

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ADAELSON FIRMINO DA SILVA JUNIOR

**ANÁLISE DO PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL COM
DETERGENTE ENZIMÁTICO EM TUBULAÇÕES
DE UM ABATEDOURO DE AVES**

DOIS VIZINHOS

2022

ADAELSON FIRMINO DA SILVA JUNIOR

**ANÁLISE DO PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL COM
DETERGENTE ENZIMÁTICO EM TUBULAÇÕES
DE UM ABATEDOURO DE AVES**

**ANALYSIS OF THE PRE-OPERATIONAL HYGIENE PROCESS WITH
ENZYMATIC DETERGENT IN PIPES OF A POULTRY SLAUGHTERHOUSE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Dra. Samara Silva de Souza

Co-orientador: Me. Alcides Ricardo Gomes de Oliveira

DOIS VIZINHOS

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa



ADAELSON FIRMINO DA SILVA JUNIOR

ANÁLISE DO PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL COM DETERGENTE ENZIMÁTICO EM TUBULAÇÕES DE UM ABATEDOURO DE AVES

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 29 de Agosto de 2022

Dra. Samara Silva De Souza, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Andreia Anschau, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Hilton Lopes Galvao, Doutorado - Instituto Federal Fluminense

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 29/08/2022.

Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem
a inteligência e o entendimento.
Provérbios 2:6

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores e ocupa posição de destaque em exportações de carne de frango. Sendo assim, torna-se imprescindível que a indústria de abate de aves monitore os riscos à saúde que seus produtos podem representar para os consumidores. A disseminação bacteriana é possível de ocorrer em todos os estágios do processo e tendem a se isolar em locais inacessíveis para os métodos de higienização convencionais. Uma higienização ineficaz, pode resultar na formação de biofilmes, que pode levar a uma difícil remoção e a uma maior resistência. A linha de produtos eviscerados das aves, onde se destaca a linha de produção de fígado é uma etapa crítica e pode ter sua higienização aprimorada através do uso de detergentes enzimáticos impedindo a formação de biofilmes. O objetivo deste trabalho foi analisar o processo de higienização pré-operacional com o uso unicamente de detergente clorado, com a adição de detergente enzimático e por último com a inclusão de linha de CIP (*clean-in-place*) exclusiva implantada para a avaliação. As amostras foram coletadas em três momentos: 0 (antes da higienização); 1 (após primeira higienização ao final da produção da semana) e 2 (após uma segunda higienização com o intervalo do final de semana sem produção) em 6 pontos: CF0, CF1 e CF2, (chuter-recepção fígado), onde o 0 é do local não higienizado, o 1 após primeira higienização, e 2 após segunda higienização; e TF0, TF1 e TF2 (tubulação), onde o 0 é do local não higienizado, o 1 após primeira higienização, e 2 após segunda higienização. Para verificar a presença de biofilmes foi utilizado um revelador visual de biofilmes, e quanto a presença de microrganismos, foram realizadas análises microbiológicas (Mesófilos aeróbios, Enterobactérias, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp) com as amostras sendo coletadas por meio de swab's nos pontos estratégicos da tubulação. As análises físico-químicas de como pH, cloro e turbidez da água também foram realizadas. Os resultados revelaram que o tratamento adicionando o detergente enzimático ao processo de higienização ainda apresentou presença de biofilme, mesmo após a segunda higienização. Os resultados estatísticos mostraram que para os dados de mesófilos aeróbicos e contagem de enterobactérias e pH, cloro e turbidez quando avaliados sobre tratamento empregado de CIP (detergente clorado, detergente enzimático e associado) em nada diferem entre si no tempo observado desde a primeira limpeza operacional até a última independente do tratamento. Em relação ao biofilme houve diferença significativa, sendo mais eficaz quando houve associação do sistema CIP com detergente clorado e enzimático. Nesse sentido, esse trabalho agrega grande valor à empresa por trazer respostas práticas para a melhoria dos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO).

Palavras-chave: biofilme; detergente enzimático; higienização; abatedouro de aves.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest producers and occupies a prominent position in exports of chicken meat. Therefore, it is essential that the poultry industry monitors the health risks that its products can pose to consumers. Bacterial dissemination is possible to occur at all stages of the process and tends to isolate in places inaccessible to conventional hygienic methods. Ineffective sanitation can result in the formation of biofilms, which can lead to difficult removal and increased resistance. The eviscerated poultry product line, where the liver production line stands out, is a critical stage and can have its sanitation improved through the use of enzymatic detergents preventing the formation of biofilms. The objective of this study was to analyze the pre-operational cleaning process with the use of chlorinated detergent only, with the inclusion of enzymatic detergent, and finally with the inclusion of an exclusive CIP (clean-in-place) line implemented for evaluation. The samples were collected in three moments: 0 (before hygienization); 1 (after the first hygienization at the end of the week's production), and 2 (after a second hygienization with the weekend break without production) in 6 points: CF0, CF1 and CF2 (chuter-receiving liver); and TF0, TF1 and TF2 (tubing). A visual biofilm developer was used to verify the presence of biofilms, and as for the presence of microorganisms, microbiological analyses were performed (Aerobic mesophiles, Enterobacteriaceae, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp) with the samples being collected through swabs at strategic points in the pipeline. Physicochemical analyses of such as pH, chlorine and turbidity of the water were also performed. The results revealed that the treatment adding the enzymatic detergent to the sanitizing process still showed the presence of biofilm, even after the second sanitizing. The statistical results showed that for the data of aerobic mesophiles and Enterobacteria count and pH, chlorine and turbidity when evaluated on the employed CIP treatment (chlorinated detergent, enzymatic detergent and associated) in no way differ from each other in the time observed from the first operational cleaning to the last, regardless of treatment. Regarding biofilm, there was a significant difference, being more effective when there was an association of the CIP system with chlorinated and enzymatic detergent. In this sense, this work adds great value to the company by bringing practical answers for the improvement of the Standard Sanitizing Operating Procedures (SSOP).

Keywords: biofilm; enzymatic detergent, higyenization, poultry slaughterhouse.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Lista de Perigos e os agentes comumente encontrados em produtos cárneos.....	15
QUADRO 2 – Legislações dos programas de autocontrole.....	17
QUADRO 3 – Elementos de controle dos PAC's.....	18
QUADRO 4 – Fatores de influência na eficiência do CIP.....	29
QUADRO 5 – Identificação dos códigos das amostras.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Avaliação microbiológica com detergente clorado - Semana 1.....	40
TABELA 2 – Avaliação microbiológica com detergente clorado - Semana 2.....	41
TABELA 3 – Avaliação microbiológica com detergente clorado - Semana 3.....	41
TABELA 4 – Avaliação microbiológica com detergente enzimático Semana 1.....	42
TABELA 5 – Avaliação microbiológica com detergente enzimático Semana 2.....	43
TABELA 6 – Avaliação microbiológica com detergente enzimático Semana 3.....	43
TABELA 7 - Avaliação microbiológica detergente enzimático + CIP Semana 1.....	44
TABELA 8 - Avaliação microbiológica detergente enzimático + CIP Semana 2.....	44
TABELA 9 - Avaliação microbiológica detergente enzimático + CIP Semana 3.....	45
TABELA 10 – Avaliação da turbidez expressos em (NTU), nos três pontos de coleta da empresa durante nove semanas.....	46
TABELA 11 – Análise estatística dos tratamentos.....	47
TABELA 12 – Análise estatística detalhada.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CIP	<i>Clean-in-place</i>
DIPOA	Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DTA	Doenças Transmissíveis por Alimentos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PAC	Programas de Autocontrole
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
SSOP	<i>Sanitation Standard Operating Procedures</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	Segurança dos alimentos	14
3.1.1	Programas de autocontrole (PAC).....	16
3.2	Procedimento padrão de higiene operacional	18
3.2.1	Procedimento padrão de higiene operacional (PPHO).....	19
3.2.2	Agentes de limpeza	20
3.2.3	Detergente enzimático.....	21
3.2.4	Tipos de higienização	23
3.2.5	Verificação da higienização por meio de <i>swab's</i>	25
3.2.6	Indicadores de higiene	25
3.2.7	Enterobactérias	26
3.2.8	Qualidade da água	27
3.2.9	Sistema <i>clean-in-place</i> (CIP).....	28
3.3	Biofilme	31
3.3.1	Biofilme na indústria de alimentos	32
3.4	Setores produtivos	34
3.4.1	Setor de evisceração	34
3.4.2	Setor de miúdos	34
3.4.3	Chutter.....	35
4	MATERIAL E METÓDOS	36
4.1	Amostragem com <i>swab's</i>	36
4.2	Analises	37
4.2.1	Análises microbiológicas	37
4.2.2	Análises físico-químicas	38
4.3	Higienização da linha chutter e tubulação	38
4.4	Análise estatística	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1	Tratamento estatístico	46
6	CONCLUSÕES	51

REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE A - 59	
Procedimento Operacional Padrão (POP).....	59

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentar brasileira encontra-se numa posição de extrema relevância no desenvolvimento do país, porque é através dela que alguns dos interesses sociais e econômicos são alcançados. Mas não é um organismo que trabalha sem a interferência do mercado, com o objetivo de atender somente ao Estado. Uma das variáveis que devem se preocupar para sua própria estabilidade econômica é a observação dos concorrentes. Com a maturidade do próprio negócio a necessidade se eleva ao ponto de a própria precisar se posicionar melhor no mercado, buscando um diferencial, e conseqüentemente fidelizar e atrair mais clientes para fins de manter a sua saúde econômica (LIMA *et al.*, 2020).

Em 2021 estava previsto uma comercialização recorde na indústria de aves, estimando cerca de 4,46 milhões de toneladas de carnes de aves exportada, e apesar da alta exportação a disponibilidade interna aumentaria em 3% até o mês de novembro de 2021. Conforme último dado, até o mês de outubro de 2021 o Brasil já tinha exportado cerca de 3,75 milhões de toneladas de carne de frango, demonstrando que estávamos perto de atingir a previsão (CONAB, 2021), além de deixar o Brasil entre os maiores players de produção e exportação a nível global (EMBRAPA, 2021b). Em 2020 o consumo per capita no Brasil foi de 45,27 Kg (ABPA, 2021), e em 2021 este consumo subiu para 51 Kg por habitante, um aumento histórico (CONAB, 2021).

Essa influência per capita na alimentação humana dos produtos de origem animal possui grande relevância no suprimento nutricional, tais como vitaminas e minerais, além de quantidade significativa de aminoácidos essenciais (DE SMET; VOSEN, 2016). Por causa dessa influência no dia-a-dia, também é necessário que a indústria alimentícia monitor e os riscos à saúde que seus produtos podem provocar nos consumidores e busquem sempre fornecer produtos que não apresentem risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA), se adequando aos quesitos de segurança alimentar.

O processo de higienização na indústria de alimentos tem o objetivo de auxiliar no processo de obtenção do produto, para que o mesmo não ofereça riscos à saúde do consumidor, além de manter as qualidades nutricionais e sensoriais do alimento. A higienização é o meio utilizado para auxiliar a o atendimento dos padrões microbiológicos estabelecidos em legislação vigente, além de impactar diretamente as características econômicas e comerciais (PRATI; HENRIQUE; PARISI, 2015).

Uma das preocupações durante os processos de higienização é impedir a potencial deformação de biofilmes, por isso a busca por processos com mais eficiência é tão necessária (CARVALHO *et al.*, 2015; MARCHI *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2011).

A formação de biofilmes na indústria alimentícia pode ocasionar perdas econômicas em termos de produção e traz riscos à saúde dos consumidores. Eles podem ser causados por frações de alimentos depositados nos equipamentos mal higienizados que permanecem aderidos formando nichos propícios para colonização de microrganismos de forma irreversível. Deve-se tomar cuidado para garantir que as superfícies de contato com alimentos, bem como utensílios e superfícies, sejam devidamente limpas para evitar sua degradação (CARVALHO *et al.*, 2015; KASNOWSKI *et al.*, 2010).

A indústria de carne de aves produz subprodutos a partir das vísceras deste animal que tem seu considerável valor agregado, tais como coração, moela e fígado. O fígado de ave exige uma linha de produção exclusiva devido à delicadeza dos seus tecidos e do exsudato produzido e é também pelo mesmo motivo que esta linha exige um alto grau de monitoramento da higienização. Assim, o objetivo principal deste trabalho é avaliar a remoção de biofilmes da linha de transporte de fígado utilizando um detergente enzimático elaborando um protocolo para o Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) pré-operacional, com sistema exclusivo de clean-in-place (CIP) para um abatedouro de aves.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a remoção de biofilmes e bactérias da linha de transporte de fígado utilizando diferentes tratamentos e o sistema exclusivo CIP para um abatedouro de aves.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar as análises microbiológicas de mesófilos aeróbios, Enterobactérias, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp e presença/ausência de biofilmes pré e pós-higienização da linha com uso de três tratamentos: unicamente detergente clorado, seguido do uso com detergente enzimático e utilizando detergente enzimático mais o sistema CIP;
- Realizar análises físico-químicas de cloro livre, pH e turbidez da água para monitoramento da capacidade de remoção de sujidade interna da linha;
- Analisar a eficiência do processo de higienização com a utilização do sistema CIP exclusivo.
- Elaborar um protocolo de PPHO pré-operacional com o detergente enzimático no sistema de CIP exclusivo da linha.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Segurança dos alimentos

Entende-se por segurança dos alimentos os procedimentos que visam manter a inocuidade do alimento e conseqüentemente asseguram a qualidade em níveis microbiológicos, físicos, químicos e sensoriais, de modo que o alimento não faça mal ao consumidor. A estratégia empregada para manter a segurança dos alimentos vai além do que se refere a saúde pública, pois impulsiona o produtor na competitividade no mercado, principalmente a nível internacional (EMBRAPA, 2021a).

Doenças que são transmitidas por alimentos, também chamadas de DTA's, são causadas devido a ingestão de alimentos e/ou água contaminados, e existem mais de 250 tipos diferentes de DTA's no mundo, com sua causa sendo majoritariamente por infecções bacterianas e suas toxinas, vírus e outros parasitas. Considera-se um surto de DTA quando no mínimo duas pessoas apresentam sintomas semelhantes após a ingestão de alimento e/ou água de um mesmo local e origem (BRASIL, 2021). Doenças causadas por alimentos contaminados não só reduzem a saúde da população como a disponibilidade de alimentos graças à ação microbiana, causando impacto direto na economia do setor alimentar (DERREADO,2017).

A FAO (Food and Agriculture Organization) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) criaram no ano de 1963 a comissão do *Codex Alimentarius*, que desenvolveu os primeiros padrões de boas práticas, orientações e recomendações sobre a segurança dos alimentos de maneira que tais padrões foram reconhecidos internacionalmente (DIAS, 2006). Desta forma, o *Codex Alimentarius* possui padrões para a proteção à saúde do consumidor em relação aos alimentos, também deixando de maneira clara a existência das práticas no mercado internacional, e também promover a gestão de normas alimentares delineadas através de organizações governamentais e não governamentais a nível internacional (CODEXALIMENTARIUSCOMMISSION, 2013).

A quantidade de doenças transmitidas por alimentos está em crescimento devido a alguns fatores como o aumento do grupo de pessoas com alguma deficiência em sua imunidade, pessoas sem conhecimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e ineficiência na qualidade higiênico-sanitária. As DTA's surgem pela falha na execução do controle higiênico-sanitário ao longo da produção e manipulação de

alimentos (Melo *et al.*, 2018). No quadro 1, encontra-se a Lista de perigos e os agentes comumente encontrados em produtos cárneos.

Quadro 1 – Lista de perigos e os agentes comumente encontrados em produtos cárneos.

Perigos	Agentes
Biológico	Bactéria <i>Clostridium botulinum</i> <i>Campylobacter jejuni</i> Cepas patogênicas de <i>E. coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
	Vírus <i>Hepatite A</i> <i>Rotavírus</i>
	Parasita <i>Entamoeba histolytica</i>
	Protozoário <i>Taenia solium</i>
Químico	Resíduos veterinários
	Antibióticos
	Plastificantes, bisfenol A, Cloreto de vinila
	Resíduos químicos, Pesticidas (DDT)
	Metais tóxicos, mercúrio, Substâncias proibidas
	Aditivos alimentares
Físico	Vidro
	Metal
	Pedras
	Madeira
	Plástico
	Parte de pragas
	Ossos
	Material de isolamento

Fonte: Santos *et al* (2021).

No período de janeiro de 2016 a dezembro de 2019 foram notificados 626 surtos de DTA's no Brasil, que atingiram cerca de 37.247 pessoas, uma média de

9.312 pessoas por ano. Nesse período houveram 38 óbitos em 26 casos, onde 23% foram acometidos por agentes etiológicos de intoxicação exógena, *E. coli* EHEC, *S. aureus*, *T. cruzi*, *Salmonella*. Os agentes mais relevantes foram: *E. coli* (35,7%), *Salmonella* (14,9%), *Staphylococcus* (11,5%), *Norovirus* (8,3%), *B. Cereus* (7,4%), rotavírus (6,95%), entre outros agentes (BRASIL, 2020).

3.1.1 Programas de autocontrole (PAC)

Os estabelecimentos que manipulam alimentos possuem diversas regulamentações através de diferentes diretrizes. Com o intuito de melhorar a eficiência e qualidade do produto, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Aninam (DIPOA) criou em 2005 os Programas de Autocontrole (PAC) (SIMAS; AMARAL; SANTOS, 2021). Tais Programas são utilizados nos estabelecimentos com o objetivo de reduzir as perdas econômicas e elevar o padrão mínimo de qualidade que o mercado exige (SILVA *et al.*, 2019).

Desta forma, a utilização de programas de qualidade como Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) têm sido utilizados com objetivo de instaurar um ambiente higiênico de tudo que possa contaminar o alimento, partindo dos equipamentos e utensílios aos colaboradores, assegurando que o alimento esteja inócuo (OLIVEIRA; CAMPOS, 2015). Os PAC's são amparados por algumas legislações para sua implantação, como é possível observar no Quadro 2.

Quadro 2 – Legislações dos Programas de Autocontrole

Legislações	Incumbência	Órgão emissor
Decreto nº9.003/2018	Disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal	MAPA
Decreto nº9013/2017	Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal	RIISPOA
Portaria nº46/1998	Estabelece obrigatoriedade de implantação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle nos estabelecimentos com SIF.	MAPA
Portaria nº368/1997	Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos e laboradores/industrializadores de alimentos.	MAPA

Fonte: MAPA (2021).

Além disto, os elementos de controle se estendem por 14 pontos, sendo o último apenas quando a origem do estabelecimento possibilita sua aplicação, conforme Quadro 3.

Quadro 3 – Elementos de controle dos PACs

Elementos de Controle	
Parte I	Manutenção
Parte II	Águas de abastecimento
Parte III	Controle integrado de pragas
Parte IV	Higiene industrial e operacional
Parte V	Higiene e hábitos higiênicos dos funcionários
Parte VI	Procedimentos sanitários operacionais (PSO) – Higiene industrial e operacional
Parte VII	Controle de matéria prima, ingredientes e material de embalagem
Parte VIII	Controle de temperaturas
Parte IX	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)
Parte X	Análises laboratoriais (microbiológicos e físico-químicos)
Parte XI	Controle de formulação de produtos e combate à fraude
Parte XII	Rastreabilidade e recolhimento
Parte XIII	Respaldo para certificação oficial
Parte XIV	Bem-estar animal
Parte XV	Identificação, remoção, segregação e destinação do material especificado de risco (MER)

Fonte: MAPA (2021).

3.2 Procedimento padrão de higiene operacional

O programa de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) descreve os procedimentos de limpeza e sanitização que devem ser executados diariamente em ambientes e utensílios industriais, para que não haja contaminação dos produtos. O controle do procedimento é dado a partir de planilhas para cada setor industrial, de acordo com suas características, sendo revisadas pelo controle de qualidade e pelo encarregado do SIF. A matéria orgânica proveniente de produtos de origem animal se mostra um ótimo substrato para a multiplicação de microrganismos (FRUET *et al*, 2014; VALOIS, 2002; BRASIL, 2002).

Cada indústria tem como responsabilidade a implantação, e monitoramento do programa aplicado, bem como treinamento quando necessário dos funcionários que estão envolvidos na produção quanto as etapas de higienização, os enxagues, os produtos utilizados e suas concentrações. Em cada procedimento devem ser

evidenciadas todas as informações ligadas a cada uma das etapas como tempo e temperatura de contato, soluções de detergentes, sanitizantes e sanificantes a serem utilizados, procedimentos de limpeza e sanitização das instalações, bem como seus equipamentos e utensílios (LEE *et al.*, 2021).

3.2.1 Procedimento padrão de higiene operacional (PPHO)

Através da circular n° 369/03 do MAPA/DCI/DIPOA, entende-se por PPHO Pré-Operacional os procedimentos de limpeza e desinfecção executados antes do início das atividades produtivas, ou seja, incluem limpeza desde o final da produção até o início da atividade imediatamente antes do mesmo início. Ao contrário do PPHO Operacional, que inclui limpeza, desinfecção de equipamentos e utensílios durante a produção e entre os turnos, incluindo paradas para descansar e almoçar.

O processo de higienização industrial é determinado pela criação de um ambiente seguro e livre de contaminantes, garantindo assim uma maior segurança de se ter um produto final de qualidade através de um conjunto de práticas responsáveis pela remoção de materiais indesejados e resíduos de produtos químicos e microrganismos. Para isso, é necessário que diversos fatores sejam analisados como qualidade da água, resíduos nos equipamentos, monitoração da higiene entre outros (SILVA *et al.*, 2010; PALMORIO *et al.*, 2021; BRASIL, 2017).

A elaboração de produtos alimentícios com padrões de higiene satisfatórios é essencial tanto para a indústria que precisa comercializar seu produto, quanto para o consumidor que o adquire, podendo em caso de falha gerar produtos que sejam responsáveis pela ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar. A aplicação regular de procedimentos de limpeza e desinfecção é necessária para controlar a instalação de microrganismos patogênicos e deteriorantes (NETO; ROSA, 2014; CARVALHO *et al.*, 2019).

Programas de higienização em indústria é uma necessidade, principalmente pelo desenvolvimento de novos produtos e também para atender ao consumidor cada vez mais exigente com a segurança e inocuidade dos produtos. Uma higienização só é completa com a retirada total de toda e qualquer matéria orgânica e minerais, o que se não acontecer pode levar ao favorecimento para formação de biofilme. Em indústrias de alimentos, a higienização inclui a limpeza e a sanitização das superfícies

que entram em contato com os alimentos durante a produção (GABARON *et al.*, 2020; BAPTISTA, 2003).

A metodologia de higienização dos equipamentos e utensílios, além dos materiais que entram em contato com o produto e/ou embalagem do mesmo, requerem que sejam seguidos rigorosamente (GOMES, 2012). De acordo com a RDC Nº 14 de 28 de fevereiro de 2007, desinfetantes são produtos que eliminam todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em determinados objetos e/ou superfícies. Sanitizantes são agentes/produtos que reduzem o número de bactérias a níveis seguros, de acordo com as normas de saúde, sendo ambos utilizados para as operações de limpeza em indústrias de alimentos. A escolha do produto a ser utilizado se dá a partir dos microrganismos que se deseja eliminar (CARVALHO *et al.*, 2019).

Os processos de limpeza e higienização possuem etapas, a começar pela retirada dos resíduos macroscópicos, a remoção das sujidades que são normalmente perceptíveis a olho nu. Logo após ocorre uma pré-lavagem utilizando água, de preferência quente, para que alguns resíduos dissolvam e desprendam das superfícies. O processo de lavagem utiliza agentes químicos que buscam eliminar a matéria orgânica e também a eliminação de alguns odores de determinada área. Após o uso de solução química pelo equipamento, o enxague é feito com água corrente, e se inicia um processo de desinfecção reduzindo os microrganismos com o uso de agentes químicos específicos a serem determinados pela indústria e/ou necessidade da superfície a ser higienizada. O enxague final é executado para retirada total da presença, sabor e odor de qualquer agente químico para que não haja interferência no produto final, nem possa vir a ocorrer uma contaminação química no consumidor (SILVA *et al.*, 2010; BERTOLINO, 2010; BRASIL, 2017).

Para que ocorra essa remoção das sujidades são utilizados sabões e detergentes que possuem moléculas de parte apolar que reage com gorduras, e extremidade polar que interage com a água formando glóbulos denominados micelas que irão remover as sujidades presentes ali (BERTOLINO, 2010).

3.2.2 Agentes de limpeza

Detergentes são produtos exclusivos do processo de limpeza, e geralmente não possuem ação de desinfecção ou sanitização (SILVA *et al.*, 2010). Cada

detergente, devido a sua composição, apresenta características e condições de utilização que irão depender de que superfície deseja-se limpar e que sujidade remover (CASTRO, 2009).

Os detergentes alcalinos podem reduzir através da dissolução estruturas proteicas, gorduras e outros compostos orgânicos presentes nos equipamentos e utensílios. Por seu alto poder químico, é tóxico e irritante para a pele, além de ter poder corrosivo. Tem o valor de pH compreendido entre 7 e 14, podendo existir diversos tipos para determinadas necessidades (SILVA *et al.*, 2010; MENEGARO *et al.*, 2016). Os agentes alcalinos moderados são eficientes para remover gorduras, porém não são eficientes para remover resíduos minerais. O carbonato de sódio é um exemplo, sendo utilizado na limpeza manual e sistemas de produção de vapor. Os alcalinos suaves são utilizados em limpezas manuais onde há pouca sujidade (MANUAL DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO INDUSTRIAL, 2010).

Os detergentes neutros não são corrosivos e nem agredem a pele dos manipuladores, é mais utilizado para remoção de partículas não aderidas a equipamentos e utensílios. Os detergentes ácidos apresentam condição para dissolver sais de cálcio e magnésio e óxido de ferro que acabam por se aderir as superfícies de contato. São geralmente utilizados em sistemas tubulares internos (CIP - Cleaning In Place). Os produtos químicos ácidos mais usados são ácido fosfórico, clorídrico, sulfúrico, sulfâmico e nítrico.

Desinfetantes são produtos que possuem um princípio ativo, em uma determinada concentração, que é capaz de eliminar os microrganismos existentes em uma superfície de contato (BRASIL, 2007). Dentre os desinfetantes, os mais utilizados são os antifúngicos e os bactericidas, podendo ser encontrados em forma líquida, sólida ou gasosa (gás de cloro). A eficácia de sua ação vai depender de fatores como o tempo de contato da solução com a superfície, temperatura de exposição, concentração e pH da solução, limpeza prévia e dureza da água (MENEGARO *et al.*, 2016; MANUAL DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO INDUSTRIAL, 2010).

3.2.3 Detergente enzimático

Enzimas são catalisadores que apresentam características importantes como a atuação em condições amenas de reação, e proporcionam um ambiente reacional não agressivo ao ambiente externo, são altamente específicas, além de apresentar alta

eficiência catalítica. O que caracteriza cada enzima é o número de aminoácidos que estará presente em sua cadeia, e a ordem que se encontram (KLOBITZ, 2008; BORZANI, 2001; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009), sendo a maioria das enzimas, proteínas, com a exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA. As enzimas possuem peso molecular que variam de 12 mil podendo ultrapassar um milhão (10⁶) de daltons (NELSON, 2014). Além disso, podem promover transformações, que seriam de difícil acesso por rotas químicas. Apresentam características úteis para o uso de detergentes diários, sendo bem-sucedidos em ações de solventes e ácidos orgânicos, e outras aplicações (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

No uso das enzimas aplicadas em detergentes enzimáticos, seu objetivo é aumentar a eficiência da higienização, a partir da adição de enzimas proteolíticas e lipases em suas formulações (ANDRADE, 2008). O detergente enzimático, de acordo com a RDC nº40 de 5 de junho de 2008, é “aquele que possui como principal ingrediente ativo catalizadores biológicos que possuam a capacidade de degradar graxas, proteínas, entre outros, de forma a gerar a fragmentação dos mesmos para realizar o processo de limpeza”.

As enzimas agem de maneira específica num determinado tipo de sujidade, e sua eficiência varia de acordo com a adequação da enzima acerca daquela sujidade. Enzimas como protease, amilase e lipase são utilizadas em grande escala dentre os componentes de detergentes. Normalmente os detergentes enzimáticos são empregados em sujidades com base em proteínas, hidratos de carbono e gorduras (BAPTISTA, 2003).

Os detergentes enzimáticos possuem em sua formulação lipases, amilases e proteases. Essa composição auxilia na limpeza industrial reduzindo tempo e temperatura no processo, devido a ação das enzimas presentes acelerar o processo tornando-o mais eficiente. Essas enzimas agem de forma mais eficiente quanto a matéria orgânica presente nas sujidades, sendo capazes de hidrolisar as gorduras e proteínas, facilitando o processo de remoção, além de dispensar o uso de água quente no processo (ANDRADE, 2008; BUTURI *et al.*, 2014).

As lipases agem catalisando a hidrólise em óleos e gorduras liberando ácidos graxos. São enzimas digestivas que atuam sobre membranas celulares, e podem ser produzidas por alguns microrganismos como bactérias, fungo filamentosos e leveduras. Essas especificadamente são para aplicação industrial, tendo maior

predominância no mercado, sendo a indústria de detergentes a de maior destino das lipases produzidas comercialmente (KOBBLITZ, 2008).

Os detergentes de origem enzimática possuem afinidade para o uso em resíduos oriundos de proteínas, gorduras e carboidratos devido a sua capacidade de hidrólise, que facilita a remoção destas sujidades. Ademais, sua eficiência pode ser melhor em meio neutro e levemente alcalino, possibilitando uma melhor avaliação das proteínas em detergentes de alcalinidade cáustica (ANDRADE, 2008). As amilases são carboidratos que hidrolisam ligações glicosídicas, quando presentes em detergentes tem função de degradar os polissacarídeos. As amilases alcalinas estão presentes nos detergentes utilizados nos processos de lavagem industrial sendo eficientes em seu uso (KOBBLITZ, 2008; SOUZA,2012). Já as proteases amplamente utilizadas em indústrias de alimentos e detergentes são enzimas que agem catalisando a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Para que se tenha um detergente enzimático com maior poder de ação, são esperadas características como saponificação, emulsificação, molhagem, penetração, diminuição da tensão superficial, solubilização de proteína, manutenção dos resíduos em suspensão, controle de minerais, não ser corrosivo e ser de baixo custo (ANDRADE,2008; KOBBLITZ, 2008).

3.2.4 Tipos de higienização

O método manual é o mais simples, mas pode ter certa falta de uniformidade por depender apenas da ação humana, consistindo das etapas de pré-lavagem para retirada de resíduos sólidos e aplicação de uma solução detergente. A água utilizada no processo deve estar no máximo a 45 – 50°C, e o enxágue deve ser feito com água de boa qualidade (SILVA *et al.*, 2010). Não é um método adequado, e é pouco sofisticado. Geralmente é feito utilizando equipamentos como escovas, raspadores, mangueiras, pistolas de água, água quente e detergente. Não devem ser utilizadas palhas de aço por haver risco de contaminação (BERTOLINO,2010).

O método por imersão é indicado apenas para pequenos equipamentos e que podem ser desmontados e montados com facilidade. Pode ou não utilizar água quente e/ou detergente, a depender do tipo de superfície e sujidade que se deseja remover. As superfícies ficam imersas por aproximadamente 15 – 30 minutos em uma

temperatura de 50 – 80°C a depender de quanto há de sujeidade para ser removida e a eficiência do agente químico utilizado (BERTOLINO,2010).

No método de alta pressão são utilizadas bombas de água que podem ser portáteis onde geralmente bombeiam entre 40 à 70L, com compressão a 41,5kg/cm³, ou fixas bombeando entre 55 a 475 L/min a uma pressão de 61,5 kg/cm³. Podem ainda ser utilizadas pistolas de vapor, onde vapor com água são misturados a produtos de limpeza, porém não são muito seguras aos manipuladores e requerem muita energia (MANUAL DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO INDUSTRIAL, 2010).

A metodologia empregando espuma e gel é realizada uma pulverização com espuma ou gel nas superfícies de equipamentos e utensílios, onde atuam por determinado tempo a partir da descrição de cada produto e sujeidade. Não faz uso de ação mecânica e poupa mão-de-obra (MANUAL DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO INDUSTRIAL,2010).

A pulverização é a aplicação da solução detergente com utilização de aspersores/pulverizadores, controle do tempo de contato e do pH, o enxague deve ser feito em água corrente. Geralmente aplicado em caixas plásticas, instalações e superfícies (MANUAL DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO INDUSTRIAL, 2010).

O sistema CIP é utilizado em ambientes completamente fechados, onde se promove a circulação do fluido de limpeza pelos equipamentos. De início são utilizados jatos de água quente para retirada de resíduos não aderidos ao equipamento, logo após um jato de água de alta pressão para limpeza geral, seguida da aplicação da solução de detergentes em temperaturas altas, onde a concentração se dá a partir de cada equipamento e superfície (MANUAL DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO INDUSTRIAL, 2010; BERTOLINO, 2010). No CIP os agentes químicos de limpeza e água circulam pelo equipamento no ambiente fechado por tempo, temperatura e velocidade determinados pela indústria a partir da proporção de sujeidade que se deseja remover, e quanto as características do produto que passam por aquele local (BERTOLINO, 2010). A força mecânica é ocasionada pelo fluxo da solução no equipamento, a força química é gerada pela solução de detergente, em geral alcalino por conseguir dissolver proteínas, gorduras e carboidratos, e a solução ácida que irá dissolver o material inorgânico presente (SEVERINO, 2020). Após a solução circular pelo equipamento, o enxague é feito com água corrente potável.

3.2.5 Verificação da higienização por meio de *swab's*

Com o intuito de avaliar as condições higiênico-sanitárias das superfícies de equipamentos e utensílios, os *swabs* são utilizados para análises de contagem padrão de microrganismos (SILVA *et al.*, 2019). A RDC 331/2019 da ANVISA estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos. A técnica do esfregaço consiste na passagem de um “*swab*” ou esponja estéril sobre uma superfície onde se deseja identificar e quantificar sujidades e microrganismos presentes, geralmente utilizados em equipamentos e utensílios industriais. Os *swab's* possuem hastes de aproximadamente 15 cm por 3 mm de diâmetro, com uma extremidade absorvente de algodão que ocupa em torno de 2cm (SILVA, 2010). O teste do *swab* é uma metodologia padrão de análise microbiológica, onde a facilidade ou dificuldade para remoção e quantificação dos microrganismos é dada a partir da superfície e textura em contato, e o tipo de microrganismo presente (ANDRADE, 2008).

3.2.6 Indicadores de higiene

Análises de aeróbios mesófilos e coliformes auxiliam na manutenção da qualidade e na inocuidade de produtos alimentares de origem animal. Os indicadores de segurança têm o objetivo de garantir a ausência de agentes patógenos. Para que haja o mínimo de possíveis contaminações é necessário a manutenção de instalações e equipamentos regularmente. Todo e qualquer material em uma indústria de alimentos, principalmente os de contato direto com os produtos devem ser livres de substâncias tóxicas, odores, sabores, não serem absorventes e resistentes a corrosão, além da capacidade de serem resistentes as operações de limpeza e desinfecção quando necessárias (SOUSA, 2006; GABARON *et al.*, 2020).

De acordo com Silva e colaboradores (2010):

- *Escherichia coli* (*E.coli*) é oriunda do trato intestinal de animais de sangue quente, e também a partir de fontes não fecais, estando incluída no grupo de coliformes totais e termotolerantes. Pode ser encontrada em ambientes industriais e equipamentos, podendo se tornar resistentes a eliminação, principalmente quando as condições de higiene e limpeza não são feitas adequadamente, podendo levar a contaminação de produtos.

- As cepas de *B. Cereus* são responsáveis por intoxicações, que são resultado da ingestão nas toxinas quando formadas no alimento. É caracterizada por dois tipos de doenças conhecidas, a síndrome diarréica com incubação de 8 a 16 h, provocada pela toxina diarréica (proteína termossensível) que pode ser inativada quando aquecida a 56°C por aprox. 5 min. Outra doença característica é a síndrome emética, com incubação de aprox. 5 h após o consumo de alimento contaminado pela toxina emética (peptídeo resistente ao calor). A presença de *B. cereus* em alimentos é alarmante sendo os alimentos ricos em amido ou proteínas, os mais comuns do grupo de risco de contaminação.

- A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica que pode provocar doenças graves como encefalite, septicemia e abortos. Pode ser encontrada em mamíferos, aves, peixes e os portadores geralmente são assintomáticos, liberando a bactéria pelas fezes sem desenvolver infecções. Tem capacidade de crescer em baixas temperaturas e são resistentes a vários antibióticos. A dose de infecção varia de acordo com a cepa e o organismo do indivíduo, podendo o período de incubação variar entre 3 a 70 dias após a exposição ao alimento contaminado, sendo um período médio de 3 semanas. Os modos de transmissão identificados são leite contaminado, queijos, água, vegetais, patês de carne, aves cruas ou cozidas, peixes e frutos do mar.

3.2.7 Enterobactérias

As enterobactérias, membros da família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos não esporuladores, anaeróbios facultativos, que podem ser encontrados na natureza e na microbiota intestinal dos seres humanos e animais, que, quando atuando como patógenos podem causar infecções no trato urinário e apresentar resistência a antimicrobianos. A microbiota intestinal de aves, por exemplo, pode compreender diversas espécies bacterianas, sendo um sistema complexo, sendo mais susceptíveis a ação de patógenos bacterianos, e com o desenvolvimento e crescimento podem inibir o crescimento dessas bactérias (OLIVEIRA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2017).

Possui 53 gêneros e aproximadamente 170 espécies, sendo 26 gêneros capazes de causar infecções em humanos. Os gêneros mais conhecidos relacionados a alimentos são *Salmonella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, sendo encontradas com

frequência em materiais e produtos ligados a indústria aviária. A família Enterobacteriaceae inclui grande parte dos microrganismos mais estudados, como a *E. coli* O157:H7, e são organismos deteriorantes que podem estar presentes em alimentos (HIRAI, 2022; GOMES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

Seu principal habitat é o trato gastrointestinal de animais, e também amplamente distribuídas no ambiente. Por poder serem responsáveis pela transmissão de doenças tendo os alimentos como veículo, a determinação de sua presença é um indicador de higiene, sendo controlado a partir de sistemas como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) (PEROTTO *et al.*, 2021).

Entre as enterobactérias, os coliformes são indicadores de qualidade microbiológica de alimentos e água, sendo sua presença um indicativo de microrganismos como *Salmonella* spp., *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Escherichia* (*E. coli*). Os coliformes são divididos entre totais que são capazes de utilizar lactose como substrato e formam gás em temperatura de 35°C, e termotolerantes que utilizam a lactose como substrato e formam gás com temperatura de 44,5 a 45,5°C (PEROTTO *et al.*, 2021).

Para detectar a presença de Enterobacterias, o método mais utilizado é o crescimento em meios seletivos, sendo que a *Salmonella* e *E. coli* O157 possuem meios de detecção de patógenos específicos. Na análise de rotina, é utilizado o caldo de enriquecimento Lauril Sulfato Triptose (LST), que produz gás em 24 a 48 horas de incubação a 35°C (teste presuntivo). A confirmação se dá por meio de caldos seletivos para coliformes totais e termotolerantes (PEROTTO *et al.*, 2021).

3.2.8 Qualidade da água

A água utilizada pela indústria de alimentos deve ser potável e com alto padrão de qualidade, levando em conta as várias funções que ela representa. O padrão deve ser avaliado a partir da forma com que ela será utilizada (SIMENSATO; BUENO, 2019). Apesar de utilizada para higienização, caso não haja um padrão de qualidade que garanta ausência de microrganismos patógenos e deterioradores, pode se tornar veículo de contaminação para a indústria. Deve-se observar quanto a sua dureza, por ter presença de sais alcalinos pode reduzir a formação de espuma do detergente, interferindo assim em uma higienização eficaz dependendo do método

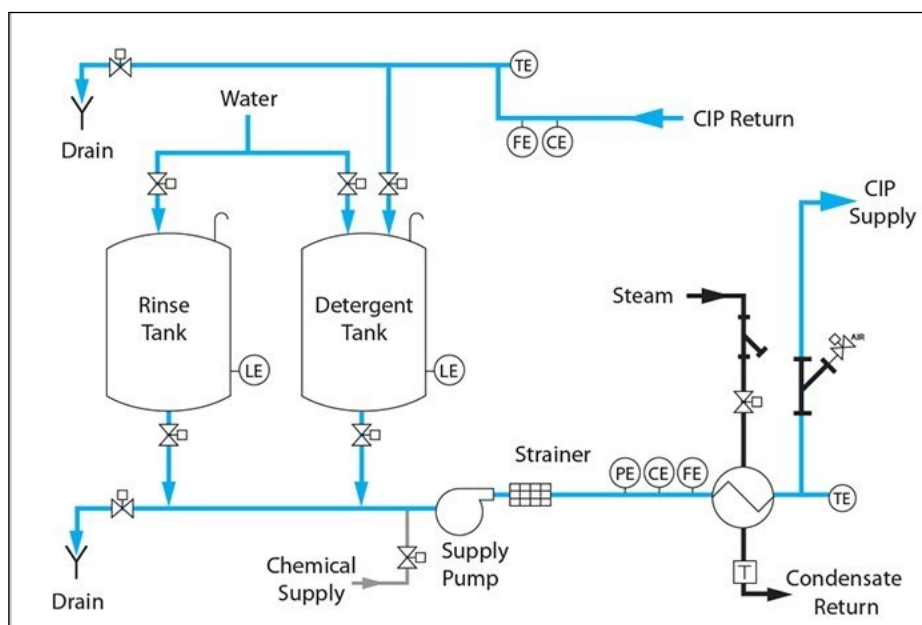
utilizado para limpeza industrial (BRASIL, 2001; ROLOFF, 2006). A água utilizada para limpeza de equipamentos, deve ter o mesmo grau de pureza da água destinada ao consumo humano, quanto a critérios físico, químicos e microbiológicos. O pH muito baixo torna ela corrosiva e muito elevado podem acarretar em incrustações, alcalinidade, presença de substâncias dissolvidas, entre outros (GUERRA *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2007).

3.2.9 Sistema *clean-in-place* (CIP)

Por volta de 1950 surgiu o sistema CIP revolucionando a higienização naquela época, trazendo uma maior eficiência na limpeza e desinfecção em linhas de produção que utilizavam meios líquidos. Além disso, melhorou a agilidade do processo quando comparado aos processos anteriores, reduziu a quantidade de trabalho e complexidade para os funcionários da higienização nos equipamentos; permitindo ainda uma limpeza contínua em sistema fechado, reproduzível e com a viabilidade para recuperar os produtos químicos e a água utilizada no procedimento (SEABRA, 2016).

Pode-se definir o sistema CIP como uma circulação de líquidos de limpeza ao longo do equipamento em circuito fechado. O fluxo destes líquidos ocasiona um efeito de higienização mecânica das superfícies, desalojando e conduzindo sujidades para fora da linha. Este sistema é aplicável fluxo de tubos, permutadores de calor, válvulas, bombas, entre outros equipamentos (SEVERINO, 2020). Na Figura 1 pode-se visualizar como ocorre o funcionamento convencional de um sistema CIP genérico.

Figura 1 - Sistema CIP genérico



Fonte: Sanimatic (2022)

Numa indústria de alimentos as bactérias tendem a se isolar em locais inacessíveis para os métodos de higienização convencionais (LUNDÉN e tal., 2000). Para atingir uma melhor eficiência do CIP, o equipamento ou linha de tubulação não deve possuir locais em que os produtos de limpeza não possam alcançar ou fluir de maneira de acordo como projetado, pois auxiliará o rápido crescimento microbiano no equipamento, conseqüentemente oferecendo risco de segurança dos alimentos (GOSTA, 1995). O Quadro 4 apresenta os fatores que influenciam a eficiência do funcionamento do sistema CIP.

Quadro 4 – Fatores de influência na eficiência do CIP

Fatores de controle	Duração do ciclo
	Temperatura
	Condição do detergente
Fatores de projeto	Alcance nas superfícies
	Frequência de higienização
	Qualidade dos produtos/equipamentos
	Integridade da rota/superfície
Fatores operacionais	Compatibilidade dos produtos de higienização
	Carga microbiana
	Manutenção
	Supervisão

Fonte: Adaptado de SHARP (1985).

De acordo com Sharp (1985), os fatores de controle podem ser entendidos como aqueles que podem ser ajustados durante a operação ou num segundo momento, para que se adequem às necessidades em questão. Os fatores de projeto estão ligados de forma intrínseca com o projetista do sistema, pois a materialização do projeto deve ser capaz de garantir que toda a linha esteja ao alcance dos produtos de higienização juntamente com a ação mecânica do fluxo. Além disso, as características dos produtos devem ser verificadas com antecedência se serão capazes de manter suas funcionalidades mediante as condições geradas pelo sistema, além da utilização de materiais que suportem o funcionamento do mesmo. Os fatores operacionais estão ligados a supervisão e gerenciamento do sistema a cerca da escolha dos fatores de controle visando a redução da carga microbiológica.

De acordo com Tetra Pak International S.A (2015) a lavagem CIP tem as seguintes etapas:

1. Pré-lavagem: adiciona-se água no sistema com temperatura entre 40°C a 60°C com o intuito de remover as sujidades e degradar as proteínas;
2. Importante que a temperatura não ultrapasse 60°C, pois acima disso ocorre a desnaturação das proteínas nativas, dificultando a retirada da mesma;
3. Detergente alcalino: logo após a pré-lavagem, é adicionado o detergente alcalino no sistema para remover os resíduos orgânicos presentes na linha, e tempo de circulação do produto na linha é pré definido pela empresa;
4. Enxágue: adiciona-se água para retirar o detergente e os resíduos da linha;
5. Ácido: o detergente ácido tem o objetivo de dissolver depósitos de minerais e calcário gerados pela água dura. A frequência desta etapa varia de acordo com a temperatura da superfície da linha;
6. Enxágue final: emprega-se a água para retirar o detergente ácido e os resíduos minerais dissolvidos na linha, deixando a mesma limpa.

O sistema clean-in-place na indústria traz diversos benefícios além da melhora da segurança de alimentos, como a soma com demais fatores administrativos para reduzir o custo total do processo de higienização, principalmente referente ao custo com mão de obra empregada no processo (SHARP, 1985). Desta forma, o sistema CIP está incorporado na tendência contemporânea da indústria alimentícia, que trata de reduzir consideravelmente o risco de transmitir doenças alimentares,

utilizando junto a outros artifícios, formas mais tecnológicas e eficientes na higienização dos equipamentos (MEMISI *et al.*, 2015).

3.3 Biofilme

Em uma indústria de alimentos é necessário que se tenha preocupação quanto ao risco à saúde do consumidor visando sempre a oferta de produtos inócuos, ou seja, que não ofereça mais riscos quanto a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Uma das preocupações em uma escala de produção é a possível formação de biofilmes, sendo sempre adotadas medidas de prevenção ou de eliminação imediata quando detectados (CARVALHO e *tal.*, 2015; MARCHI e *tal.*, 2011; BARROS *et al.*, 2011).

A formação de biofilmes ocorre a partir da adesão de microrganismos em determinada superfície de contato, onde irão constituir uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) e iniciar seu crescimento. Os EPS têm natureza polissacarídica ou protéica, e são sintetizados por polimerases, que iram garantir a formação de uma estrutura complexa e hidratada, além de conferirem certa proteção aos sanitizantes utilizados, podendo impedir que atuem como inibidores de contaminação (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

Biofilmes são caracterizados por serem uma comunidade bacteriana de fácil aderência em superfícies inertes, e em sua formação são destacadas três fases – adesão (fase reversível), consolidação e colonização, sendo os três componentes básicos de um biofilme os microrganismos, a matriz EPS (confere proteção e permite seu desenvolvimento e é responsável pela comunicação que ocorre dentro da estrutura por meio de interações intercelulares chamadas de quorum sensing), e a superfície de ligação. Cada biofilme tem suas características e composição específicas, a partir do meio ao qual está aderido (RODRIGUES, 2009; CARVALHO *et al.*, 2019). Forças físicas permitem a adesão em vários tipos de superfícies sendo essa adesão influenciada por fatores como o tipo de substrato disponível, temperatura, e a fase de desenvolvimento bacteriana. Essa fase é reversível uma vez que, podem ocorrer casos de hidrofobicidade, quantidade insuficiente de substrato, ou interações não-específicas que irão dificultar a adesão desses microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2015).

Após a adesão do biofilme, ocorre o estágio de consolidação, onde as células bacterianas irão sofrer alterações, que podem aumentar sua resistência, dificultando

reverter esse estágio, e também é intensificada a produção de EPS, tornando a estrutura mais complexa (CARVALHO *et al.*, 2015). No último estágio, já com o biofilme maduro, o aglomerado bacteriano é capaz de se desprender e enviar para o meio em que está aderido células bacterianas viáveis para expansão do biofilme, além da possível propagação de toxinas que são produzidas durante os processos anteriores e também enviadas ao meio em que estão inseridos. Nessa fase, o uso de sanitizantes apresenta uma eficácia reduzida, tornando a eliminação mais difícil. Após estabelecidas no material, são fonte de contaminação constante liberando microrganismos patogênicos e deteriorantes. A densidade e complexidade do biofilme aumenta nesta etapa, a medida que as células se dividem, novos componentes são gerados e irão interagir com as moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no ambiente de sua formação, permitindo assim que se propaguem (CARVALHO, 2015; COSTA *et al.*, 2016; KASNOWSKI *et al.*, 2010).

A composição da matriz de um biofilme compreende entre 70 a 97% de água, e 2 a 5% de matriz do biofilme, sendo o microrganismo formador presente. Pode ser formado por uma única espécie de microrganismo ou de múltiplas, sendo que a adesão será determinada por características dos microrganismos presentes como o tipo de material e do meio que o envolve, pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, entre outros. Dentre os microrganismos patogênicos que podem participar da formação do biofilme pode-se citar *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (CARVALHO *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2016; KASNOWSKI *et al.*, 2010). Diversos fatores ambientes são capazes de influenciar o desenvolvimento do biofilme, sendo os três aspectos principais: pH, que afeta diretamente o crescimento bacteriano; reologia, gerando estresse ao microrganismo e ocasionando o deslocamento dos expolissacarídeos no sentido do cisalhamento; e temperatura, pois quanto mais propriedades os polissacarídeos possuem em baixas temperaturas, maiores as chances têm de se desenvolverem e se aderirem no local com baixa temperatura (GARRET; BHAKOO; ZHANG; 2008).

3.3.1 Biofilme na indústria de alimentos

A formação de biofilmes em uma indústria de alimentos implica diretamente a perda econômica quanto a produção e oferece risco a saúde dos consumidores.

Podem ser originados devido a resíduos de alimentos que se depositam nos equipamentos, e quando não higienizados de forma correta podem se aderir irreversivelmente colonizando e se multiplicando. Deve-se atentar para que a higienização das superfícies que entram em contato com os alimentos seja feita corretamente, evitando assim sua degradação, bem como de utensílios e superfícies (CARVALHO *et al.*, 2015; KASNOWSKI *et al.*, 2010).

Para a higienização em uma indústria como forma de prevenção ou eliminação de biofilmes podem ser utilizados vários agentes químicos, sendo sua escolha feita a partir do custo e a forma e eficácia de ação contra os microrganismos. Os mais utilizados são o ácido peracético e o hipoclorito de sódio. O ácido peracético tem ação desnaturante quanto proteínas e enzimas celulares e interfere na permeabilidade celular, já o hipoclorito de sódio é indicado para inibir ou destruir um grande número de microrganismos, com um custo menor quando comparado ao ácido peracético (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Detergentes são uma opção para diminuição da carga microbiana presente em determinada superfície, porém, apesar de serem produtos destinados a limpeza, nem sempre são eficazes quanto a desinfecção das superfícies. Em escala industrial podemos ter detergentes ácidos, alcalinos, neutros, com solvente, alcalino solvente, desincrustante alcalino, desincrustante ácido, entre outros. Uma higienização ineficaz, pode resultar na formação de biofilmes, que pode levar a uma difícil remoção e a uma maior resistência (CORREA, 2020).

O tempo para crescimento do biofilme pode variar por diversos fatores, sendo os mais comuns a frequência e a eficiência da higienização (GIBSON *et al.*, 2001). Para que se realize uma higienização correta, é necessário que se siga rigorosamente as práticas implantadas pela empresa quanto a limpeza e sanificação. Geralmente são utilizados detergentes alcalino e ácido, com enxague durante as operações e ao final é aplicado um agente sanificante. Com o avanço nos processos industriais, cada vez mais os alimentos entram em contato com superfícies de equipamentos e utensílios, que podem levar a uma maior transferência de matérias orgânicas que podem levar a formação de biofilmes (CARVALHO *et al.*, 2019).

3.4 Setores produtivos

3.4.1 Setor de evisceração

De acordo com a Embrapa (2007), na evisceração as carcaças passam pelas etapas de:

- Extração de conteúdo intestinal;
- Abertura do abdômen;
- Exposição de vísceras;
- Retirada de vísceras comestíveis;
- Retirada das vísceras abdominais e de pulmões.

Além disso, ainda possui a etapa de Inspeção de Linha, onde ocorre a verificação da carcaça acerca da possível presença de contaminação (BRASIL, 1998). O conteúdo das vísceras comestíveis deve ser transportado de imediato para resfriamento após sua coleta e preparação, não sendo permitido o acúmulo para processamento. O resfriamento e processamento deve ser realizado em seção própria para isso (BRASIL, 1998).

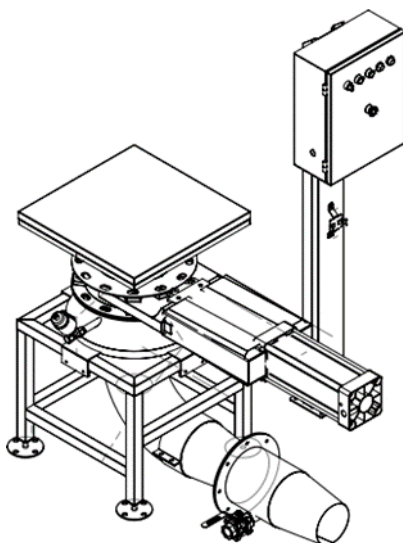
3.4.2 Setor de miúdos

As vísceras comestíveis após extração são (coração, fígado e moela) pré-resfriadas imediatamente em resfriadores do tipo contínuo, por imersão, com rosca sem fio, e com sua temperatura não ultrapassando 4°C. Além disto, há renovação de água, em sentido contrário dos movimentos, com proporção mínima de 1,5L por Kg de produto (BRASIL, 1998).

3.4.3 Chutter

Os Chuters pneumáticos são utilizados para realizar o transporte do produto de um setor para outro através de tubulações de aço hermeticamente fechadas, e utilizam a pressão positiva de ar comprimido (PIAIA, 2009). Na Figura 2 pode-se visualizar melhor o equipamento.

Figura 2 –Chuter de fígado



Fonte: Autor (2022) produzido em software AutoCAD®

4 MATERIAL E METÓDOS

Esse trabalho foi conduzido em um abatedouro de aves em Pato Branco-PR, mais especificamente na linha de produção de fígado com o intuito de solucionar uma não-conformidade repetidamente encontrada durante o processo.

O projeto está celebrado entre a UTFPR-DV e a empresa por meio de um Acordo de Cooperação Técnica para realização da pesquisa e com uso de recursos estruturais e humanos para a concretização do mesmo de ambas as partes. A empresa construiu uma linha exclusiva de CIP para análise deste sistema e utiliza um laboratório reconhecido pelo Serviço de Inspeção Federal e certificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4.1 Amostragem com *swab's*

Os procedimentos de *swab's* foram realizados em dois pontos estratégicos: no início, ou seja, dentro do equipamento *Chuter* (Equipamento responsável pelo deslocamento pneumático do fígado na linha de transporte) e um ponto no fim da linha do tubo de transporte, antes de entrar no *Chiller*, equipamento de congelamento. Foi realizado um esfregaço com movimentos helicoidais em sentido horário do interior para a extremidade do tubo com a conexão, de forma que se tenha um máximo alcance da superfície de contato que depois era depositado num tubo de ensaio contendo água peptona esterilizada.

As coletas das amostras ocorreram sempre em triplicata. O início da utilização dos detergentes clorado e/ou enzimático cuja identificação dos pontos e momento das coletas, seguiu-se a seguinte nomenclatura: o código da amostra com a letra (C), refere-se ao ponto de recepção do fígado (F) no equipamento *Chuter* e quando iniciar por (T), refere-se ao ponto de coleta na tubulação. Os números 0, 1 e 2 referem-se ao momento da coleta.

Por medidas organizacionais da empresa as amostras eram coletadas na sexta-feira, última produção do dia, identificadas com o número 0 no momento do término da produção sem que ocorra a higienização. O número 1 é o momento de coleta após a higienização na sexta-feira ao término da produção. Assim a linha fica vazia durante o final de semana, ou seja, até o início da produção na segunda-feira.

Aqui foi feita uma coleta de amostra antes do início da produção da segunda-feira, mas após uma nova higienização, identificada como 2. Resumidamente, a descrição dos códigos e momentos da coleta das amostras estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Identificação dos códigos das amostras

Identificação da amostra	Descrição do local e momento da coleta
CF0	<i>Chuter</i> após termino da produção, mas ainda sem higienização
TF0	Tubulação não higienizada
CF1	<i>Chuter</i> higienizado após a produção de sexta-feira.
TF1	Tubulação higienizada após a produção de sexta-feira
CF2	<i>Chuter</i> após a higienização da segunda-feira, porém antes da produção deste mesmo dia.
TF2	Tubulação após a higienização da segunda-feira, porém antes da produção deste mesmo dia.

Fonte: Autor (2022)

4.2 Análises

4.2.1 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em laboratório prestador de serviço para a empresa LANALI© – Laboratório de Análises de Alimentos S/S com creditação no ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela Portaria N°99 de 02 de julho de 2014 e ABNT NBR ISO/IEC17025CRL0628, revisado em 15 de dezembro de 2021.

As análises dos microrganismos realizadas foram mesófilos aeróbios, através do método AOAC 990.12, das Enterobactérias pelo método AFNOR01/06-09/97, *Listeria monocytogenes* pelo método AOAC 2004.02 e *Salmonella* com a metodologia AFNOR 01/16-11/16

Os limites internos de qualidade estabelecidos pelo abatedouro são de 0 a 10 UFC/mL de mesófilos, de 0 a 1 UFC/cm de enterobactérias, ausência para *Salmonella* e *Listeria*, e negativo para biofilme nas superfícies que também seguem os padrões da legislação brasileira (BRASIL, 2019) e Européia (União Européia, 2001).

A verificação da presença de biofilmes foi realizada por meio de um teste rápido, utilizando um revelador visual de biofilmes, da fabricante Higex®, o qual apresenta

alteração em sua coloração para indicar a presença de biofilmes na superfície referentes aos microrganismos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

4.2.2 Análises físico-químicas

As amostras para análises físico-químicas de cloro livre, pH e turbidez da água foram coletadas em tubos de ensaio de rosca com tampa para serem analisadas no próprio Laboratório da empresa, utilizando para verificação do cloro livre o equipamento colorímetro, e para as análises de turbidez e pH seguiram-se as metodologias segundo Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.3 Higienização da linha chutter e tubulação

A higienização com o uso do detergente clorado foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

1. Pré-lavagem com água em temperatura de 48°C à 54°C, para remoção das sujidades presentes no Chuter e na tubulação, além de degradar proteínas que possam estar aderidas na parede da linha;
2. Adição de gelo juntamente com água, para aumentar a superfície de contato e auxiliar na remoção de possíveis resíduos ainda presentes na linha;
3. Adição de detergente clorado na concentração de 5%, para remover os resíduos orgânicos presentes na linha;
4. Enxágue com água para retirar os resíduos e o detergente presente na linha.

Esse procedimento é igualmente realizado após o término da produção, na sexta-feira (madrugada de sábado) e repetido antes do início da nova produção, na segunda-feira.

Para a utilização do detergente enzimático, realiza-se o mesmo procedimento, porém, no dia da amostragem, última produção de sexta-feira, após o enxágue do detergente clorado, utiliza-se o detergente enzimático na concentração de 10%.

Para o emprego no CIP exclusivo, foi realizado o protocolo padrão, e logo após a adição do detergente enzimático recirculando na linha por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de enxágue.

4.4 Análise estatística

Utilizou-se o software estatístico SPSS Statistics® versão 28.0.1, em período gratuito para testes, para realizar as análises estatísticas. Para análise estatística dos dados de mesófilos aeróbicos, contagem de Enterobactérias, turbidez, pH e cloro, seguiu-se os seguintes passos:

- Passo 1: Teste de Normalidade Kolmogorov-Smirnov com nível de significância $\alpha = 5\%$ para verificar quais variáveis utilizaremos testes estatísticos paramétricos e quais utilizaremos testes estatísticos não paramétricos. Critério de aceitação: p-valor (Sig) < 0,05 rejeita-se a normalidade dos dados. Caso contrário, Não rejeita-se;
- Passo 2: Para as variáveis que apresentaram normalidade foi realizada uma ANOVA com os fatores Dias e Tratamento, segundo o modelo aditivo: $Y = \text{Media} + \text{Trat} + \text{Tubo} + \text{Dia}$;
- Passo 2.1: Para os fatores que apresentaram diferença significativa (p-valor < 0.05) foi realizado um teste de comparação de médias para identificar a diferença entre os fatores;
- Passo 3: Para as Variáveis que não apresentaram normalidade, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis para k amostras independentes com nível de significância de 5% com o objetivo de identificar a diferença significativa entre os Fatores Dias, Tubo e Tratamento.

Para a análise estatística da *Listéria monocytogenes*, *Salmonella* e biofilme, seguiu-se os seguintes passos:

- Passo 1: As Variáveis Qualitativas foram transformadas em Variáveis Binárias: (Presença/Positivo = 1 e Ausência/Negativo = 0);
- Passo 2: Os dados foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O trabalho preocupou-se com a qualidade e segurança do alimento produzido, bem como o controle microbiológico de biofilmes da linha do mesmo, com um sistema inovador de aplicação do detergente enzimático com linha exclusiva de CIP para este fim.

A Tabela 1 apresenta os resultados do procedimento de higienização com o emprego unicamente do detergente alcalino clorado. Pode-se notar que houve uma elevação da contagem microbiana em Mesófilos e Enterobactérias, mas permanece com o resultado ausente para os microorganismos *Listeria* e *Salmonella* ao longo do fim de semana para os valores encontrados no Chuter. Em relação ao biofilme, o resultado foi novamente positivo após a higienização. Quanto a tubulação avaliada, não foi encontrado o mesmo comportamento no Chuter, as contagens microbianas avaliadas não sofreram aumento e não apresentaram resultados negativos em relação aos biofilmes.

Tabela 1 – Avaliação microbiológica com detergente clorado - Semana 1

	Mesófilos aeróbios (UFC/cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	8,0×10 ¹	4,7×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF1	1,8×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
CF2	2,7×10 ²	2,2×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	5,8×10 ²	2,9×10 ²	Ausente	Ausente	Positivo
TF1	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF2	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo

Legenda: CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* higienizado antes da produção de segunda-feira, TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação higienizada antes da produção de segunda-feira.

Fonte: Autor (2022)

Lembrando que a linha (*Chuter* e tubulação) permanece seca ou com pequenos depósitos de líquido acumulado, possivelmente água do enxágue, durante o período de 48h, quando será novamente higienizado e posteriormente terá o início da produção.

A avaliação microbiológica das próximas semanas analisadas está apresentada nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Avaliação microbiológica com detergente clorado - Semana 2

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	9,7×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Presente	Negativo
CF1	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Presente	Ausente	Negativo
CF2	3,4×10 ²	<1,0×10 ⁰	Presente	Ausente	Negativo
TF0	1,1×10 ³	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF1	7,9×10 ²	<1,0×10 ⁰	Presente	Ausente	Positivo
TF2	1,1×10 ³	4,0×10 ¹	Presente	Ausente	Positivo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Tabela 3 – Avaliação microbiológica com detergente clorado - Semana 3

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	9,0×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF1	9,6×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	1,2×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	5,4×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF1	9,4×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF2	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

É possível notar que, principalmente no *Chuter*, após a realização de um novo processo de higienização antes do início do processo produtivo, a carga microbiana está mais alta que a higienização anterior. Além disso, na semana 2 houve a presença de *Listeria monocytogenes* na após a primeira higienização indicando uma possível contaminação cruzada, que não foi eliminada mesmo após todo o processo de higienização. Também houve a presença de *Salmonella* spp, porém a primeira higienização foi capaz de eliminá-la.

O equipamento Chuter pode conter mais barreiras/acidentes físicos do que as tubulações que impedem a livre circulação dos fluidos causando zonas de baixo contato com os compostos químicos utilizados na higienização caracterizando falhas de higienização que não regulares, mas detectáveis no período das análises. Estas condições poderiam estabelecer um ambiente propício ao desenvolvimento dos microrganismos remanescentes da higienização e conseqüentemente geração dos biofilmes decorrentes de higienizações não monitoradas por estas variáveis, como por exemplo, algum microrganismo detectável pelo kit visual de inspeção rápido de biofilmes empregado no trabalho.

De acordo com a American Public Health Association (APHA), o número médio aceitável de mesófilos aeróbios devem ser de 2 (dois) UFC/cm², e a Organização Mundial da Saúde recomenda que seja até 50 (cinquenta) UFC/cm² (ANDRADE, 2008). Além disso, de acordo com os parâmetros internos do abatedouro, o limite máximo para mesófilos aeróbios é de 10 (dez) UFC/cm², e de 1 (um) UFC/cm² para enterobactérias. Considerando esses limites verifica-se a necessidade de melhoria no procedimento de PPHO pré-operacional.

Conforme apresentado nas Tabelas 4, 5 e 6 pode-se observar os resultados dos testes com a utilização do detergente enzimático.

Tabela 4 – Avaliação microbiológica com detergente enzimático - Semana 1

	Mesófilos aeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp	Biofilme
CF0	7,6 × 10 ²	4,5 × 10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF1	<1,0 × 10 ⁰	<1,0 × 10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	<1,0 × 10 ⁰	<1,0 × 10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	9,7 × 10 ²	7,2 × 10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF1	1,3 × 10 ²	<1,0 × 10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF2	1,0 × 10 ³	5,2 × 10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Tabela 5 – Avaliação microbiológica com detergente enzimático - Semana 2

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	1,6 ×10 ²	5,4×10 ¹	Ausente	Positivo	Negativo
CF1	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	1,7×10 ²	4,1×10 ¹	Ausente	Ausente	Positivo
TF1	3,1×10 ²	4,9×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF2	7,9×10 ³	5,2×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Tabela 6 – Avaliação microbiológica com detergente enzimático - Semana 3

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	1,5×10 ²	1,0×10 ⁰	Ausente	Positivo	Negativo
CF1	2,2×10 ²	1,7×10 ¹	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	3,2×10 ²	5,9×10 ¹	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	1,7×10 ³	1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF1	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF2	1,1×10 ³	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Ao observar os resultados individuais do tratamento adicionando o detergente enzimático ao processo de higienização é possível notar que a presença de biofilme ainda se faz presente e constante, mesmo após a segunda higienização. Por duas semanas consecutivas houve a presença de *Salmonella* spp. na linha, porém a primeira higienização foi eficiente para removê-la. As tabelas 7, 8 e 9 mostram os resultados obtidos durante as três semanas com o tratamento utilizando detergente enzimático e sistema CIP.

Tabela 7 – Avaliação microbiológica detergente enzimático + CIP semana 1

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	4,5×10 ²	1,0 ×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF1	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	3,2×10 ²	5,9×10 ¹	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	7,7×10 ²	1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF1	4,4×10 ²	2,7×10 ⁰	Ausente	Ausente	Positivo
TF2	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Tabela 8 – Avaliação microbiológica detergente enzimático + CIP semana 2

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	4,9×10 ²	1,7×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF1	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	2,8×10 ²	5,3×10 ¹	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	5,9×10 ²	1,8×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF1	4,1×10 ²	2,2×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF2	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Tabela 9 – Avaliação microbiológica detergente enzimático + CIP semana 3

	Mesófilosaeróbios (UFC/ cm ²)	Enterobactérias (UFC/ cm ²)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	Biofilme
CF0	4,7×10 ²	1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
CF1	<1,0×10 ⁰	1,3×10 ¹	Ausente	Ausente	Negativo
CF2	2,2×10 ²	4,5×10 ¹	Ausente	Ausente	Negativo
TF0	6,0×10 ²	1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF1	3,7×10 ²	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo
TF2	<1,0×10 ⁰	<1,0×10 ⁰	Ausente	Ausente	Negativo

CF 0: *Chuter* não higienizado; CF 01: *Chuter* após higienização; CF 02: *Chuter* antes da produção, após segunda higienização; TF 0: Tubulação não higienizada; TF 1: Tubulação após higienização, TF 02: Tubulação antes da produção, após segunda higienização.

Fonte: Autor (2022)

Observando os resultados obtidos do tratamento com a utilização do detergente enzimático mais o sistema CIP é possível notar uma menor incidência da presença de biofilmes na linha, além de maior incidência de valores abaixo 1,0×10⁰ UFC/mL após a última higienização. Durante este período de coleta de amostras não houve presença de *Salmonella spp* e nem *Listeria monocytogenes*, tanto antes da higienização quanto após.

Na Tabela 10 os resultados das análises de turbidez da água nos três pontos de coleta (linha não higienizada; linha após higienização; e linha antes da produção, após segunda higienização), durante nove semanas estão expressos em NTU.

Tabela 10 - Avaliação da turbidez expressos em (NTU), nos três pontos de coleta da empresa durante nove semanas

Pontos de coleta	
Semana	Média \pm desvio padrão ($\mu \pm \sigma$)
1	2,66 \pm 0,10
2	2,38 \pm 0,14
3	2,75 \pm 0,22
4	2,31 \pm 0,13
5	1,27 \pm 0,11
6	1,27 \pm 0,11
7	1,25 \pm 0,08
8	0,75 \pm 0,06
9	0,79 \pm 0,07

Fonte: Autor (2022)

Foi observado que havia uma turbidez característica da água de lavagem coletada nos pontos de amostragem das análises microbiológicas das tubulações, porém o mesmo não foi observado no Chuter. A turbidez é retirada da linha inteiramente após qualquer processo de higienização tanto com uso do detergente alcalino clorado quanto ao processo associado com detergente enzimático.

5.1 Tratamento estatístico

Para o teste de normalidade rejeita-se as variáveis Mesófilos aeróbios, contagem de Enterobactérias e e turbidez, e com isso foi necessário realizar testes não paramétricos, como o de Kruskall-Wallis. Para pH e cloro não rejeita-se a hipótese de normalidade, então utilizou-se o Teste de Anova com mais de um fator. Pode-se observar na Tabela 11 os valores.

Tabela 11 - Análise estatística dos Tratamentos

Parâmetros	Tratamento		
	Detergente Clorado	Detergente Enzimático	CIP + Detergente Enzimático
	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$
Mesófilos aeróbios	493 \pm 426,7	902,5 \pm 20,86	286,56 \pm 329,29
Enterobactérias	19,5 \pm 68,12	13,88 \pm 0,65	10,89 \pm 22,16
Turbidez	0,43 \pm 0,99	0,33 \pm 0,14	0,15 \pm 0,37
pH	7,11 \pm 0,09	7,13 \pm 0,20	7,13 \pm 0,12
Cloro	1,22 \pm 0,15	1,11 \pm 0	1,19 \pm 0,18
<i>Listeria</i>	0,22 \pm 0,43	0 \pm 0	0 \pm 0
<i>Salmonella</i>	0,06 \pm 0,24	0,06 \pm 0,24	0 \pm 0
Biofilme	0,56 \pm 0,51* b	0,44 \pm 0,51*ab	0,11 \pm 0,32*a

**Diferença Significativa pelo Teste Tukey (p-valor < 0,05). *Diferença significativa pelo Teste Kruskal - Wallis (p-valor < 0,05). Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si a um nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal – Wallis.

Fonte: Autor (2022)

Ao observar a Tabela 11, podemos notar que estatisticamente houve diferença significativa apenas para o fator biofilme, com os demais fatores não possuindo diferença significativa entre os três tratamentos realizados. Nota-se que o tratamento com detergente alcalino clorado não possui diferença significativa do tratamento com detergente enzimático, porém é diferente do tratamento com detergente enzimático e CIP; e o tratamento com detergente enzimático não possui diferença significativa do tratamento com o mesmo detergente mais o CIP, mas é diferente do tratamento inicial. Pode-se observar que dentre os três tratamentos, o CIP mais detergente enzimático possui uma maior eficiência na eliminação de biofilmes presentes linha.

De acordo com o estudo de Fabiano *et al.* (2020), o detergente alcalino possuiu uma maior eficácia na remoção de biofilmes em superfícies de aço inoxidável em comparação ao detergente enzimático, enquanto Luciano *et al.* (2016), que pesquisou sobre o uso de diferentes detergentes para remoção de biofilmes em endoscópios, chegou a conclusão que ambos os detergentes são ineficazes à remoção de biofilme e redução microbiana. Ambas as pesquisas utilizaram apenas um dos detergentes em cada higienização, gerando a hipótese de que sua utilização singular gera uma baixa eficiência na remoção de biofilmes, porém mesclando os detergentes a eficiência aumenta como mostrado no presente trabalho, e ainda é possível potencializar ainda mais esta eficiência com a adição de mais um método, que é o sistema CIP. De acordo com Luciano *et al.* (2016), em seu estudo não houve a identificação das cepas presentes no biofilme, apenas o teste de presença ou

ausência de biofilmes natural da linha produtiva por meio de um revelador de biofilmes realizado no abatedouro, mas os resultados referentes a redução da carga microbiana desta pesquisa foram semelhantes ao estudo em questão.

Uma hipótese para esta eficiência da remoção de biofilmes é que quando se utiliza primeiro o detergente alcalino clorado o mesmo atua eliminando a capa protetora do biofilme, e em seguida o detergente enzimático age no biofilme com maior efetividade por não haver proteção no biofilme (CHEN *et al.*, 2018). Além disso, o fato do detergente alcalino utilizado nesta pesquisa possuir uma porcentagem de cloro em sua composição, conseqüentemente melhora a sua capacidade desinfetante durante o emprego do mesmo. Zhu *et al.* (2021) pesquisou a eficiência da remoção de biofilmes em linhas de água, utilizando desinfetante com cloro em sua formulação juntamente com detergente enzimático, e chegou a conclusão que a combinação dos produtos obteve um resultado satisfatório. Isto de maneira semelhante corrobora com os resultados obtidos na presente pesquisa, onde se utilizou um detergente com cloro em sua composição e combinou com o uso de detergente enzimático, obtendo um resultado satisfatório na remoção de biofilmes na linha.

Tabela 12 - Análise estatística detalhada

Parâmetros	Dia			Linha	
	0	1	2	Chuter	Tubulação
	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$
Mesófilos aeróbios	688,39 ± 458,69 *b	203,89 ± 332,6 1*a	789,78 ± 1821,84 *ab	338,56 ± 379,28	782,81 ± 1506,49
Enterobactérias	22,94 ± 68,30	4,78 ± 11,67	16,56 ± 25,02	12,52 ± 22,33	17,01 ± 56,19
Turbidez	0,91 ± 1,01*b	0 ± 0*a	0 ± 0 * a	0,039 ± 0,17 *a	0,57 ± 0,94 *b
pH	7,13 ± 0,11	7,06 ± 0,10	7,19 ± 0,11	-	-
Cloro	1,19 ± 0,21	1,26 ± 0,14	1,08 ± 0,14	-	-
<i>Listeria</i>	0 ± 0 *b	0,11 ± 0,32*a	0,11 ± 0,32*a	0,07 ± 0,27	0,07 ± 0,27
<i>Salmonella</i>	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	0,07 ± 0,27	0 ± 0
Biofilme	0,33 ± 0,49	0,5 ± 0,51	0,28 ± 0,46	0,04 ± 0,19 *a	0,70 ± 0,47 *b

**Diferença Significativa pelo Teste Tukey (p-valor < 0,05). *Diferença significativa pelo Teste Kruskal - Wallis (p-valor < 0,05). Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si a um nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal - Wallis.

Fonte: Autor (2022)

Utiliza-se como um dos indicadores das condições da qualidade higiênica no abatedouro a contagem dos Mesófilos aeróbios (RAIMUNDO *et al.*, 2021). Na Tabela 12 é possível observar de maneira detalhada em relação ao tratamento estatístico que para Mesófilos aeróbios a carga microbiana inicial na linha não difere, estatisticamente, da carga microbiana da última higienização, realizada dois dias após a primeira, desta forma gerando a hipótese que ao longo da tubulação pode haver pontos com possibilidade de menor contato com os produtos ou algum desgaste na tubulação que possa ocasionar a retenção de matéria orgânica, facilitando a multiplicação microbiana. Os resultados encontrados à eficiência de redução dos Mesófilos aeróbios são similares aos resultados de Fabiano *et al.* (2020).

Observa-se na tabela acima que os parâmetros microbiológicos e os parâmetros "tais" apresentaram alto coeficientes de variação (CV), de acordo com a faixa de classificação clássica proposta por Gomes (1990). Tal resultado indicaria que a precisão do experimento estaria comprometida (CV maiores que 30%) e inviabilizaria o experimento. Porém, esta observação é válida quando os dados referentes aos parâmetros de estudo possuem aderência à curva normal de probabilidade e, portanto, ditos, dados paramétricos. Os dados em questão, de acordo com o teste de normalidade aplicado, não apresentam distribuição normal ($p\text{-valor} < 0.5$) e por esse motivo houve a necessidade de serem avaliados mediante estatísticas não paramétricas, não cabendo portanto, a avaliação por meio de coeficientes de variação, ou desvio padrão. Desse modo, foi aplicado, o teste de Kruskal-Wallis para comparação de grupos provenientes de dados não paramétricos.

Quando há uma variabilidade grande dos resultados a precisão dos experimentos, conforme sugerida por Amaral *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2004 no que se refere a dados agrônômicos, Judice *et al.*, 1999 em suínocultura e Mohallem *et al.* 2007 em dados avícolas podem não ter o CV como requisito de avaliação do grau de precisão dos experimentos e este deve ser determinado individualmente para cada trabalho. Assim, fica evidente a necessidade de se estudar a distribuição dos valores de CV em pesquisas com testes de higienização, pois a maioria dos pesquisadores tem comparado os seus resultados com aqueles sugeridos por Gomes (1990).

O teste estatístico apontou que houve diferença significativa entre os Mesófilos aeróbicos e a turbidez em relação ao fator Dias, evidenciando a redução da matéria orgânica presente na água de lavagem quando comparada antes da higienização e após os tratamentos.

Para a *Listeria monocytogenes* houve diferença significativa quando comparado a carga microbiana inicial e os demais resultados após cada higienização, destacando que todos os tratamentos foram efetivos em eliminar este microrganismo. O resultado alcançado está de acordo com os resultados obtidos por Pañora (2021), onde utilizou detergente alcalino clorado e enzimático em diferentes superfícies contra biofilmes formados por *Listeria monocytogenes*.

Ademais, no Apêndice A deste documento está a sugestão para um novo PPHO a ser empregado na higienização da linha de fígado.

6 CONCLUSÕES

A associação dos detegentes clorado e enzimático realizou a remoção dos biofilmes no período e condições analisadas, mas nenhuma diferença foi observada dentre os demais microrganismos analisados, sendo assim os tratamentos aplicados ainda não promoveram a segurança alimentar necessária ao processo. Possivelmente o resultado satisfatório deve-se ao fato da ação do cloro presente no detergente alcalino, o qual age danificando a capa protetora do biofilme e facilitando a ação posterior do detergente enzimático, seguida da força de cisalhamento gerado pelo sistema CIP.

As análises dos parâmetros de água de higienização apresentaram diferença significativa indicando que o processo físico promove a remoção das sujidades de forma eficaz, evidenciando que é necessária mais ação química sobre os microrganismos analisados.

A proposta do PPHO elaborada, presente no Apêndice A, conforme os resultados garantirão a remoção dos biofilmes, sendo ainda necessário mais estudos para se ter o controle do processo. Esse trabalho pode servir de base para outros estudos em que outras variáveis de processos possam ser analisadas como tempo de contato e aplicação de um sanificante na linha após a higienização.

REFERÊNCIAS

ABERG, V.; *et al.* Carboxylic acid isosteres improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in *E. coli*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 18, n.12, p. 3536-3540, 2008.

ABPA. Estatística do setor. **Relatório Anual 2021**. p. 1-6. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf. 2021. Acesso em: 03 maio 2022.

AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica–Segurança**. p.1-1. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/Abertura.html. 2021. Acesso em: 3 junho de 2022.

AGROCONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. v.1, n.1.2021.

AMARAL, A.M.; MUNIZ, J.A.; SOUZA, M. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão na experimentação com citros. **Pesq. Agropecu. Bras.**, v.32, p.1221-1225, 1997.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Ed. Varela. 412p. 2008.

AZEVEDO, F. P. **Melhoria do procedimento do processo CIP de uma linha de enchimento e estudo da qualidade microbiológica de uma embalagem para uso alimentar**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar) Universidade do Minho, 2016.

BAPTISTA, P. Higienização de equipamentos e instalações na indústria Agro - alimentar. **Forvisão**. Poeiras, Marketing, comunicação e designer LTDA. Portugal–2003.

BELOIN, C.; GHIGO, J. M. Find in gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends in Microbiology**. v. 13, n. 1, p. 16 – 19, 2005.

BERNARDO, F. Perigos sanitários nos alimentos. **Segurança e qualidade alimentar**. Noções Gerais, Regulamentação e Certificação. n.01. 2006.

BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher. 2001.

BRASIL. **Boletim epidemiológico**. Secretariade Vigilância em Saúde– Ministério da Saúde. v. 51, 2020.

BRASIL. **Doenças transmitidas por alimentos**. Ministério da Saúde, p.1-7,2021.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 40, de 5 de junho de 2008 – Regulamento técnico para produtos de limpeza e afins harmonizado no âmbito do**

mercosul através da resolução GMC nº47/07. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2008.

BRASIL. **Portaria nº 146, de 18 de setembro de 2020.** Verificação oficial de elementos de controle. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2020.

BRASIL. **Portaria nº 1.469 de 29, de dezembro de 2000** – Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Fundação Nacional de Saúde. 2001.

BRASIL. **Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998** - Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA), 1998.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 331, de 23 de dezembro de 2019** – Padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2019.

BUTURI, E. P.; HORT, A. A.; BONA, E.; TANAMATI, A. A. C.; GONÇALVES, O. H. Avaliação da eficiência de detergente enzimático na remoção de lipídios presentes em embalagens de produtos cárneos. **REBRAPA**, v.5, n. 3, p. 8-15. 2014.

CARVALHO, A. N. P.; RIBEIRO, R. A. C.; ZAGO, S.; BONNAS, D. S. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**. v. 16, n. 30, p. 319. 2019.

CARVALHO, M. E. A.; SOUZA, N. C. S.; GUEVARA, N. N.; RAMOS, Y. C.; SOUZA, L. B.; OLIVEIRA, R. A.; FRANCO, M. R. **O Despertar profissional**. APG/ESALQ. p. 141, 2015.

CASTRO, H. F. **Processos químicos industriais II**. p. 1-20. Universidade de São Paulo. 2009.

CHEN, Z.; WANG, Z.; REN, J.; QU, X. Enzyme mimicry for combating bacteria and biofilms. **Acc. Chemical research**. v. 51, p. 789-799. 2018.

CLOETE, E.; et al. Biofilms in the food and beverage industries. **Biofilms in the Food and Beverage Industries**. p. 3-41, 2009.

COSTA, N.H.A.D.; SERAPHIN, J.C.; ZIMMERMANN, F.J.P. Novo método de classificação de coeficientes de variação para a cultura do arroz de terras altas. **Pesq. Agropecu. Bras.**, v.37, p. 243-249, 2002.

DERREADO, A.C.C. **Melhoria contínua no chão de fábrica** – FSSC22000. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar). Universidade Nova de Lisboa. 79f. 2017.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n.9, p. 881-890, 2002.

EMBRAPA. **Embrapa suínos e aves**. v.2021, p.1-3,2021.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a produção, abate, processamento e comercialização de frangos de corte coloniais**. Embrapa Suínos e Aves. 2007.

EPSTEIN, A. K.; e tal. Bacterial biofilm shows persistentes resistance to liquid wetting and gas penetration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.v. 108, n. 3, p.995-1000, 2011.

FABIANO, G. G.; AGUERA, R. G; PRADO, D. B. Efficiency of detergents in the removal of escherichia coli biofilms on stainless steel surfaces. **Revista Uningá**. v. 57, n. 4, p. 46-56. 2020.

FAO/WHO. **Codex alimentarius commission**. Procedural Manual. v.21, 2015.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, n. 9, p. 623-633, 2010.

GARCÍA, C. F.; et al. Topographical alterations render bacterial biofilms susceptible to Chemical and mechanical stress. **Biomaterials Science**. v.7, n.1, p.220-232. 2019.

GALIÉ, S.; et al. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**. v.9, p.1-18, 2018.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**. v.18, n. 9, p.1049-1056. 2008.

GEDAS, A.; OLSZEWSKA, M. A. Chapter 1 - Biofilm formation and resistance **Recent Trends in Biofilm Science and Technology**. 2020.

GOMES, D.; CARRARO, C. B.; MEZA, S. K. L.; COSTA, T. A.; COLACITE, J. Resistência antimicrobiana de enterobactérias isoladas de utensílios e equipamentos de uma unidade de alimentação e nutrição do município de Toledo – PR. **Revista de Biologia e Saúde**. v. 8, n. 2,25-34. 2016.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 467p.

GOSTA, B. **Dairy processing handbook**. TetraPak Processing Systems AB. 1995.

GRANDILLO, A.; TATIANCHENKO, S. Optimization of clean-in-place sanitation systems for McCain supplychain. **McGill University**. 64f. 2020.

HAN, Q.; et al. Removal of the oborne pathogen biofilms by acidified electrolyzed water. **Frontiers in Microbiology**.v.8, p.1-12.2017.

HIRAI, C. K. Atualizações sobre enterobactérias. **Revista Analytica**. Ano 2020, Ed. 116. Disponível em: <https://www.yumpu.com/pt/document/read/66231858/revista-analytica-116>. Acesso em 20 fevereiro 2022.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 20 março 2022.

JUDICE, M.G.; MUNIZ, J.A.; CARVALHEIRO, R. Avaliação do coeficiente de variação na experimentação com suínos. **Cienc. Agrotec.**, v.23, p.170-173, 1999.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n. 15, 2010.

KLOBITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

LIMA, C. D.; et al. Proposta de integração do Sistema de Gestão de Qualidade (SG1) e sistema de Gestão de Segurança Alimentar (SGSA) em empresas de embalagens metálicas para a implementação da norma ISSO 22000:2018. **Research, Society and Development**. v.10, n.1, 2021.

LIMA, L.L.; NUNES, G.H.S.; BEZERRA NETO, F. Coefficients of variation of some melon yield components and fruit quality traits: a proposal for classification. **Hortic. Bras.**, v.22, p.14-17, 2004.

LUCIANO, C. C; OLSON, N; DEGAGNE, P; FRANÇA, R; TIPPLE, A. F. V; ALFA, M. A new buildup biofilm model that mimics accumulation of material in flexible endoscope channels. **Journal of Microbiological Methods**. 127, 224-229. 2016.

LUNDÉN, J. M.; MIETTIENEN, M. K.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Persistent listeria monocytogenes strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**.v. 63, n. 9, 2000.

MAHAPATRA, A.; et al. Study of biofilm in bacteria from water pipelines. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 9, n.3. 2015.

MAPA/DIPOA. **Circular Nº 369, de 2003** - Instruções para elaboração e implantação dos sistemas PPHO e APPCC nos estabelecimentos habilitados à exportação de carnes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)/Divisão de Controle do Comércio Internacional (DCI)/Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). p. 1-9, 2003.

MAPA. **Portaria Nº 368, de 4 de Setembro de 1997**. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos e laboradores/industrializadores de alimentos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA). 1997.

MAPA. **Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017** – Inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/>

/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698. 2017. Acesso em: 18 março 2022

MARIN, C.; LAINEZ, M. *Salmonella* detection in feces during boiler rearing and after live transport to the slaughterhouse. **Poultry Science**. v. 88, n. 9, p.1999-2005. 2009.

MELO, E. S.; et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **Pubvet**. v. 12, n.10, p. 1-9. 2018.

MEMISI, N.; et al. CIP cleaning processes in the dairy industry. **Procedia Food Science**. v. 5, p. 184– 186. 2015.

MENEGARO, A.; et al. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 15, n.2, p. 171-174,2015.

Nelson, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. Cap. 8 Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, N. C. T.; CAMPOS, R. M. L. Utilização das ferramentas de gestão de qualidade em frigorífico de abate de bovinos para exportação. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 12, n.2, p. 4016-4029, 2015.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 742-756. 2009.

OLIVEIRA, W. F.; CARDOSO, W. M.; MARQUES, L. C. L.; SALLES, R. P. R.; FILHO, J. L. C. A.; TEIXEIRA, R. S. C.; ROMÃO, J. M.; LIMA, A. C. P. Utilização de diferentes meios de cultura para isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do estado do Ceará, Brazil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, 211-214. 2004

PALMORIO, L.; GAIO, F. N.; RIBEIRO, D. H. B. Avaliação da eficiência de diferentes agentes de limpeza utilizados na indústria de alimentos. **Brazilian Journal of Development**. v.7, n. 12, p. 319-326. 2004.

PAÑORA, C. A. D. **Efectividad de dos tratamientos de limpieza y determinación de la regeneración de biofilms de listeria monocytogenes en superficies limpias y con suciedad**. Dissertação (Mestrado em Qualidade de Alimentos de Origem Animal) Universidade Autonoma de Barcelona. 2021.

PEROTTO, D. L.; VARGAS, B. K.; JACOCIUNAS, L. V.; WEHMEYER, C. O. T. **Microrganismos causadores de DTAs: um olhar pautado na legislação**. 160 p. Porto Alegre. 2021.

PIAIA, O. **Utilização de sistema a vácuo na otimização do transporte de resíduos cárneos industriais**. Tese (Doutorado em Processos Industriais) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Catarina. 2009.

PINHEIRO, T. R.; COITINHO, G. N.; STOPIGLIA, C. D. O. Perfil de sensibilidade de enterobactérias isoladas de carne bovina comercializadas na cidade de Uruguaiana. **Anais do 9º SIEPE**. Santana do Livramento. 2017.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista de Nutrição**. v. 17, n. 3, p. 319-326. 2004.

PRATI, P.; HENRIQUE, C. M.; PARISI, M. M. C. Importância da higienização na indústria de alimentos. **Pesquisa&Tecnologia**. v. 12, n.1. 2015.

PRIYA, A.; SWETHA, T. K.; PANDIAN, S. K. Antimicrobial peptides a sapotente therapeutic regimento quinche biofilm mediated antimicrobial resistance. **ElsevierInc**. 2021.

RAIMUNDO, D. C. **Listeria monocytogenes em queijo minas meia-cura: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas**. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de SãoPaulo. 2013.

RAMOS, G. D. M.; et al. Qualidade da água utilizada em indústrias de alimentos localizadas no estado do Rio de Janeiro. **Revista Univ. Rural**.v. 27, n.1, p. 33-39. 2007.

SAHOO, D.; et al. Study of biofilme in bacteria from water pipelines. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v.9, n. 3, p. 9-11. 2015.

SANIMATIC. **Food & Beverage: Two-Tank CIP System**. Disponível em: <https://sanimatic.com/food-beverage/clean-in-place/two-tank/>. Acesso em 18 abril 2022.

SANTOS, D. A.; etal. A importância das condições higiênico-sanitárias em abatedouros: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**. v.10, n.1. 2021.

SEABRA, C. A. C. **Validação e Otimização do Sistema Automático de Limpeza de Equipamentos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Produção e Transformação Agro-Industrial) - Universidade Nova de Lisboa. 2016.

SEVERINO, I. T. T. **Validação da desinfecção e otimização de um sistema Clean-In Place numa indústria alimentar**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Alimentar) – Instituto Politécnico de Santarém, 2020.

SHARP, N. P. B. CIP system design and philosophy. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v.38, n. 1. 1985.

SILVA, I. A. A. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias de abatedouros de aves**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 42f. 2019.

SILVA, T. M.; MILBRADT, E. L.; ZAMAE, J. C.; ANDREATTIFILHO, R. L.; OKAMOTO, A. S. Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária – impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary Science**. v. 21, n. 2, 09-20. 2016.

SILVA, N.; et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Ed. Varela. 4ed. 2010.

SILVA, G.; DUTRA, P. R. S.; CADIMA, I. M. **Higiene na Indústria de Alimentos**. Escola Técnica Aberta do Brasil (Técnico em Alimentos). Universidade Federal Rural do Pernambuco. 2010b.

SIMAS, J. V.; AMARAL, G. V.; SANTOS, D. A. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias em queijarias: uma revisão. **Research, Society and Development**. v.10, n.2, 2021.

SMET, S.; VOSSSEN, E. Meat: The balance between nutrition and health. A review. **Meat Science**. v. 120, p. 145-156, 2016.

SOUZA, E. F. **Aplicação de proteases e amilases produzidas por Bacillus sp. SMIA-2 na remoção de manchas de tecido**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 2012.

TETRAPAK INTERNATIONAL S.A. **Cleaning in Place Handbook**. 2015.

TSIAPRAZI-STAMOU, A.; MONFORT, I. Y.; ROMANI, A. N.; BAKAILS, S.; GKATZIONIS, K. The synergistic effect of enzymatic detergents on biofilm cleaning from different surfaces. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**. v. 35, n.8, 2019.

União Europeia, Directiva 2001/1471/CE, de 21 de junho de 2001. **Regras para os controlos regulares aplicados à higiene geral dos estabelecimentos**. Comissão das Comunidades Europeias, Europa, 2001.

ZHU, C.; HONG, F.; YU, X. Anti-biofilm effect of low concentration chlorine containing disinfectant assisted by multi-enzyme detergent in dental unit waterlines. **New Microbiologica**. v. 44, n. 2, p. 117-124. 2021.

**APÊNDICE A -
Procedimento Operacional Padrão (POP)**

Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA OPERAÇÃO DE HIGIENIZAÇÃO NO FRIGORÍFICO DE AVES	POP HN 01			
	Versão: 01		Próxima revisão: 09/02/23	
Elaborado por: Adaelson Firmino da S. Junior	Data de criação: 09/08/22			
Revisado por:	Data de revisão:			
Aprovado por:	Data de aprovação:			
Local de guardo do documento:				
Responsável pelo POP e pela atualização: Adaelson Firmino da S. Junior				
Objetivo: Higienização Pré-operacional da linha de transporte de fígado				
ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO E INSTRUÇÕES DE TRABALHO: Página 1/1				
Objetivo: Realizar a higienização garantindo que a linha esteja apta para segurança dos alimentos.				
Execução da tarefa: Colaboradores da equipe de higienização pré-operacional.				
Material Necessário: <ul style="list-style-type: none"> • Água; • Gelo • Detergente alcalino clorado; • Detergente enzimático 				
Procedimento: <ol style="list-style-type: none"> 1. Pré-lavagem com água em temperatura de 48°C à 54°C, para remoção das sujidades presentes no Chuter e na tubulação, além de degradar proteínas que possam estar aderidas na parede da linha; 2. Adição de gelo juntamente com água, para aumentar a superfície de contato e auxiliar na remoção de possíveis resíduos ainda presentes na linha; 3. Adição de detergente alcalino clorado na concentração de 5% recirculando por 15 minutos; 4. Descartar o detergente utilizado e enxaguar com água para retirar os resíduos e o detergente presente na linha; 5. Adição de detergente enzimático na concentração de 10% recirculando por 30 minutos; 6. Descartar o detergente utilizado e enxaguar com água para retirar os resíduos e o detergente presente na linha. 				
Frequência: <ul style="list-style-type: none"> • Semanalmente 				
Ação corretiva: <ul style="list-style-type: none"> - Realizar a atividade novamente até que as superfícies estejam limpas; - Se houve necessidade, procurar capacitação. 				
Procedimento Operacional Padrão (POP)				
Código do documento POP HN 01	Versão 01	Página 1/1	Data de criação 09/08/2022	Local de guardo do documento