois se estiver muito elevada pode provocar a desnaturação de proteína, se estiver muito baixa, causa a solidificação de gordura; a lavagem com detergente deve ser em cerca de 70 °C; os sanitizantes de compostos clorados e o ácido peracético devem ser utilizados na temperatura de 20 a 25 °C (ANDRADE, 2008).

### **3.5.3 Projeto higiênico**

Após a higienização, a contaminação das superfícies dos equipamentos de processamento de alimentos pode ainda permanecer relativamente alta, visto que essas superfícies constituem um ambiente específico para a sobrevivência de micro-organismos em comunidades de biofilme (SCHLEGELOVÁ et al., 2010).

As linhas de processamento de alimentos representam um desafio para manutenção das condições sanitárias, visto que a alta disponibilidade de nutrientes e oxigênio favorecem a multiplicação microbiana. Além desses fatores, falhas no projeto higiênico industrial, especialmente de laticínio, torna o processo de higienização mais difícil e menos eficiente, pois os resíduos do processamento de alimentos se acumulam nesses locais e proporcionam um

ambiente propenso à colonização por bactérias, principalmente na forma de biofilmes (CLETO et al., 2012).

Portanto, as plantas de processamento de alimentos devem atender aos requisitos básicos de um bom projeto higiênico, a fim de reduzir os riscos de contaminações biológicas, físicas e químicas (MATUSZEK, 2012).

Os materiais de construção para equipamentos, tubulações e utilidades de processamento de alimentos devem ser homogêneos, suaves, não porosos, não absorventes, não tóxicos, fáceis de limpar, impermeáveis, inertes, resistentes a produtos químicos, à prova de corrosão, fisicamente duráveis, estáveis mecanicamente e de fácil manutenção (MOERMAN; PARTINGTON, 2014).

Os aços inoxidáveis são habitualmente utilizados na indústria de alimentos e indispensáveis para aplicações em que os requisitos de higienização são críticos (MATUSZEK, 2014). Os principais elementos dos aços inoxidáveis são ferro, cromo, molibdênio e níquel, sendo que os modelos AISI SS 304 (L) e AISI SS 316 (L) são comumente usados para superfícies em indústrias de alimentos (MOERMAN; PARTINGTON, 2014).

No geral, a fim de facilitar a higienização, as superfícies devem ser lisas, isentas de fendas, rachaduras e microestruturas, inclusive devem evitar degraus de desalinhamentos e conexões. Assim, as superfícies de acabamentos devem ter um grau de rugosidade suave, sendo geralmente a rugosidade média igual ou menor que  $0,8 \mu\text{m}$  para o aço inoxidável (EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP – EHEDG, 2018).

Além desses requisitos, quando possível, outros também devem ser observados no projeto higiênico, sendo eles: as vedações ou gaxetas devem ser usadas alinhadas; a área rosqueada dos parafusos, as juntas de fixadores e as fendas de dobradiças não devem ser expostas; ângulos e cantos internos devem ser radiados; espaços mortos devem ser eliminados; os instrumentos devem fazer a detecção por sensor e por alarme; a soldagem deve ser contínua (EHEDG, 2018).

### **3.5.4 Qualidade da água**

A fim de obter resultados de higienização ideais e consistentes, a água usada para preparar as soluções deve ser de qualidade e para consumo humano (MOERMAN; RIZOULIÈRES; MAJOOR, 2014).

De acordo com o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde, a água para consumo humano é a água potável destinada à

ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem (BRASIL, 2017a). Porém, a qualidade da água potável pode ser afetada devido ao aumento da população, ao crescimento da indústria e à variedade de compostos químicos presentes (SALARI et al., 2018).

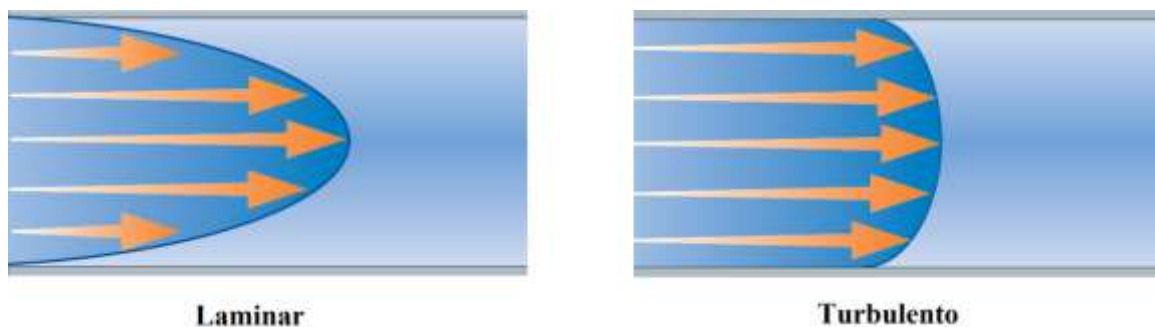
A dureza da água é um fator importante na indústria de alimentos e representa, basicamente, a quantidade de cálcio e magnésio existentes na água. O ideal é que a água seja considerada mole (até  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para uso em indústria de alimentos. Outro fator importante é o pH da água, aconselha-se o uso próximo de 8,3, visto que não contém acidez, a fim de evitar processo de corrosão em superfícies para processamento de alimentos (ANDRADE, 2008).

### 3.5.5 Força mecânica

A força mecânica no método *clean in place* (CIP) é a força de cisalhamento criada pelo fluxo. Como regra geral, para ter uma força mecânica adequada o fluxo deve ser turbulento e a velocidade deve ser de pelo menos  $1,5 \text{ m.s}^{-1}$  (TETRA PAK, 2015).

Conforme a Figura 6, no fluxo laminar a velocidade é maior no centro da passagem, visto que a velocidade diminui progressivamente em direção às paredes devido ao atrito entre as camadas. No fluxo turbulento as camadas se misturam e, portanto, a velocidade do líquido é aproximadamente a mesma na parte central da passagem, entretanto a velocidade diminui em direção às paredes (TETRA PAK, 2020).

Figura 6 – Perfil de velocidade para fluxos laminar e turbulento



Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 2020

No entanto, os trabalhos realizados por Faille et al. (2013) e Xu Zhou et al. (2017) demonstraram que esporos bacterianos, especialmente de *Bacillus Cereus*, são capazes de suportarem altas tensões de cisalhamento e apresentam resistência aos processos de higienização.



Uma alternativa para melhoria da eficiência da força mecânica do método CIP é por meio da pulsação do fluxo, que visa obter maior tensão de cisalhamento em direção à parede, sem a necessidade de investimento alto, visto que o equipamento necessário já está sendo usado no método CIP (GOODE et al., 2013).

### 3.5.5.1 Pulsação do fluxo

Nos últimos anos, em razão dos resultados de higienizações insatisfatórios na indústria de alimentos, especialmente nos laticínios, o método *clean in place* (CIP) com fluxo pulsado tornou-se cada vez mais utilizado (WEIDEMANN; VOGT; NIRSCHL, 2014).

Comparado ao fluxo constante nos sistemas turbulentos, a aplicação da pulsação do fluxo torna esses sistemas mais eficientes, pois aumenta a remoção dos esporos bacterianos aderidos à superfície, pelo motivo de ampliar o gradiente de velocidade em direção à parede (BLEL et al., 2009a; BLEL et al., 2009b).

A pulsação do fluxo contribui na redução do tempo de parada para higienização e no consumo de energia (SILVA, 2019). Sendo que, com essa alternativa, o tempo necessário para uma higienização eficiente pode ser reduzido em mais de 50% (BODE et al., 2007).

Essa pulsação é caracterizada por um fluxo estacionário, seguido de um fluxo oscilante. Assim, a tensão de cisalhamento aumenta e, por consequência, o resultado da higienização melhora (SILVA, 2019; WEIDEMANN; VOGT; NIRSCHL, 2014).

O principal parâmetro para caracterizar o fluxo pulsado é a ondulação ( $W$ ), que é uma razão adimensional do máximo de oscilação ( $w_{os,max}$ ) e da velocidade estacionária ou média do fluxo ( $\bar{w}$ ), conforme as Equações 1, 2 e 3 (FÖSTE et al., 2013).

$$W = \frac{w_{os,max}}{\bar{w}} \quad (1)$$

Em que a velocidade média  $\bar{w}$  para um intervalo de oscilação ( $t_{os}$ ) é definida conforme a Equação 2:

$$\bar{w} = \frac{1}{t_{os}} \int_0^{t_{os}} w(t) dt \quad (2)$$

sendo  $w(t)$ :

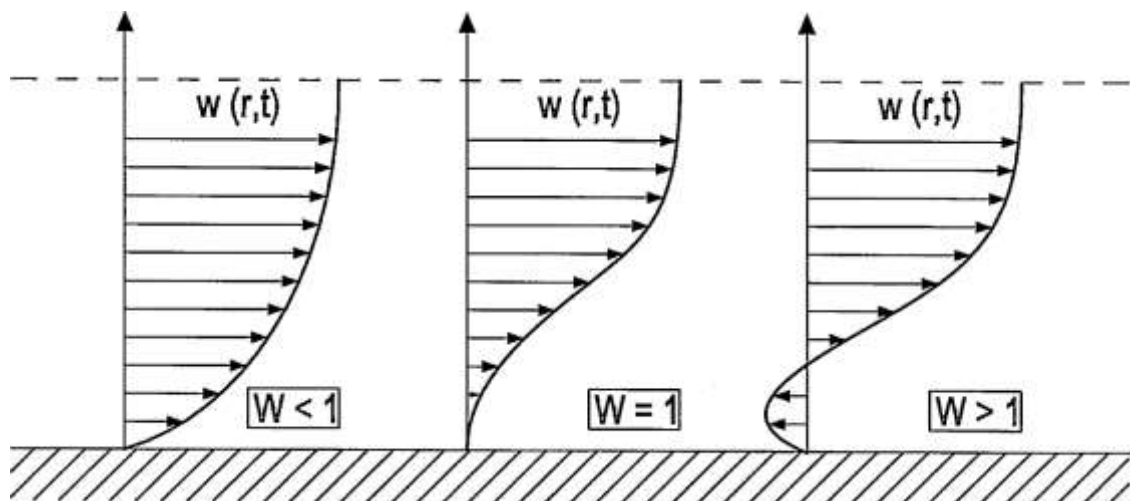
$$w(t) = w_{stat} + w_{os} \quad (3)$$

em que  $w_{stat}$ : velocidade estacionária

Quanto ao resultado da razão, se  $W > 1$  resultará na separação da subcamada viscosa e na formação de redemoinhos, conforme a Figura 7. Além disso, a velocidade máxima não ocorre necessariamente na área central, mas perto da parede, ocasionando altas tensões de cisalhamento (AUGUSTIN et al., 2010).

Portanto, com  $W > 1$  o pulso provoca o efeito anular, na qual possibilita aumentar a tensão de cisalhamento na parede, difundir o agente sanitizante na subcamada viscosa e na superfície e reduzir os recursos econômicos que refletem nos custos da higienização (AUGUSTIN et al., 2010).

Figura 7 – Perfil de velocidade de vazão pulsada para diferentes ondulações



Fonte: Augustin et al., 2010

### 3.6 ETAPAS DA HIGIENIZAÇÃO INDUSTRIAL

As etapas de higienização são definidas a partir do tipo de resíduo a ser removido, no entanto essas etapas são semelhantes, sendo definidas no Quadro 2 (GOODE et al., 2013).

Quadro 2 – Etapas da higienização industrial

<b>Etapa</b>	<b>Ação</b>
Pré-lavagem	Remoção das sujidades fracamente aderidas
Limpeza com detergente (alcalino ou ácido)	Remoção das camadas de incrustações
Enxágue intermediário	Remoção do detergente
Sanitização/desinfecção (química e/ou térmica)	Destruição dos micro-organismos e restauração das condições higiênicas do sistema
Enxágue final	Remoção do produto sanitizante e retomada da linha de produção

Fonte: Adaptado de Goode et al., 2013

### 3.6.1 Pré-lavagem e enxágue

A primeira etapa da higienização é a pré-lavagem com água, que objetiva remover a maior parte dos materiais restantes das linhas de processamento de alimentos após o término da produção (FAN; PHINNEY; HELDMAN, 2015). Já o enxágue intermediário consiste em remover os detergentes utilizados durante o processo de limpeza (TRINH et al., 2017).

Sabe-se que nessas etapas utiliza-se uma quantidade intensiva de água, por isso a fim de reduzir a quantidade desse recurso, parâmetros de velocidade, tempo de contato e temperatura devem ser ajustados. Além desses fatores, outro modo de redução desse recurso é reutilizando-o do enxágue final, sendo que a água não é direcionada para drenagem e sim para ser utilizada na etapa seguinte de pré-lavagem. Supõe-se que a eficácia da água reutilizada é mantida devido às forças mecânicas durante a pré-lavagem (FAN; PHINNEY; HELDMAN, 2015).

### 3.6.2 Limpeza com detergentes

Para limpeza adequada deve-se usar soluções corretas, nas concentrações adequadas. Existe uma ampla gama de soluções de limpeza disponíveis para a indústria e sua utilização depende de fatores como a natureza do resíduo, a dureza da água e a superfície a ser limpa. As soluções de limpeza têm muitas funções, tais como saponificação, umedecimento, emulsificação, abrandamento da água, formação de espuma (STIER, 2020).

Nessa etapa, deve-se considerar as características de solubilidade dos resíduos em detergentes alcalinos e ácidos. Conforme o Quadro 3, verifica-se a necessidade do uso de

agentes alcalinos ou de surfactantes para a remoção de gordura e de ácidos para a remoção de sais minerais divalentes, como o cálcio e magnésio. Os alcalinos também são os agentes responsáveis pela remoção de resíduos de proteína (ANDRADE, 2008).

Quadro 3 – Solubilidade dos resíduos

Sujidade	Solubilidade
Carboidrato	Geralmente solúvel em água
Gorduras	Solúveis em alcalinos ou surfactantes
Proteínas	Solúveis em alcalinos ou ácidos
Sais minerais monovalentes ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )	Solúveis em água
Sais minerais divalentes ( $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Mg}^{++}$ )	Solúveis em ácidos

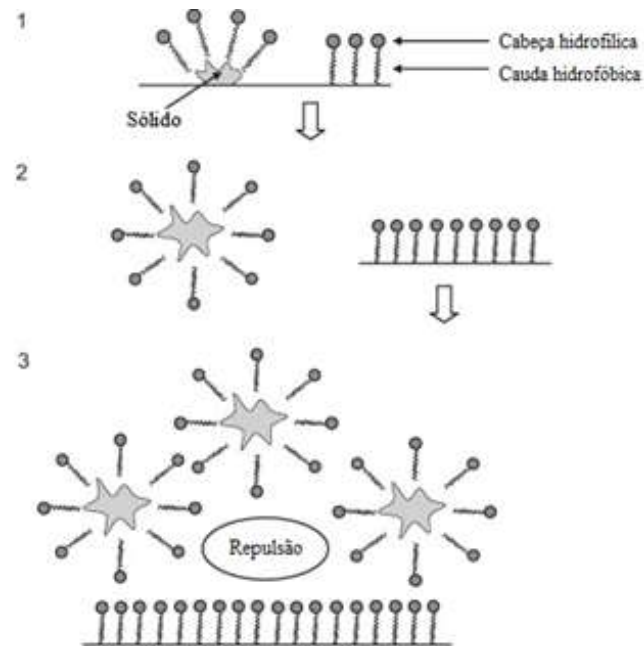
Fonte: Adaptado de Andrade, 2008

Em escala industrial, a limpeza geralmente é baseada em etapas empíricas, incluindo a limpeza com detergentes alcalinos para remoção da matéria orgânica e a limpeza com detergentes ácidos para remover incrustações minerais. Nas limpezas com alcalinos o hidróxido de sódio (NaOH) com pH 11,5 é normalmente utilizado, enquanto que nas limpezas com ácidos o ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) com pH 1,6 é comumente utilizado (PAUGAM et al., 2013). Nas fábricas de laticínios, as soluções de NaOH e o  $\text{HNO}_3$  também são frequentemente utilizadas para essas finalidades (MARTIN et al., 2016).

O hidróxido de sódio, também conhecido como soda cáustica, possui boas propriedades para a remoção de resíduos. Durante o método *clean in place* (CIP) as soluções cáusticas e ácidas são aplicadas em concentrações de 0,5 a 2% (m/m), seguidas por enxágue com água (SUÁREZ et al., 2012).

Os surfactantes reduzem a tensão superficial dos fluidos por meio do acúmulo de moléculas orientadas na interface. Essa propriedade deriva de sua estrutura anfifílica, que inclui uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica dentro da mesma molécula, causando a separação e a repulsão do sólido, conforme a Figura 8 (SUÁREZ et al., 2012).

Figura 8 – Efeito dos surfactantes



Fonte: Adaptado de Suárez et al., 2012

Nota: (1) adesão; (2) separação; (3) repulsão.

### 3.6.3 Sanitização

A sanitização é o tratamento de uma superfície limpa com um agente físico ou químico para remoção de organismos causadores de doenças e deteriorações. Essa prática visa reduzir a população total de micro-organismos para um nível seguro (STIER, 2020). Assim, após a etapa de sanitização, a sobrevivência de bactérias patogênicas representa um risco potencial à indústria de alimentos e aos consumidores (BELTRAME et al., 2012).

A sanitização por meio físico é vantajosa por apresentar eficácia antimicrobiana, não ser corrosiva e possuir bons resultados em circuitos fechados. No entanto esse método tem limitações, visto que não poder ser utilizado em superfícies sensíveis ao calor e por ser relativamente caro, principalmente em relação ao consumo de energia (INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ICTA, 2010).

A sanitização por meio químico é muito empregada na indústria de alimentos. Vários sanitizantes estão disponíveis no mercado, contudo para a eficiência da sanitização é necessário conhecer as funções de cada produto sob diferentes concentrações e sua interação com o meio, além das características dos micro-organismos presentes e suas sensibilidades aos agentes químicos empregados (BELTRAME et al., 2012; BERNARDI et al., 2018).

Entre os sanitizantes empregados na indústria de alimentos, principalmente em laticínios e cervejarias, destaca-se o ácido peracético (ANDRADE, 2008). O crescente mercado por esse sanitizante é resultado do avanço na tecnologia de sua fabricação, crescente popularidade de produtos químicos de base biológica e técnicas inovadoras desenvolvidas para seu uso. Contudo, a exposição direta a esse produto pode causar queimaduras graves, alergias e outros perigos à saúde dos olhos, pele e órgãos respiratórios, por esse motivo deve ser manuseado de forma cuidadosa (DUGHERI et al., 2018).

O ácido peracético é um sanitizante constituído pelos princípios ativos do ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético (BERNARDI et al., 2018). Portanto, a sua composição é amigável ao meio ambiente, pois os produtos de sua decomposição são o ácido acético e a água (ANDRADE, 2008).

No geral, apresenta eficácia contra bactérias e esporos bacterianos, sendo uma alternativa de uso aos produtos à base de cloro. No entanto, se a atividade antifúngica é um requisito, são necessários níveis mais altos para gerar a atividade fungicida (HUMPHREYS et al., 2013).

### 3.7 MÉTODOS: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E DESEJABILIDADE

A metodologia de superfície de resposta é um método matemático estatístico usado para analisar e otimizar os experimentos. No processo de análise, há variáveis de entrada que afetam as de saída, chamadas variáveis de resposta (HEJAZI et al., 2012).

Entre os *design* de superfícies de resposta mais utilizados, incluem o planejamento composto central. Esse planejamento consiste em determinar o número de experimentos a partir dos pontos fatoriais ( $2^k$ ) e axiais ( $2k$ ) e número de pontos centrais ( $n_c$ ), sendo  $k$  o número de variáveis e  $\alpha$  a localização dos pontos axiais, conforme as Equações 4 e 5 (CANDIOTI et al., 2014; MONTGOMERY, 2012):

$$2^k + 2k + n_c \quad (4)$$

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (5)$$

No entanto, muitos problemas de superfície de resposta envolvem a análise de várias respostas. A este respeito, algumas das variáveis devem ser maximizadas e outras minimizadas. No entanto, em muitos casos, ocorre uma competição entre essas respostas; ou seja, melhorar uma resposta pode levar a outra resposta à deterioração. Alternativamente, a função da

desejabilidade, que combina todas as respostas em uma medição, pode ser usada (PALABIYIK et al., 2015).

Em 1980, Derringer e Suich encontraram uma das soluções para otimizar respostas múltiplas. A abordagem geral é primeiro converter cada resposta ( $y_i$ ) em função da desejabilidade individual ( $d_i$ ) que varia ao longo do intervalo (MONTGOMERY, 2012):

$$0 \leq d_i \leq 1$$

onde:

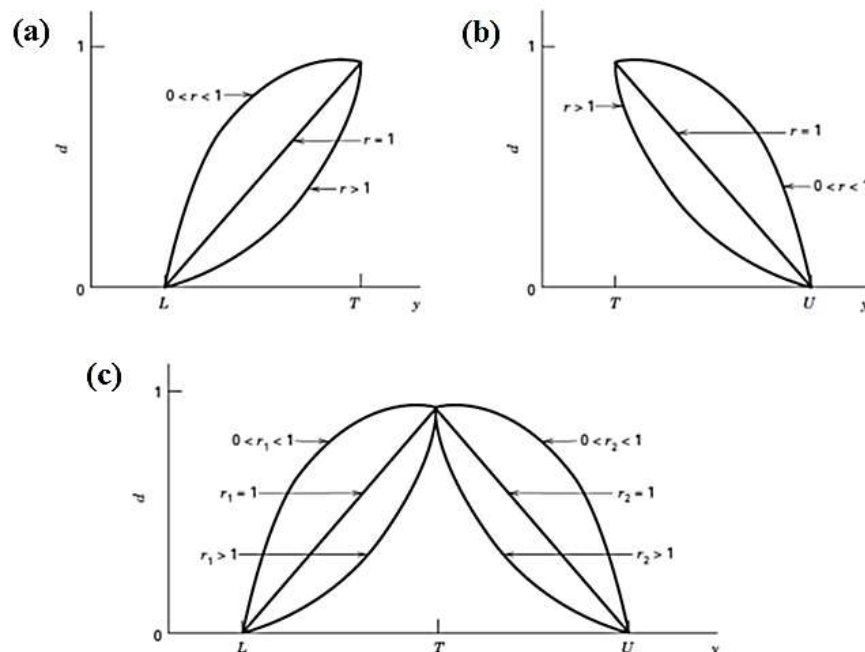
se a resposta  $y_i$  está no objetivo ou alvo, então  $d_i = 1$ ;

se a resposta está fora de uma região aceitável,  $d_i = 0$ .

E valores intermediários de  $d_i$  indicam respostas mais ou menos desejáveis (CANDIOTI et al., 2014).

Montgomery (2012) demonstrou os cálculos das funções de desejabilidade individuais, a partir da estruturação apresentada na Figura 9.

Figura 9 – Funções de desejabilidade individuais para otimização simultânea



Fonte: Adaptado de Montgomery, 2012

Nota: (a) o objetivo (alvo) é maximizar  $y$ ; (b) o objetivo (alvo) é minimizar  $y$ ; (c) o objetivo é estar o mais próximo possível do alvo.

Assim, se o objetivo ou alvo para a resposta for um valor máximo, pode-se calcular através da Equação 6:

$$d_i = \begin{bmatrix} 0 \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^r \\ 1 \end{bmatrix} \quad (6)$$

se:

$$\begin{aligned} y &< L \\ L &\leq y \leq T \\ y &> T \end{aligned}$$

onde:

$r = 1$ , a função desejabilidade é linear;

$r > 1$  coloca mais ênfase em estar perto do valor alvo;

$0 < r < 1$  torna-o menos importante.

Se a meta da resposta for um valor mínimo, pode-se calcular pela Equação 7:

$$d_i = \begin{bmatrix} 1 \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^r \\ 0 \end{bmatrix} \quad (7)$$

se:

$$\begin{aligned} y &< T \\ T &\leq y \leq U \\ y &> U \end{aligned}$$

Se o alvo está localizado entre os limites inferior ( $L$ ) e superior ( $U$ ) é definido por meio da Equação 8:

$$d_i = \begin{bmatrix} 0 \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^{r1} \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^{r2} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (8)$$

se:

$$\begin{aligned} y &< L \\ L &\leq y \leq T \\ T &\leq y \leq U \\ y &> U \end{aligned}$$



Uma vez que as  $n$  variáveis (níveis de fator e respostas) são transformadas em funções de desejabilidade, elas são combinadas em uma função única chamada Desejabilidade Global ( $D$ ) para descobrir as melhores respostas conjuntas. Assim,  $D$  pode ser calculado usando a Equação 9 (CANDIOTI et al., 2014):

$$D = (d_1^{r_1} \times d_2^{r_2} \times \dots \times d_n^{r_n})^{1/\sum r_i} = \prod_{i=1}^n d_i^{r_i/\sum r_i} \quad (9)$$

onde:

$r_i$  é a importância de cada variável em relação às outras, que normalmente pode ser de 1 a 5, com 5 indicando a maior importância e 1 indicando a menor.

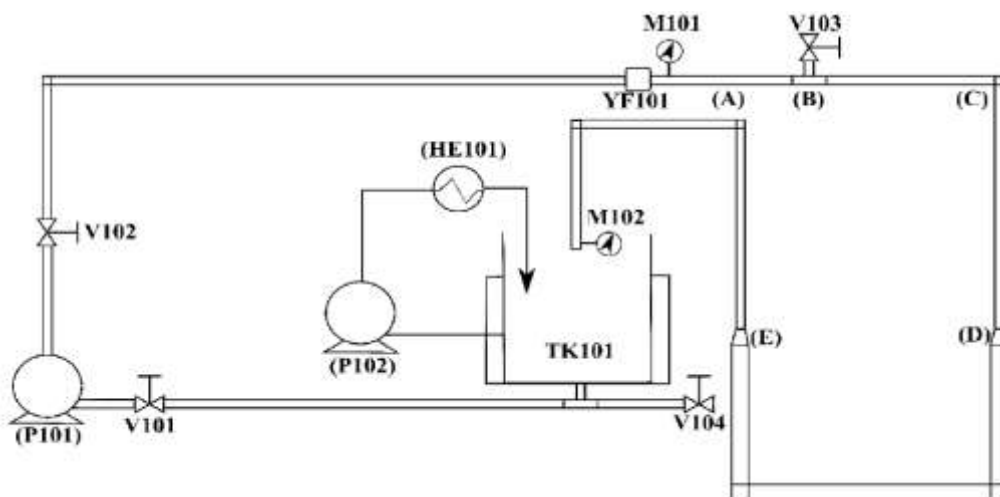
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 UNIDADE EXPERIMENTAL

O protótipo utilizado para realizar este estudo foi uma linha de circulação de leite, com características semelhantes às observadas nos laticínios. Essa linha encontra-se no Laboratório de Bioprocessos, localizado no Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Esse protótipo é constituído de aço inoxidável (AISI 304) de polimento nº 4 e possui os equipamentos e instrumentos apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática do modelo de linha de circulação de leite



Fonte: Silva et al. 2020b

Nota: TK – tanque de armazenamento de leite e soluções de limpeza e sanitização (capacidade 25 L); V – válvulas de bloqueio tipo esfera tripartida de ½” de passagem plena em conexão tipo rosca; P – bomba centrífuga para promover circulação de fluidos e agentes de limpeza e sanitização no sistema; YF – sensor de vazão tipo turbina de ½””; M - Manômetro tipo tubo em U; HE – trocador de calor; superfícies de prova em diferentes geometrias: trecho cilíndrico reto (A), tê (B), cotovelo (C), expansão (D) e redução (E).

Na linha de circulação de leite as extremidades de cada trecho de tubulação são rosqueáveis. Neste estudo foram utilizadas superfícies de prova nas seguintes geometrias: trecho cilíndrico reto, tê, cotovelo, expansão e redução, de forma a representarem trechos e acessórios comumente encontrados na indústria láctea e as diferentes intensidades de força de cisalhamento no interior da linha de circulação.

## 4.2 ADESÃO MICROBIANA

Previamente, a cada configuração proposta, todas as geometrias usadas neste estudo do método *clean in place* (CIP) foram higienizadas por meio de escovação com uso de água e detergente neutro líquido e enxaguadas com água destilada. Em seguida, foram autoclavadas por 30 minutos a 121 °C e 1,1 bar para garantir a descontaminação microbiana.

As geometrias após a higienização foram preenchidas com leite UHT integral, inoculadas com aproximadamente  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de células de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), previamente ativado (SILVA et al., 2020a). As geometrias foram incubadas em BOD (TECNAL) à 37 °C por um período que foi determinado a partir da cinética de adesão.

A incubação foi em condição estática, a fim de se obter uma adesão microbiana nas superfícies a partir da contaminação intencional no leite. As condições estáticas foram escolhidas para obter homogeneidade nos níveis de sujidade na superfície das geometrias, a fim de isolar o efeito da hidrodinâmica durante a adesão e formação de biofilme. Após o período de adesão, o leite inserido foi drenado e as geometrias foram instaladas na planta para serem submetidas ao processo CIP.

Uma réplica da geometria utilizada na higienização foi selecionada para a contagem inicial de células na superfície das geometrias. Essa geometria foi preenchida com água peptonada estéril (Acumedia, Lansing, Estados Unidos) 0,1% (m/v), a qual permaneceu no interior da superfície, por 1 minuto, para remoção das células planctônicas. Em seguida, as células sésseis foram removidas com auxílio de um *swab*.

As células aderidas foram transportadas para solução de água peptonada estéril 0,1% (m/v) onde permaneceu por 2 minutos em agitação em vórtex (Velp, Wizard Advanced IR) para a liberação das células para a solução. Após essa etapa, diluições seriadas foram preparadas e plaqueadas, pelo método *pour plate*, em ágar padrão para contagem (PCA – Kasvi, Itália). As placas foram incubadas por 24 horas à 37 °C. O resultado da contagem foi expresso em UFC.cm<sup>-2</sup>. Para a expressão dos resultados, aplicou-se a Equação 10:

$$\frac{UFC}{cm^2} = \frac{C \cdot V_R}{V_A \cdot A} \quad (10)$$

em que:

C: contagem média do número de colônias após incubação [UFC];

V<sub>R</sub>: Volume usado na amostra [mL];

V<sub>A</sub>: Volume usado para plaqueamento da amostra [mL];

A: área da geometria [cm<sup>2</sup>].

#### 4.2.1 Cinética de adesão

Cupons de prova de 1cm x 1cm, em aço inox 304 e polimento nº 4, igual a linha de circulação de leite em estudo, foram higienizados com detergente neutro e em seguida esterilizados na autoclave por 30 minutos a 121 °C e 1,1 bar. Cada cupom foi colocado em um tubo falcon com leite UHT integral, inoculado com aproximadamente  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Bacillus cereus*, previamente ativado, para promover a multiplicação e adesão do micro-organismo.

Logo em seguida os tubos falcon foram incubados em BOD (TECNAL) à 37 °C, para iniciar a multiplicação e a adesão bacteriana. A cada 2 horas de incubação, durante 24 horas (considerando que a indústria realiza a higienização diariamente), um tubo falcon foi retirado da incubadora a fim de determinar a adesão bacteriana na superfície.

Para determinar a adesão bacteriana na superfície, o cupom de prova foi retirado do tubo falcon em que se encontrava com uma pinça esterilizada e transportado para solução de água peptonada estéril 0,1% (m/v) onde permaneceu por 2 minutos, para remoção das células planctônicas. Posteriormente, com o auxílio de uma pinça esterilizada o cupom foi transportado para uma nova solução de água peptonada estéril 0,1% (m/v) e foi submetido à agitação no vórtex, para a liberação das células para a solução. Em seguida, diluições seriadas foram preparadas e plaqueadas, pelo método *pour plate*, em ágar padrão para contagem. As placas foram incubadas por 24 horas à 37 °C. O resultado da contagem foi expresso em UFC.cm<sup>-2</sup>.

#### 4.2.2 Compostos exopoliméricos (EPS) do biofilme

A composição dos exopolissacarídeos (EPS) foi caracterizada usando *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). A partir do tempo determinado pela cinética de adesão, um cupom com a superfície contaminada com *Bacillus cereus* foi enxaguado assepticamente três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v) para remover as células planctônicas. Os cupons foram secos ao ar à temperatura ambiente, conforme descrito no trabalho de Silva et al. (2020b).

Os espectros foram coletados no modo de transmissão de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> com espectrômetro Shimadzu com resolução 2 cm<sup>-1</sup> e 128 scans. Conforme descrito no trabalho de Karunakaran e Biggs (2010), como as macromoléculas de origem biológica apresentam picos de absorvância característicos entre 800 e 1.800 cm<sup>-1</sup>, o espectro FTIR foi analisado entre esses números de onda.

O espectro da placa de aço inoxidável sem biofilme foi usado para remover o fundo espectral. Os picos correspondentes aos grupos funcionais foram pesquisados e identificados de acordo com referências disponíveis na literatura.

#### 4.3 PROCESSO CIP CONVENCIONAL

Após a contagem do número inicial de células aderidas, as demais superfícies foram inseridas na linha de circulação de leite para a execução do método CIP. O processo convencional foi realizado em triplicata e os parâmetros estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Programa de higienização CIP.

<b>Pré-enxágue</b>	<b>Alcalino</b>	<b>Enxágue</b>	<b>Sanitizante</b>	<b>Enxágue</b>
Água Potável	NaOH 1%	Água Potável	Ácido peracético 0,01%	Água potável
1,5 m.s <sup>-1</sup>	1,5 m.s <sup>-1</sup>	1,5 m.s <sup>-1</sup>	1,5 m.s <sup>-1</sup>	1,5 m.s <sup>-1</sup>
5 minutos	15 minutos	5 minutos	15 minutos	5 minutos
Temperatura ambiente	70 °C	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente

Fonte: Elaborado pela autora, 2020

Logo após o processo CIP, as geometrias foram submetidas à técnica de *swab* para a remoção das células microbianas, do mesmo modo realizada para a geometria antes da higienização. As amostras coletadas com *swab* foram incubadas por 24 horas à 37 °C. O resultado das contagens foi expresso em UFC.cm<sup>-2</sup>.

Após a coleta dos dados das análises das geometrias antes e depois da higienização foram calculadas as reduções logarítmicas (*RD*) do número de células pela Equação 11.

$$RD = \log N - \log n \quad (11)$$

em que:

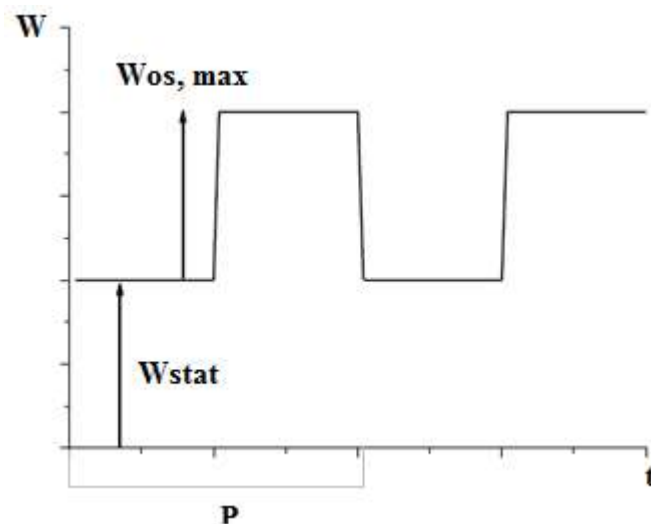
*N*: é o número de unidades formadoras de colônia/cm<sup>2</sup> (UFC) antes do CIP;

*n*: é o número de unidades formadoras de colônia/cm<sup>2</sup> (UFC) após o CIP.

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO CIP CONVENCIONAL

Os pulsos aplicados na etapa de sanitização foram quadráticos, com ondulação ( $W$ ) e período ( $P$ ) fixos, conforme apresentado na Figura 11. Esses dados foram estabelecidos a partir de recomendações e resultados encontrados na literatura (AUGUSTIN et al., 2010; BODE et al., 2007; SILVA et al., 2020a). A perturbação na amplitude proporciona incrementos e decréscimos na vazão, de forma que a média da vazão durante essa etapa seja igual ao processo convencional (SILVA, 2019).

Figura 11 – Pulsção do fluxo quadrático



Fonte: Adaptado de Silva, 2019

A concentração da solução sanitizante e o tempo de execução dessa etapa foram variados a fim de reduzir o consumo de solução sanitizante, energia e tempo, visto que essa etapa, seguida da limpeza com detergente, consome mais tempo para ser executada. Além de que a sanitização representa o maior custo econômico ligado a esse processo, seguida pelos custos das etapas de enxágue com água (YANG et al., 2018).

Portanto, o efeito dessas duas variáveis foi representado como:  $A$ : concentração da solução;  $B$ : tempo, no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os níveis das variáveis  $A$  e  $B$  foram utilizadas na forma adimensional, utilizando a seguinte codificação da Equação 12:

$$Xi = \frac{\varepsilon - \varepsilon(0)}{\frac{\varepsilon(+1) - \varepsilon(-1)}{2}} \quad (12)$$

em que:

$i$ : número de variáveis estudadas;

$X_i$ : é o valor da variável  $i$  na forma codificada;

$\varepsilon$ : é o valor real da variável;

$\varepsilon(0)$ : é o valor real da variável no ponto central;

$\varepsilon(+1)$ : é o valor real da variável no ponto superior;

$\varepsilon(-1)$ : é o valor real da variável no ponto inferior.

Em que a distância axial do ponto central ( $\alpha$ ) é calculado em função do número de variáveis ( $k$ ), conforme a Equação 13:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (13)$$

Nesse estudo como  $k = 2$ , obtém-se que  $\alpha$  é igual a 1,41. A Tabela 3 apresenta os níveis codificados e o valor real, com os níveis baixo, médio e alto de -1, 0 e +1, respectivamente.

Tabela 3 – Níveis codificados e reais das variáveis que foram estudadas.

Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
<b>A - Concentração</b> [mg.L <sup>-1</sup> ]	40	50	75	100	110
<b>B - Tempo [min]</b>	3	5	10	15	17

Fonte: Elaborado pela autora, 2020

As faixas de variação de cada parâmetro foram estabelecidas de acordo com os dados mais comumente utilizados no método CIP (ANDRADE, 2008; AUGUSTIN et al., 2010; BODE et al., 2007; SILVA et al., 2020a; SILVA et al., 2020b).

A Tabela 4 apresenta o planejamento experimental com níveis de cada variável que foi utilizada nesse experimento, totalizando em 11 corridas.

Logo após cada corrida proposta, seguiu para a contagem microbiana do mesmo modo realizada para o CIP convencional.

Por fim, a superfície de resposta avaliou a influência das variáveis em estudo, após o ajuste do modelo, nos quais os fatores insignificantes foram eliminados ( $p > 0,05$ ). E as funções de desejabilidade foram desenvolvidas, a partir do *Google Colab*, a fim de determinar as melhores condições operacionais do CIP para todas as geometrias.

Tabela 4 – Matriz de planejamento em variáveis reais e codificadas.

Corrida	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	A	B	Concentração [mg.L <sup>-1</sup> ]	Tempo [min]
1	-1	-1	50	5
2	+1	-1	100	5
3	-1	+1	50	15
4	+1	+1	100	15
5	-1,41	0	40	10
6	+1,41	0	110	10
7	0	-1,41	75	3
8	0	+1,41	75	17
9	0	0	75	10
10	0	0	75	10
11	0	0	75	10

Fonte: Elaborado pela autora, 2020

#### 4.4.1 Funções de desejabilidade

Conforme relatado por Montgomery (2012) foi obtida a resposta ( $y_i$ ) em função da desejabilidade individual ( $d_i$ ) para as cinco geometrias em estudo, de modo a alcançar o mais próximo possível do alvo ( $T$ ), conforme a Equação 14:

$$d_i = \begin{bmatrix} 0 \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^{r1} \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^{r2} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (14)$$

se:

$$y < L$$

$$L \leq y \leq T$$

$$T \leq y \leq U$$

$$y > U$$

No presente estudo, as funções de desejabilidade foram desenvolvidas a partir das reduções decimais e a influência das variáveis em estudo.



A Desejabilidade Global ( $D$ ) foi calculada, a fim de determinar as melhores condições operacionais do CIP para todas as geometrias, considerando  $ri = 5$ , conforme a Equação 15, e foi estimado o valor da redução decimal para cada geometria. Por fim, a partir desses parâmetros foi realizada a validação do protocolo em triplicata.

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times d_4 \times d_5)^{1/5} \quad (15)$$

#### 4.5 CONSUMO DE ENERGIA

A energia consumida ( $E$ ) é expressa em função do tempo de operação do equipamento pelo produto da potência ativa total para uma carga trifásica balanceada pelo tempo. A corrente elétrica foi medida com uma pinça amperimétrica Minipa ET-3200. A energia consumida pode ser determinada pela Equação 16 conforme empregado por Silva et al. (2020a):

$$E = \sqrt{3}.VL.\cos\theta.\int_0^t IL(t)dt \quad (16)$$

em que:

$VL$ : tensão elétrica (V);

$\theta$ : ângulo de fase;

$IL$ : corrente elétrica (A).

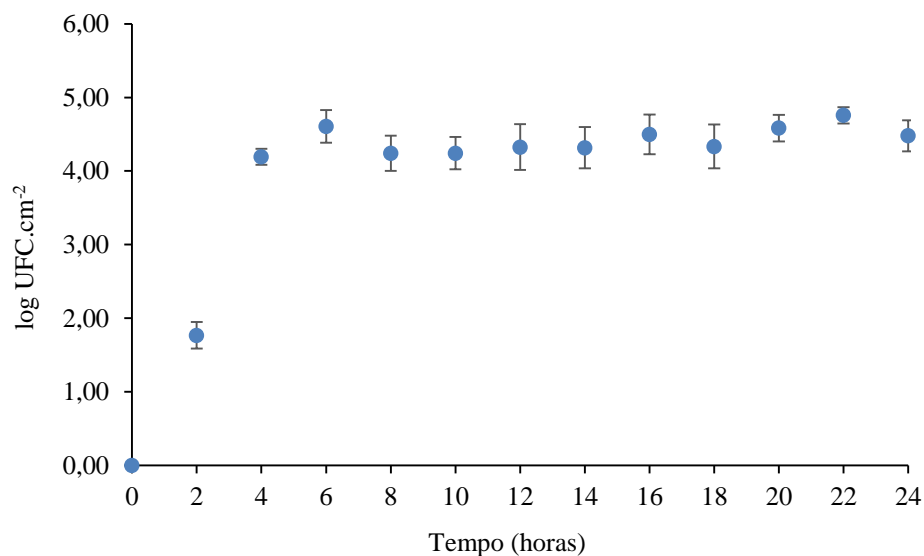
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ADESÃO MICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

#### 5.1.1 Cinética de adesão

A cinética do tempo de adesão do *Bacillus cereus* na superfície do cupom de aço inoxidável pode ser observada na Figura 12, em que a bactéria, na fase logarítmica, começou a divisão por fissão binária até atingir a taxa de crescimento máxima. Logo após começou a fase estacionária, em que o número de células em divisão se assemelha ao número de células mortas por esgotamento dos nutrientes (WANG et al., 2015).

Figura 12 – Cinética de adesão na superfície do cupom de aço inoxidável



Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Entre os períodos de 8 a 24 horas de incubação, a média de células de *Bacillus cereus* aderidos ao cupom foi de  $4,42 \pm 0,26$  log UFC.cm<sup>-2</sup>. Semelhante a esse resultado, Bernardes et al. (2010) e Bernardes et al. (2012) encontraram o valor de  $4,01 \pm 0,80$  log UFC.cm<sup>-2</sup> para a média de adesão da mesma bactéria, no aço inoxidável 304, em um dia, na temperatura de 35 °C. De acordo com Bernardes et al. (2012), esses valores são altos o suficiente para atingir um valor crítico, dependendo das condições de armazenamento do leite. Dado que, superfícies inadequadamente higienizadas se entrarem em contato com o leite podem contaminá-lo,

afetando a sua qualidade e diminuindo a vida útil dos produtos lácteos. Assim, a qualidade dos laticínios é consideravelmente afetada pela presença do número elevado de *Bacillus cereus*.

Em uma fábrica de laticínios, *Bacillus cereus* representa 12,4% da microbiota que cresce em biofilmes (SHARMA; ANAND, 2002). O biofilme de *Bacillus cereus* pode ser uma fonte recorrente de deterioração de alimentos e de surtos de intoxicação alimentar (KUMARI; SARKAR, 2014). Essa bactéria produz enzimas extracelulares que podem afetar a qualidade sensorial do leite e de produtos lácteos, por exemplo produtos com sabor desagradável, rançoso, amargo (KUMARI; SARKAR, 2016).

Alimentos contaminados por *Bacillus cereus* podem desencadear no consumidor as síndromes diarreica e emética. A síndrome diarreica é causada pela ingestão de células vegetativas e de esporos e produção de toxinas no intestino delgado, tendo os sintomas de diarreia aquosa e dor abdominal, sendo que essa enfermidade está associada a alimentos proteicos, como leite e lácteos, produtos à base de carne, pudim, sopas, molhos e legumes. Já a síndrome emética está relacionada à alimentos ricos em amido, como o arroz, e é dada pela toxina pré-formada nos alimentos, que pode resultar em náuseas, vômitos, mal-estar e, em alguns casos, insuficiência hepática fatal (KUMARI; SARKAR, 2016).

Destaca-se que Bernardes et al. (2010) e Bernardes et al. (2012) determinaram que o valor de adesão dessa bactéria, no aço inoxidável 304, durante os períodos de um dia e dez dias são próximos, sendo, respectivamente,  $4,01 \pm 0,80 \log \text{UFC.cm}^{-2}$  e  $4,43 \pm 0,77 \log \text{UFC.cm}^{-2}$ .

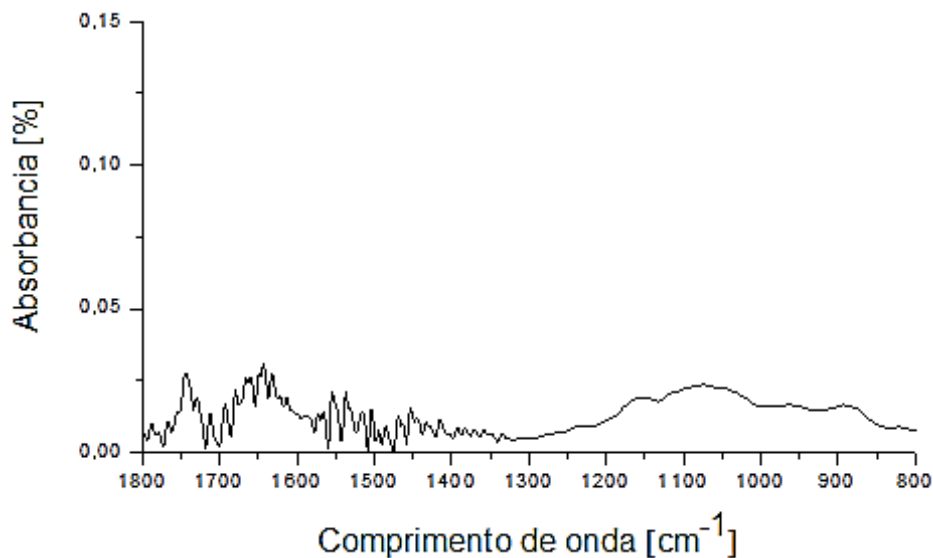
No período de 8 a 24 horas, os resultados da contagem de células não diferem entre si ( $p > 0,05$ ). Por esse motivo, preliminarmente, 16 horas foi selecionada como o tempo de incubação das geometrias em estudo, a fim de iniciar o processo de adesão e formação de biofilme. Esse tempo foi confirmado posteriormente, a partir dos resultados dos compostos exopoliméricos.

### 5.1.2 Compostos exopoliméricos (EPS) do biofilme

A análise do espectro ATR-FTIR do biofilme de *Bacillus cereus* no aço inoxidável após 16 horas de incubação está presente na Figura 13. A região 1800 a  $700 \text{ cm}^{-1}$  inclui a absorção de dois componentes celulares principais: proteínas ( $1700$  a  $1480 \text{ cm}^{-1}$ ) e carboidratos ( $1200$  a  $900 \text{ cm}^{-1}$ ) (BOSCH et al., 2005). De acordo com referências disponíveis na literatura, na referida figura, os picos de  $1647 \text{ cm}^{-1}$  e  $1075 \text{ cm}^{-1}$  indicam, respectivamente, que o EPS é constituído predominantemente de região de alongamento C = O de amidas associadas a

proteínas (conhecida como amida I), e de polissacarídeos (BOSCH et al., 2005; EBOIGBODIN; BIGGS, 2008; TUGAROVA et al., 2017).

Figura 13 – Espectro FTIR-ATR do biofilme de *Bacillus cereus* no aço inoxidável após 16 horas de incubação



Fonte: Da autora, 2021

De modo similar, Karunakaran e Biggs (2010) descreveram o espectro de FTIR do EPS do biofilme de *Bacillus cereus* ATCC 10987 e ATCC 14579 cultivados em caldo *Miller's Luria*, por 24 horas a 30 °C, indicando que proteínas e carboidratos predominaram no EPS de ambas as amostras.

## 5.2 PROCESSO CIP CONVENCIONAL

No processo CIP convencional, a média da redução decimal de cada geometria em estudo, bem como a contagem final de *Bacillus cereus* estão presentes na Tabela 5. A partir dos dados presentes na referida tabela, analisa-se que, estatisticamente, as geometrias trecho reto e redução não apresentaram diferença significativa nas reduções decimais entre si e também em relação às geometrias cotovelo e expansão. Já as geometrias cotovelo e expansão apresentaram diferença significativa nas reduções decimais entre si. Quanto à geometria tê, essa apresentou diferença significativa na redução decimal quando comparada, estatisticamente, com todas as geometrias.

Tabela 5 – Redução decimal e contagem final de *Bacillus cereus* nas diferentes geometrias, submetidas ao CIP convencional

<b>Geometria</b>	<b>Média da redução decimal</b>	<b>Contagem final [UFC.cm<sup>-2</sup>]</b>
Trecho reto	4,01 ± 0,08 <sup>a,b</sup>	2,00 ± 0,57
Tê	0,00 ± 0,28 <sup>c</sup>	4,5x10 <sup>4</sup> ± 2954,70
Cotovelo	3,93 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,57
Expansão	4,34 ± 0,02 <sup>b</sup>	< 1,00 (estimado)
Redução	4,25 ± 0,25 <sup>a,b</sup>	1,00 ± 0,56

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: <sup>a,b,c</sup> Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Os resultados obtidos, normalmente, podem ser comparados com as especificações ou com as recomendações propostas por órgãos oficiais ou por entidades científicas conceituadas, como a *American Public Health Association* (APHA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Panamericana de Saúde (OPAS). Alguns pesquisadores e algumas instituições, como a OPAS e a OMS, admitem contagens de mesófilos aeróbios de até 50 UFC.cm<sup>-2</sup> na superfície. Por outro lado, para que as superfícies sejam consideradas higienizadas, a APHA recomenda até 2 UFC.cm<sup>-2</sup> do mesmo grupo microbiano (ANDRADE, 2008). Portanto, todas as geometrias apresentaram condições aceitáveis de higienização, exceto a do tê, segundo a preconização desses órgãos.

Nessa configuração do CIP, a superfície do tê também não apresentou redução decimal ao final do processo. Com esses resultados, pode-se considerar que essa geometria foi a mais desafiadora no estudo em relação às demais. Possivelmente, esse fato ocorreu porque a existência de seção de tê em tubos possibilita a redução da velocidade do fluxo, produzindo uma área relativamente estável ou espaço morto, na qual possibilita que resíduos de produtos se acumulem e micro-organismos se multipliquem (LELIEVELD; MOSTERT; CURIEL, 2003).

Corroborando com esse conceito, Silva et al. (2020b) constatou que a ramificação em tê na linha de processamento resulta na existência de zona de estagnação com recirculação de fluido a baixa velocidade, de ordem de 0,3 m.s<sup>-1</sup>, enquanto que em outros pontos a velocidade seria de 1,5 m.s<sup>-1</sup>. Além disso, a baixa tensão de cisalhamento e menor transferência de massa dos agentes químicos acarretam na redução da eficiência do processo. Demais estudos também ratificam que áreas de recirculação e de estagnação reduzem a eficiência da higienização, visto

que elas resultam em baixa tensão de cisalhamento na parede (BLEL et al., 2008; JENSEN; FRIIS, 2005; LI et al., 2019).

Contudo, não são em todos os sistemas que a presença do tê gera zonas de recirculação e de estagnação de fluido. Figueiredo et al. (2009) mostraram que o tê foi a geometria que apresentou melhores resultados de higienização, em comparação com trecho reto e cotovelo. Assim, tais fatos dependem do *layout* da tubulação e da posição do tê na linha de processamento, visto que desse modo proporcionam maiores vazões e, conseqüentemente, os fenômenos de transferência de massa são mais efetivos e favorecem a remoção/destruição das células.

### 5.3 PROCESSO CIP COM FLUXO PULSADO

Os resultados das reduções decimais para cada geometria do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Reduções decimais para cada geometria do planejamento experimental

Corrida	Variáveis codificadas		Reduções decimais em cada geometria				
	A	B	TR	TÊ	COT	EXP	RED
1	-1	-1	4,31	0,00	4,27	4,22	4,27
2	1	-1	4,37	0,00	4,32	4,16	4,34
3	-1	1	4,41	0,66	4,42	4,15	4,22
4	1	1	4,71	0,96	4,74	5,03	5,13
5	-1,41	0	4,44	0,13	4,41	4,01	4,10
6	1,41	0	4,64	0,01	4,60	4,65	5,10
7	0	-1,41	4,15	0,19	4,10	4,06	3,95
8	0	1,41	4,61	1,57	4,55	5,06	5,08
9	0	0	4,61	2,29	4,55	3,28	3,78
10	0	0	4,64	2,19	4,62	3,32	3,73
11	0	0	4,67	2,19	4,62	3,30	3,71

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: TR: trecho reto; COT: cotovelo; EXP: expansão; RED: redução.

A partir desses resultados, em relação à geometria tê, compreende-se que o ponto central do planejamento experimental foi a configuração que mais resultou em reduções decimais.

Dado que, a higienização dessa geometria com o CIP com fluxo pulsado foi significativamente diferente ( $p = 0,0001$ ) do CIP convencional.

Portanto, conforme a Tabela 7, no ponto central, a higienização da geometria mais desafiante, em estudo, foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) para o CIP com fluxo pulsado quando comparada ao CIP convencional. No entanto, mesmo com a melhora com o fluxo pulsado, a geometria não permanece sem atender às recomendações de órgãos oficiais ou de entidades científicas, como OPAS, OMS, APHA, em relação à quantidade de UFC.cm<sup>-2</sup> presente nesta superfície.

Tabela 7 – Comparação da redução decimal da geometria t<sub>ê</sub>, no CIP convencional e no ponto central do planejamento do CIP com fluxo pulsado

Método CIP	Contagem de células no t <sub>ê</sub> (log UFC.cm <sup>-2</sup> )		Redução decimal
	Antes do CIP	Após o CIP	
<b>CIP convencional</b>	4,32 ± 0,10	4,54 ± 0,27	0,00 ± 0,28
<b>CIP com fluxo pulsado</b>	4,20 ± 0,10	1,97 ± 0,10	2,22 ± 0,05

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

No trabalho de Lelièvre et al. (2002), em que a capacidade de limpeza foi baseada na remoção de esporos de *Bacillus cereus*, os autores demonstraram a complexidade da higienização de um projeto higiênico. Em algumas zonas de baixa tensão de cisalhamento foram consideradas como muito limpáveis, porque nessas áreas um alto nível de turbulência foi observado, portanto, houve uma alta taxa de flutuação da transferência de massa para a superfície. Por outro lado, pela presença de geometrias consideradas impróprias para o projeto higiênico, algumas áreas permaneceram mal limpas apesar do aumento da velocidade do fluxo.

Nos subitens abaixo, nas Tabelas 8, 10, 12, 14 e 16, os resultados da ANOVA foram empregados para avaliar a significância dos modelos quadráticos para representar a redução decimal de cada geometria em estudo. Os modelos apresentados foram obtidos após eliminar os termos não significativos, conforme as Tabelas 9, 11, 13, 15 e 17. Os ajustes para os modelos foram significativos ( $p < 0,05$ ), indicando que os modelos ajustados poderiam descrever a variação dos dados.

A análise do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi utilizada para verificar a adequação dos modelos. Os valores de  $R^2$  variaram entre 0,957 a 0,991, o que indicam que os modelos

podem ser usados para preverem a tendência de redução decimal logarítmica, nas condições testadas. As Equações 17, 18, 19, 20 e 21 representam o modelo matemático da redução decimal para cada geometria, em que as variáveis codificadas *A* e *B* representam, respectivamente, concentração da solução e tempo.

### 5.3.1 Trecho reto

No trecho reto, as variáveis concentração e tempo, em termos lineares e quadráticos, tiveram efeitos significativos na redução decimal. Neste modelo, o  $R^2$  foi de 0,974.

Tabela 8 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria trecho reto

Fonte	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	<i>p</i>
A	0,051674	1	0,051674	0,002557
A <sup>2</sup>	0,015476	1	0,015476	0,028381
B	0,148573	1	0,148573	0,000224
B <sup>2</sup>	0,099149	1	0,099149	0,000581
AB	0,014400	1	0,014400	0,032131
ERRO	0,008311	5	0,001662	
TOTAL	0,323273	10		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: Não significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 9 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria trecho reto

Fator	Efeito	Desvio	<i>p</i>	Limite de confiança		Coeficiente do modelo
				-95%	95%	
Média	4,640035	0,023538	0,000000	4,579529	4,700542	4,640035
A	0,160979	0,028871	0,002557	0,086763	0,235195	0,080489
A <sup>2</sup>	-0,105122	0,034451	0,028381	-0,193681	-0,016563	-0,052561
B	0,272962	0,028871	0,000224	0,198746	0,347178	0,136481
B <sup>2</sup>	-0,266080	0,034451	0,000581	-0,354639	-0,177520	-0,133040
AB	0,120000	0,040770	0,032131	0,015198	0,224802	0,060000

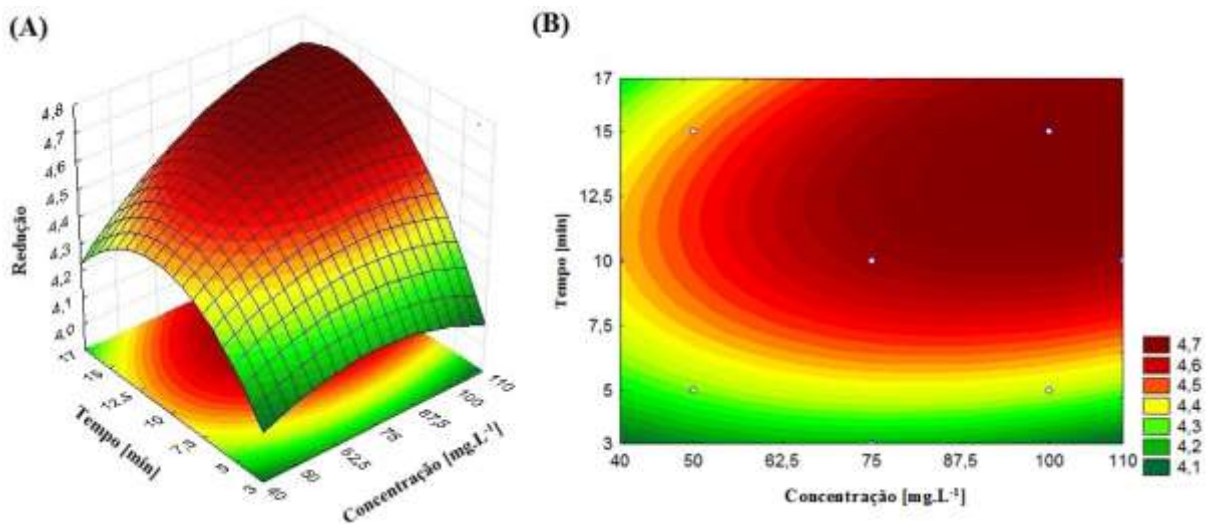
Fonte: Elaborado pela autora, 2021



A redução pode ser matematicamente expressa pela Equação 17, tendo uma redução média de 4,64 no ponto central. Conforme a Figura 14, os coeficientes lineares positivos apontam que o aumento da concentração e do tempo favorecem maiores reduções decimais logarítmicas do biofilme. No entanto, os termos quadráticos negativos indicam que há uma região máxima para as variáveis em estudo.

$$\text{Redução} = 4,64 + 0,08 A - 0,05 A^2 + 0,13 B - 0,13 B^2 + 0,06 AB \quad (17)$$

Figura 14 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria trecho reto, em função das variáveis tempo e concentração.



Fonte: Da autora, 2021

### 5.3.2 Tê

No tê, a variável tempo teve efeito significativo na redução decimal em termo linear e quadrático. Já a variável concentração apenas em relação ao termo quadrático. O coeficiente de determinação foi 0,991.

A redução pode ser matematicamente expressa pela Equação 18, tendo uma redução média de 2,22 no ponto central:

$$\text{Redução} = 2,22 - 1,09 A^2 + 0,44 B - 0,69 B^2 \quad (18)$$

Tabela 10 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria tê

<b>Fonte</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b><i>p</i></b>
A <sup>2</sup>	6,756010	1	6,756010	0,000000
B	1,594109	1	1,594109	0,000007
B <sup>2</sup>	2,673023	1	2,673023	0,000001
ERRO	0,080104	7	0,011443	
TOTAL	9,271855	10		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: Não significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 11 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria tê

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Desvio</b>	<b><i>p</i></b>	<b>Limite de confiança</b>		<b>Coefficiente do modelo</b>
				<b>-95%</b>	<b>95%</b>	
Média	2,22357	0,061761	0,000000	2,07753	2,36961	2,22357
A <sup>2</sup>	-2,19640	0,090395	0,000000	-2,41016	-1,98265	-1,09820
B	0,89411	0,075755	0,000007	0,71498	1,07324	0,44705
B <sup>2</sup>	-1,38156	0,090395	0,000001	-1,59531	-1,16780	-0,69078

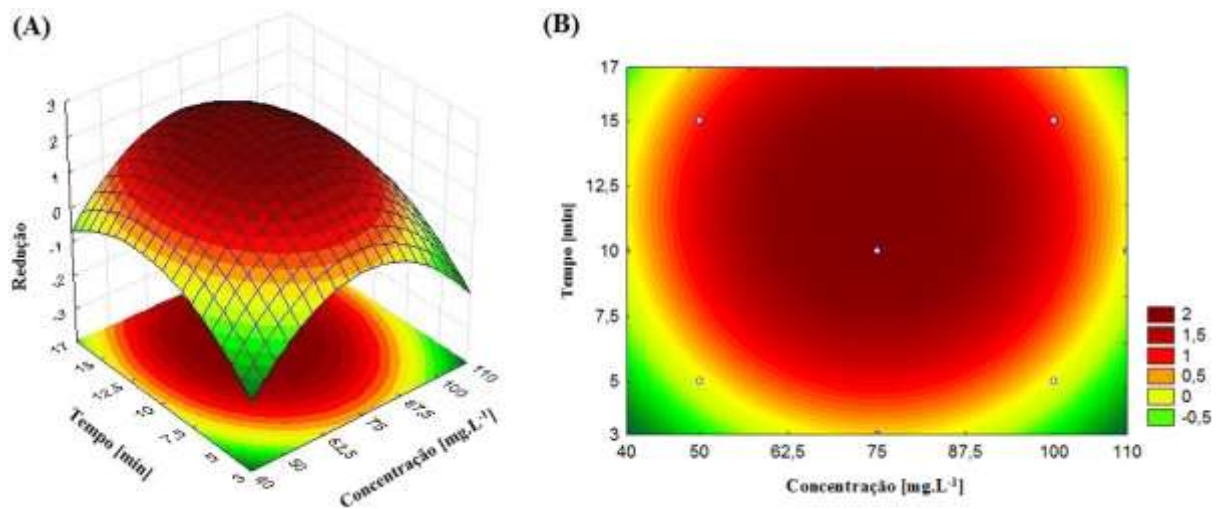
Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Ao comparar os resultados desse processo com o CIP convencional, houve uma redução significativa da presença de micro-organismos nessa geometria, visto que no convencional não houve nenhuma redução decimal. Conforme Augustin et al. (2010), a aplicação do fluxo pulsado melhora a higienização do processo devido que, uma ondulação mais alta, resulta na separação da subcamada viscosa e na formação de redemoinhos. Assim, a velocidade máxima não ocorre necessariamente no centro do tubo, mas perto da parede, resultando em altas tensões de cisalhamento da parede. Além disso, proporciona uma melhora na difusão do agente sanitizante próximo à parede.

No estudo realizado por Silva et al. (2020a) também foi constatado que esse comportamento do fluxo contribui para i) melhorar o transporte do sanitizante; ii) tornar o escoamento mais turbulento; iii) resultar em maiores transferências do sanitizante para a superfície a ser higienizada; iv) favorecer os mecanismos de ação do sanitizante sobre a microbiota presente na superfície; v) resultar em maiores reduções decimais das unidades formadoras de colônias.

Conforme a Figura 15, os termos quadráticos negativos apontaram a região máxima para as variáveis concentração e tempo.

Figura 15 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria tê, em função das variáveis tempo e concentração.



Fonte: Da autora, 2021

### 5.3.3 Cotovelo

No cotovelo as variáveis concentração e tempo, em termos lineares e quadráticos, tiveram efeitos significativos na redução decimal. Para essa geometria, o valor do  $R^2$  foi de 0,982.

Tabela 12 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria cotovelo

Fonte	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	<i>p</i>
A	0,051016	1	0,051016	0,001373
A <sup>2</sup>	0,009021	1	0,009021	0,043072
B	0,181894	1	0,181894	0,000068
B <sup>2</sup>	0,095645	1	0,095645	0,000319
AB	0,018225	1	0,018225	0,012250
ERRO	0,006213	5	0,001243	
TOTAL	0,353018	10		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: Não significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 13 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria cotovelo

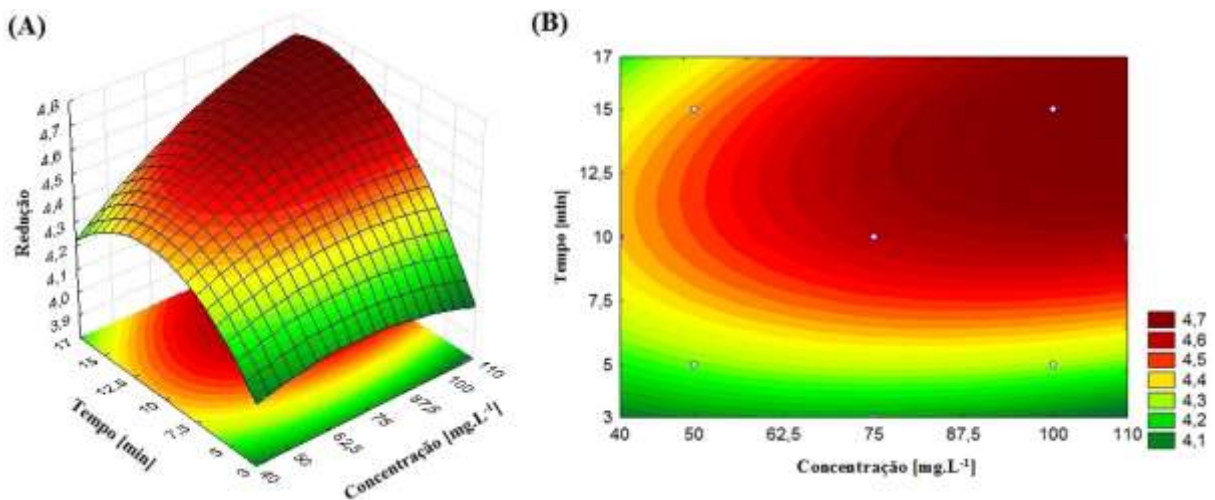
Fator	Efeito	Desvio	<i>p</i>	Limite de confiança		Coeficiente do modelo
				-95%	95%	
Média	4,596573	0,020351	0,000000	4,544259	4,648888	4,596573
A	0,159951	0,024963	0,001373	0,095783	0,224119	0,079975
A <sup>2</sup>	-0,080257	0,029787	0,043072	-0,156827	-0,003688	-0,040129
B	0,302024	0,024963	0,000068	0,237855	0,366192	0,151012
B <sup>2</sup>	-0,261335	0,029787	0,000319	-0,337904	-0,184765	-0,130667
AB	0,135000	0,035250	0,012250	0,044388	0,225612	0,067500

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

A redução pode ser matematicamente expressa pela Equação 19, tendo uma redução média de 4,59 no ponto central. Semelhante à geometria do trecho reto, conforme a Figura 16, os coeficientes lineares positivos indicam que o aumento do valor das variáveis em estudo proporciona maiores reduções decimais. Contudo, os termos quadráticos negativos indicam a região máxima dessas variáveis.

$$\text{Redução} = 4,59 + 0,07 A - 0,04 A^2 + 0,15 B - 0,13 B^2 + 0,06 AB \quad (19)$$

Figura 16 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria cotovelo, em função das variáveis tempo e concentração.



Fonte: Da autora, 2021

### 5.3.4 Expansão

Na expansão, as duas variáveis resultaram em coeficientes lineares e quadráticos positivos. Nas condições estudadas, esse fato indica que maiores concentrações e tempo proporcionam maiores reduções decimais.

Tabela 14 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria expansão

Fonte	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	<i>p</i>
A	0,371939	1	0,371939	0,002301
A <sup>2</sup>	1,413942	1	1,413942	0,000102
B	0,612334	1	0,612334	0,000743
B <sup>2</sup>	2,140091	1	2,140091	0,000037
AB	0,220900	1	0,220900	0,007017
ERRO	0,057032	5	0,011406	
TOTAL	4,038218	10		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: Não significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 15 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria expansão

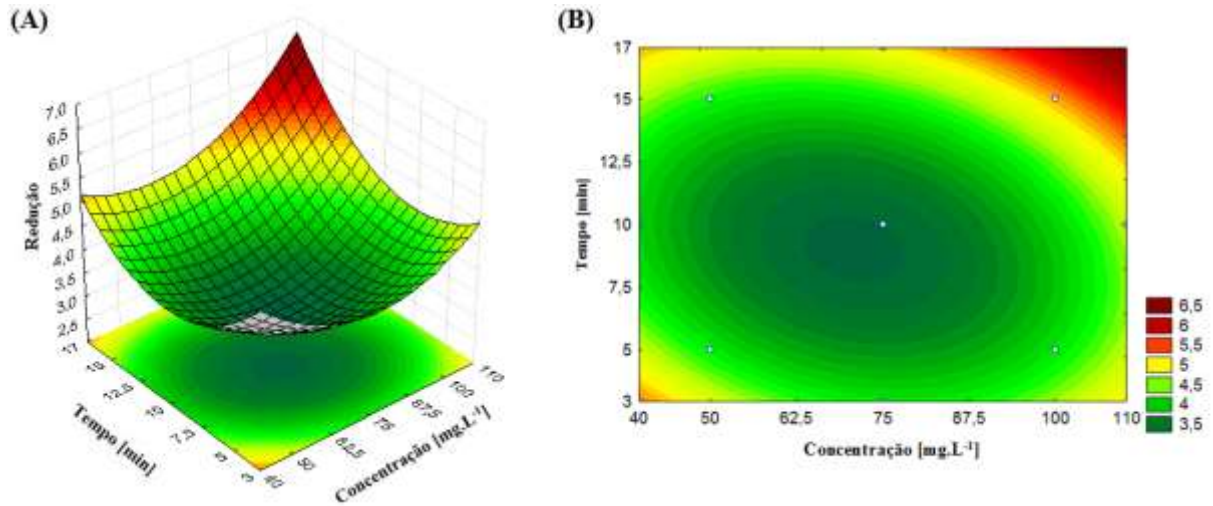
Fator	Efeito	Desvio	<i>p</i>	Limite de confiança		Coeficiente do modelo
				-95%	95%	
Média	3,300245	0,061661	0,000000	3,141741	3,458750	3,300245
A	0,431885	0,075632	0,002301	0,237466	0,626304	0,215942
A <sup>2</sup>	1,004808	0,090249	0,000102	0,772815	1,236801	0,502404
B	0,554149	0,075632	0,000743	0,359729	0,748568	0,277074
B <sup>2</sup>	1,236184	0,090249	0,000037	1,004192	1,468177	0,618092
AB	0,470000	0,106801	0,007017	0,195459	0,744541	0,235000

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Neste modelo o  $R^2$  foi 0,985. A redução decimal pode ser matematicamente expressa pela Equação 20, tendo uma redução média de 3,30 no ponto central. O termo quadrático das duas variáveis em estudo resultou em um comportamento diferente na parábola em relação às três geometrias anteriores, conforme a Figura 17.

$$\text{Redução} = 3,30 + 0,21 A + 0,50 A^2 + 0,27 B + 0,61 B^2 + 0,23 AB \quad (20)$$

Figura 17 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria expansão, em função das variáveis tempo e concentração.



Fonte: Da autora, 2021

### 5.3.5 Redução

Similar ao comportamento da expansão, na redução os coeficientes lineares e quadráticos também foram positivos.

Tabela 16 – Resultados da ANOVA para o modelo quadrático da geometria redução.

Fonte	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	<i>p</i>
A	0,716143	1	0,716143	0,003318
A <sup>2</sup>	0,961159	1	0,961159	0,001732
B	0,682567	1	0,682567	0,003681
B <sup>2</sup>	0,772985	1	0,772985	0,002809
AB	0,176400	1	0,176400	0,047834
ERRO	0,129759	5	0,025952	
TOTAL	3,051000	10		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: Não significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 17 – Avaliação do efeito da concentração (A) e do tempo (B) na remoção do biofilme na geometria redução

Fator	Efeito	Desvio	<i>p</i>	Limite de confiança		Coeficiente do modelo
				-95%	95%	
Média	3,740287	0,093007	0,000000	3,501204	3,979371	3,740287
A	0,599283	0,114082	0,003318	0,306027	0,892539	0,299641
A <sup>2</sup>	0,828447	0,136129	0,001732	0,478516	1,178378	0,414223
B	0,585066	0,114082	0,003681	0,291809	0,878322	0,292533
B <sup>2</sup>	0,742938	0,136129	0,002809	0,393007	1,092869	0,371469
AB	0,420000	0,161096	0,047834	0,005891	0,834109	0,210000

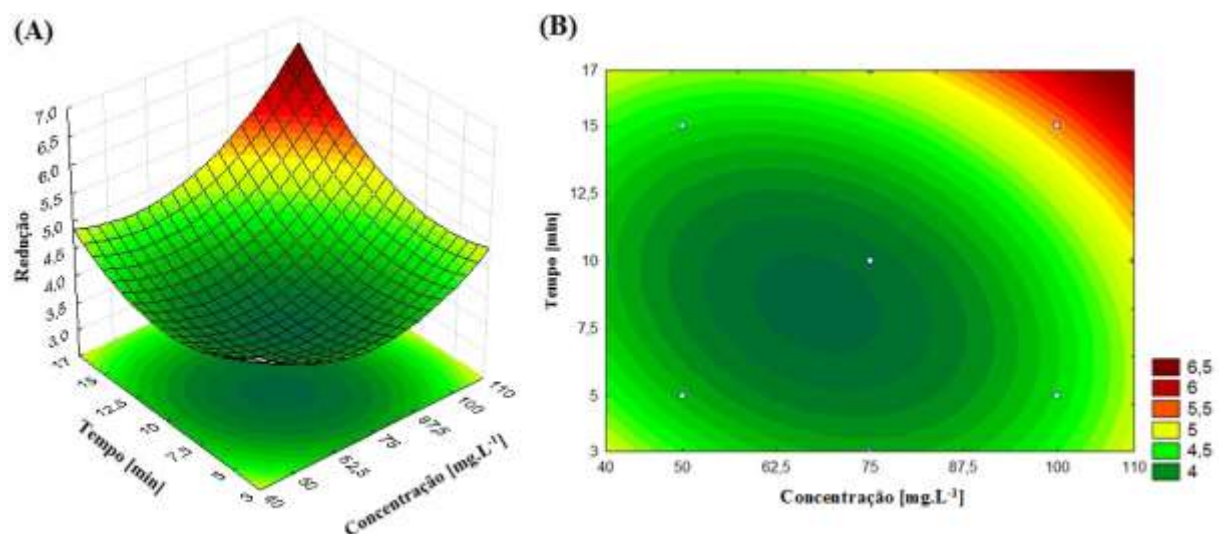
Fonte: Elaborado pela autora, 2021

O valor do coeficiente de determinação foi de 0,957. A redução decimal pode ser matematicamente expressa pela Equação 21, tendo uma redução média de 3,74 no ponto central:

$$\text{Redução} = 3,74 + 0,29 A + 0,41 A^2 + 0,29 B + 0,37 B^2 + 0,21 AB \quad (21)$$

Assim, conforme a Figura 18, a região com maior concentração e tempo resulta em maiores reduções decimais.

Figura 18 – Superfície de resposta (A) e de perfil (B) da geometria redução, em função das variáveis tempo e concentração.



Fonte: Da autora, 2021

#### 5.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO CIP

A partir dos resultados apresentados de cada geometria em estudo no CIP com fluxo pulsado, aplicou-se o método da desejabilidade, a fim de determinar as melhores condições operacionais do CIP para todas as geometrias.

Conforme a Tabela 18, o valor da desejabilidade foi de 0,728, indicando que todas as respostas ou fatores estavam dentro do intervalo de desejabilidade aceitável. O resultado dado como a melhor configuração, para operar o CIP com fluxo pulsado na etapa de sanitização, foi a combinação das variáveis codificadas 0 e 0,4, o que representam, respectivamente, a concentração do agente sanitizante  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  e o tempo de execução da etapa de 12 minutos.

Tabela 18 – Valores da desejabilidade

Desejabilidade	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	A	B	Concentração [ $\text{mg.L}^{-1}$ ]	Tempo [min]
0,728	0	0,4	75	12

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

A metodologia da desejabilidade estimou o valor da redução decimal para cada geometria. Por fim, realizou-se a validação do protocolo do CIP com fluxo pulsado na etapa de sanitização a partir dos parâmetros dessa metodologia. Os resultados podem ser observados na Tabela 19.

Tabela 19 – Valor estimado para a redução decimal e média da redução decimal obtida para cada geometria, a partir da metodologia da desejabilidade

Geometria	Valor estimado para a redução decimal	Média da redução decimal obtida
Trecho reto	4,66	$4,45 \pm 0,26$
Tê	2,28	$2,27 \pm 0,35$
Cotovelo	4,62	$4,09 \pm 0,24$
Expansão	3,48	$4,43 \pm 0,27$
Redução	3,89	$4,59 \pm 0,11$

Fonte: Elaborado pela autora, 2021



Ao operar o CIP com fluxo pulsado na etapa de sanitização na configuração proposta pela desejabilidade, sendo a concentração  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  e o tempo 12 minutos, encontrou-se o ponto ótimo de operação para todas as geometrias.

Logo, o ponto ótimo para sanitização com fluxo pulsado reduziu o tempo de parada do processo e minimizou o consumo do agente sanitizante e, ainda, foi capaz de produzir as mesmas reduções decimais nas geometrias cotovelo, expansão e redução, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado com o CIP convencional, e de aumentar a redução decimal na geometria trecho reto, conforme a Tabela 20. Em relação à geometria tê, a higienização com o CIP otimizado foi significativamente diferente ( $p = 0,0009$ ) do CIP convencional.

Tabela 20 – Média da redução decimal nos processos do CIP convencional e otimizado

<b>Geometria</b>	<b>Média da redução decimal no processo CIP convencional</b>	<b>Média da redução decimal no processo CIP otimizado</b>
Trecho reto	$4,01 \pm 0,08^a$	$4,45 \pm 0,26^b$
Tê	$0,00 \pm 0,28^c$	$2,27 \pm 0,35^d$
Cotovelo	$3,93 \pm 0,19^e$	$4,09 \pm 0,24^e$
Expansão	$4,34 \pm 0,02^f$	$4,43 \pm 0,27^f$
Redução	$4,25 \pm 0,25^g$	$4,59 \pm 0,11^g$

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, de acordo com *t-test* ( $p > 0,05$ )

Kumari e Sarkar (2016) relataram a preocupação da existência de *Bacillus cereus* em linhas de processamento de laticínios e reforçaram a importância da otimização dos protocolos de higienização. Assim, pode-se dizer que a configuração proposta nesta pesquisa otimizou o processo, visto que ao comparar esse protocolo com o do CIP convencional, resultou no aumento da redução decimal de *Bacillus cereus* na geometria mais desafiante em estudo.

## 5.5 REDUÇÃO DE RECURSOS ECONÔMICOS UTILIZADOS NO MÉTODO CIP

Nessa pesquisa, a otimização do processo CIP reduziu recursos econômicos, que refletem nos recursos ambientais. De modo semelhante, a atenção para o consumo inadequado de recursos e os custos associados aos processos de higienização industrial vêm sendo apontados por diversos autores (KUMARI; SARKAR, 2016; PETTIGREW et al., 2015; PIEPIÓRKA-STEPUK; DIAKUN; MIERZEJEWSKA, 2016).

Logo, a comparação dos dados da etapa de sanitização do CIP convencional e com fluxo pulsado podem ser observados na Tabela 21.

Tabela 21 – Comparação dos dados da etapa de sanitização do CIP convencional e com fluxo pulsado, que refletem nos recursos econômicos e ambientais

<b>Método CIP</b>	<b>Sanitizante [mg.L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Tempo [min]</b>	<b>Energia [KJ]</b>
<b>CIP convencional</b>	100	15	176,3
<b>CIP com fluxo pulsado</b>	75	12	151,4

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

Quando comparado ao CIP convencional, o consumo de agente sanitizante foi reduzido em 25% e o tempo de parada para execução da etapa de sanitização em 20%. Além disso, essa nova proposta também reduziu o consumo de energia em 14,13%.

Augustin et al. (2010) relatou que o CIP com fluxo pulsado possibilita reduzir os recursos econômicos que refletem nos custos da higienização, em razão do aumento da tensão de cisalhamento nas superfícies e difusão do agente sanitizante na subcamada viscosa. Os trabalhos de Bode et al. (2007), Silva (2019) e Silva et al. (2020a) descrevem que o CIP com fluxo pulsado pode reduzir o tempo de parada para execução do protocolo. Silva (2019) e Silva et al. (2020a) também concluíram que a proposta de pulsação do fluxo possibilita reduzir o consumo de energia.

## 6 CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, avaliou-se diferentes condições do método *clean in place* (CIP) e propôs uma otimização do processo convencional, por meio da aplicação da pulsação do fluxo na etapa de sanitização, nas quais as variáveis concentração da solução sanitizante e o tempo de execução foram variadas.

Das superfícies de prova utilizadas neste estudo, a geometria tê foi a mais desafiante, possivelmente pela presença de áreas de recirculação e de estagnação de fluidos, que reduzem a velocidade do fluxo. Tal fato sinaliza para as indústrias de alimentos a importância de um projeto higiênico apropriado.

As variáveis estudadas foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na redução decimal de *Bacillus cereus* aderidos nas superfícies, utilizados na contaminação desafio. O aumento da concentração e do tempo favorecem maiores reduções decimais logarítmicas do biofilme. O modelo matemático e a superfície de resposta das geometrias trecho reto, tê e cotovelo indicaram uma região máxima para as referidas variáveis.

Por meio do método da desejabilidade, determinou-se as melhores condições operacionais do CIP para todas as geometrias. Assim, o ponto ótimo reduziu o tempo de parada do processo e minimizou o consumo de energia e do agente sanitizante e, ainda, foi capaz de produzir as mesmas reduções decimais nas geometrias cotovelo, expansão e redução, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado com o CIP convencional, e de aumentar a redução decimal na geometria trecho reto. Para a geometria tê, notavelmente desafiadora com zonas de estagnação de fluido, apresentou significativa diminuição na presença do micro-organismos em dois ciclos.

No entanto, a geometria tê permaneceu sem atender às recomendações de órgãos oficiais ou de entidades científicas, como OPAS, OMS, APHA, em relação à quantidade de UFC.cm<sup>-2</sup> presente nesta superfície. Assim, sugere-se que haja a continuidade nesta linha de pesquisa para que uma configuração seja ajustada a fim de otimizar ainda mais a higienização desta geometria.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J. de. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 2008.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J. de; CARVALHO, A. F. de; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. de S.; SILVA, L. H. M. da. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, [S.l.], v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000900022>. Acesso em: 21 mar. 2020.
- AUGUSTIN, W.; FUCHS, T.; FÖSTE, H.; SCHÖLER, M.; MAJSCHAK, J.-P.; SCHOLL, S. Pulsed flow for enhanced cleaning in food processing. **Food and Bioproducts Processing**, [S.l.], v. 88, n. 4, p. 384-391, dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.08.007>. Acesso em: 18 jun. 2020.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Milk and dairy products. In: **Food Chemistry**. 4th ed. Berlin: Springer, 2009. cap. 10, p. 498-544. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>. Acesso em: 28 abr. 2020.
- BELTRAME, C. A.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A.; ROTTAVA, I.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D. de; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Food Science and Technology**, [S.l.], v. 32, n. 2, p. 228-232, 17 abr. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612012005000046>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J. de; FERREIRA, S. O.; SÁ, J. P. N. de; ARAÚJO, E. A.; DELATORRE, D. M. Z.; LUIZ, L. M. P. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 41, n. 4, p. 984-992, dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822010000400017>. Acesso em: 12 maio 2021.
- BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J. de; PENÃ, W. E. L.; MINIM, L. A.; SÁ, J. P. N.; FERNANDES, P. É.; COLOMBARI, D. dos S. Modeling of the adhesion of *bacillus cereus* isolated from a dairy plant as a function of time and temperature. **Journal of Food Process Engineering**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 187-191, 13 fev. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.2012.00671.x>. Acesso em: 12 mai. 2021.
- BERNARDES, P. C.; ARAÚJO, E. A.; ROSÁRIO, D. K. A. do. Formação de Biofilmes Microbianos. In: SÃO JOSÉ, J. F. B. de; ABRANCHES, M. V. (org.). **Microbiologia e Higiene de Alimentos: teoria e prática.** Rio de Janeiro: Rubio, 2019. cap. 11, p. 167-174.
- 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**, [S.l.], v. 97, p. 25-30, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.037>. Acesso em: 21 abr. 2020.
- BLEL, W.; LEGENTILHOMME, P.; LEGRAND, J.; BÉNÉZECH, T.; GENTIL-LELIÈVRE, C. Le. Hygienic design: effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line.

**Aiche Journal**, [S.l.], v. 54, n. 10, p. 2553-2566, out. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/aic.11559>. Acesso em: 11 set. 2021.

BLEL, W.; GENTIL-LELIÈVRE, C. Le; BÉNÉZECH, T.; LEGRAND, J.; LEGENTILHOMME, P. Application of turbulent pulsating flows to the bacterial removal during a cleaning in place procedure. Part 1: experimental analysis of wall shear stress in a cylindrical pipe. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 90, n. 4, p. 422-432, fev. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.008>. Acesso em: 18 jun. 2020.

BLEL, W.; LEGENTILHOMME, P.; BÉNÉZECH, T.; LEGRAND, J.; GENTIL-LELIÈVRE, C. Le. Application of turbulent pulsating flows to the bacterial removal during a cleaning in place procedure. Part 2: effects on cleaning efficiency. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 90, n. 4, p. 433-440, fev. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.019>. Acesso em: 18 jun. 2020.

BODE, K.; HOOPER, R. J.; PATERSON, W. R.; WILSON, D. I.; AUGUSTIN, W.; SCHOLL, S. Pulsed Flow Cleaning of Whey Protein Fouling Layers. **Heat Transfer Engineering**, [S.l.], v. 28, n. 3, p. 202-209, mar. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01457630601064611>. Acesso em: 25 jun. 2020.

BOSCH, A.; SERRA, D.; PRIETO, C.; SCHMITT, J.; NAUMANN, D.; YANTORNO, O. Characterization of Bordetella pertussis growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 71, n. 5, p. 736-747, 16 nov. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0202-8>. Acesso em: 23 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Ficam aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A [...]. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 9, 30 nov. 2018. Disponível em: [www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137). Acesso em: 13 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Anexo XX - Do controle e da vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005\\_03\\_10\\_2017.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html). Acesso em: 22 abr. 2020.

BRASIL. Presidente da República. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 3, 30 mar. 2017. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/03/2017&jornal=1&pagina=3&totalArquivos=240>. Acesso em: 13 abr. 2020.

BUABENG-BAIDOO, E.; MAFUKIDZE, N.; PAL, J.; TIWARI, S.; SRINIVASAN, B.; MAJOZI, T.; SRINIVASAN, R. Study of water reuse opportunities in a large-scale milk processing plant through process integration. **Chemical Engineering Research and Design**,

[S.l.], v. 121, p. 81-91, maio 2017. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2017.02.031>. Acesso em: 12 ago. 2020.

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M. de; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization: using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, [S.l.], v. 124, p. 123-138, jun. 2014. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>. Acesso em: 10 jul. 2021.

CLETO, S.; MATOS, S.; KLUSKENS, L.; VIEIRA, M. J. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **Plos One**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 1-8, 28 jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040189>. Acesso em: 20 abr. 2020.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA; FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **O uso racional da água no setor industrial**. 2. ed. Brasília: CNI, 2017. Disponível em: <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/manual-uso-racional-de-agua-no-setor-industrial/>. Acesso em: 12 ago. 2020.

DIF, M.; BLEL, W.; TASTAYRE, G.; LENDORMI, T.; SIRE, O. Identification of transfer mechanisms involved in soiled CIP solutions regeneration at extreme pH and high temperature. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 114, n. 4, p. 477-485, fev. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.036>. Acesso em: 11 ago. 2020.

DJUKIC, D.; MORACANIN, S. V.; MILIJASEVIC, M.; BABIC, J.; MEMISI, N.; MANDIC, L. Food safety and food sanitation. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, [S.l.], v. 14, p. 25-31, 2016. Disponível em: <http://www.jhed.mk/categories/view/464/456>. Acesso em: 30 abr. 2020.

DUGHERI, S.; BONARI, A.; POMPILIO, I.; COLPO, M.; MONTALTI, M.; MUCCI, N.; ARCANGELI, G. Assessment of occupational exposure to gaseous peracetic acid. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 527-535, 7 fev. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01166>. Acesso em: 24 maio 2020.

EBOIGBODIN, K. E.; BIGGS, C. A. Characterization of the Extracellular Polymeric Substances Produced by Escherichia coli Using Infrared Spectroscopic, Proteomic, and Aggregation Studies. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 686-695, 11 jan. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bm701043c>. Acesso em: 23 out. 2021.

EIDE, M.H; HOMLEID, J.P; MATTSSON, B. Life cycle assessment (LCA) of cleaning-in-place processes in dairies. **Lwt - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 36, n. 3, p. 303-314, maio 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438\(02\)00211-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438(02)00211-6). Acesso em: 11 ago. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite Embrapa 2021**. EMBRAPA GADO DE LEITE, 2021. Disponível em: [embrapa.br/gado-de-leite](http://embrapa.br/gado-de-leite). Acesso em: 21 out. 2021.

EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP. **Document n° 8: hygienic design principles**. 3th ed. Frankfurt: EHEDG, mar. 2018. Disponível em: <https://www.ehedg.org/guidelines/free-documents/>. Acesso em: 12 maio 2020.

FAILLE, C.; BÉNÉZECH, T.; BLEL, W.; RONSE, A.; RONSE, G.; CLARISSE, M.; SLOMIANNY, C. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. **Food Microbiology**, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 149-157, abr. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.010>. Acesso em: 16 abr. 2020.

FAN, M.; PHINNEY, D. M.; HELDMAN, D. R. Effectiveness of rinse water during in-place cleaning of stainless steel pipe lines. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 80, n. 7, p. 1490-1497, 30 maio 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12914>. Acesso em: 14 maio 2020.

FIGUEIREDO, H. M. de; ANDRADE, N. J. de; OZELA, E. F.; MORALES, G. P. Influência da velocidade de circulação do leite na adesão de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 469-473, set. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612009000300002>. Acesso em: 23 set. 2021

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S.l.], v. 8, n. 9, p. 623-633, 2 ago. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>. Acesso em: 07 jun. 2020.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, [S.l.], v. 14, n. 9, p. 563-575, 11 ago. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>. Acesso em: 07 jun. 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Dairy Products Toolkit: liquid milk, cheese, butter and ghee, frozen**. [S.l.]: FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-au164e.pdf>. Acesso em: 05 maio 2020.

FRYER, P. J.; ASTERIADOU, K. A prototype cleaning map: a classification of industrial cleaning processes. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 20, n. 6-7, p. 255-262, jul. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.005>. Acesso em: 27 abr. 2020.

FRYER, P. J.; ROBBINS, P. T.; COLE, P. M.; GOODE, K. R.; ZHANG, Z.; ASTERIADOU, K. Populating the cleaning map: can data for cleaning be relevant across different lengthscales?. **Procedia Food Science**, [S.l.], v. 1, p. 1761-1767, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.259>. Acesso em: 13 maio 2020.

FÖSTE, H.; SCHÖLER, M.; MAJSCHAK, J.-P.; AUGUSTIN, W.; SCHOLL, S. Modeling and Validation of the Mechanism of Pulsed Flow Cleaning. **Heat Transfer Engineering**, [S.l.], v. 34, n. 8-9, p. 753-760, 15 jul. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01457632.2012.741499>. Acesso em: 16 jun. 2020.

GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the Food Industry: health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 9, 7 maio 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>. Acesso em: 06 jun. 2020.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; DOULGERAKI, A.; NYCHAS, G.-J.; KAČÁNIOVÁ, M.; CZACZYK, K. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens.

**Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 6, 20 ago. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>. Acesso em: 07 jun. 2020.

GOODE, K. R.; ASTERIADOU, K.; ROBBINS, P. T.; FRYER, P. J. Fouling and cleaning studies in the food and beverage industry classified by cleaning type. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 121-143, mar. 2013.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12000>. Acesso em: 16 abr. 2020.

GROUT, L.; BAKER, M. G.; FRENCH, N.; HALES, S. A Review of potential public health impacts associated with the global dairy sector. **Geohealth**, [S.l.], v. 4, n. 2, fev. 2020.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1029/2019gh000213>. Acesso em: 13 abr. 2020.

GUZMÁN-SOTO, IRENE; MCTIERNAN, CHRISTOPHER; GONZALEZ-GOMEZ, MAYTE; ROSS, ALEX; GUPTA, KESHAV; SUURONEN, ERIK J.; MAH, THIEN-FAH; GRIFFITH, MAY; ALARCON, EMILIO I. Mimicking biofilm formation and development: recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. **iScience**, [S.l.], v. 24, n. 5, p. 1-51, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>. Acesso em: 10 jan. 2022.

HEJAZI, T. H.; BASHIRI, M.; DÍAZ-GARCÍA, J. A.; NOGHONDARIAN, K. Optimization of probabilistic multiple response surfaces. **Applied Mathematical Modelling**, [S.l.], v. 36, n. 3, p. 1275-1285, mar. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apm.2011.07.067>. Acesso em: 10 jul. 2021.

HERVERT, C. J.; ALLES, A. S.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 99, n. 9, p. 7033-7042, set. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11074>. Acesso em: 14 abr. 2020.

HUMPHREYS, P. N.; FINAN, P.; ROUT, S.; HEWITT, J.; THISTLETHWAITE, P.; BARNES, S.; PILLING, S. A systematic evaluation of a peracetic-acid-based high performance disinfectant. **Journal of Infection Prevention**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 126-131, 11 fev. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1757177413476125>. Acesso em: 24 maio 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Trimestral do Leite - 2º trimestre 2021**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>. Acesso em: 28 set. 2021.

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Manual de higienização da indústria alimentar**. Porto Alegre: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/icta/instituto/gerencia-administrativa1/limpeza/manual-de-higienizacao/view>. Acesso em: 15 abr. 2020.

JENSEN, B. B.B.; FRIIS, A. PREDICTING THE CLEANABILITY OF MIX-PROOF VALVES BY USE OF WALL SHEAR STRESS. **Journal of Food Process Engineering**,



[S.l.], v. 28, n. 2, p. 89-106, abr. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.2005.00370.x>. Acesso em: 07 set. 2021.

KARUNAKARAN, E.; BIGGS, C. A. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 89, n. 4, p. 1161-1175, 9 out. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2919-2>. Acesso em: 23 out. 2021.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, [S.l.], v. 69, p. 20-29, nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012>. Acesso em: 13 ago. 2020.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. **Food Control**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 153-158, fev. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.014>. Acesso em: 24 out. 2021

LELIÈVRE, C.; LEGENTILHOMME, P.; GAUCHER, C.; LEGRAND, J.; FAILLE, C.; BÉNÉZECH, T. Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. **Chemical Engineering Science**, [S.l.], v. 57, n. 8, p. 1287-1297, abr. 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2509\(02\)00019-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2509(02)00019-2). Acesso em: 11 set. 2021.

LELIEVELD, H. L. M.; MOSTERT, M. A.; CURIEL, G. J. Hygienic equipment design. In: LELIEVELD, H. L. M.; MOSTERT, M. A.; HOLAH, J.; White, B. **Hygiene in food processing**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. cap. 8.

LI, G.; TANG, L.; ZHANG, X.; DONG, J. A review of factors affecting the efficiency of clean-in-place procedures in closed processing systems. **Energy**, [S.l.], v. 178, p. 57-71, jul. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2019.04.123>. Acesso em: 15 set. 2021.

MARTIN, J. G. P.; SILVA, G. de O. e; FONSECA, C. R. da; MORALES, C. B.; SILVA, C. S. P.; MIQUELLUTI, D. L.; PORTO, E. Efficiency of a cleaning protocol for the removal of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in dairy plants. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 238, p. 295-301, dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.018>. Acesso em: 26 abr. 2020.

MATUSZEK, T. Food production quality and risk assessment on machinery design. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, [S.l.], v. 1, p. 66-71, 2012. Disponível em: <http://www.jhed.mk/categories/view/413/456>. Acesso em: 30 abr. 2020.

MATUSZEK, T. Basic factors for food processing equipment hygienic design and its cleanabilities with minimal contamination risk. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, [S.l.], v. 6, p. 38-45, 2014. Disponível em: <http://www.jhed.mk/categories/view/449/456>. Acesso em: 30 abr. 2020.

MIZAN, M. F. R.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. **Food Microbiology**, [S.l.], v. 49, p. 41-55, ago. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.009>. Acesso em: 07 jun. 2020.

MOERMAN, F.; PARTINGTON, E. Materials of construction for food processing equipment and services: requirements, strengths and weaknesses. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, [S.l.], v. 6, p. 10-37, 2014. Disponível em: <http://www.jhed.mk/categories/view/449/456>. Acesso em: 01 maio 2020.

MOERMAN, F.; RIZOULIÈRES, PH.; MAJOOR, F. A. Cleaning-in-place. *In*: LELIEVELD, H. L. M.; HOLAH, J.; NAPPER, D. **Hygiene in Food Processing: principles and practice**. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. cap. 10, p. 303-383.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8. ed. John Wiley & Sons, Inc., 2012.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.l.], v. 16, n. 5, p. 1022-1041, 1 ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12283>. Acesso em: 15 abr. 2020.

NADA, S.; ILIJA, D.; IGOR, T.; JELENA, M.; RUZICA, G. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, [S.l.], v. 25, n. 2, p. 728-731, jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.022>. Acesso em: 16 abr. 2020.

NILSSON, R. E.; ROSS, T.; BOWMAN, J. P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 150, n. 1, p. 14-24, out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.012>. Acesso em: 07 jun. 2020.

PALABIYIK, I.; YILMAZ, M. T.; FRYER, P. J.; ROBBINS, P. T.; TOKER, O. S. Minimising the environmental footprint of industrial-scaled cleaning processes by optimisation of a novel clean-in-place system protocol. **Journal of Cleaner Production**, [S.l.], v. 108, p. 1009-1018, dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.114>. Acesso em: 14 maio 2020.

PAUGAM, L.; DELAUNAY, D.; DIAGNE, N. W.; RABILLER-BAUDRY, M. Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: on the real effect of nitric acid step. **Journal of Membrane Science**, [S.l.], v. 428, p. 275-280, fev. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>. Acesso em: 18 maio 2020.

PAUL, T.; JANA, A.; DAS, A.; MANDAL, A.; HALDER, S. K.; MOHAPATRA, P. K. das; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning techniques towards dairy industries. **Journal of Cleaner Production**, [S.l.], v. 76, p. 140-153, ago. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.028>. Acesso em: 11 ago. 2020.

PETTIGREW, L.; BLOMENHOFER, V.; HUBERT, S.; GROß, F.; DELGADO, A. Optimisation of water usage in a brewery clean-in-place system using reference nets. **Journal of Cleaner Production**, [S.l.], v. 87, p. 583-593, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.10.072>. Acesso em: 11 ago. 2020.

PIEPIÓRKA-STEPUK, J.; DIAKUN, J.; MIERZEJEWSKA, S. Poly-optimization of cleaning conditions for pipe systems and plate heat exchangers contaminated with hot milk using the Cleaning In Place method. **Journal of Cleaner Production**, [S.l.], v. 112, p. 946-952, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.018>. Acesso em: 11 ago. 2020.

SALARI, M.; SHAHID, E. S.; AFZALI, S. H.; EHTESHAMI, M.; CONTI, G. O.; DERAKHSHAN, Z.; SHEIBANI, S. N. Quality assessment and artificial neural networks modeling for characterization of chemical and physical parameters of potable water. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 118, p. 212-219, ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.036>. Acesso em: 23 abr. 2020.

SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; FERNANDES, P. E.; LOPES, J. P.; BERNARDES, P. C.; PORTUGAL, J. G. Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 62, n. 6, p. 1478-1483, dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352010000600026>. Acesso em: 06 jun. 2020.

SCHLEGLOVÁ, J.; BABÁK, V.; HOLASOVÁ, M.; KONSTANTINOVÁ, L.; NECIDOVÁ, L.; ŠIŠÁK, F.; VLKOVÁ, H.; ROUBAL, P.; JAGLIC, Z. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. **Czech Journal of Food Sciences**, [S.l.], v. 28, n. 5, p. 450-461, 14 out. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17221/65/2009-cjfs>. Acesso em: 18 abr. 2020.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, [S.l.], v. 13, n. 6-7, p. 469-477, set. 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0956-7135\(01\)00068-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-7135(01)00068-8). Acesso em: 24 out. 2021.

SILVA, L. D. **Otimização da limpeza CIP (Clean In Place) por meio de vazão pulsada**. 2019. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.351>. Acesso em: 21 mar. 2020.

SILVA, L. D.; COUTINHO FILHO, U.; NAVES, E. A. A.; GEDRAITE, R. Pulsed flow in clean-in-place sanitization to improve hygiene and energy savings in dairy industry. **Journal of Food Process Engineering**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 1-9, 15 nov. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.13590>. Acesso em: 13 dez. 2020.

SILVA, L. D.; MOREIRA, M. G.; GUERRA, N. T.; NAVES, E. A. A.; VIANNA, P. C. B.; COUTINHO FILHO, U.; GEDRAITE, R. Clean in place (CIP) of different stainless steel geometries contaminated with *Pseudomonas fluorescens*. **Research, Society And Development**, [S.l.], v. 9, n. 12, p. 1-23, 21 dez. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i12.10866>. Acesso em: 16 jan. 2021.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, [S.l.], v. 31, n. 2, p. 572-585, jun. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>. Acesso em: 07 jun. 2020.

STIER, R. F. Basics of cleaning: understanding the difference between cleaning and sanitizing is critical. **Food Engineering**, [S.l.], v. 92, n. 1, p. 62–66, 2020.

SUÁREZ, L.; DÍEZ, M. A.; GARCÍA, R.; RIERA, F. A. Membrane technology for the recovery of detergent compounds: a review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S.l.], v. 18, n. 6, p. 1859-1873, nov. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2012.05.015>. Acesso em: 17 maio 2020.

TAMIME, A. Y. (ed.). **Cleaning-in-Place: dairy, food and beverage operations**. 3rd ed. Oxford: Blackell Publishing, 2008.

TETRA PAK. **Cleaning in place: a guide to cleaning technology in the food processing industry**. [S.l.]: Tetra Pak, 2015.

TETRA PAK. **Dairy Processing Handbook**. [S.l.]: Tetra Pak, 2020. Disponível em: <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/>. Acesso em: 11 maio 2020.

TRINH, L.; WILLEY, A. R.; MARTIN, P. J.; ASHLEY, J.; TOTHILL, I. E.; RODGERS, T. L. Rate-based approach to cleaning-in-place. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S.l.], v. 56, n. 23, p. 6695-6702, 31 maio 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00727>. Acesso em: 13 maio 2020.

THOMAS, A.; SATHIAN, C. T. Cleaning-in-place (CIP) system in dairy plant - review. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 8, n. 6, p. 41 - 44, jun. 2014.

TUGAROVA, A. V.; SCHELUDKO, A. V.; DYATLOVA, Y. A.; FILIPECHEVA, Y. A.; KAMNEV, A. A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. **Journal of Molecular Structure**, [S.l.], v. 1140, p. 142-147, jul. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>. Acesso em: 17 out. 2021.

VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. Milk and milk products. In: **Essentials of Food Science**. 4th ed. New York: Springer, 2014. cap. 11, p. 201-229. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9138-5>. Acesso em: 28 abr. 2020.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

WANG, L.; FAN, D.; CHEN, W.; TARENTJEV, E. M. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 5, n. 1, 14 out. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15159>. Acesso em: 13 dez. 2020.

WEIDEMANN, C.; VOGT, S.; NIRSCHL, H. Cleaning of filter media by pulsed flow – Establishment of dimensionless operation numbers describing the cleaning result. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 132, p. 29-38, jul. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.02.005>. Acesso em: 17 jun. 2020.

XU ZHOU, K.; LI, N., CHRISTIE, G.; WILSON, DI. Assessing the impact of germination and sporulation conditions on the adhesion of *Bacillus* spores to glass and stainless steel by

fluid dynamic gauging. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 82, n. 11, p. 2614-2625, nov. 2017.

YANG, J.; JENSEN, B. B. B.; NORDKVIST, M.; RASMUSSEN, P.; GERNAEY, K. V.; KRÜHNE, U. CFD modelling of axial mixing in the intermediate and final rinses of cleaning-in-place procedures of straight pipes. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 221, p. 95-105, mar. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.017>. Acesso em: 28 ago. 2020.